

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DETERMINACIÓN DE BIFENILOS
POLICLORADOS EN ALIMENTOS MEDIANTE
CROMATOGRAFIA DE GASES

Autor/a: Juan Carlos Martínez Castro

Tutor/a: María Isabel Gómez del Rio

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS

Septiembre 2018

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DETERMINACIÓN DE BIFENILOS
POLICLORADOS EN ALIMENTOS MEDIANTE
CROMATOGRAFIA DE GASES

Autor/a: Juan Carlos Martínez Castro

Tutor/a: María Isabel Gómez del Rio

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS

Septiembre 2018

Índice

Índice de Tablas	6
Índice de Figuras	7
Siglas y abreviaturas.....	8
1. Introducción	10
2. Objetivos.....	12
3. Bifenilos Policlorados.....	13
3.1 Efectos tóxicos de los PCBs.....	15
3.2. Regulación sobre la exposición a PCBs	16
3.3 Presencia de PCBs en alimentos	17
3.4 Presencia de PCBs en humanos.....	18
4. Técnicas analíticas en la determinación de PCBs.....	20
4.1 Técnicas no cromatográficas o de detección	20
4.1.1 Técnica colorimétrica	20
4.1.2 Técnica electroquímica	21
4.1.3 Técnica ELISA.....	22
4.1.4 Técnica CALUX	22
4.2 Métodos cromatográficos	23
4.2.1 Cromatografía líquida de alta resolución	24
4.2.2 Cromatografía de gases con detección de captura electrónica (GC/ECD) ..	25
4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)	27
4.4 Problemas de calidad durante la determinación de PCBs (Konieczka et al., 2010).....	27
4.4.1 Selectividad	28
4.4.2 Calibración.....	30
5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en la determinación de PCBs en alimentos	31
5.1 Resultados de la consulta bibliográfica.....	32
5.2 Método propuesto para el análisis de PCBs por GC/MS	37
5.2.1 Preparación de la muestra y limpieza	38
5.2.1.1 Extracción	41
5.2.1.2 Disolventes empleados en la extracción.....	43
5.2.1.3 Limpieza.....	43
5.2.2 Condiciones instrumentales	44
5.2.2.1 Cromatógrafo de gases (HRGC)	45

5.2.2.2 Espectrómetro de masas (HRMS)	46
5.2.3 Control de calidad	46
6. Conclusiones	49
7. Referencias bibliográficas	51

Índice de Tablas

Tabla 1. Números IUPAC y posiciones de los átomos de Cloro de los PCBs.....	14
Tabla 2. Regulaciones relacionadas con PCBs.....	16
Tabla 3. Comparación del método electroquímico frente a otros métodos.....	22
Tabla 4. Estudios de determinación de PCBs mediante GC con ECD.....	25
Tabla 5. Estudios de determinación de PCBs mediante GC acoplado a MS.....	32
Tabla 6. Ejemplos de métodos de extracción según el tipo de alimento.....	42
Tabla 7. Programación de la temperatura del horno del GC.....	45

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de los PCBs.....	13
Figura 2. Separación cromatográfica entre 2 componentes	29
Figura 3. Equipo de GC/MS Agilent 7890A	38
Figura 4. Equipo GC/MS AutoSpec Premier	38
Figura 5. Flujo de trabajo analítico para la determinación de PCBs, PBDEs y PAHs ..	39
Figura 6. Diagrama de flujo de preparación de la muestra para la determinación de PCBs en pescado	40
Figura 7. Modelo de un equipo Soxtec 1043HT	41
Figura 8. Estructura del silicato de magnesio	43
Figura 9. Equipo de GC Agilent 6890	44

Siglas y abreviaturas

APPI	Fotoionización a presión atmosférica
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades
ASE	Extracción acelerada con solventes
BDEs	Bromo difenil éteres
CALUX	Activación química del gen de la luciferasa
CBs	Cloro bifenilos
CDDs	Cloro dibenzo-p-dioxinas
CDFs	Cloro dibenzofuranos
ECD	Detección de captura electrónica
ECFR	Código de regulaciones federales electrónica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPA	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
FMASE	Extracción con solventes empleando un aparato Soxhlet con una fuente de microondas
GC-ECD	Cromatografía de gases acoplada a un detector de captura electrónica
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HRGC/HRMS	Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de alta resolución
IARC	Agencia internacional para la investigación del cáncer
LCL	Nivel más bajo de calibración
LC-FLD	Cromatografía líquida acoplada a detección de fluorescencia
LC-UV	Cromatografía líquida acoplada a detección ultravioleta
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPGC	Cromatografía de gases de baja presión
MAE	Extracción acelerada con microondas
MCL	Concentración máxima de contaminante
MS	Espectrómetro de masas o espectrometría de masas
NCI	Ionización química negativa
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PBDEs	Polibromodifenil éteres

PCBs	Bifenilos policlorados
PCDDs	Dibenzo-p-dioxinas policloradas
PCDFs	Dibenzofuranos policlorados
PEL	Límite de exposición permisible
PLE	Extracción en fase líquida
POP	Contaminante orgánico persistente
ppm	Partes por millón
QA/QC	Aseguramiento de la calidad / Control de la calidad
QuEChERS	Rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro
TEF	Factor equivalente toxico
TWA	Media ponderada en el tiempo
SIM	Monitorización selectiva de iones
SFE	Extracción con fluido súper crítico
SPE	Extracción en fase sólida
USP	Farmacopea americana
WHO	Organización mundial de la salud

1. Introducción

No hay duda que los avances en materia de tecnología e industrialización en los últimos años han sido realmente notables. Lo que hace 20 años se podía ver en un filme como ciencia ficción hoy día es una realidad. Sin embargo lamentablemente estos avances van de la mano con el deterioro del medio ambiente y con la generación de materiales, cuya seguridad no ha sido completamente caracterizada y en la actualidad vivimos las consecuencias de la persistencia de estos materiales que de una u otra forma llegan a la población y se traducen en múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer.

Entre los distintos contaminantes que podemos encontrar en nuestro medio ambiente se encuentran los bifenilos policlorados (PCBs), que son compuestos de origen aromático con algunos átomos de cloro en su estructura, lo cual les confiere unas propiedades fisicoquímicas excepcionales, por lo que su uso en la década de los 70s fue bastante común, ya sea como aislantes en el campo eléctrico, en la industria de los plastificantes o como tintas para impresión. La estabilidad que le brinda su estructura ha permitido que se conviertan en un verdadero problema en términos de los efectos nocivos a los cuales se encuentra expuesta toda la población y que lamentablemente la exposición ante estos contaminantes estará presente durante muchos años más.

Los efectos que tienen los PCBs en la salud son tan variados como el número de congéneres que podemos encontrar dispersos en el mar, ríos, suelos o el aire. Existen 209 congéneres, los cuales son comúnmente encontrados en peces y mariscos, a través de los cuales pueden llegar a los humanos, originando cambios en el sistema endocrino y en la fisiología celular. El hecho de que los PCBs puedan afectar el sistema endocrino se traduce en los variados efectos nocivos que presentan estas sustancias, por ejemplo se han informado efectos nocivos para el sistema nervioso y locomotor, reproductor y patologías más complejas, como por ejemplo: cáncer.

Dada las dimensiones que ha alcanzado la toxicidad de los PCBs y al hecho que durante la década de los 70s fueron producidas miles de toneladas de estas sustancias, las autoridades de gobierno y regulatorias principalmente de los países desarrollados han establecido límites para la presencia de estas sustancias en alimentos y otros materiales, como por ejemplo: envolturas para alimentos. Para la determinación de estos límites existen guías, en donde se establecen parámetros de

operación y criterios de adecuación para la determinación de los PCBs, sin embargo estas condiciones pueden variar en función de los instrumentos empleados, de la matriz que esté estudiando y de la preparación de la muestra, entre otros.

Al revisar las distintas bases de datos en la web, así como revistas científicas de toxicología ambiental y cromatografía se pone de manifiesto la gran cantidad de estudios que existen relacionados sobre la determinación de PCBs en distintas matrices, la mayoría relacionados con la exposición a humanos y animales. Este creciente interés por los PCBs refleja la preocupación de organizaciones de tipo académico y gubernamental por la problemática en materia de contaminación, exposición y toxicología tanto de los PCBs, como de otras sustancias, como por ejemplo, las utilizadas en los procesos de control de plagas.

En materia de contaminación se hace necesario reforzar los controles sobre alimentos y fuentes de exposición, por lo que se deben contar con métodos de cuantificación con la precisión, exactitud y límites de cuantificación adecuados, que se ajusten a los valores establecidos por los organismos regulatorios. Sin embargo, el mayor trabajo está en crear conciencia sobre el problema de la contaminación y con eso evitar que nuevos materiales incluso más tóxicos que los PCBs terminen en el medio ambiente.

2. Objetivos

Actualmente a través de los distintos procesos industriales se dispersan al medio ambiente una gran cantidad de contaminantes, muchos de los cuales intervienen en la cadena alimenticia de especies animales o formando parte de la contaminación de las fuentes hídricas. Sin duda los intereses económicos de estas grandes organizaciones industriales y la falta de responsabilidad respecto al bien común se convierten en un verdadero obstáculo frente a la problemática de la contaminación.

De parte de los entes regulatorios se puede ver un mayor grado de conciencia frente a la disposición y al tipo de desechos que se originan de la actividad industrial, soportados en la aplicación de una legislación que establece límites para los contaminantes, así como los requerimientos de metodologías de cuantificación robustas. Sin embargo, en la mayoría de la población, el trabajo de divulgación de la situación actual y concienciación de la problemática es mucho lo que queda por hacer. Es por ello, por lo que los objetivos que se plantea este trabajo son:

- Describir la problemática toxicológica de los bifenilos policlorados para la humanidad.
- Mostrar ejemplos de la presencia de PCBs en medio ambiente, en alimentos y en muestras biológicas.
- Definir el método más adecuado para la determinación de PCBs en muestras de alimentos.
- Establecer unas condiciones estándar teóricas de trabajo para la determinación de PCBs en alimentos mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

3. Bifenilos Policlorados

De acuerdo a la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) los bifenilos policlorados (PCBs) son un grupo de compuestos orgánicos aromáticos que están constituidos por átomos de carbono, hidrogeno y cloro. Los PCBs están compuestos de una estructura bifenil en donde están enlazados 2 anillos de benceno y algunos de sus hidrógenos son reemplazados por átomos de cloro. La posición y el número de los átomos de cloro en el interior de la molécula determinan sus características físicas y químicas, por lo que se pueden encontrar desde un estado líquido o sólido, y de colores claros hasta negro. En la figura 1 se muestra la estructura química de los PCBs.

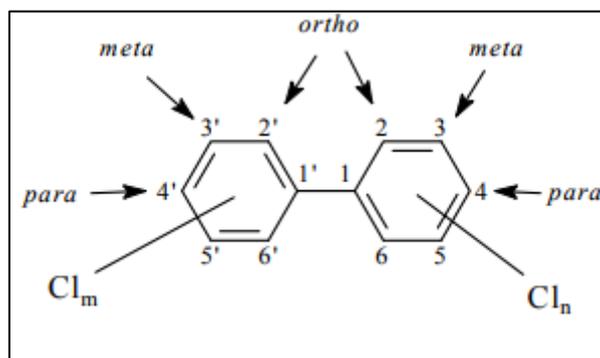


Fig. 1. Estructura química de los PCBs, tomado de IARC(2015)

La fórmula química de los PCBs es $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, donde n va de 1 a 10. En teoría existen 209 diferentes congéneres en la familia de los PCBs, sin embargo solo alrededor de 130 de ellos han sido identificados en productos de uso comercial (WHO, 2000). Los PCBs no se encuentran de forma natural en el medio ambiente sino que son producidos sintéticamente. Su producción data a partir del año 1929 hasta 1979, cuando fue prohibida su producción.

Dado que los PCBs poseen altos puntos de fusión (170-380°C), sumado a su gran estabilidad química los hace resistentes al fuego. Y a pesar de que muchos de ellos pueden formar vapores en contacto con el aire, no son explosivos. Los PCBs tienen una baja conductividad eléctrica, alta conductividad térmica y una alta resistencia a la degradación térmica. Estas propiedades permitieron que los PCBs tuviesen muchas aplicaciones industriales, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes:

- Componente de equipos eléctricos, hidráulicos y de transferencia de calor.
- Plastificantes en pinturas, en productos plásticos y de caucho.

- Pigmentos, tintas y papel de copia sin carbón.

En la Tabla 1 se muestran los 209 tipos de PCBs que existen, los cuales se diferencian en el número y la posición de los átomos de cloro.

