



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES**

**ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE PCBs E HO-PCBs EN PLASMA
HUMANO**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

L.Q. LIDIA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN NELINHO PÉREZ MALDONADO

COMITÉ TUTELAR:

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ

DRA. MARIA DEOGRACIAS ORTIZ PÉREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES**

**ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE PCBs E HO-PCBs EN PLASMA
HUMANO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

L.Q. LIDIA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN NELINHO PÉREZ MALDONADO

SINODALES:

PRESIDENTE:

DR. IVÁN NELINHO PÉREZ MALDONADO _____

SECRETARIO:

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ _____

VOCAL:

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA _____

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

MAYO DE 2009

**PROYECTO REALIZADO EN:
EL DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE
LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ, BAJO LA TUTORÍA DEL DR. IVÁN
NELINHO PÉREZ MALDONADO.**

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)
BECA-TESIS CONVENIO No. 207095**

**LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES ESTA INCLUIDA EN EL
PADRON NACIONAL DE POSGRADOS DEL CONACYT.**

AGRADECIMIENTOS:

A mi hija Anadelia, la cual es mi motivo de superación.

A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional.

Al Dr. Iván Pérez y Dr. Fernando Díaz-Barriga por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su asesoría.

En especial a la Dra. Pury por su valiosa asesoría en el desarrollo de mi tesis, gracias por todo el tiempo dedicado.

Al Dr. Jorge Torres y al Maestro Marco Martín González Chávez por su amistad y asesoría en la estandarización de la reacción de derivatización.

A mis amig@s Mariana Cárdenas, Maribel Medina, Valeria Martín, Yei Rentería, Paty Muñiz, Octavio Gáspar.

A todo el personal, compañeros y amig@s del Laboratorio de Toxicología Ambiental, Leticia Carrizales, Jorge Alegría, Lilia Bártres...

I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar un método analítico para cuantificar PCBs e HO-PCBs en plasma humano. El análisis fue realizado por medio de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. 2,2',3,4,5,5'-hexaclorobifenilo marcado con ^{13}C (CB 141- $^{13}\text{C}_{12}$) y 4-hidroxi-2,2',3,4',5,5',6-heptaclorobifenilo marcado con ^{13}C (4-HO-CB187- $^{13}\text{C}_{12}$), fueron empleados como estándares internos en la cuantificación de PCBs e HO-PCBs, obteniéndose un 76 ± 10 y $89 \pm 7\%$ de recuperación, respectivamente. La validación del método se realizó utilizando puntos control en plasma fortificado a (15 y 50 $\mu\text{g/L}$) para PCBs y (5 y 15 $\mu\text{g/L}$) para los HO-PCBs, obteniéndose porcentajes de recuperación entre 92-108% y coeficientes de variación de 1.5 a 18%. Los límites de detección se encontraron en un rango de 1.12-2.58 y 0.38-0.85 $\mu\text{g/L}$ para PCBs e HO-PCBs, respectivamente; y los límites de cuantificación de 2.46-5.66 $\mu\text{g/L}$ para PCBs y de 0.80-1.76 $\mu\text{g/L}$ para HO-PCBs. Finalmente, se cuantificaron PCBs e HO-PCBs en 10 pools y 4 muestras individuales de la comunidad de San Nicolás, Qro.; analizadas dentro del control de calidad interno establecido, confirmando que la metodología desarrollada es confiable para la cuantificación de ambos compuestos.

Palabras clave: PCBs, HO-PCBs, derivatización, trimetilsilildiazometano, COPs.

II. INTRODUCCIÓN

Los PCBs son compuestos orgánicos clorados con fórmula general condensada $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$ en la que n puede tomar valores desde 1 hasta 10, lo que teóricamente genera hasta 209 compuestos individuales o congéneres, de los cuales alrededor de 130 están presentes en productos comerciales (Schulz, y cols. 1989). Se sintetizaron por primera vez en 1881, pero fueron producidos comercialmente desde 1929 hasta finales de los 70's. Debido a sus propiedades tuvieron un extenso uso como fluidos de transferencia de calor, lubricantes hidráulicos y fluidos dieléctricos en transformadores y capacitores, así como pigmentos para pinturas, barnices, tintas para impresión, balastos, ceras, plastificantes de resinas y hules, papel para copia sin carbón, interruptores de alta tensión y bobinas reguladoras (ATSDR, 2004; Erickson, 1997 y Safe 1992). El extenso uso y manejo inapropiado durante su manufactura y disposición, ocasionó su introducción al medio ambiente. Debido a su amplia capacidad de distribución y transporte en diferentes compartimentos ambientales (agua, aire, sedimento, entre otros); tanto animales como humanos se encuentran expuestos a través de diferentes vías y su alta lipofilidad les confiere la capacidad de bioacumularse en tejido adiposo (Safe, 1992; EPA, 1995; WHO, 2000 y ATSDR, 2004).

Los impactos y efectos adversos a la salud humana por exposición a PCBs dependen de diferentes factores, como: niveles, vías, periodos de exposición, metabolismo, así como la toxicidad de los diferentes congéneres y metabolitos

presentes en la mezcla e inclusive la de otros tóxicos y la susceptibilidad de las especies (WHO, 2000 y ATSDR, 2004).

El metabolismo o biotransformación de xenobióticos, incluyendo los PCBs, generalmente termina con la formación de compuestos más polares que su forma nativa, los cuales subsecuentemente serán eliminados del organismo (Peña; 2001). Para el caso de los PCBs, el metabolismo de los mismos conlleva a la formación de metabolitos hidroxilados (HO-PCBs) entre otros, aunque estos compuestos (HO-PCBs) son mas polares que los PCBs, algunos HO-PCBs con ciertas características estructurales son retenidos en plasma (Bergman y cols., 1994). La estructura que presentan tiene un gran parecido con la tiroxina (hormona tiroidea; T4) y estudios realizados *in vivo* con ratas e *in vitro* con transtiretina (TTR) humana, demuestran que este tipo de HO-PCBs tienen una afinidad de 6 a 10 veces mayor que la tiroxina (T4) por el sitio de enlace con su proteína transportadora, transtiretina (TTR), interfiriendo en el transporte de hormonas tiroideas e incrementando la eliminación de T4 (Lans y cols., 1993 y Brouwer y cols., 1990), lo cual probablemente está relacionado con otro tipo de efectos endocrinos, neurológicos y reproductivos dependientes de la hormona T4. La afinidad de ciertos HO-PCBs por la TTR, es probablemente el mecanismo de su alta y selectiva retención en sangre de humanos y animales (Bergman y cols., 1994).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es obtener una metodología analítica validada capaz de determinar niveles de PCBs e HO-PCBs en plasma humano.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Iso-octano, *n*-hexano (HX), diclorometano (DCM), acetona y tolueno grado pesticida, adquiridos por Burdick & Jackson. Metanol anhidro (MeOH; 99.98%), etanol anhidro (99.7%), sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ (99.3%), ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄, 97.5%), sulfato de sodio anhidro Na₂SO₄ y cartuchos de florisil (1000 mg/6mL, MgO 3.6 SiO₂) adquiridos por JT Baker. Para la derivatización se empleó trimetilsilildiazometano (TMSDM) obtenido en solución 2M en hexano por Sigma-Aldrich Inc.

Estándares Internos: 2,2',3,4,5,5'-hexaclorobifenilo marcado con ¹³C (CB 141-¹³C₁₂, pureza isotópica 99%, 40 ± 2 mg/L in nonano) obtenido por los laboratorio Cambridge Isotope Inc (Andover, MA, USA). 4-hidroxi-2,2',3,4',5,5',6-heptaclorobifenilo marcado con ¹³C (4-HO-CB187-¹³C₁₂, M4H187, pureza química >98%, pureza isotópica >99%, 50 ± 2.5 mg/L en tolueno), obtenidos por los laboratorios Wellington Inc.

Estándares para la cuantificación de bifenilos policlorados, (PCBs; 100 mg/L en hexano) obtenidos por ULTRA (Kinsgtown, USA): PCB 28 (2,4,4'-triclorobifenilo), PCB 52 (2,2',5,5'-tetraclorobifenilo), PCB 101 (2,2',4,5,5'-pentaclorobifenilo), PCB 99 (2,2',4,4',5-pentaclorobifenilo), PCB 118 (2,3',4,4',5-pentaclorobifenilo), PCB

153 (2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo), PCB 105 (2,3,3',4,4'-pentaclorobifenilo), PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenilo), PCB 187 (2,2',3,4',5,5',6-heptaclorobifenilo), PCB 183 (2,2',3,4,4',5',6-heptaclorobifenilo), PCB 128 (2,2',3,3',4,4'-hexaclorobifenilo), PCB 156 (2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenilo), PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenilo), PCB 170 (2,2',3,3',4,4',5-heptaclorobifenilo), PCB128 (2,2',3,3',4,4'-hexaclorbifenilo).

Estándares para la cuantificación de Hidroxi-PCBs (HO-PCBs) como Metoxi-PCBs (MeO-PCBs), (50 ± 2.5 mg/L en nonano), obtenidos por los laboratorios Wellington Inc: 4-hidroxi-2,3,3',4',5-pentaclorobifenilo (4-HO-CB107, 4H107), 4-hidroxi-2,2',3,4',5,5'-hexaclorobifenilo (4-HO-CB146, 4H146), 4'-hidroxi-2,2',3,3',4,5,5'-heptaclorobifenilo (4'-HO-CB172, 4H172), 4-hidroxi-2,2',3,4',5,5',6 – heptaclorobifenilo (4-HO-CB187, 4H187) y 4-metoxi-2,2',3,4',5,5'-hexaclorobifenilo (4-MeO-CB146, 4M146).

Método

Extracción, separación y limpieza de PCBs e HO-PCBs

Esta parte de la metodología está basada principalmente en el método desarrollado por Sandanger y cols. 2004, con algunas modificaciones. A 2 mL de plasma se le adicionaron los estándares internos CB 141- $^{13}\text{C}_{12}$ y 4-HO-CB187- $^{13}\text{C}_{12}$ a una concentración de 25 y 7.5 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, tanto a las muestras como a los estándares que sirvieron para construir la curva de calibración y puntos

control, se mezcló en vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 60 minutos.