Tabla 1. Números IUPAC y posiciones de los átomos de Cloro de los PCBs (Tomado de la EURO-WHO, 2000)

No.	Structure	No.	Structure	No.	Structure	No.	Structure
1	2	56	2,3,3',4'	111	2,3,3',5,5'	166	2,3,4,4',5,6
2	3	57	2,3,3',5	112	2,3,3',5,6	167**	2,3',4,4',5,5'
3	4	58	2,3,3',5'	113	2,3,3',5',6	168	2,3',4,4',5',6
4	2,2'	59	2,3,3',6	114**	2,3,4,4',5	169*	3,3',4,4',5,5'
5	2,3	60	2,3,4,4'	115	2,3,4,4',6	170***	2,2',3,3',4,4',5
6	2,3'	61	2,3,4,5	116	2,3,4,5,6	171	2,2',3,3',4,4',6
7	2,4	62	2,3,4,6	117	2,3,4',5,6	172	2,2',3,3',4,5,5'
8	2,4'	63	2,3,4',5	118**	2,3',4,4',5	173	2,2',3,3',4,5,6
9	2,5	64	2,3,4',6	119	2,3',4,4',6	174	2,2',3,3',4,5,6'
10	2,6	65	2,3,5,6	120	2,3',4,5,5'	175	2,2',3,3',4,5,6
11	3,3'	66	2,3',4,4'	121	2,3',4,5',6	176	2,2',3,3',4,6,6'
12	3,4	67	2,3',4,5	122	2',3,3',4,5	177	2,2',3,3',4',5,6
13	3,4'	68	2,3',4,5'	123**	2',3,4,4',5	178	2,2',3,3',5,5',6
14	3,5	69	2,3',4,6	124	2',3,4,5,5'	179	2,2',3,3',5,6,6'
15	4,4'	70	2,3',4',5	125	2',3,4,5,6'	180***	2,2',3,4,4',5,5'
16	2,2',3	71	2,3',4',6	126*	3,3',4,4',5	181	2,2',3,4,4',5,6
17	2,2',4	72	2,3',5,5'	127	3,3',4,5,5'	182	2,2',3,4,4',5,6'
18	2,2',5	73	2,3',5',6	128	2,2',3,3',4,4'	183	2,2',3,4,4',5,6
19	2,2',6	74	2,4,4',5	129	2,2',3,3',4,5	184	2,2',3,4,4',6,6'
20	2,3,3'	75	2,4,4',6	130	2,2',3,3',4,5'	185	2,2',3,4,5,5',6
21	2,3,4	76	2',3,4,5	131	2,2',3,3',4,6	186	2,2',3,4,5,6,6'
22	2,3,4'	77*	3,3',4,4'	132	2,2',3,3',4,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
23	2,3,5	78	3,3',4,5	133	2,2',3,3',5,5'	188	2,2',3,4',5,6,6'
24	2,3,6	79	3,3',4,5'	134	2,2',3,3',5,6	189**	2,3,3',4,4',5,5'
25	2,3',4	80	3,3',5,5'	135	2,2',3,3',5,6'	190	2,3,3',4,4',5,6
26	2,3',5	81	3,4,4',5	136	2,2',3,3',6,6'	191	2,3,3',4,4',5',6
27	2,3',6	82	2,2',3,3',4	137	2,2',3,4,4',5	192	2,3,3',4,5,5',6
28	2,4,4'	83	2,2',3,3',5	138	2,2',3,4,4',5'	193	2,3,3',4',5,5',6
29	2,4,5	84	2,2',3,3',6	139	2,2',3,4,4',6	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
30	2,4,6	85	2,2',3,4,4'	140	2,2',3,4,4',6'	195	2,2',3,3',4,4',5,6
31	2,4',5	86	2,2',3,4,5	141	2,2',3,4,5,5'	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
32	2,4',6	87	2,2',3,4,5'	142	2,2',3,4,5,6	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
33	2',3,4	88	2,2',3,4,6	143	2,2',3,4,5,6'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
34	2',3,5	89	2,2',3,4,6'	144	2,2',3,4,5',6	199	2,2',3,3',4,5,6,6'
35	3,3',4	90	2,2',3,4',5	145	2,2',3,4,6,6'	200	2,2',3,3',4,5',6,6'
36	3,3',5	91	2,2',3,4',6	146	2,2',3,4',5,5'	201	2,2',3,3',4',5,5',6
37	3,4,4'	92	2,2',3,5,5'	147	2,2',3,4',5,6	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
38	3,4,5	93	2,2',3,5,6	148	2,2',3,4',5,6'	203	2,2',3,4,4',5,5',6
39	3,4',5	94	2,2',3,5,6'	149	2,2',3,4',5',6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
40	2,2',3,3'	95	2,2',3,5',6	150	2,2',3,4',6,6'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
41	2,2',3,4	96	2,2',3,6,6'	151	2,2',3,5,5',6	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
42	2,2',3,4'	97	2,2',3',4,5	152	2,2',3,5,6,6'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
43	2,2',3,5	98	2,2',3',4,6	153	2,2',4,4',5,5'	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
44	2,2',3,5'	99	2,2',4,4',5	154	2,2',4,4',5,6'	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'
45	2,2',3,6	100	2,2',4,4',6	155	2,2',4,4',6,6'		
46	2,2',3,6'	101	2,2',4,5,5'	156**	2,3,3',4,4',5		
47	2,2',4,4'	102	2,2',4,5,6'	157**	2,3,3',4,4',5'		
48	2,2',4,5	103	2,2',4,5',6	158	2,3,3',4,4',6		
49	2,2',4,5'	104	2,2',4,6,6'	159	2,3,3',4,5,5'		
50	2,2',4,6	105**	2,3,3',4,4'	160	2,3,3',4,5,6		
51	2,2',4,6'	106	2,3,3',4,5	161	2,3,3',4,5',6		
52	2,2',5,5'	107	2,3,3',4',5	162	2,3,3',4',5,5'		
53	2,2',5,6'	108	2,3,3',4,5'	163	2,3,3',4',5,6		
54	2,2',6,6'	109	2,3,3',4,6	164	2,3,3',4',5',6		
55	2,3,3',4	110	2,3,3',4',6	165	2,3,3',5,5',6		

Los congéneres marcados han sido designados según su TEF en: *congéneres no orto ** congéneres mono-orto***congéneres di-orto

3.1 Efectos tóxicos de los PCBs

A pesar de que la producción de PCBs fue suspendida a finales del siglo pasado, se estima que en nuestra biosfera hay un remanente de aproximadamente 750 mil toneladas de PCBs, lo cual sugiere que el problema persistirá aun por muchos años, dada la estabilidad de estos compuestos y la baja tasa de biotransformación. Los PCBs son responsables de efectos nocivos de tipo neurológico, reproductivo, endocrino y cáncer, entre otros. A continuación se muestran algunos de los estudios que sirven de ejemplo sobre la toxicidad que tienen los PCBs sobre de las personas (Ghosh et al., 2010).

Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un término que se utiliza para definir la condición de un grupo de personas con factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, diabetes, obesidad visceral, valores de colesterol y triglicéridos séricos por encima de lo recomendable. En un estudio realizado por Lind et al (2017) se evaluó la relación entre la incidencia de síndrome metabólico y 30 contaminantes ambientales. El estudio muestra una asociación entre los PCB126, PCB170 y PCB118 y la aparición de síndrome metabólico.

Neurotoxicidad

Diversos estudios muestran que la exposición continua a PCBs tiene un efecto tóxico sobre el sistema nervioso. Por ejemplo, en el estudio desarrollado por Gascon et al (2013) se sugiere que tanto la exposición prenatal al PCB-153, así como la exposición a través de la lactancia, produce en los infantes un deterioro en el desarrollo neurofisiológico.

En el trabajo de Ribas et al (2001) en donde se realizó un seguimiento a 7 estudios sobre exposición prenatal a PCBs, se encontró que en cuatro de cinco estudios en donde se evaluaba el desarrollo psicomotor, se ponía de manifiesto un decrecimiento en las habilidades motrices, mientras que uno de los cinco presentaba déficit en la adquisición de habilidades cognitivas.

En un estudio realizado por Tsukimori et al (2013) menciona que la exposición maternal a PCBs, PCDDs y PCDFs puede resultar en efectos adversos en la salud de los infantes. Los síntomas presentados por los niños concuerdan con una enfermedad que ha sido de amplio estudio en Japón, esta es, la enfermedad de Yusho. Esta enfermedad se caracteriza porque los niños padecen severo retraso en su crecimiento,

hiperplasia gingival, edema facial y aparición precoz de los dientes, entre otros síntomas.

Toxicidad sistema endocrino

En una revisión realizada por Pinson et al (2017) se proponen los mecanismos por medio de los cuales se da la disrupción endocrina mediada por PCBs. Las hormonas que se ven principalmente afectadas son las hormonas tiroideas y las hormonas esteroideas, lo que se traduce en desordenes en el desarrollo neurológico, como por ejemplo: una reducción en el índice de coeficiente intelectual.

Cáncer

En una revisión realizada por Rodgers et al (2018) se han identificado 158 artículos, en donde se muestra evidencia experimental de la relación entre la exposición a ciertos contaminantes ambientales, entre ellos los PCBs y la aparición de cáncer de mama.

3.2. Regulación sobre la exposición a PCBs

Dado la evidencia que existe en torno al carácter toxico de los PCBs, distintos gobiernos de orden local y global han dictado normativas con el propósito de controlar la exposición de la población a los PCBs, por lo que se han establecido límites de exposición en ambiente, alimentos y por exposición ocupacional.

La FDA (ECFR, 2018) establece un límite de PCBs de 2 ppm para los alimentos de origen animal. De igual forma la FDA establece un límite para los materiales que constituyen las envolturas de los alimentos, el límite es de 10 ppm.

La FAO y la WHO establecen que la ingesta diaria de PCBs debe ser inferior a 6 µg/Kg.

En la tabla 2 pueden observarse las concentraciones límites para PCBs de acuerdo a varias agencias normativas.

Tabla 2. Regulaciones relacionadas con PCBs (Tomado de ATSDR, 2016)

Agencia	Enfoque	Concentraciones límites	Comentarios
OSHA	Aire: área de trabajo	1,0 mg/m ³ para PCBs con 42% de Cloro 0,5 mg/m ³ para PCBs con 54% de Cloro	Aplicable; TWA* y PEL ^a Ambos estándares aplican para todas las formas físicas de aerosoles: vapor, niebla, aerosoles y

			partículas de polvo cargadas con PCBs.
NIOSH	Aire: área de trabajo	1,0 µg/m ³	Alerta; TWA (10 horas)
EPA	Agua potable: ambiente	0,0005 ppm	Aplicable MCL ^b
FDA	Alimentos: ambiente	0,2 – 3,0 ppm (todos los alimentos) 2,0 ppm (pescados) 10 ppm (envolturas de papel para alimentos)	Aplicable; nivel de tolerancia
WHO FAO	Alimentos: ambiente	6,0 µg/Kg por día	Ingesta diaria permitida

*TWA: se refiere a la concentración media ponderada en el tiempo para un día de trabajo y una jornada semanal de 40 horas en el cual los trabajadores pueden estar expuestos de manera repetitiva.

^aPEL: se refiere a la concentración más alta en el aire al cual un trabajador puede estar expuesto, en promedio durante 8 horas de trabajo diario.

^bMCL: concentración máxima permitida para agua potable.

mg/m³: miligramo por metro cubico

µg/m³: microgramo por metro cubico

µg/Kg: microgramo por kilogramo

En relación a la legislación europea (Diario oficial de la unión Europea, 2011) se permiten contenidos de PCBs hasta de 40 ng/g grasa en alimentos de origen animal, tales como: bovinos, ovinos, cerdo y aves de corral. Mientras que para los pescados se permite un límite de hasta 300 ng/g peso.

3.3 Presencia de PCBs en alimentos

Algunas de las vías por medio de las cuales los PCBs se encuentran en los alimentos que a diario se consumen están directamente relacionadas con la presencia de estos contaminantes en el medio ambiente. Por ejemplo, la presencia de PCBs en aguas de los ríos o en los mares se convierte en una fuente de PCBs para los animales que habitan o están relacionados con estos ecosistemas. Para el caso de la agricultura, la persistencia de estos contaminantes en el aire, agua y tierra hace que puedan encontrarse PCBs en verduras, frutas, granos y todos los alimentos que se cultivan en los suelos. Sin embargo, dado la baja la solubilidad en medios acuosos, los alimentos que provienen de la agricultura son los que presentan menor cantidad de PCBs en alimentos.

La fuente más común de PCBs para la dieta humana son los pescados y mariscos y en un menor grado están los alimentos que provienen de animales de cría, como por

ejemplo: el ganado porcino, vacuno y las aves de corral. Para el caso de la cría de animales a escala comercial, la fuente primaria de PCBs es la alimentación suministrada a los animales. Esta alimentación en algunos casos puede estar contaminada con sustancias químicas, tales como: dioxinas, PCBs, metales pesados y micotóxicas, que pasan de la carne a la población, comprometiendo la salud de los consumidores. Una vez que se ha encontrado la posible fuente de contaminación, la siguiente pregunta es: de donde proviene las materias primas con las cuales se producen los piensos para animales, que calidad poseen estas materias primas y bajo qué controles se realiza su producción. En algunos casos estas materias primas proceden de lugares, en donde la exposición a PCBs presenta altos límites, ya sea durante el cultivo o el procesamiento a escala industrial.

En relación a los piensos, en un trabajo realizado por Van der Fels-Klerx et al (2017) se desarrolló un modelo mediante el cual se clasifican los ingredientes animales sobre la base del riesgo potencial de los contaminantes presentes en concentraciones por encima de los límites permitidos. Durante este trabajo se demostró que el modelo propuesto es aplicable para el caso de dioxinas y PCBs en piensos para granjas de animales en Holanda entre 2013 y 2014. Los alimentos que se encontraron en los primeros lugares de riesgo son: aceites de origen vegetal y animal; maíz y pescado. Este estudio también se menciona el impacto en la salud humana relacionada con dioxinas y PCBs; y que es debido fundamentalmente a la contaminación que puede encontrarse en alimentos, tales como los huevos o la leche, ya que son los que presentan la más alta transferencia de estos contaminantes, lo que podría asociarse a la facilidad que tienen de incorporar sustancias lipofílicas.

En un estudio realizado por Lee et al (2016) en mercados de Taiwán desde 2004 hasta 2012 se comparó la distribución de PCDD/F y PCBs en nueve categorías de alimentos. Los resultados muestran una tendencia de la reducción de PCBs en el año 2012 frente a los obtenidos en 2004. Tal como se ha manifestado anteriormente, los pescados y mariscos, en especial los cangrejos presentan los valores más altos de PCBs, sin embargo los resultados obtenidos para el 2012 presentan una disminución aproximada del 65% frente a los resultados del 2004. Las carnes, productos lácteos y cereales, presentan una reducción que varía entre el 13 y 40%.

3.4 Presencia de PCBs en humanos

En un estudio realizado por Abdallah et al (2017) se determinaron los contaminantes organohalogenados en pacientes con cáncer colorrectal y paralelamente se hizo la

determinación en pacientes sanos, como grupo control. En lo que respecta a PCBs el estudio pretendía verificar la presencia de los siguientes PCBs: 118, 138, 153, 170 y 180. En relación a los resultados en ambos grupos la concentración de PCBs se encontró por encima de un límite de cuantificación de 0,1 ng/g y sin diferencias significativas en las concentraciones de PCBs determinadas entre uno y otro grupo.

En un estudio realizado sobre 42 personas en Alemania (Fromme et al., 2016) se encontraron altas concentraciones de PCB153, PCB180 y PCB138. En 11 de las 42 personas las concentraciones de PCBs estaban por encima de lo reportado en guías sobre exposición a agentes químicos.

Otro ejemplo de la presencia de PCBs en humanos se da en un estudio realizado por el gobierno de Canadá (Haines et al., 2017) a través de su organismo sanitario, en el cual se definieron valores de referencia para biomonitorización de contaminantes orgánicos persistentes en humanos. En el 66,0% del total de los participantes en el estudio fueron detectados contaminantes. El grupo más numeroso de contaminantes encontrados fueron los PCBs, con un total de 10, siendo los más significativos el PCB153, PCB180 y el PCB138.

4. Técnicas analíticas en la determinación de PCBs

La gran capacidad toxicológica que presentan los PCBs, como se ha indicado anteriormente, explica un poco la razón de que existan muchos estudios en el campo de la toxicología analítica, en donde se realiza la determinación de PCBs en matrices ambientales, en su gran mayoría, en matrices biológicas, principalmente sangre; y por último en alimentos, los cuales vienen a convertirse en una fuente importante de exposición para los humanos a través de la dieta, en especial por el consumo de pescados y mariscos.

A partir del número de congéneres existentes para los PCBs y de las concentraciones límites que normativamente deben cumplir los alimentos, se hace necesario que los métodos empleados para la caracterización y cuantificación de estas moléculas no solo posean una sensibilidad del orden de ppm, en algunos casos nanogramos, sino que sean selectivos y puedan diferenciar cada uno de los 209 congéneres.

4.1 Técnicas no cromatográficas o de detección

4.1.1 Técnica colorimétrica

La técnica colorimétrica se fundamenta en el color que adopta el medio disolvente en que se encuentran disueltos los PCBs debido a la reacción que se da entre una parte de la estructura de PCBs y un reactivo o mezcla de reactivos. Por ejemplo, en el método EPA 9079 la reacción se da entre los átomos de cloro de la molécula de PCB y una mezcla de sodio metálico, naftaleno y dietilenglicol dimetil éter. El método EPA (9079) permite detectar concentraciones de PCBs hasta de 20 µg/g en aceites empleados en equipos eléctricos industriales.

En el caso de la técnica propuesta por la EPA 9079 puede existir la posibilidad de que otras moléculas pudieran responder a la prueba, lo que generaría un falso positivo, por ejemplo, si la muestra analizada contiene una alta concentración de sulfuros al aplicar el reactivo propuesto por la EPA 9079 se formará un color amarillo en el punto final de la reacción, indicando la posible presencia de PCBs en la muestra, lo cual no puede ser cierto. Sin embargo existe otro ejemplo, en donde la técnica colorimétrica resulta ser altamente específica. En el trabajo realizado por Cheng et al. (2018), se ha desarrollado un método colorimétrico que permite la detección y cuantificación de un

PCB específico, este es, el PCB 77 en una matriz como agua, que resulta ser mucho menos compleja que una muestra biológica.

Comparativamente un método colorimétrico resulta más rápido y sencillo que un método cromatográfico. La detección del PCB se obtiene de manera visual y el resultado puede estar disponible en cuestión de minutos. Sin embargo es necesario mencionar que el método propuesto por Cheng et al (2018) tiene una mejora significativa, ya que ha incorporado al método un aptámero, con el propósito de que el método sea más específico. El aptámero es una porción de una cadena de ácido nucleico que es capaz de reconocer una molécula de PCB específica, actuando de manera similar a la respuesta que tiene un anticuerpo frente a un antígeno.

4.1.2 Técnica electroquímica

La técnica electroquímica se fundamenta en la medición de la corriente o voltaje que se genera a través de la actividad de especies iónicas. La voltametría, amperometría, conductimetría y la potenciometría, son ejemplos de técnicas electroquímicas, siendo la potenciometría la de mayor uso en el laboratorio de análisis químico. La técnica electroquímica presenta algunas ventajas, tales como: la instrumentación simple, de fácil miniaturización, buena determinación cuantitativa, alta selectividad y sensibilidad (Shi et al., 2016); y un rápido tiempo de respuesta.

Dado que los PCBs no tienen actividad electroquímica, es necesario la formación de un complejo entre un polímero de β -ciclodextrina y un indicador redox (Óxido de grafeno reducido, polipirrol y ferroceno). Debido a la estructura especial que presenta la β -ciclodextrina es posible alojar en la cavidad que posee, moléculas como PCBs, mientras que la incorporación de indicadores redox, le imprimen al sensor la selectividad adecuada (Zheng et al., 2016).

En relación a los límites de detección la técnica propuesta por Zheng en la cual se emplean sensores electroquímicos ha probado tener límites de detección significativamente bajos. En la tabla 3 se muestra una comparación de los límites de detección y el rango lineal entre la técnica electroquímica frente a otras técnicas, como son: GC-MS, inmunoensayo cromatográfico e inmunosensor electroquímico.

Tabla 3. Comparación del método electroquímico frente a otros métodos (Tomado de Zheng et al., 2016)

Método	Rango lineal (nM*)	Límite de detección (nM)
GC-MS	0,068-860	0,0092
Inmunoensayo cromatográfico	-	3,1
Inmunosensor electroquímico	0,0034-340	0,001
Sensor electroquímico	0,001-10000	0,0005

*nM: nanomolar

4.1.3 Técnica ELISA

La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno por parte de un anticuerpo que se pone en contacto con una enzima y genera una respuesta que puede ser medida, como por ejemplo: un cambio de color. ELISA es un método alternativo para la detección de dioxinas, tales como los PCBs, empleándose en su mayor parte como un método para detectar la presencia o no de PCBs y no con fines cuantitativos, ya que no tienen la especificidad de un método cromatográfico que pueda diferenciar entre los distintos PCBs.

Tsutsumi et al (2006) han desarrollado un método de ELISA para la detección del PCB 118 en muestras de pescados. Tsutsumi y su grupo de trabajo en su estudio con el PCB 118 aprovecharon la alta especificidad que tiene este PCB con un anticuerpo monoclonal. Una vez que el anticuerpo se une al PCB, se adiciona una enzima y se somete a incubación, lo cual genera un producto que resulta con una absorbancia que puede ser medida a 450 nm. El método ELISA desarrollado por Tsutsumi et al fue comparado de manera paralela con un método de HRGC/HRMS encontrándose que el método de ELISA puede identificar PCBs en concentración de hasta de 2 pg/g.

Otro ejemplo de la utilización de la técnica ELISA para la determinación de PCBs es el estudio realizado por Van Emon et al (2013), en donde se realizó la determinación de PCBs en muestras de suelo y sedimento, encontrándose una aplicación tanto cualitativa como cuantitativa en la determinación de PCBs, sin embargo es necesario que las muestras se encuentren altamente contaminadas.

4.1.4 Técnica CALUX

La técnica CALUX se fundamenta en el empleo de una línea celular modificada a la cual se le ha incorporado un gen que responde a la actividad de la enzima luciferasa, la actividad lumínica producida una vez entra en contacto con la sustancia química es la respuesta que puede ser medida. Las dioxinas y cualquier otra molécula que activen

el receptor de aril hidrocarburos pueden llevar a la inducción de la expresión del gen de luciferasa.

En el trabajo realizado por Hasegawa et al (2007) se realizó la determinación de PCBs en aceite de pescado empleando los métodos CALUX y HRGC/HRMS de manera paralela. La comparación de los resultados obtenidos en ambos métodos era otro de los objetivos del estudio realizado por Hasegawa.

Los valores TEQ obtenidos por Hasegawa con la técnica CALUX son aproximadamente la mitad de lo que puede ser obtenido con HRGC/HRMS. Esta diferencia pudiera ser explicada por la respuesta de los estándares utilizados en el método CALUX, las cuales fueron entre 1.5 a 2.12 veces mayor a la que presentaron los estándares con el método HRGC/HRMS. La otra razón que podría explicar esta diferencia es el efecto antagonista de especies específicas en la muestra. Debido a estas limitaciones la principal aplicación de CALUX es como una técnica para verificar la presencia o no de PCBs.

Otra aplicación de la técnica de CALUX se da en la detección de PCBs en muestras de alimentos, en un estudio realizado por Winkler, 2015, en donde al aplicar la técnica de CALUX en una muestra de huevos se encuentra que los valores de PCBs exceden los niveles permitidos. Una vez se informa de un resultado con CALUX este debe confirmarse empleando un método cromatográfico, como por ejemplo: GC/HRMS.

4.2 Métodos cromatográficos

Las técnicas presentadas anteriormente corresponden a técnicas no cromatográficas y que son utilizadas generalmente en una fase inicial del proceso analítico, con el propósito de detectar la presencia de PCBs. Son técnicas rápidas con una instrumentación simple, con gran sensibilidad y límites de detección bajos, sin embargo la selectividad no resulta ser adecuada ante muestras con algún grado de complejidad, como son los alimentos. Es por ello, por lo que cuando son empleadas estas técnicas los resultados deben ser confirmados empleando un método cromatográfico.

Los métodos cromatográficos en comparación con las técnicas no cromatográficas presentan la ventaja de poder detectar y cuantificar varias moléculas de PCBs en una

misma prueba, incluso es posible cuantificar los 209 congéneres en un mismo cromatograma.

La cromatografía es una técnica analítica en el cual los componentes de una mezcla se separan o distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria o fija, y una fase móvil en la cual se encuentra la mezcla, cuyos componentes se pretenden separar. Las técnicas cromatográficas empleadas para la detección y cuantificación de PCBs son las siguientes:

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Cromatografía de gases acoplada a un detector de captura electrónica (GC-EDC)
- Cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas (GC-MS)
- Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un espectrofotómetro de alta resolución (HRGC-HRMS)

De las técnicas cromatográficas la que se emplea más en la determinación de PCBs es la cromatografía de gases, mientras que la cromatografía líquida tiene una aplicación más que todo preparativa en el análisis de PCBs. La detección de captura electrónica en cromatografía de gases es de uso frecuente en la determinación de PCBs, ya que es capaz de brindar bajos límites de detección y alta precisión, sin embargo resulta ser menos sensible y específica que un espectrofotómetro de masas.

4.2.1 Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la determinación de PCBs fue empleada en el estudio de Olsovská et al (2010), en el cual se utilizó un equipo UHPLC en fase reversa junto con varias columnas de fase C18, con diámetros de partículas de 1,7 μm o de diámetros menores. El método permite determinar hasta 16 PCBs, con un coeficiente de correlación entre 0,997 y 0,999; y límite de detección entre 0,1 y 0,5 ppm. El orden de elución de los picos obtenidos fue corroborado empleando GC/MS, sin embargo una limitante que pudiera mencionar sobre este estudio, es que el método no fue puesto a prueba en lo concerniente a la recuperación frente a una matriz, por ejemplo una muestra de tejido.

Otro trabajo en donde se empleó una técnica HPLC acoplada a MS fue el que realizó Quinete et al. (2015, 2016), en donde se determinaron las concentraciones de PCBs,

sin embargo hay que anotar que los PCBs estaban hidroxilados, lo que facilitaba su interacción con la fase estacionaria empleada en cromatografía líquida.

Si bien el empleo de la cromatografía líquida no resulta conveniente para la determinación de PCBs, a través de varios estudios (Cettier et al., 2015; Cloutier et al., 2017; Deshpande et al., 2013) se logra poner de manifiesto su empleo como parte del método de limpieza de la muestra previo a la inyección al cromatógrafo de gases.

4.2.2 Cromatografía de gases con detección de captura electrónica (GC/ECD)

En la tabla 4 se pueden observar las condiciones de análisis y del instrumento empleado en la determinación de PCBs mediante cromatografía de gases con detección de captura electrónica. En virtud de los objetivos planteados en este trabajo, las condiciones recopiladas en la tabla 4 son: matriz en la cual se encuentran los PCBs, columna, condiciones cromatográficas, límite de detección y rango de cuantificación. Es importante conocer la matriz en que se desarrolla el estudio, ya que lo que se pretende es que el método propuesto al final de este trabajo es determinar PCBs en alimentos, por lo que es preferible conocer estudios realizados en muestras de pescados, lácteos, tejidos, etc. La columna en conjunto con unas adecuadas condiciones cromatográficas son importantes para lograr una adecuada resolución entre cada uno de los PCBs, así como tener un límite de detección que se ajuste a los objetivos que pretende el método o bien por exigencias regulatorias.