Posteriormente, se le adicionaron 2 mL de alcohol desnaturalizado, 2 mL de sulfato de amonio saturado y se mezcló en vortex por 15 segundos (desnaturalización de proteínas). Se extrajo con 6 mL de hexano, se agitó en vortex durante 4 minutos y centrifugó a 2,300 rpm, a 20°C por 8 minutos, finalmente se separó la fase orgánica obtenida a pH neutro y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Fue re-extraído 2 veces más, siguiendo el mismo procedimiento y se juntaron las 3 fases orgánicas obtenidas. La fase acuosa, residuo del procedimiento anterior se acidificó a pH aproximado de 1 ó 2 usando 100 μL de H_2SO_4 y se extrajo dos veces con 6 mL de Hexano:Diclorometano (HX:DCM) (3:1), se agitó en vortex durante 4 minutos, centrifugó a 2,300 rpm, a 20°C por 8 minutos, obteniéndose dos extractos orgánicos a pH ácido, transfiriéndose a otro tubo. Las dos fases orgánicas obtenidas a diferentes valores de pH y polaridades del extractante; neutra para la cuantificación de PCBs y ácida para HO-PCBs, fueron evaporadas con corriente de nitrógeno a 500 μL en un evaporador Tubo Vap® LV No. 43750/30 (Zymark Center., USA) y sometidas a un proceso de extracción en fase sólida, con la finalidad de retirar lípidos y otras interferencias de matriz, así como separar PCBs e HO-PCBs. El sistema de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) consistió en cartuchos empacados con 1000 mg de florisil desactivado y 500 mg de Na_2SO_4 anhidro en la parte superior, en una cámara al vacío (J.T. Baker). Los cartuchos fueron lavados

y activados con 6 mL de HX:DCM (3:1). En seguida, el extracto neutro se transfirió y los PCBs fueron eluidos con 6 mL de HX:DCM (3:1), evaporados y resuspendidos en 100 μ L con iso-octano para su posterior análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS). Posteriormente, el mismo cartucho de florisil fue lavado con 10 mL de HX:Acetona (85:15) y el extracto ácido fue transferido y los HO-PCBs fueron eluidos con 6 mL de Diclorometano:Metanol (DCM:MeOH) (9:1) y 6 mL DCM:MeOH (4:1) y posteriormente evaporados con corriente de nitrógeno.

Derivatización con TMSDM

Para establecer las condiciones ideales de la reacción de derivatización de los HO-PCBs, se basó principalmente en los procedimientos desarrollados por Rimmer y cols. 1996 y Persson y cols. 2006; modificando el disolvente y tiempo de reacción, dejando en exceso el reactivo trimetilsilildiazometano (TMSDM).

El concentrado de HO-PCBs se resuspendió con 100 μ L MeOH:Tolueno (50:50), se le adicionó 25 μ L de TMSDM (2.0 M) y fue sonificado por 40 min, considerado como tiempo de reacción óptimo (Mecanismo de reacción, Figura 1). Se realizó una última limpieza por extracción en fase sólida, activando el cartucho de florisil con 6 mL de HX:DCM (3:1). Posteriormente se transfirió el producto de reacción, conteniendo los MeO-PCBs formados y se eluyeron con 6 mL de la misma mezcla. La derivatización es necesaria para convertir el grupo hidroxilo (HO-) del

metabolito a metoxilo (MeO- o CH₃O-), dándole mayor estabilidad térmica a la molécula para su posterior análisis por CG-MS.

Para la obtención del tiempo de reacción óptimo se realizó una cinética de reacción con diferentes concentraciones (0.5, 5.0, 50.0 y 500 µg/L) a cinco tiempos (10, 20, 30, 40, 50 minutos). Posteriormente se obtuvo el porcentaje de rendimiento de reacción a lo largo del intervalo lineal utilizado para la cuantificación de HO-PCBs como MeO-PCBs (CH₃O-PCBs) que va desde 0.5 a 100 µg/L, donde se comparó el compuesto 4-hidroxi-2,2',3,4',5,5'-hexaclorobifenilo (4-HO-CB146) derivatizado con el compuesto 4-metoxi-2,2',3,4',5,5'-hexaclorobifenilo (4-MeO-CB146 ó 4-CH₃O-CB146) como valor teórico.

Para evaluar la eficiencia de todo el tratamiento de muestra se compararon las abundancias relativas (áreas), en plasma fortificado y en solvente (iso-octano) de los dos estándares internos CB 141-¹³C₁₂ y 4-HO-CB187-¹³C₁₂ empleados para la cuantificación de PCBs e HO-PCBs; a 25 y 7.5 µg/L respectivamente.

Análisis por Cromatografía de Gases espectrometría de masas (CG-MS)

Para el análisis de PCBs e HO-PCBs (identificados como MeO-PCBs), se trabajó con un cromatógrafo de gases HP 6890 equipado con inyector automático HP G1513A, acoplado a un detector selectivo de masas HP 5973. La columna utilizada, fue una capilar HP-5MS (60 m X 0.25 mm de diámetro interno X 0.25 µm de espesor de película), se empleó Helio como gas acarreador. La temperatura del

inyector fue de 270°C usando splitless pulsado (5 minutos a 21.1 psi) y 1 µL como volumen de inyección. La temperatura de trabajo de la línea de transferencia entre CG-MS (interfase) fue de 300°C, el espectrómetro de masas fue operado en modo de ionización positiva por impacto electrónico a 70 eV. Se trabajó un programa de temperatura en el horno que inicia en 100°C, se mantiene 1 minuto, incrementando la temperatura a las siguientes velocidades: 20°C/min hasta 200°C, 10°C/min hasta 245°C, 4°C/min hasta 280°C y 30°C/min hasta 310°C manteniéndose por 7 min.