Tabla 4. Estudios de determinación de PCBs mediante GC con ECD

Autor	Matriz	Columna	Condiciones cromatográficas	Límite de detección / Rango de cuantificación
Bordajandi et al., 2008	Leche materna	DB-5, 30m x 0.25mm x 0.25µm	Gas de arrastre: Nitrógeno Flujo: 1 mL/min Temperatura del detector: 300°C Temperatura del horno: 2 min: 80°C; 30°C/min: 80- 185°C; 1.5°C/min: 185-230°C; 5°C/min : 230-270°C	0.04 – 0.4 pg/µL
Durante et al., 2016	Tejido adiposo subcutáneo de Delfín	DB5, 30m x 0.25mm, 1µm	Gas de arrastre: Hidrógeno (13 psi) Gas de purga: Nitrógeno Volumen de inyección : 2µL Temperatura del inyector: 280°C Temperatura del detector: 320°C Temperatura del horno: 1 min: 70°C; 40°C/min: 70- 170°C; 1.5 min: 170-240°C; 15 C°/min: 240-300°C; 11 min: 300°C	0.05 – 1.68 ng/L
Fromberg et al., 2011	Lácteos y pescados	CP-Sil-5CB, 50m x 0.25mm x	Gas de arrastre: Helio Inyección splitless: 2µL	0.5 – 4 µL

		0.25µm DB-17, 60m x 0.25mm x 0.25µm	Temperatura del detector: 320°C Temperatura del horno: 1 min: 90°C; 30°C/min: 90- 180°C; 10 min: 180°C; 2°C/min: 180 -240°C; 10°C/min: 240- 280°C; 20 min: 280°C	
Glynn et al., 2011	Sangre	Ultra-2, 50m x 0.20mm x 0.33µm + DB-17, 60m x 0.25mm x 0.25µm	Gas de arrastre: Helio (0,6 y 1,3 mL/min) Gas de purga: Nitrógeno, 40- 60mL/min Volumen de inyección : 2µL Temperatura del inyector: 200°C Temperatura del detector: 300°C Temperatura del horno: 1.3 min: 105°C; 20°C/min: 105- 210°C; 2 min: 210°C; 2 C°/min: 210-260°C; 5 min: 260°C; 5 C°/min: 260-270°C; 8 min: 270°C	1-7 pg/g
Jones et al., 2006	Pescado (musculo)	HP-5MS, 30m x 0.25mm x 0.25µm (dual)	Gas de arrastre: Helio (1.35 mL/min) Gas de purga: Metano: Argón (5:95), 65mL/min Volumen de inyección : 2µL Temperatura del inyector: 305°C Temperatura del detector: 305°C Temperatura del horno: 2 min: 130°C; 1.4°C/min: 130- 255°C; 18 C°/min: 265°C; 9 min: 265°C	1.0 ± 0.3 µg/kg
Lemarchand et al., 2010	Hígado de nutria (<i>Lutra lutra</i>)	Rtx-5, 60m x 0.25mm x 0.25µm	Gas de arrastre: Nitrógeno Volumen de inyección : 2µL Temperatura del horno: 2 min: 75°C; 15°C/min: 75- 150°C; 1,2 C°/min: 150- 256°C; 25 C°/min: 256-300°C	0.5 – 1.0 ng/g
Perugini et al., 2013	Musculo de pescado (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Rtx-5MS, 30m x 0.25mm, 0.25µm	Volumen de inyección : 1µL Temperatura del inyector: 270°C Temperatura del horno: 1 min: 60°C; 10°C/min: 60- 190°C; 13 min: 190°C; 3 C°/min: 190-270°C; 6.33 min: 270°C	0.1 – 1.4 ng/g
Crespo et al., 2005	Algas	BP5, 30m x 0.25mm, 0.25µm	Gas de arrastre: Nitrógeno (1 mL/min) Volumen de inyección : 1µL Temperatura del inyector: 280°C Temperatura del detector: 320°C Temperatura del horno: 1 min: 50°C; 15°C/min: 50- 200°C; 7 °C/min: 200- 320°C; 8 min: 320°C	0.62 (PCB118) – 19.0(PCB77) ug/L
Torres et al., 2015	Tejido graso de ballena (<i>Eubalaena australis</i>)	SPB-5, 30m x 0.25mm, 0.25µm	Gas de arrastre: Helio (1,5 mL/min) Volumen de inyección : 1µL Temperatura del inyector: 275°C Temperatura del detector: 290°C Temperatura del horno: 1 min: 100°C; 5°C/min: 100- 150°C; 1 min: 150°C; 1.5 °C/min: 150-240°C; 10 °C/min: 240-300°C; 10 min: 300°C	0.08 – 0.33 ng/mL

A partir de los datos mostrados en la tabla 4 se puede observar que la técnica de GC acoplada a un detector de ECD tiene la posibilidad de utilizarse en distintos tipos de matrices. En todos los casos, excepto en los que no se mencione, el detector empleado fue un detector de captura electrónica de ⁶³Ni. La columna de mayor uso en estos trabajos fue la G27, según la clasificación de fases estacionarias de la USP (farmacopea americana) y que corresponde a una composición de (5% Fenil)-metilpolisiloxano. Los gases de arrastre y purga pueden variar entre Hidrógeno, Nitrógeno y Helio, mientras que el flujo puede ser de 1 mL/min. El gradiente de

temperatura para el horno puede ajustarse dependiendo los tiempos de retención de las moléculas de PCBs presentes en la matriz, partiendo de una temperatura de 50°C hasta 320°C. La temperatura del inyector y del detector deben estar cerca de los 300°C, siendo la temperatura del detector unos 30 o 40°C mayor que la presenta el inyector.

4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

En una monografía sobre PCBs de la Agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC, 2015) menciona que el método para la determinación de PCBs es esencialmente el mismo indistintamente del tipo de matriz, esto es, GC/MS. Esta información es consecuente con la mayoría de los artículos consultados durante este trabajo.

Al igual que el método de cromatografía de gases con detección de captura electrónica (GC/EDC), la columna de mayor uso para la separación de PCBs mediante GC/MS fue la G27 (clasificación USP). Las marcas de mayor uso resultan ser: DB-5MS, ZB-5MS y HP-5MS. En comparación con el método de GC/ECD, el gas de arrastre en la mayoría de los estudios consultados, sino en todos, fue el Helio a un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección puede variar entre 1 y 5 μ L; mientras que la temperatura del inyector se ubica en un valor cercano a los 280°C. El gradiente de temperatura del horno generalmente inicia con un valor entre 60°C y 80°C, en donde puede permanecer alrededor de uno a dos minutos. Luego incrementa hasta los 180°C empleando un gradiente cercano a los 10°C/min. Seguido se emplea un gradiente menor, que puede estar entre los 3°C/min a 5°C/min hasta una temperatura entre 280°C a 310°C. Una vez alcanza la temperatura final puede permanecer en este valor hasta por 25 minutos, para un tiempo total de corrida aproximado de una hora.

En relación a las condiciones de operación del espectrómetro de masas la identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención empleando para ello estándares certificados y monitorización selectiva de iones (SIM). La temperatura de la fuente iónica estuvo en un valor cercano a los 250°C.

4.4 Problemas de calidad durante la determinación de PCBs (Konieczka et al., 2010).

De manera general la determinación de PCBs en alimentos, en las cuales se esperan concentraciones a niveles traza, involucra las siguientes etapas (Konieczka et al., 2010):

1. Obtención de la muestra (muestreo).
2. Transporte y almacenamiento de muestras.
3. Preparación de las muestras para análisis.
4. Determinación final de los PCBs.
5. Cálculo e interpretación de la data.
6. Control y aseguramiento (QA/QC) de las medidas analíticas e informe de los resultados.

Si bien todas las etapas del proceso de determinación de PCBs tienen directa o indirecta relación con el método, las 2 primeras etapas pueden estar comúnmente asociadas a errores humanos durante el muestreo y transporte de las muestras. Contrario a las etapas iniciales, la preparación de las muestras y la determinación de los PCBs tienen una importante relación con la confiabilidad que pudieran tener los resultados obtenidos. Por lo que no es posible pensar en el éxito de un método si la preparación de la muestra no logra asegurar una recuperación que se ajuste a los objetivos del método. Por otra parte, si la columna no resulta ser la adecuada, en adelante nada debería funcionar de manera correcta. Es por ello, por lo que se hace necesario considerar los posibles problemas que pueden presentarse durante el desarrollo del método y las posibles alternativas en caso de que los primeros ensayos no logren presentar el mejor desempeño.

4.4.1 Selectividad

Se entiende por selectividad a la capacidad que tiene el método de discriminar el analito o los analitos de interés frente al resto de componentes que pudieran estar presentes en la matriz objeto de estudio. En cromatografía esto significa que el pico de interés debe encontrarse debidamente resuelto de los picos adyacentes, por un lado, y por otro, de que el pico debe ser puro, lo que se refiere a que no debe haber solapamiento de picos. La resolución (R_S) es el parámetro utilizado en cromatografía para evaluar la diferencia en los tiempos de retención y con ello la correcta separación entre dos picos. Según el capítulo 621 de la USP 40 (USP, 2018), la resolución se define como la separación que hay entre 2 componentes de un cromatograma definido por la siguiente formula:

$$R_S = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

Donde t_{R2} es t_{R1} son los tiempos de retención de cada uno de los componentes; y W_2 y W_1 corresponden a los anchos de banda de cada uno de los picos. En la figura 2 se muestra de manera gráfica los conceptos de t_R y W , así como el concepto de resolución cromatográfica.

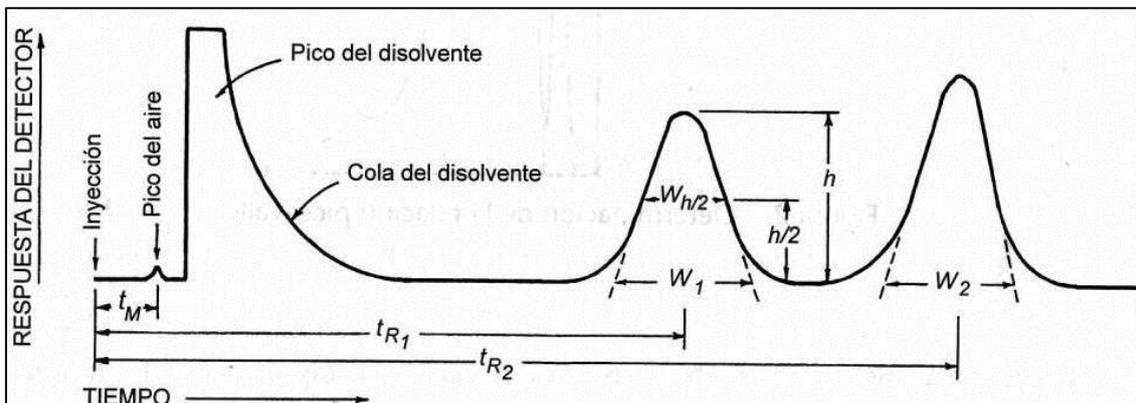


Fig. 2. Separación cromatográfica entre 2 componentes, tomado de la USP 40

En cromatografía de gases la resolución entre los picos se ve especialmente afectada en función de algunas condiciones del método, entre las cuales están:

- El tipo de columna empleada
- Los parámetros de separación cromatográfica, por ejemplo: el flujo del gas o el gradiente de temperatura.

En un análisis cromatográfico la separación de dos o más sustancias se da en virtud de la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Esta interacción depende por un lado de las propiedades fisicoquímicas del analito, la cual es una variable que está fuera de nuestro control. Por otro lado está la química de la fase estacionaria, que ofrece la posibilidad de realizar ajustes y con ello poder lograr una resolución adecuada para el método.

La separación de dos especies en cromatografía puede darse a través de distintos procesos fisicoquímicos, entre los cuales se encuentran: adsorción, distribución de masas o intercambio iónico. Sin duda el curso que adopte el método cromatográfico dependerá no solo del analito que se pretende separar o cuantificar, sino también del resto de componentes presentes en la matriz objeto de estudio, así como de la interacción con la fase estacionaria.

4.4.2 Calibración

A través de la calibración podemos asegurar que la respuesta obtenida por el equipo corresponde a los valores conocidos o esperados del analito. Dado que la curva de calibración tiene un componente predictivo es necesario que la respuesta del instrumento sea dependiente de la concentración en que se encuentre el analito estudiado. La calibración depende de los siguientes factores:

- El tipo de instrumento de medida.
- El número de muestras.
- Una amplia distribución de las concentraciones de las muestras sobre la curva de calibración.
- La precisión requerida del método.
- La composición de la matriz.
- La posibilidad de que la composición de la muestra pueda cambiar durante el proceso de análisis.

Gran parte de la decisión sobre la elección del instrumento de medida estará condicionada por los niveles de concentración esperados para la muestra, por lo que se requerirá un instrumento que pueda dar un límite de detección menor a la concentración del analito. Atendiendo a las normativas regulatorias en relación a los niveles permitidos de PCBs en alimentos es necesario que el límite de detección que pueda dar el cromatógrafo de gases sea menor de 20 ng/g, lo cual se cumple en los distintos estudios de determinación de PCBs en alimentos consultados durante este trabajo. De igual forma se necesita que el método tenga una precisión adecuada, la cual debe quedar definida en el QA/QC y debe ser verificada a través de la validación del método de análisis.

Sobre el resto de los factores que afectan la calibración, se puede decir que dependen de la constitución de las muestras, por lo que es tan importante el instrumento, como la selección de un método adecuado de preparación y limpieza de la muestra.

5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en la determinación de PCBs en alimentos

En cuando a la técnica utilizada para la determinación de PCBs, si bien existen varias que ofrecen una alta especificidad, la técnica de mayor uso y recomendada por los entes normativos es la de cromatografía de gases acoplada a un detector de masas.

Para definir finalmente tanto el método, como las condiciones de trabajo del mismo, se realizó la revisión de varios estudios de determinación de PCBs en muestras de alimentos, tal como puede observarse en la tabla 5. De esta forma las condiciones del método se establecerán teniendo en cuenta los elementos comunes que pudieran existir entre la bibliografía revisada, la cual está compuesta básicamente de: estudios de determinación de PCBs en alimentos y de las guías normativas. De igual forma cobra especial importancia las recomendaciones vistas en el ítem 4.4, en el cual se relacionan algunos de los problemas que pudieran presentarse durante la determinación de PCBs, y en la medida en que se logren evitarse o solucionarse rápidamente estos inconvenientes se asegurará el éxito del método propuesto.

El método propuesto al final de este trabajo estará compuesto de las siguientes partes:

- El método de preparación y limpieza de la muestra.
- La columna empleada para el análisis cromatográfico.
- Las condiciones de separación del método cromatográfico.
- Los requerimientos en términos de sensibilidad y precisión de método.

No se incluyen en el marco de este trabajo lo relacionado con la toma de la muestra y el procesamiento de los datos.

En la tabla que se muestra a continuación pueden observarse los estudios que forman parte de la revisión realizada sobre la determinación de PCBs por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Información tal como la preparación de la muestra, condiciones cromatográficas y del espectrofotómetro de masas, así como los LOD, LOQ y coeficiente de correlación lineal se encuentran en la tabla 5.

5.1 Resultados de la consulta bibliográfica

Tabla 5. Estudios de determinación de PCBs mediante GC acoplado a MS.

Estudio	Matriz	Técnica	Preparación de la muestra	Moléculas identificadas y/o cuantificadas	Condiciones cromatográficas	Condiciones espectrómetro de masas	LOD y LOQ R (Coeficiente de correlación)
1. Specific profiles of polybrominated diphenylethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in fish and tucuxi dolphins (Quinete et al.,2011)	Musculo e hígado de pescado y delfín	Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) en modo de ionización negativa de captura electrónica	Homogenización, saponificación, extracción, evaporación, limpieza o purificación del extracto, inyección al GC	Se lograron cuantificar 13PCBs, siendo los PCBs 28, 52 y 70 los más abundantes en pescados.	Columna: HP-5MS; 30m x 250 µm; 0.25µm Volumen de inyección: 1 µL Gas de arrastre: He Flujo: 1,3 mL/min Temperatura del horno: 3 min: 75°C; 15°C/min: 75-150°C; 2°C/min: 260°C; 20°C/min: 300°C; 1 min: 300°C	Operado en modo de monitoreo de ion seleccionado (SIM)	LOQ: 1,36 -10,6 ng/g R >0,99
2. Method validation for 243 pesticides and environmental contaminants in meats and poultry by tandem mass spectrometry coupled to low-pressure gas chromatography (Han et al., 2016)	Carne de ganado vacuno y porcino; y aves de corral	Cromatografía de gases de baja presión(LPGC) acoplada a espectrometría de masas Tándem (MS/MS)	Se empleó QuEChERS. Extracción, extracción en fase sólida, limpieza e inyección al GC	13 PCBs (77, 81, 105, 114, 123/128, 126, 126/157, 170, 180 y 189)	Columna: DB-5MS; 15m x 0,53mm; 1µm Volumen de inyección: 2,5 µL Gas de arrastre: He Flujo: 2,0 mL/min Temperatura del horno: 1,5 min: 70°C; 80°C/min: 70-180°C; 40°C/min: 250°C; 70°C/min: 320°C; 3,4 min: 320°C	Temperatura línea de transferencia: 250°C Temperatura fuente iónica: 320°C Ionización electrónica: -70eV Temperatura cuadrupolo: 150°C Gas de colisión: Ni (1,5 mL/min) Gas de enfriamiento: He (2,25 mL/min)	LCL: 0,5 ng/g R >0,99
3. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in grass, yak muscle, liver, and milk in Ruergai high altitude prairie, the eastern edge	Leche, musculo e hígado de yak	Cromatografía de gases de baja presión(LPGC) acoplada a espectrometría de masas Tándem (MS/MS)	Homogenización, extracción, limpieza, concentración, inyección al HRGC	6 PCBs (28, 52, 101, 138, 153 y 180), sin embargo el 1802 no fue detectado	Columna: HP-5MS; 30m x 0,32mm; 0.25µm Temperatura inlet inyección: 280°C Volumen de inyección: 1 µL Flujo: 1,3 mL/min Temperatura del horno: 2 min: 50°C; 10°C/min: 50-	Temperatura fuente iónica: 280°C La ionización fue realizada en modo de ionización electrónica (EI) La energía de electrón fue de 40eV y la	LOQ: 0,01 -0,09 pg/g

of Qinghai-Tibet Plateau (Nan Gai et al., 2014)					180°C; 2 min: 180-220°C; 10°C/min: 220-290°C; 15 min:290°C	corriente electrónica de 650µA	
4. Polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorine pesticides in selected cereals available on the Polish retail market (Roszko et al., 2014 and Roszko et al., 2012)	Cereales (avena, hojuelas, pastas, harina, salvado, pan, papilla y frituras)	Ultra-cromatografía de gases (UGC) con inyector PTV acoplada a espectrometría de masas (MS)	Homogenización, extracción, limpieza, extracción concentración, inyección al GC	19 PCBs (28, 52, 101, 138, 153, 180, 194, 77, 81, 105, 14, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 y 189)	Columna: ZB-5MS; 60m x 0,25mm; 0.25µm Precolumna: ZB-5MS; 5m x 0,25mm; Volumen de inyección: 40 µL Flujo: 1,0 mL/min Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 3 min: 100°C; 10°C/min: 10-180°C; ; 1,7°C/min: 180-200°C; 2 min: 200°C; 1,8°C/min: 200-240°C; 2 min: 240°C; 50°C/min: 240-280°C; 15 min:280°C	Operado en modo MS/MS. Gas de descarga trampa de iones: He. Voltaje multiilicador: 1700 V. El MS fue calibrado con perfluoro- terbutilamina en modo ionización positiva de impacto electrónico Temperatura línea de transferencia: 320°C	LOD: 0,11 -0,59 pg/g LOQ: 0,01 -0,30 pg/g R >0,98
5. Multi pesticide and PCB residues in Nile tilapia and catfish in Assiut city, Egypt (Yahia et al., 2014)	Pescado (Tilapia y bagre)	Cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) acoplada a espectrometría de masas (MS)	Homogenización, extracción, separación de la parte lipídica, limpieza, concentración e inyección al GC	4 PCBs (28, 52, 118 y 138)	Columna: J&W Scientific, DB-1701 Temperatura inlet inyección: 260°C Flujo: 1,2 mL/min Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 1 min: 40°C; 30°C/min: 40-130°C; 5°C/min: 130-250°C; 10°C/min: 250-300°C; 5 min:300°C	Energía de ionización: 70eV Temperatura. interfase: 280°C La selección de iones en el modo SIM fue dividida en 14 grupos	LOD: 2,0 ug/kg
6. Occurrence, variability and human exposure to Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins (PCDDs), Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) and Dioxin-Like Polychlorinated Biphenyls (DL-PCBs)	Leche de vaca	Cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	Homogenización, extracción, concentración, limpieza, fraccionamiento, secado, reconstitución e inyección al GC	11 PCBs (77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 157, 167, 169 y 189)	Columna: Rtx-5MS, 60m x 0,25mm; 0.25µm Volumen de inyección: 1,5 µL Flujo: 1,5 mL/min Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 3 min: 120°C; 20°C/min: 120-180°C; 2°C/min: 180-270°C; 19 min:270°C	Cuantificación de los compuestos seleccionados fue realizada mediante el método de dilución isotópica usando el software Target Lynx	LOD/LOQ: 0,007-2,31 pg/g

in dairy products (Aránguiz et al., 2015)							
7. Streamlined sample cleanup using combined dispersive solid-phase extraction and in-vial filtration for analysis of pesticides and environmental pollutants in shrimp (Han et al., 2014)	Camarones	Cromatografía de gases de baja presión(LPGC) acoplada a espectrometría de masas Tándem (MS/MS)	Homogenización, extracción, limpieza, SPE, concentración, reconstitución e inyección al GC	9 PCBs (105, 114, 118/123, 126, 156, 157, 167 y 169)	Columna: SLB-5MS; 5m x 0,53µm; 1µm Volumen de inyección: 5 µL Gas de arrastre: He Flujo: 2,0 mL/min Temperatura del horno: 1,5 min: 70°C; 80°C/min: 70-180°C; 40°C/min: 180-250°C; 70°C/min: 250-320°C; 4,5 min: 320°C	Temperatura transferencia: 250°C Temperatura fuente iónica: 320°C Energía de ionización: -70eV Temperatura cuadrupolo: 150°C (Sapozhnikova et al., 2013)	LOD < 0,5ng/g
8. Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps (Kalachova et al., 2011)	Pescado y camarones	Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS-TOF)	Extracción , limpieza, SPE, concentración, reconstitución e inyección al GC	18 PCBs (28, 52, 77, 81, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 138, 153, 156, 157, 167, 169, 180 y189)	Columna: BPX-50, 30m x 0,25mm; 0.25µm Volumen de inyección: 8 µL Flujo: 1,3 mL/min Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 4.3 min: 80°C; 30°C/min: 80-220°C; 2°C/min: 220-240°C; 10°C/min: 240-340°C; 15 min:340°C	Rango masa: m/z 45-750 Temperatura fuente iónica: 250°C Temperatura línea transferencia: 280°C Voltaje del detector: -1950V Frecuencia adquisición datos: 3 espectros/s	LOQ: 0,1-0,5 µg/kg
9. Preparation of mesoporousZrO2-coated magnetic microsphere and its application in the multi-residue analysis of pesticides and PCBs in fish byGC–MS/MS (Peng et al., 2015)	Pescado	Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS/MS)	Homogenización, extracción, limpieza, concentración, reconstitución e inyección al GC	7 PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180)	Columna: Rtx-5MS, 30m x 0,25mm; 0.25µm Volumen de inyección: 1 µL Flujo: 1,0 mL/min Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 4 min: 40°C; 25°C/min: 40-125°C; 10°C/min: 125-300°C; 10°C/min:300°C	Temperatura fuente iónica: 230°C Temperatura línea transferencia: 250°C Operado en modo de detección monitorización de reacción selectiva	LOD: 0.02 – 4.40 ng/g R ² > 0.9903
10. Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork, and chicken fat (Kim et al., 2004)	Carne de res, cerdo y pollo	Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	Homogenización, extracción, limpieza, concentración, reconstitución e inyección al GC	7 PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180)	Columna: DB-5MS, 50m x 0,25mm; 0.25µm Volumen de inyección: 2 µL Flujo: 1,0 mL/min Gas de arrastre: He Temperatura inyector: 280°C Temperatura del horno: 1	Temperatura transferencia: 290°C MS operado en modo de monitorización selectiva de iones	LOD: 2.05 pg/g

					min: 120°C; 10°C/min: 120-220°C; 4°C/min: 220-280°C; 30°C/min: 280°C		
11. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and Polybrominated Diphenyl ethers (PBDEs) in three fish species from an estuary in the southeastern coast of Brazil (Lavandier et al., 2013)	Musculo e hígado de pescado	Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS)	Saponificación, homogenización, extracción, limpieza, concentración, reconstitución e inyección al GC	25 PCBs	Columna: HP-5MS, 30m x 0,25mm; 0.25µm Volumen de inyección: 1 µL Flujo: 1,1 mL/min Temperatura inyector: 280°C Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 3 min: 75°C; 15°C/min: 75-150°C; 2°C/min: 150-260°C; 20°C/min: 260-300°C; 10 min: 300°C	Temperatura interfase: 280°C Temperatura fuente iónica: 300°C Operado en modo SIM	LOQ: 1.89 – 5.94 ng/g R ² > 0.995
12. Polychlorinated dioxins, furans (PCDD/Fs), dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) and indicator PCBs (ind-PCBs) in egg and egg products in Turkey (Olanca et al., 2014)	Huevo y productos derivados de huevo	Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	Homogenización, extracción, limpieza, concentración, reconstitución e inyección al GC	18 PCBs	Columna: DB5-MS, 60m x 0,25mm; 0.25µm Flujo: 1,2 mL/min Gas de arrastre: He Temperatura del horno (no-ortoPCBs): 20°C/min: 110-200°C; 4°C/min: 200-280°C; 20 min: 280°C; 5°C/min: 280-300°C; 8 min: 300°C Temperatura del horno (mono-orto e ind-PCBs): 20°C/min: 110- 200°C; 4°C/min: 200-300°C; 10 min: 300°C	Modo de impacto electrónico y SIM Temperatura fuente iónica: 260°C Energía electrón: 35eV Voltaje del detector: 350V	LOQ < 0.276 pg/g
13. Method development for the simultaneous determination of polybrominated, polychlorinated, mixed polybrominated/chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, polychlorinated biphenyls	Pescado	Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	Homogenización, extracción, concentración, reconstitución e inyección al GC	28 PCBs	Columna: ZB-5MS, 60m x 0,25mm; 0.25µm Flujo: 1,0 mL/min Volumen de inyección: 1 µL Temperatura inyector: 270°C Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 2 min: 75°C; 15°C/min: 75-150°C; 2,5°C/min: 150-290°C; 1 min: 290°C	Temperatura fuente iónica: 280°C Modo de ionización d impacto positivo Energía electrón: 36eV Corriente trampa: 600 µA	LOQ: 0.17-0.34 pg/g

and polybrominated diphenyl ethers in fish (Zacs et al., 2015)							
14. Uptake and depuration of PCB-153 in edible shrimp Palaemonetes varians and human health risk assessment (Grilo et al., 2014)	Camarones	Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS)	Extracción, limpieza, concentración, reconstitución e inyección al GC	PCB 153	Columna: ZB-5MS, 30m x 0,25mm; 0.25µm Flujo: 0,9 mL/min Temperatura inyector: 280°C Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 2 min: 40°C; 10°C/min: 40-180°C; 6°C/min: 180-310°C; 10 min: 310°C	Detector MS ionización de impacto electrónico en modo SIM Detector programado m/z en 360 y estándar interno en m/z en 362	LOQ < 0,25 µg/L
15. Analysis of dioxins, furans and DL-PCBs in food and feed samples from Lithuania and estimation of human intake (Godliauskiene et al., 2012)	Pescado, carne de res y cerdo. Alimento para animales	Cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	Extracción, limpieza, concentración, reconstitución e inyección al GC	No reporta	Columna: DB-5, 60m x 0,25mm; 0.25µm Flujo: 1,0 mL/min Volumen de inyección: 2 µL Gas de arrastre: He Temperatura del horno: 2 min: 120°C; 30°C/min: 120-200°C; 6°C/min: 200-280°C; 10°C/min: 280-320°C; 5 min: 320°C	Temperatura línea de transferencia: 250°C Temperatura fuente iónica: 250°C EI (energía impacto electrónico): 40eV Operado en modo SIM resolución 10000	LOQ: 0,2 ng/kg

5.2 Método propuesto para el análisis de PCBs por GC/MS

De la revisión realizada se observa de que muchos trabajos están basados en estudios realizados previamente, de la cual toman las condiciones de la preparación de la muestra y del método; y realizan ajustes en virtud de la matriz estudiada y de las condiciones propias de cada laboratorio, como por ejemplo: la tecnología del instrumento, la columna o el tipo de muestra.

En otros casos se hacen referencia a métodos propuestos por organismos de tipo regulatorio o normativo como por ejemplo: EPA (1613, 1614, 1668, 8082) o la UE (Reglamento 2017/644).

El método EPA 1613 de dilución isotópica sugiere una técnica de HRGC/HRMS, empleándose en muestras de aguas, suelos, sedimentos, lodos, tejidos y otras matrices. Si bien el método 1613 es sugerido por la EPA para la cuantificación de moléculas distintas a los PCBs (CDDs y CDFs), varios de los estudios de la tabla 5 tomaron como base el método EPA 1613 para establecer las condiciones del método para la determinación de PCBs. La similitud estructural y la posibilidad de que estos compuestos se cuantifiquen de manera conjunta con los PCBs como contaminantes en alimentos y muestras ambientales, hace que los métodos de análisis empleados para el análisis de unos u otros contaminantes, sean muy similares.

Otros métodos que sirvieron de partida para los trabajos presentados en la tabla 5 son: EPA 1612, para el análisis de bromo difenil éteres (BDEs) y sus congéneres; EPA 1668 para el análisis de congéneres de cloro bifenilos (CBs); y finalmente el método EPA 8082 para el análisis de PCBs, sin embargo este último a diferencia de los anteriores, emplea un detector ECD acoplado a un GC, mientras que el resto de los métodos sugeridos por la EPA son técnicas de HRMS acoplado a un HRGC.