Para la identificación de los compuestos, se emplearon soluciones estándares a 1 mg/L, con las cuales se obtuvo el espectro de masas y el tiempo de retención en modo SCAN y posteriormente por modo SIM (monitoreo de ión selectivo), con el que se seleccionaron los iones más abundantes. Para los PCBs que contienen 3 cloros (PCB 28) ión 256 m/z, 4 cloros (PCB 52) ión 292 m/z, 5 cloros (PCB 99, 101, 105 y 118) ión 326 m/z, 6 cloros (PCB 128, 138, 153 y 156) ión 360 m/z, 7 cloros (PCB 170, 180, 183, 187) ión 394 m/z y 372 m/z para el estándar interno CB 141-¹³C₁₂. En el caso de los HO-PCBs identificados como MeO-PCBs (CH₃O-PCBs), ión 356 m/z para 4-MeO-CB107, 390 m/z para 4-MeO-CB146, 424 m/z para 4-MeO-CB187 y 4'-MeO-CB172, 436 m/z para el estándar interno 4-HO-CB187-¹³C₁₂, identificado como 4-MeO-CB187-¹³C₁₂.

La cuantificación de los compuestos, se realizó por el método de estándar interno, las curvas de calibración se construyeron para cada uno de los compuestos en 2

mL de plasma fortificado con los PCBs (28, 52, 99, 101, 105 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180, 183 y 187) en un intervalo de concentración de 6 a 100 µg/L e HO-PCBs (4H107, 4H146, 4H172 y 4H187) de 1 a 40 µg/L. Cada uno de los niveles de la curva de calibración contenía 25 y 7.5 µg/L de los estándares internos CB 141-¹³C₁₂ y 4-HO-CB187-¹³C₁₂ respectivamente. Cada nivel fue sometido a todo el proceso de tratamiento de muestra y se manejó un blanco de plasma por cada replica de curva de calibración con 6 niveles de concentración en la validación.

Control y aseguramiento de calidad (CC/AC)

Los parámetros para la validación del método y control de calidad interno a evaluar, se realizaron principalmente en base a la guía de validación para métodos analíticos en la determinación de compuestos orgánicos en niveles trazas (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 2000), tomando en cuenta algunas recomendaciones de las guías elaborada por EURACHEM (1998) e ICH Q2 (R1) (2005).

Validación de la Metodología

Limites de detección y cuantificación, se calcularon con los resultados obtenidos del triplicado de la curva de calibración de cada uno de los compuestos a determinar (PCBs e HO-PCBs, estos últimos identificados como sus derivados metoxilados, MeO-PCBs) en concentraciones que van desde 0.5-5.0 µg/L con 2.5 µg/L de estándar interno en plasma fortificado.

La linealidad y sensibilidad de la metodología se obtuvo del triplicado de la curva de calibración empleada para la cuantificación de PCBs e HO-PCBs (identificados como MeO-PCBs) en plasma fortificado, incluyendo un blanco por réplica.

El porcentaje de recuperación del método para cada analito se obtuvo con puntos control a dos diferentes concentraciones independientes de los niveles de la curva de calibración; 15 y 50 $\mu\text{g/L}$ para PCBs, 5 y 15 $\mu\text{g/L}$ para HO-PCBs, con 25 y 7.5 $\mu\text{g/L}$ de sus correspondientes estándares internos, evaluados en plasma fortificado y por sextuplicado.

La precisión de la metodología se obtuvo como repetibilidad y precisión intermedia con las mismas concentraciones de los puntos control empleados para la recuperación del método, evaluados el mismo día y en tres días diferentes por sextuplicado, respectivamente.

Población

Se formaron 10 pools de aproximadamente 5 mL cada uno de las muestras tomadas en la comunidad de San Nicolás, municipio de Tequisquiapan, estado de Querétaro. Analizándose también, cuatro muestras individuales de dicha comunidad. Las muestras fueron seleccionadas al azar de niños sanos que acuden a escuelas públicas de preescolar y primaria, con un rango de edad de 4 a 11 años y por lo menos 2 años de residencia en la zona. Los padres contestaron un cuestionario de exposición tomado de estudios previos realizados en México;

incluyendo preguntas sobre estado de salud, ingesta de medicamentos y exposición a humo de tabaco. La sangre fue obtenida por punción venosa utilizando tubos con Heparina como anticoagulante, las muestras se mantuvieron a 4°C hasta ser analizadas.

Control de calidad interno (verificación del desempeño de la metodología)

Los valores obtenidos de porcentaje de recuperación y coeficiente de variación durante la validación del método con los puntos control establecidos para PCBs (15 y 50 µg/L) e HO-PCBs (5 y 15 µg/L), sirvieron para establecer un control de calidad interno, el cual nos ayudará a demostrar que el desempeño del método se encuentra bajo un control estadístico durante la cuantificación de PCBs e HO-PCBs en muestras reales. Se analizaron 2 pools de la Comunidad de San Felipe Nuevo Mercurio, estado de Zacatecas, 10 pools de la comunidad de Alpuyecá, estado de Morelos y finalmente 10 pools y 4 muestras individuales de la comunidad de San Nicolás, estado de Querétaro. Evaluando por duplicado los puntos control establecidos dentro de un lote de cada 5 pools o muestras individuales, los límites o valores de rechazo fueron establecidos con el promedio del porcentaje de recuperación obtenido para cada congénere de PCBs o metabolito hidroxilado (HO-PCBs) a las dos concentraciones de los puntos control ($\%R_{prom}$), tomando en consideración el coeficiente de variación obtenido como \pm

2CV, para la construcción de cartas control. Los pools de las dos primeras comunidades no se incluyeron en el presente estudio, debido a que los niveles de PCBs e HO-PCBs se encuentran a concentraciones menores que las de sus límites de detección, tomándose únicamente en consideración la comunidad de San Nicolás, estado de Querétaro.