De los métodos expuestos anteriormente el que presenta mayor utilidad para la determinación de PCBs fue el EPA 1668, ya que en comparación con el método EPA 8082 permite determinar la concentración de los 209 congéneres de PCBs a unos niveles de concentración muy bajos, en el orden de partes por trillón.

En las figuras 3 y 4 se muestran algunos ejemplos de los equipos utilizados para la determinación de PCBs, las marcas Agilent y Waters, corresponden a algunas de las referencias de mayor uso en los estudios consultados.

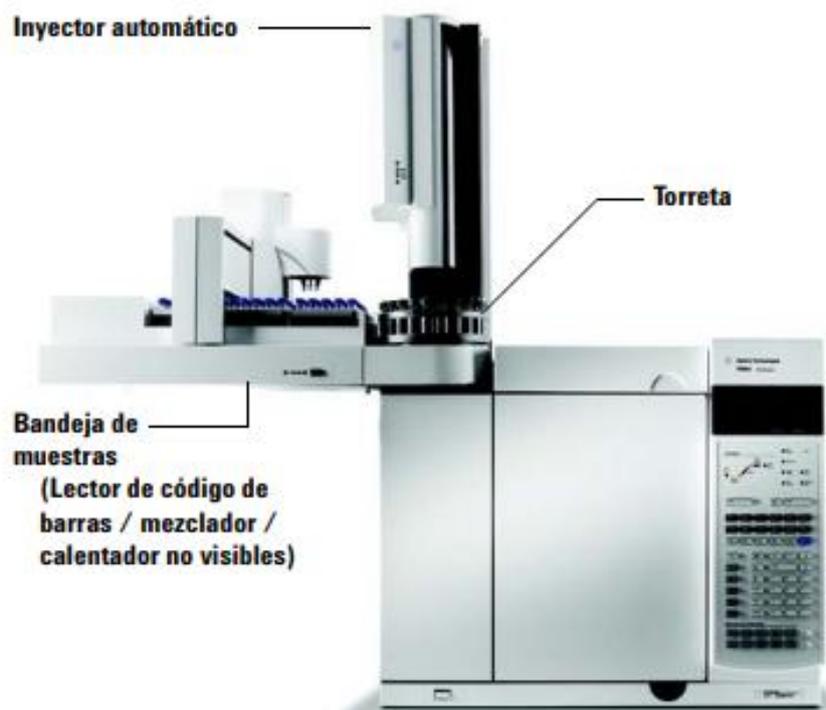


Fig. 3. Equipo de GC/MS Agilent 7890A (Tomado de <https://www.agilent.com/>, acceso 09 de Junio de 2018)



Fig. 4. Equipo GC/MS AutoSpec Premier (Tomado de http://www.waters.com/waters/home.htm?locale=en_US , acceso 08 de Junio de 2018)

5.2.1 Preparación de la muestra y limpieza

De manera general la preparación de la muestra involucra los siguientes pasos, tal como se ha descrito en los distintos estudios consultados y que se pueden observar en la columna de preparación de la muestra de la tabla 5:

- Homogenización
- Extracción
- Limpieza
- Concentración
- Reconstitución e inyección al GC

La figura 5 (Kalachova et al., 2011) muestra el flujo analítico para la determinación de PCBs y otros compuestos. Los pasos A hasta C corresponden a la preparación de la muestra.

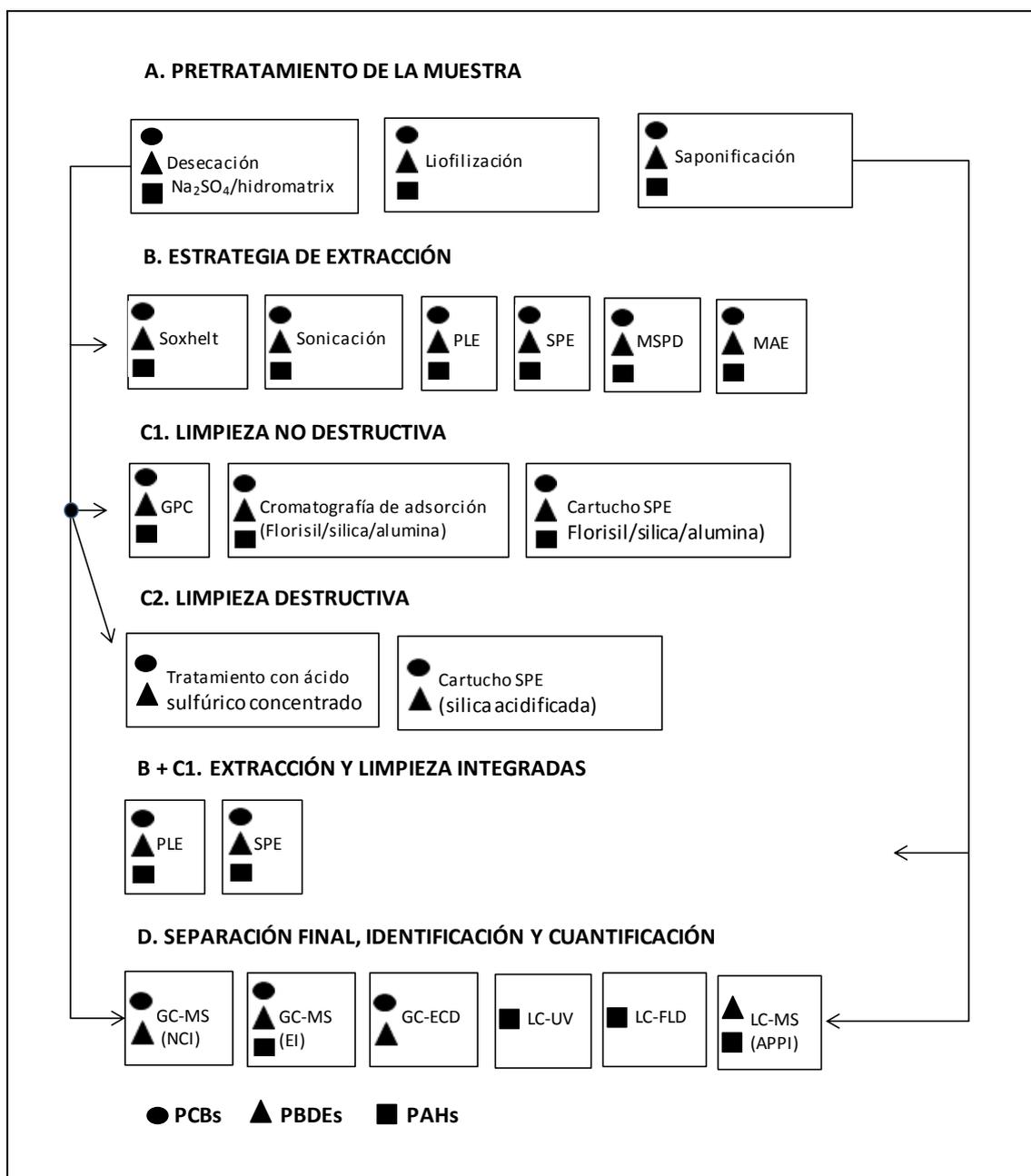


Fig. 5. Flujo de trabajo analítico para la determinación de PCBs, PBDEs y PAHs

Una vez se tiene conocimiento sobre la muestra de alimento que será estudiada, el paso se tiene que seguir es definir la cantidad de muestra que será empleada en cada determinación. Para ello es posible valerse de antecedentes que se tengan sobre la concentración de PCBs en los alimentos que se están estudiando, o partiendo de la concentración límite esperada.

En varios estudios mencionan la utilización de un equipo ultraturrax, el cual se encarga de dispersar la muestra, mientras que en otros casos se recurre a un molino, o por medio de maceración se logra la reducción del tamaño, como por ejemplo para muestras sólidas, como cereales o algunos tejidos. El objetivo de la homogenización es facilitar la extracción de los PCBs una vez se pongan en contacto con un disolvente.

En la figura 6 (Zacs et al., 2015) se observa otro flujograma de preparación de muestras para determinación de PCBs. Justo después de la homogenización se puede observar la adición de un estándares internos marcados isotópicamente (^{13}C).

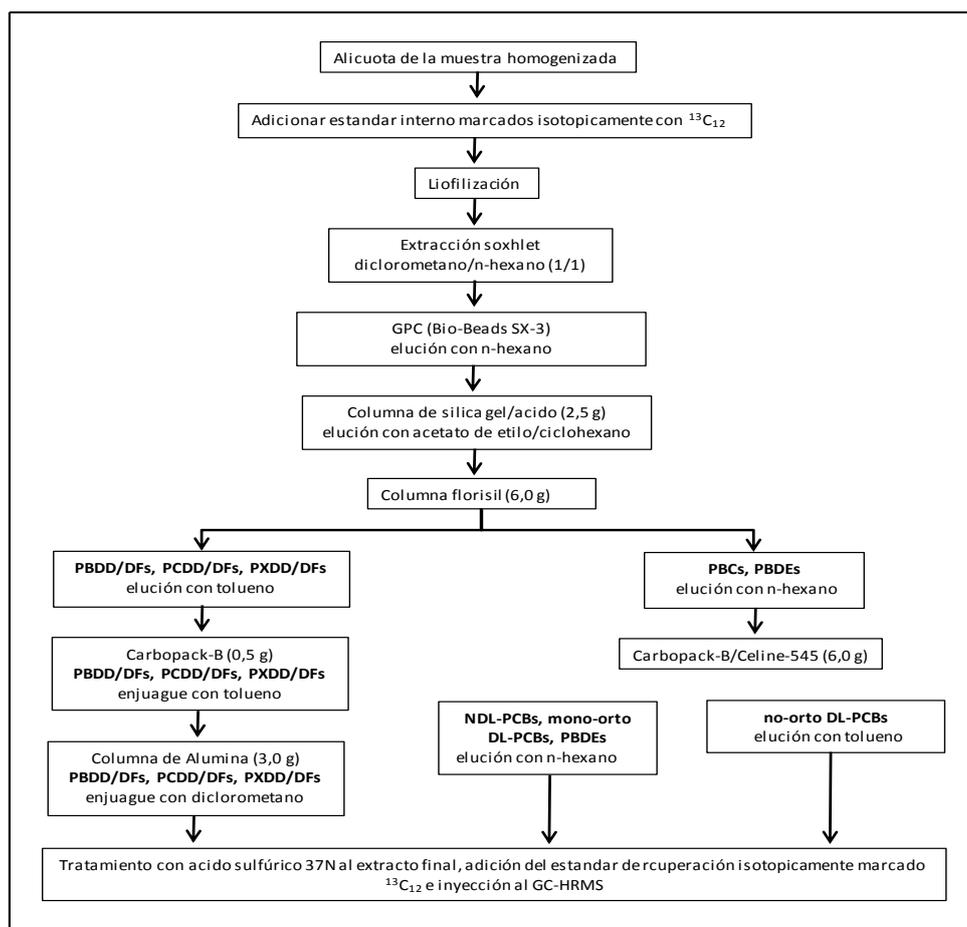


Fig. 6. Diagrama de flujo de preparación de la muestra para la determinación de PCBs en pescados

A continuación, la muestra se somete a un proceso de saponificación con un álcali fuerte como hidróxido de potasio (KOH) para eliminar la grasa, como en el caso de muestras de pescados o de ganado con alto contenido de grasa. En las muestras con alto contenido en grasa la saponificación es un proceso efectivo de purificación de la muestra. Existe la posibilidad de extraer la grasa empleando un equipo Soxtec System (Ver figura 7), tal como se realizó en el trabajo realizado por Trocino et al, 2012. Para las muestras con un alto contenido de agua, la liofilización o por medio de desecación empleando un reactivo como sulfato de sodio (Na_2SO_4) son las vías más comunes de eliminar el agua en exceso.



Fig. 7. Modelo de un equipo Soxtec 1043HT

5.2.1.1 Extracción

La purificación o limpieza de la muestra permite que los PCBs se encuentren en una concentración adecuada a través de la cual puedan extraerse, por lo que el próximo paso es definir la estrategia de extracción que se debe emplear. Entre las técnicas que existen para el aislamiento de los PCBs en alimentos están las siguientes opciones:

- Extracción con disolventes mediante agitación.
- Extracción con disolventes empleando un aparato Soxhlet.

- Extracción con disolventes empleando un aparato Soxhlet con una fuente de microondas (FMASE).
- Extracción con ultrasonificación.
- Extracción acelerada con microondas (MAE).
- Extracción acelerada con disolventes (ASE).
- Técnicas de extracción con membranas.
- Técnicas de extracción en fase sólida.

Con relación al método Soxhlet si bien aún se encuentran estudios en donde se aplica, los altos tiempos de extracción y el gran consumo de disolventes ha hecho que su utilización sea menos frecuente, además el empleo de tecnologías más eficientes en términos del rendimiento de PCBs obtenidos también ha favorecido el desuso del método Soxhlet en la extracción de PCBs. Por otra parte, desde el punto de vista ambiental no resulta conveniente, por los altos consumos de disolventes para el proceso de extracción. En la tabla 6 se relacionan ejemplos de métodos de extracción para distintos tipos de contaminantes, entre ellos PCBs.

Tabla 6. Ejemplos de métodos de extracción según el tipo de alimento estudiado (Tomado de Beyer et al., 2008)

Muestra	Analitos	Solvente	Tecnica	Referencia
Miel	Pesticidas organoclorados	Eter de petroleo/acetato de etilo (80:20, v:v)	LLE	Tahboub, Zaater y Barri (2006)
Miel	Pesticidas	Acetonitrilo, acetona, acetato de etilo o diclorometano	LLE	Rissato, Galhiane, Almeida, Gerenutti y Apon (2007)
Mantequilla	PCBs	Hexano y acetona/hexano (2:1, v:v)	LLE	Ramos, Ejarat, hernandez, Rivera y Gonzalez (1999)
Frutas y vegetales	Pesticidas y sus metabolitos	Acetato de etilo	LLE	Jansson, Pihlstrom, Osterdah y Markides (2004)
Aceite de oliva	Insecticidas organoclorados	Acetonitrilo, acetonitrilo/acetona (3:1, v:v), acetonitrilo/hexano (3:1, v:v)	LLE	Lentza-Rizos, Avramides y Cherasco (2001)
Pimientos, brocoli, tomates, naranja, limones, manzana y melon	Pesticidas	Metanol	USE	Ferrer, Garcia-reyes, Mezcuca, Thurman y Fernandez-Alba (2005)
Higado de pollo	Pesticidas clorados	Hexano/acetona (4:1, v:v)	USE	Lambropoulou et al. (2006)
Frijoles	Fenitrotión	Diclorometano	Extracción soxhlet	Diagne et al. (2002)
Leche	PCBs	Pentano/diclorometano (1:1, v:v)	Extracción soxhlet	Focant et al. (2002)
Aves de corral, cerdo y cordero	Pesticidas organofosforados	Acetato de etilo	Extracción soxhlet	Garrido Frenich et al. (2006)
Pescado	Pesticidas organoclorados	Hexano/acetona (1:1, v:v)	Extracción soxhlet	Fidalgo-Used, Centineo, Blanco-Gonzalez y Sanz-Medel (2003)
Pescado	PCBs	Hexano	Extracción soxtec	Faladysz et al. (2004)
Semillas de girasol	Residuos de pesticidas	Diclorometano	FMASE	Prados-Rosales et al. (2003)

El método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) es un método de extracción en fase sólida de bajo costo, fácil de utilizar y muy rápido. De la revisión realizada se pone de manifiesto su empleo en estudios de determinación de PCBs (Han et al., 2016), por lo que es un método conveniente para considerar en la extracción de PCBs en alimentos.

El método EPA 1668 implica una extracción con Soxhlet/dean Stark para muestras sólidas, semisólidas y multifases, mientras que para muestras de pescados y tejidos emplea una extracción Soxhlet con cloruro de metileno. Sin embargo en los estudios consultados fue poca la utilización de este método.

5.2.1.2 Disolventes empleados en la extracción

En la tabla 6 se muestran algunos disolventes empleados durante la extracción de los PCBs. De la revisión realizada sobre estudios de determinación de PCBs en alimentos, los disolventes de mayor uso son: hexano, acetona, diclorometano, n-pentano, acetonitrilo y mezclas que se dan entre ellos, generalmente en proporción 1:1.

5.2.1.3 Limpieza

El extracto obtenido del paso anterior (extracción) y que contiene PCBs se somete a un proceso de limpieza mediante una extracción inversa con ácido sulfúrico y/o una base, seguido de cromatografía por permeación de gel, silica gel o Florisil. El método EPA 3620C es un método de limpieza que utiliza Florisil y que tiene una amplia aplicación en la limpieza de extractos en la determinación de: pesticidas organoclorados, organofosforados y PCBs.

Florisil corresponde al nombre comercial del silicato de magnesio (Figura 8) con propiedades básicas, y que se utiliza para separar los analitos (PCBs) de los interferentes. El Florisil se emplea en una etapa previa a la aplicación de un método cromatográfico, como por ejemplo, en el caso de la separación de los distintos congéneres de PCBs.

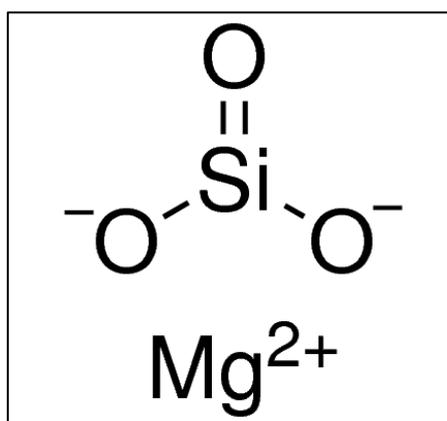


Fig. 8. Estructura del silicato de magnesio

A partir de la revisión realizada y al observar la información consignada en la tabla 6, el definir un método estándar de limpieza, resulta una tarea compleja, ya que hay una gran variedad de alternativas usadas por los autores, de manera general utilizan una cromatografía en base silica, que puede ser modificada o estar acompañada de sales, ácidos, bases, sulfatos y nitratos entre otros.

5.2.2 Condiciones instrumentales

Básicamente las condiciones del método están descritas en los apartados 4.2 y 4.3 que tratan sobre los métodos cromatográficos para la determinación de PCBs. Tal como se ha mencionado antes, el método para la determinación de PCBs es el mismo independientemente de la matriz estudiada, es decir, con unas pocas modificaciones las condiciones del método empleadas en una matriz ambiental serán las mismas que se emplean para una muestra de un alimento, como por ejemplo, pescado.

Muchos de los estudios encontrados, así como el método EPA 1668 reportan el uso de instrumentos de alta resolución, por lo que la recomendación de este trabajo es que la determinación de PCBs se realice en un equipo HRGC acoplado a un HRMS.

El cromatógrafo de gases de mayor uso en los estudios consultados son: el Agilent 7890A acoplado a un detector de triple cuadrupolo 7000A (Figura 3) y la referencia Agilent 6890 (Figura 9) acoplado a un espectrómetro de masas Autospec Ultima de Waters (Figura 4).



Fig. 9. Equipo de GC Agilent 6890 (Tomado de <https://www.agilent.com/>, acceso 09 de Junio de 2018)

La recomendación de este trabajo es el empleo de un cromatógrafo de gases, en lo posible de alta resolución acoplado a un detector de masas de triple cuadrupolo.

5.2.2.1 Cromatógrafo de gases (HRGC)

A continuación se muestran las condiciones de operación del cromatógrafo de gases para el método propuesto:

Columna: las referencias HP-5MS (Agilent), DB5MS (Agilent J&W) y ZB-5MS (phenomenex) son las marcas de columnas que mayormente fueron empleadas en los estudios consultados. Todas estas referencias y algunas de otras marcas corresponden a la fase G27 (USP), es la misma columna utilizada en el método para PCBs en muestras ambientales y en el método que emplea el detector ECD. Las dimensiones de la columna pueden variar en su longitud de un estudio a otro, se sugiere emplear la de mayor dimensión (60m x 0,25mm; 0.25 μ m), para asegurar una adecuada resolución entre los PCBs.

Flujo: el flujo se establecería en un valor entre 1 a 1,3 mL/min, dependería un poco del instrumento, de la respuesta, de que el sistema cromatográfico este adecuado y del cumplimiento de los requerimientos establecidos por QA/QC.

Gas de arrastre: Helio, la mayoría de los estudios consultados emplearon este gas.

Volumen de inyección: se sugiere iniciar con un volumen de 1 μ L, y evaluar la respuesta de los picos cromatográficos, así como el desempeño de los parámetros cromatográficos. En caso de ser necesario incrementar el volumen o plantear cambios en el proceso de purificación/extracción, por ejemplo en el caso que la señal este cerca al límite de cuantificación.

Temperatura del inyector: 270°C

Temperatura de la interfase: 290°C

Temperatura del horno: la programación de la temperatura se puede observar en la tabla 7 que se presenta a continuación.

Tabla 7. Programación de la temperatura del horno del GC

Temperatura (°C)	Gradiente (°C/min)
75	0*
150	15
290	2,5
290	0**

*2 minutos al inicio a 75°C **10-15 minutos en 290°C

5.2.2.2 Espectrómetro de masas (HRMS)

El espectrómetro de masas debe utilizarse en modo de detección de monitorización selectiva de iones, para ello se sugieren los siguientes parámetros de operación:

Energía de ionización: un valor cercano a 40eV debería ser capaz de una monitorización selectiva de iones con una resolución mayor a 10000.

Interfase GC/MS: en relación a la interfase del espectrómetro de masas es necesario asegurar que la columna que viene del GC se encuentra a un 1 cm de la fuente iónica, de manera que no interfiera en el flujo de electrones.

Temperatura de la fuente iónica: la temperatura debe ser la misma o estar cercana al valor de la temperatura de la interfase, por lo que un valor de 280°C es adecuada.

Procesamiento de los datos: el HRMS debe contar con un software que integrado al equipo permita la colección, registro, almacenamiento y procesamiento de los datos generados del espectrómetro de masas. De manera general, cada marca de equipo viene con su propia versión de software.

Factores de respuesta y calibraciones multipuntos: el software del MS debe mantener registros y listas de los factores de respuesta (radio de respuesta para dilución isotópica) y calibraciones multipuntos.

Rango de masa: m/z 45-750

5.2.3 Control de calidad

Una vez definidas las condiciones de operación del cromatógrafo de gases y del espectrómetro de masas, el siguiente paso es establecer parámetros que aseguren que el método es adecuado para los objetivos que se pretenden, por ejemplo: identificación o cuantificación. Es por ello, por lo que la instrumentación es tan importante como el hecho de que parámetros como el límite de detección y cuantificación se encuentren por debajo de la concentración esperada para los PCBs o que la resolución sea suficiente de manera que puedan diferenciar cada una de las señales de PCBs, sin que se presente superposición de cada uno de ellos.

Tiempos de retención de los congéneres: es necesario realizar una inyección de 1 o 2µL con el propósito de establecer tanto la respuesta de la señal, como el tiempo de retención de cada uno de los congéneres. Los tiempos de retención se definirán por

comparación con cada uno de los estándares de los congéneres or comparación con cada uno de los estándares de los congéneres. En caso de que los tiempos de retención excedan el tiempo de análisis cromatográfico, es necesario considerar realizar cambio en el gradiente de temperatura o una ampliación en el tiempo de análisis.

Relación de abundancia iónica, niveles mínimos y relación señal-ruido: a partir de una inyección de los estándares se debe determinar las áreas de cada congénere o grupo de congéneres, y calcular la relación de abundancia iónica para cada m/z. El espectrómetro debe utilizarse en modo de corrección de la deriva de masa. El lock mass, se define como la masa de un ion con valor de relación m/z conocida, derivado de un estándar de un compuesto conocido que ha sido adicionado a una muestra y que se introduce a una fuente iónica para ser analizado. Cada lock mass debe ser monitoreado y no debe variar más de un $\pm 20\%$ dentro de su respectivo tiempo de retención.

Deben definirse los niveles mínimos de cuantificación, para ello se establecerá la respuesta de 10 inyecciones de un blanco para un medio de muestra (agua, aceite, tejido, etc.). El nivel mínimo debería ser no menos de 2 veces la desviación estándar encontrada. De acuerdo con la tabla 5, el límite de cuantificación del método debe ser al menos 1pg/g.

Resolución del MS: el poder de resolución del instrumento deberá ser mínimo de 10000, para ello es posible utilizar un estándar de PFK (perfluoroqueroseno), encontrándose un fragmento con relación m/z a 330.9792 o dentro del rango de 300 a 350. La escala de detección debe ajustarse de manera que no exceda el 10% de la escala total de deflexión.

Curva de calibración: la curva de calibración deberá contar con un mínimo de 5 puntos. La relación entre respuesta relativa vs la concentración en las disoluciones de calibración se calcula en el intervalo de calibración. La respuesta relativa se calcula teniendo en cuenta las áreas generadas por las respuestas primarias y secundarias de la relación exacta de m/z. Este mismo proceso deberá realizarse en el caso del empleo de estándar interno, en el cual no se habla de respuesta relativa, sino de factor de respuesta (RF).

Definir la precisión y recuperación del método: es necesario determinar la recuperación del método, para ello se deberá cargar la matriz con un estándar y definir la recuperación, el cual se calcula mediante la siguiente formula:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Concentración encontrada } \left(\frac{ng}{mL}\right)}{\text{Concentración adicionada } \left(\frac{ng}{mL}\right)} \times 100$$

El cálculo de las concentraciones en matrices solidas o acuosas se calculan mediante las siguientes formulas:

$$\text{Concentración en sólidos } \left(\frac{ng}{kg}\right) = \frac{(C_{ex} \times V_{ex})}{W_s}$$

$$\text{Concentración en fase acuosa } \left(\frac{pg}{L}\right) = \frac{(C_{ex} \times V_{ex})}{V_s}$$

Donde:

C_{ex} = concentración del extracto

V_{ex} = volumen del extracto

W_s = peso de la muestra

V_s = volumen de la muestra

Finalmente la concentración en un extracto (C_{ex}) se calcula con la fórmula que se muestra abajo, en donde A1 y A2 hace referencia a las respuestas primaria y secundaria del estándar añadido y del estándar interno, mientras que RF es el factor de respuesta para cada uno de los PCBs. C_{is} es la concentración del estándar interno.

$$C_{ex} \left(\frac{ng}{mL}\right) = \frac{(A1_s + A2_s)C_{is}}{(A1_{is} + A2_{is})RF}$$

La recuperación debe encontrarse en un rango entre 30 y 120% para todos los congéneres para considerarse un método aceptable según los métodos de la EPA 1613B, 1668A y 1614.

Exactitud: la exactitud se expresará en función de la recuperación, para lo cual es necesario conocer tanto el porcentaje de recuperación (R), como la desviación estándar del porcentaje de recuperación (S_R). La exactitud queda expresada como el rango entre $R-2 S_R$ a $R+2 S_R$.

6. Conclusiones

Partiendo de los objetivos planteados para este trabajo y de acuerdo a la relevancia de la problemática que se pone de manifiesto durante el desarrollo del mismo, las conclusiones que se desprenden de la presente revisión son:

- Se estima que 750 mil toneladas de PCBs se encuentran en la biosfera siendo causantes de trastornos reproductivos, de crecimiento y desarrollo psicomotor, metabólicos y cáncer. Los procesos de cáncer producidos a través de la exposición a PCBs pudieran estar relacionados con muerte celular a través de un mecanismo de apoptosis.
- A través del estudio bibliográfico se pudo comprobar la gran cantidad de investigaciones que existen sobre la determinación de PCBs en alimentos y con ello la presencia de los mismos en humanos, principalmente en muestras sanguíneas y leche materna.
- Los animales marinos mediante la dieta suelen ser la principalmente fuente de PCBs para los humanos. Siendo el PCB 153 uno de los más comunes en los estudios consultados.
- Las técnicas colorimétrica, electroquímica, ELISA y CALUX resultan ser buenas alternativas en etapas iniciales del proceso analítico, como técnicas de detección, sin embargo su utilidad en términos cuantitativos es limitada.
- Debido a las propiedades fisicoquímicas de los PCBs el método más adecuado para la determinación de PCBs es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se muestra que la cromatografía líquida presenta una utilidad en las etapas previas a la cuantificación, como parte de la preparación de la muestra, más específicamente durante el proceso de limpieza o fraccionamiento de los extractos.
- Dentro de las condiciones de trabajo para el método propuesto es importante resaltar el gas de arrastre utilizado, la columna, la temperatura del horno y los parámetros de operación del espectrómetro de masas. Estas condiciones propuestas pueden variar en función de las referencias de los materiales y

equipos utilizados. Las condiciones de trabajo están disponibles en el capítulo 5.