Análisis estadístico

Para evaluar la cinética de reacción (derivatización), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba Post Hoc (Tukey HSD y LSD), comparando los porcentajes de rendimiento de la reacción a los diferentes tiempos evaluados. Los valores de p menores a 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos, todo el análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 12.0.

IV. RESULTADOS

Extracción, separación y limpieza de PCBs y HO-PCBs

La eficiencia de cada uno de los pasos del tratamiento de muestra; extracción líquido-líquido y en fase sólida, inclusive la derivatización, no siempre se pueden evaluar de manera individual debido a que los compuestos por identificar y cuantificar (PCBs e HO-PCBS) en muestras reales requieren desnaturalización de proteínas, extracción, separación, limpieza y derivatización previo a su análisis por CG-MS, por tal motivo se evaluó el porcentaje de recuperación obtenido para los estándares internos empleados en la cuantificación CB 141-¹³C₁₂ y 4-HO-CB187-¹³C₁₂, obteniéndose 76 ± 10 y $89 \pm 7\%$, respectivamente.

Derivatización con TMSDM

Con el análisis de varianza realizado para evaluar la cinética de reacción en la derivatización con TMSDM; se obtuvo que el tiempo óptimo de derivatización fue de 40 minutos, debido a que el porcentaje de rendimiento de la reacción obtenido para 4-HO-CB146 derivatizado comparado con 4-MeO-CB146 sin derivatizar, dentro del intervalo lineal empleado en la cuantificación de HO-PCBs, fue de $100 \pm 26\%$; mayor y estadísticamente significativo ($P < 0.05$), que el obtenido a 10 minutos ($0.15 \pm 0.25\%$), 20 minutos ($36.4 \pm 41.2\%$) y 30 minutos ($43.7 \pm 45.8\%$);

incluso el tiempo de 50 minutos se descartó, debido a que se observaron subproductos de reacción en el cromatograma.

Análisis por CG-MS

En la figura 2 y 3 se observan los cromatogramas generados por el sistema CG-MS obtenidos en modo SIM; para PCBs y MeO-PCBs, de un punto control y una muestra, respectivamente. Se observa una buena resolución entre todos los picos cromatográficos correspondientes a PCBs y MeO-PCBs (HO-PCBs derivatizados).

Validación del método (CC/AC)

El límite de detección (LOD) y cuantificación (LOC) fueron calculados con la curva de calibrado cercana al origen (0.5 a 5.0 $\mu\text{g/L}$), utilizando tanto las pendientes como su ordenada en el origen, obteniendo límites de detección en un rango de 1.12-2.58 y 0.38-0.85 $\mu\text{g/L}$ para PCBs e HO-PCBs, respectivamente; y límites de cuantificación de 2.46-5.66 $\mu\text{g/L}$ para PCBs y de 0.80-1.76 $\mu\text{g/L}$ para HO-PCBs, (Tabla 1).

La regresión lineal obtenida para cada uno de los congéneres de PCBs e HO-PCBs, se realizó en relación con sus correspondientes estándares internos, generando una correlación superior a 0.99 en todos los casos (Tabla 2), sin embargo, la sensibilidad metodológica presenta valores variables entre los diferentes compuestos (Tabla 2).

Los promedios del porcentaje de recuperación de la metodología para todos los congéneres de PCBs, obtenidos de puntos control a concentración de 15 y 50 µg/L fueron $102.02 \pm 3.16\%$ y $104.73 \pm 1.38\%$, respectivamente; para el caso de los HO-PCBs, la concentración de 5 µg/L obtuvo $97.89 \pm 4.58\%$ y 15 µg/L $98.95 \pm 3.33\%$ (Tabla 3).

El promedio de los coeficientes de variación utilizados para evaluar la precisión del método como repetibilidad; para PCBs a 15 y 50 µg/L, fue de 3.20 ± 1.77 y $4.85 \pm 1.10\%$, respectivamente, en el caso de HO-PCBs, 5 µg/L de $5.28 \pm 3.34\%$ y 15 µg/L $12.22 \pm 5.76\%$; la precisión intermedia, en PCBs a 15 µg/L fue de $10.68 \pm 2.24\%$ y 50 µg/L $3.62 \pm 1.11\%$ y los HO-PCBs a 5 µg/L obtuvo $4.47 \pm 1.95\%$ y 15 µg/L $6.24 \pm 1.81\%$ (Tabla 4).

Cada uno de los valores obtenidos para evaluar los parámetros de validación del método analítico desarrollado, se encontraron dentro de los criterios de aceptación de la guía AOAC/FAO/IAEA/IUPAC (2000), basados en los establecidos por Horwitz en 1982.

Cuantificación de PCBs e HO-PCBs

Las concentraciones encontradas en los 10 pools evaluados de la comunidad de San Nicolás se muestran en la tabla 5, la sumatoria de PCBs (14 congéneres) e HO-PCBs (4 metabolitos), son 555 y 364 ng/g de lípido, respectivamente; de la

misma forma en la Tabla 5 son presentadas las concentraciones individuales (media) de cada congénere de PCBs e HO-PCBs encontrados en plasma, en donde se observa, que los congéneres más abundantes de PCBs son el 153 y 138, y para el caso de los HO-PCBs (identificados como MeO-PCBs), el 4-HO-CB187 es el de mayor abundancia seguido del 4-HO-CB107. Los niveles encontrados en las 4 muestras individuales se presentan en la tabla 6, donde la muestra 15 presenta la mayoría de los congéneres de PCBs y todos los metabolitos hidroxilados, y la muestra 11 solo presentó el congénere 153 y 138, así como solo el metabolito hidroxilado 4-OH-CB187. Durante la corrida analítica, todos los puntos del control de calidad interno evaluados como parte de la verificación de desempeño de la metodología, estuvieron dentro de las siguientes especificaciones ($\%R_{prom} \pm 2CV$), valores mostrados en la tabla 7. Por lo que las concentraciones que se cuantificaron para PCBs e HO-PCBs en los 10 pools y las 4 muestras individuales de la comunidad de San Nicolás, Qro., son confiables.

V. DISCUSIÓN

Cuando se requiere analizar compuestos químicos en muestras biológicas, se debe de tener en cuenta que la matriz biológica contiene otros componentes, que pueden causar interferencias en la cuantificación de los analitos de interés. Para contrarrestar este efecto, es necesario desarrollar, estandarizar y validar la metodología en matriz biológica, empleando diferentes técnicas analíticas en el tratamiento de muestra. En el presente estudio, se empleo plasma sanguíneo como matriz biológica, debido a que PCBs e HO-PCBs son distribuidos y retenidos en plasma sanguíneo, respectivamente (Gómez-Catalán y cols., 1991 y Bergman y cols., 1994).

La metodología desarrollada permite la identificación y cuantificación específica de PCBs y sus metabolitos hidroxilados (HO-PCBs). La cuantificación se llevo a cabo por el método de estándar interno, utilizando el CB 141-¹³C₁₂ y 4-HO-CB187-¹³C₁₂ obteniéndose porcentajes de recuperación 76 ± 10 y $89 \pm 7\%$, respectivamente a lo largo de todo el proceso analítico. Metodologías análogas ha sido desarrollada, como la que forma parte del programa de evaluación y monitoreo del Ártico (AMAP, por sus siglas en inglés) (Sandanger y cols., 2003 y 2004), que permite la determinación de los niveles de COPs, entre ellos los 14 PCBs y los 4 metabolitos hidroxilados (HO-PCBs) analizados en el presente trabajo, los cuales fueron evaluados en la población de Uelen (Península de Chukotka, Rusia), en el que emplearon los mismos estándares internos obteniendo porcentajes de

recuperación, de 65 a 97% para los estándares internos utilizados en la cuantificación de PCBs, entre ellos el CB 141-¹³C₁₂, lo cual nos indica que el porcentaje obtenido para este estándar interno $76 \pm 10\%$ se encuentra dentro del rango obtenido por Sandanger y cols. 2003. Para el caso del 4-HO-CB187-¹³C₁₂ obtuvieron un porcentaje de recuperación de 72% (Sandanger y cols. 2004), siendo menor al reportado en el presente trabajo, $89 \pm 7\%$. Cabe mencionar, que es importante obtener altos porcentajes de recuperación de los estándares internos, debido a que este tipo de cuantificación proporciona alta precisión a métodos analíticos, donde se involucran un número considerable de pasos dentro del tratamiento de muestra, como en este caso.

Es importante mencionar que antes de la aplicación del método en muestras reales, fue validado, con el objetivo de demostrar que el método analítico es conveniente para el propósito establecido (en este caso, la cuantificación de PCBs e HO-PCBs), donde todos los parámetros de validación evaluados se encontraron dentro de los criterios de aceptación reportados en la guía de validación para métodos analíticos en la determinación de compuestos orgánicos en niveles trazas (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 2000). Debido a que los parámetros de validación determinan el control de calidad de un método analítico, se estableció que el método desarrollado permite la determinación de PCBs e HO-PCBs en plasma humano bajo un control estadístico, por lo que se puede tener confiabilidad en los resultados generados.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOC) son indispensables para un proceso de validación analítico, sobre todo cuando se requiere cuantificar niveles trazas de los analitos de interés, como es el caso de los metabolitos hidroxilados. La tabla 1 muestra LOD y LOC de cada uno de los compuestos a cuantificar, obtenidos en base a sus determinadas desviaciones estándares de la respuesta del intercepto y la pendiente de curva de calibración cercana al origen (Miller and Miller, 2000 e ICH, 2005). Comparando los límites de detección obtenidos para HO-PCBs de 0.38 a 0.85 $\mu\text{g/L}$ (ppb) (380 a 850 ppt) y para PCBs de 1.12-2.58 $\mu\text{g/L}$ (ppb) (1120 a 2580 ppt), con los obtenidos por Sandanger y cols., 2003 y 2004, de 4 a 9 (ng/L, ppt) para PCBs y 2 a 5 (pg/g, ppt) para HO-PCBs; son mayores entre 2 a 3 órdenes de magnitud, esto es debido a la diferente técnica de ionización empleada en el espectrómetro de masas. En este caso se empleó la fuente de ionización por impacto electrónico (EI), que genera excesiva fragmentación del ión molecular, reflejándose en el aumento de los límites de detección (Hoffmann y cols., 2004), en cambio la técnica empleada por Sandanger y cols. 2004, es la de ionización negativa por captura de electrones (ECNI por sus siglas en inglés) en la cuantificación de HO-PCBs y la de ionización química negativa (NCI por sus siglas en inglés) para PCBs, ambas técnicas producen un espectro con menor fragmentación, permitiendo detectar y cuantificar bajos niveles de concentración de los compuestos de interés, obteniendo límites de detección menores (Hoffmann y cols., 2004). Esto nos sugiere de forma particular, que la técnica de ECNI, sería necesaria para el análisis de muchos contaminantes

ambientales que presentan alta afinidad electrónica y se encuentran en niveles traza, como el caso de los PCBs y sus metabolitos hidroxilados y de algunos otros, como los compuestos bromados (PBDEs, MeO-PBDEs e HO-PBDEs), empleados como retardantes de flama, y que requieren técnicas instrumentales que proporcionen bajos límites de detección, para llevar a cabo su identificación y cuantificación (Athanasiadou, 2003).