- Como parte de la idoneidad del método es necesario evaluar la relación de abundancia iónica, la resolución de ambos instrumentos, la exactitud en función de la recuperación, precisión y de unos niveles mínimos de cuantificación.

7. Referencias bibliográficas

1. Abdallah, M. A., Zaky, A. H., & Covaci, A. (2017). Levels and profiles of organohalogenated contaminants in human blood from egypt. *Chemosphere*, 176, 266-272.
2. Access Washington. Estado de Washington. Estados Unidos de América (USA). <https://fortress.wa.gov/ecy/publications/documents/1509052.pdf> (acceso 29 de Mayo 2018)
3. Agencia para las sustancias toxicas y registro de enfermedades (ATSDR). <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=30&po=8> (acceso 10 de febrero 2018)
4. Bordajandi, L. R., Abad, E., & González, M. J. (2008). Occurrence of PCBs, PCDD/Fs, PBDEs and DDTs in spanish breast milk: Enantiomeric fraction of chiral PCBs. *Chemosphere*, 70(4), 567-575.
5. Cettier, J., Bayle, M., Béranger, R., Billoir, E., Nuckols, J. R., Combourieu, B., & Fervers, B. (2015). Efficiency of wipe sampling on hard surfaces for pesticides and PCB residues in dust. *Science of the Total Environment*, 505, 11-21.
6. Cheng, R., Liu, S., Shi, H., & Zhao, G. (2018). A highly sensitive and selective aptamer-based colorimetric sensor for the rapid detection of pcb 77. *Journal of Hazardous Materials*, 341, 373-380.
7. Cloutier, P., Fortin, F., Groleau, P. E., Brousseau, P., Fournier, M., & Desrosiers, M. (2017). QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples. *Talanta*, 165, 332-338.
8. Crespo, M. P., & Yusty, M. L. (2005). Comparison of supercritical fluid extraction and soxhlet extraction for the determination of PCBs in seaweed samples. *Chemosphere*, 59(10), 1407-1413.
9. Código electrónico de regulaciones federales (ECFR). Estados Unidos de América (USA). <https://www.ecfr.gov/cgi-bin> (acceso 3 Marzo 2018)
10. Deshpande, A. D., Dockum, B. W., Cleary, T., Farrington, C., & Wieczorek, D. (2013). Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in young-of-the-year bluefish (*pomatomus saltatrix*) in the vicinity of a superfund site in new bedford harbor, massachusetts, and in the adjacent waters. *Marine Pollution Bulletin*, 72(1), 146-164.
11. Durante, C. A., Santos-Neto, E. B., Azevedo, A., Crespo, E. A., & Lailson-Brito, J. (2016). POPs in the south latin america: Bioaccumulation of DDT, PCB, HCB, HCH and mirex in blubber of common dolphin (*delphinus delphis*) and fraser's dolphin

- (lagenodelphis hosei) from argentina. *Science of the Total Environment*, 572, 352-360.
12. Erickson, M. D. (1997). *Analytical chemistry of PCBs* CRC press.
 13. Fromberg, A., Granby, K., Højgård, A., Fagt, S., & Larsen, J. C. (2011). Estimation of dietary intake of PCB and organochlorine pesticides for children and adults. *Food Chemistry*, 125(4), 1179-1187.
 14. Fromme, H., Hilger, B., Albrecht, M., Gries, W., Leng, G., & Völkel, W. (2016). Occurrence of chlorinated and brominated dioxins/furans, PCBs, and brominated flame retardants in blood of german adults. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(4-5), 380-388.
 15. Gascon, M., Verner, M., Guxens, M., Grimalt, J. O., Forn, J., Ibarluzea, J., Haddad, S. (2013). Evaluating the neurotoxic effects of lactational exposure to persistent organic pollutants (POPs) in spanish children. *Neurotoxicology*, 34, 9-15.
 16. Glynn, A., Larsdotter, M., Aune, M., Darnerud, P. O., Bjerselius, R., & Bergman, Å. (2011). Changes in serum concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs), hydroxylated PCB metabolites and pentachlorophenol during pregnancy. *Chemosphere*, 83(2), 144-151.
 17. Godliauskienė, R., Petraitis, J., Jarmalaitė, I., & Naujalis, E. (2012). Analysis of dioxins, furans and DL-PCBs in food and feed samples from lithuania and estimation of human intake. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4169-4174.
 18. Grilo, T., Cardoso, P., Pato, P., Duarte, A., & Pardal, M. (2014). Uptake and depuration of PCB-153 in edible shrimp *Palaemonetes varians* and human health risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 101, 97-102.
 19. Haines, D. A., Khoury, C., Saravanabhavan, G., Werry, K., Walker, M., & Malowany, M. (2017). Human biomonitoring reference values derived for persistent organic pollutants in blood plasma from the canadian health measures survey 2007–2011. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(4), 744-756.
 20. Han, L., Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. (2014). Streamlined sample cleanup using combined dispersive solid-phase extraction and in-vial filtration for analysis of pesticides and environmental pollutants in shrimp. *Analytica Chimica Acta*, 827, 40-46.
 21. Hasegawa, J., Guruge, K. S., Seike, N., Shirai, Y., Yamata, T., Nakamura, M., . . . Miyazaki, S. (2007). Determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in fish oils for feed ingredients by congener-specific chemical analysis and CALUX bioassay. *Chemosphere*, 69(8), 1188-1194.

22. Jones, R. P., Millward, R. N., Karn, R. A., & Harrison, A. H. (2006). Microscale analytical methods for the quantitative detection of PCBs and PAHs in small tissue masses. *Chemosphere*, 62(11), 1795-1805.
23. Kim, M., Kim, S., Yun, S., Lee, M., Cho, B., Park, J., Kim, O. (2004). Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork, and chicken fat. *Chemosphere*, 54(10), 1533-1538.
24. Konieczka, P., Wolska, L., & Namieśnik, J. (2010). Quality problems in determination of organic compounds in environmental samples, such as PAHs and PCBs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 706-717.
25. Lavandier, R., Quinete, N., Hauser-Davis, R. A., Dias, P. S., Taniguchi, S., Montone, R., & Moreira, I. (2013). Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in three fish species from an estuary in the southeastern coast of Brazil. *Chemosphere*, 90(9), 2435-2443.
26. Lee, C. C., Lin, H. T., Kao, Y. M., Chang, M. H., & Chen, H. L. (2016). Temporal trend of polychlorinated dibenzo-p-dioxin/polychlorinated dibenzofuran and dioxin like-polychlorinated biphenyl concentrations in food from Taiwan markets during 2004-2012. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 644-652. doi:S1021-9498(16)30027-8 [pii]
27. Lemarchand, C., Rosoux, R., & Berny, P. (2010). Organochlorine pesticides, PCBs, heavy metals and anticoagulant rodenticides in tissues of Eurasian otters (*Lutra lutra*) from upper Loire river catchment (France). *Chemosphere*, 80(10), 1120-1124.
28. Lind, L., Salihovic, S., Lampa, E., & Lind, P. M. (2017). Mixture effects of 30 environmental contaminants on incident metabolic syndrome—A prospective study. *Environment International*, 107, 8-15.
29. Moschou, D., Greathead, L., Pantelidis, P., Kelleher, P., Morgan, H., & Prodromakis, T. (2016). Amperometric IFN- γ immunosensors with commercially fabricated PCB sensing electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 805-810.
30. Olanca, B., Cakirogullari, G. C., Ucar, Y., Kirisik, D., & Kilic, D. (2014). Polychlorinated dioxins, furans (PCDD/Fs), dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) and indicator PCBs (ind-PCBs) in egg and egg products in Turkey. *Chemosphere*, 94, 13-19.
31. Olšovská, J., Křesinová, Z., Flieger, M., & Cajthaml, T. (2010). Separation of PCBs by liquid chromatography on reversed phase sub-2-micron particle columns. *Talanta*, 80(5), 1849-1855.
32. Peng, X., Jiang, L., Gong, Y., Hu, X., Peng, L., & Feng, Y. (2015). Preparation of mesoporous ZrO₂-coated magnetic microsphere and its application in the multi-residue analysis of pesticides and PCBs in fish by GC-MS/MS. *Talanta*, 132, 118-125.

33. Perugini, M., Manera, M., Tavoloni, T., Lestingi, C., Pecorelli, I., & Piersanti, A. (2013). Temporal trends of PCBs in feed and dietary influence in farmed rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 141(3), 2321-2327.
34. Pinson, A., Franssen, D., Gérard, A., Parent, A., & Bourguignon, J. (2017). Neuroendocrine disruption without direct endocrine mode of action: Polychlorobiphenyls (PCBs) and bisphenol A (BPA) as case studies. *Comptes Rendus Biologies*, 340(9-10), 432-438.
35. Pizarro-Aranguiz, N., Galbán-Malagón, C., Ruiz-Rudolph, P., Araya-Jordan, C., Maddaleno, A., & San Martin, B. (2015). Occurrence, variability and human exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) in dairy products from Chile during the 2011–2013 survey. *Chemosphere*, 126, 78-87.
36. Priego-Capote, F., & de Castro, M. L. (2005). Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: A convincing alternative for total fat isolation from bakery products. *Talanta*, 65(1), 81-86.
37. Quinete, N., Esser, A., Kraus, T., & Schettgen, T. (2016). Determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in human urine in a highly occupationally exposed German cohort: New prospects for urinary biomarkers of PCB exposure. *Environment International*, 97, 171-179.
38. Quinete, N., Kraus, T., Belov, V. N., Aretz, C., Esser, A., & Schettgen, T. (2015). Fast determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls in human plasma by online solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 888, 94-102.
39. Quinete, N., Lavandier, R., Dias, P., Taniguchi, S., Montone, R., & Moreira, I. (2011). Specific profiles of polybrominated diphenylethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in fish and tucuxi dolphins from the estuary of Paraíba do Sul river, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 62(2), 440-446.
40. Ribas-Fito, N., Sala, M., Kogevinas, M., & Sunyer, J. (2001). Polychlorinated biphenyls (PCBs) and neurological development in children: A systematic review. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 55(8), 537-546.
41. Rodgers, K. M., Udesky, J. O., Rudel, R. A., & Brody, J. G. (2018). Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environmental Research*, 160, 152-182.
42. Roszko, M., Szterk, A., Szymczyk, K., & Waszkiewicz-Robak, B. (2012). PAHs, PCBs, PBDEs and pesticides in cold-pressed vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(3), 389-400.

43. Roszko, M., Jędrzejczak, R., & Szymczyk, K. (2014). Polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorine pesticides in selected cereals available on the polish retail market. *Science of the Total Environment*, 466, 136-151.
44. Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. (2013). Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 758, 80-92.
45. Shi, H., Zhao, J., Wang, Y., & Zhao, G. (2016). A highly selective and picomolar level photoelectrochemical sensor for PCB 101 detection in environmental water samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 81, 503-509.
46. Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2011). Preparación de la muestra: Um passo crucial para el análisis de GC-MS. *Uma Publicação Trimestral do Instituto Internacional De Cromatografia (IIC) Ciência Cromatográfica*, 3(1)
47. Torres, P., Miglioranza, K. S. B., Uhart, M., Gonzalez, M., & Commendatore, M. (2015). Organochlorine pesticides and PCBs in southern right whales (*eubalaena australis*) breeding at península valdés, argentina. *Science of the Total Environment*, 518, 605-615.
48. Tsukimori, K., Uchi, H., Tokunaga, S., Yasukawa, F., Chiba, T., Kajiwara, J., . . . Furue, M. (2013). Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in yusho mothers and their descendants: Association with fetal yusho disease. *Chemosphere*, 90(5), 1581-1588.
49. Tsutsumi, T., Amakura, Y., Okuyama, A., Tanioka, Y., Sakata, K., Sasaki, K., & Maitani, T. (2006). Application of an ELISA for PCB 118 to the screening of dioxin-like PCBs in retail fish. *Chemosphere*, 65(3), 467-473.
50. Van der Fels-Klerx, H., Adamse, P., de Jong, J., Hoogenboom, R., de Nijs, M., & Bikker, P. (2017). A model for risk-based monitoring of contaminants in feed ingredients. *Food Control*, 72, 211-218.
51. Van Emon, J. M., Chuang, J. C., Bronshtein, A., & Altstein, M. (2013). Determination of polychlorinated biphenyls in soil and sediment by selective pressurized liquid extraction with immunochemical detection. *Science of the Total Environment*, 463, 326-333.
52. Winkler, J. (2015). High levels of dioxin-like PCBs found in organic-farmed eggs caused by coating materials of asbestos-cement fiber plates: A case study. *Environment International*, 80, 72-78.

53. Yahia, D., & Elsharkawy, E. E. (2014). Multi pesticide and PCB residues in Nile tilapia and catfish in Assiut city, Egypt. *Science of the Total Environment*, 466, 306-314.
54. Zacs, D., Rjabova, J., Viksna, A., & Bartkevics, V. (2015). Method development for the simultaneous determination of polybrominated, polychlorinated, mixed polybrominated/chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish. *Chemosphere*, 118, 72-80.
55. Zhang, X., Hong, Q., Yang, L., Zhang, M., Guo, X., Chi, X., & Tong, M. (2015). PCB1254 exposure contributes to the abnormalities of optomotor responses and influence of the photoreceptor cell development in zebrafish larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 133-138.
56. Zheng, X., Li, H., Xia, F., Tian, D., Hua, X., Qiao, X., & Zhou, C. (2016). An electrochemical sensor for ultrasensitive determination of polychlorinated biphenyls. *Electrochimica Acta*, 194, 413-421.