Sin embargo, aunque los parámetros de validación como recuperación (%R, Tabla 3) y precisión (%CV, Tabla 4), se encuentran dentro de los criterios de aceptación; los HO-PCBs presentan mayor variabilidad en los parámetros evaluados que los PCBs, debido a que este tipo de compuestos son más inestables y fácilmente se pueden perder durante el procesamiento de la muestra que los PCBs, debido a que pueden adherirse a las paredes del material de vidrio manejado (Rimmer y cols., 1996), y presentan inestabilidad térmica en el sistema CG-MS, lo cual puede afectar la precisión del método, así como a los porcentajes de recuperación. Debido a esto es necesario proteger la molécula con un grupo más estable como lo es el metoxilo ($\text{CH}_3\text{O}-$), a través de una reacción de derivatización del grupo hidroxilo ($\text{HO}-$) causante de la inestabilidad de los compuestos. Sin embargo, también se puede evitar su pérdida, por medio de procedimientos de silanizado del material de vidrio, que en algunos de los casos se emplea diclorodimetilsilano en ciclohexano (Rimmer y cols., 1996). Inclusive, se puede evitar la derivatización de los HO-PCBs, cambiando de técnica instrumental, como la empleada por Letcher y cols. 2005, empleando un sistema de cromatografía de líquidos de alto

desempeño acoplado a espectrometría de masas con ionización por electrospray, técnica que evita el rompimiento del grupo (HO-) de los metabolitos y disminuye el tiempo de procesamiento de muestra, obteniendo valores aceptables durante la validación (Letcher y cols., 2005).

Los métodos analíticos no siempre miden toda la cantidad de analito presente en la muestra, por tal motivo es necesario evaluar la eficiencia del método, por medio del cálculo de los porcentajes de recuperación de cada uno de los compuestos de interés (EURACHEM Guide, 1998). Los porcentajes de recuperación obtenidos en el presente trabajo se encuentran entre 92 y 108% (Tabla 3), para todos los compuestos de interés por cuantificar, evaluados a través del fortificado de puntos control para el caso de los PCBs a dos concentraciones 15 y 50 ($\mu\text{g/L}$, ppb) e HO-PCBs a 5 y 15 ($\mu\text{g/L}$, ppb), de acuerdo a la guía de validación de métodos para el análisis de compuestos orgánicos en niveles traza (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 2000), los valores aceptados para las concentraciones de 15 y 50 ppb deben de encontrarse dentro del rango de 70 a 120% de recuperación, y para el punto control de menor concentración (5 ppb) entre 60-120%; lo cual nos indica que la metodología cumple con los criterios de la guía.

Sin embargo, comparando los porcentajes de recuperación obtenidos con otras metodologías, como por ejemplo con las desarrolladas por Hovander y cols. 2000 y Sandanger y cols. 2003 y 2004, que en ambas metodologías se emplearon procedimientos de tratamiento diferentes, pero sirvieron en la determinación de los

niveles de compuestos halogenados neutros entre ellos PCBs y compuesto fenólicos halogenados como los HO-PCBs. En ambas metodologías, inclusive en la desarrollada en el presente trabajo (Tabla 3), se demostró que en general para los compuestos fenólicos se obtienen porcentajes de recuperación menores que para los compuestos neutros. En base a esto, es importante mencionar, que la obtención de altos porcentajes de recuperación de los HO-PCBs, radica en la separación de los compuestos fenólicos de neutros y en el proceso de derivatización. Por consiguiente, fue importante encontrar un proceso analítico que nos permitiera separar los PCBs de HO-PCBs y de otros compuestos solubles como lípidos. La aplicación de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) utilizando florisil como sorbente (Sandanger y cols., 2004) sirvió para separarlos, evitándose el uso de hidróxido de potasio (KOH) que afecta los porcentajes de recuperación de los HO-PCBs (Hovander y cols., 2000); y a la vez ayudó a retirar lípidos. Sin embargo, a diferencia de la metodología desarrollada por Sandanger y cols. 2004, en el presente trabajo se obtuvieron dos fracciones independientes, para la respectiva cuantificación de PCBs e HO-PCBs, lo cual favoreció los porcentajes de recuperación. Otra de las causas que afecta la recuperación de los HO-PCBs; es la reacción de derivatización, la cual es necesaria para proteger la molécula, convirtiendo el grupo (HO-) del metabolito hidroxilado a (MeO-) (Mecanismo de reacción, Figura 1), con la finalidad de disminuir su polaridad, aumentar su estabilidad térmica y facilitar su detección. Por lo que se empleó una reacción con alto rendimiento, obteniendo $100 \pm 26\%$ a un

tiempo óptimo de 40 minutos, empleando trimetilsilildiazometano (TMSDM). Aunque en la mayoría de los métodos desarrollados para derivatizar HO-PCBs (compuestos fenólicos) se emplea diazometano (Hovander y cols., 2000 y Sandanger y cols. 2004); este compuesto es poco estable, difícil de manejar y preparar, se descompone si no se encuentra a ciertas condiciones ambientales, generando subproductos que pueden afectar el rendimiento de reacción y por consiguiente los porcentajes de recuperación de los metabolitos a evaluar, como los obtenidos por Sandanger y cols. 2004, que drásticamente bajan, después del empleo del diazometano en la metodología. Por el contrario, la técnica empleada en el presente trabajo es fácil de estandarizar, debido a que el trimetilsilildiazometano (TMSDM) es estable y no representa alto grado de peligrosidad durante su manipulación. Otra de las ventajas del TMSDM, es que se puede emplear en la determinación de otros tóxicos que presentan en su molécula el grupo (HO-) de forma nativa o como producto de metabolización. En el caso de algunos herbicidas es necesario derivatizar la molécula para poder identificarlos, obteniéndose porcentajes de recuperación alrededor del 100% (Rimmer y cols., 1996), inclusive puede servir para la determinación y cuantificación de HO-PBDEs, metabolitos hidroxilados de los PBDEs, en los cuales también es necesaria la derivatización del grupo HO-, para lograr su detección (Athanasidou, 2003).

Finalmente, el análisis de 10 muestras mixtas de la comunidad de San Nicolás, Querétaro, mostró niveles de 555 ng/g lípido y 364 ng/g lípido para PCBs (14 congéneres analizados) e HO-PCBs (4 metabolitos analizados) respectivamente,

estos niveles son mayores a los encontrados en el NHANES III en Estados Unidos de Norte-América para el caso de los PCBs (CDC, 2005), en el caso de los HO-PCBs los niveles son menores a los encontrados en algunas poblaciones con alta exposición a PCBs, como en ciertas comunidades de la Península Chukotka (Sandanger y cols. 2004), y similares a los encontrados en las islas Faroe (Fängström y cols., 2002), ambas zonas del Ártico. También fue encontrado que los congéneres más abundantes y que se encontraron en la mayor parte de las muestras analizadas fueron los congéneres PCB153 y el PCB138. En este contexto, ha sido demostrado que los congéneres más frecuentemente detectados en población general son 138, 153, 177, 178, 180, 183 and 187, (Patterson y cols., 1994 y Heudorf y cols., 2002). Estos congéneres contribuyen en una gran proporción del total de PCBs observados en muestras mixtas (pools) representativas en una población de Nueva Zelanda (Bates y cols., 2004) y en una pequeña muestra de hombres en Suecia (Glynn y cols., 2000). Por otro lado, Longnecker y cols. 2003, realizó el análisis de 10 estudios de exposición a PCBs y pudo notar que el congénere con mayor abundancia y mayormente detectado fue el PCB 153, pero congéneres como el 118, 138 y 180 estuvieron también presentes. Para el caso de HO-PCBs, el metabolito más encontrado en nuestro análisis fue el 4-HO-CB187, que también es el de mayor abundancia en estudios donde han sido analizados HO-PCBs (Fängström y cols., 2002 y Park J. y cols., 2007). En base a esto, la abundancia de este metabolito, sugiere que procede de dos congéneres de PCBs, del PCB 183, generándolo mediante la formación de un epóxido a través de la vía 1,2-desplazamiento que hace factible su

biotransformación al hidroxilado y también a partir del PCB 187 mediante inserción directa del grupo (HO-) (Letcher y cols., 2000), ambos PCBs son altamente persistentes y frecuentemente detectados en poblaciones expuestas a este tipo de compuestos (Heudorf y cols., 2002).

Con lo anterior se puede concluir que el método desarrollado en el presente trabajo puede ser utilizado en el monitoreo de PCBs e HO-PCBs en poblaciones expuestas, lo que nos permitirá una mejor estimación del riesgo en este tipo de poblaciones.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Schulz, D.E., Petrick, G., and Duinker, J.C. (1989). Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environ. Sci. Technol.* 23:852-859.

ATSDR (2004) Toxicological profile for Polychlorinated Biphenyls. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. US Public Health Service. Atlanta, GA.

Erickson, M. D. (1997). *Analytical Chemistry of PCBs*, 2nd ed.; Lewis Publishers.

Safe, S. (1992) Toxicology, Structure-Function Relationship, and Human and Environmental Health Impacts of Polychlorinated Biphenyls: Progress and Problems. *Environ. Health Perspect.* 100:259-268.

EPA, Environmental Protection Agency, (1995). *PCBs: Cancer Dose-Response Assessment and Application to Environmental Mixtures*. Cincinnati, OH, US.

WHO, World Health Organization. (2000). *Air Quality Guidelines, Polychlorinated biphenyls (PCBs)*. Chapter 5.10, Second Edition. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.

Peña, C. E., Carter D. E., Ayala-Fierro, F. (2001). Toxicología ambiental, Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Southwest Hazardous Waste Program A Superfund Basic Research and Training Program At the College of Pharmacy, The University of Arizona.

Bergman, Å., Klasson-Wehler, E., Kuroki, H. (1994). Selective retention of hydroxylated PCB Metabolites in Blood. *Environ Health Perspect*, 102:464-469.

Lans, M.C., Klasson-Wehler, E., Willemsen, M., Meussen, E., Safe, S., Brouwer, A. (1993). Structure-dependent, competitive interaction of hydroxy-polychlorobiphenyls, -dibenzo-p-dioxins and -dibenzofurans with human transthyretin. *Chem-Biol. Interact.* 88:7-21.

Brouwer, A., Klasson-Wehler E., Bokdam, M., Morse, D., Traag, W. (1990). Competitive inhibition of thyroxin binding to transthyretin by mono-hydroxy metabolites of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere.* 20:1257-1262.

Sandanger, T. M., Dumas, P., Berger, U., Burkow, I. C. (2004). Analysis of HO-PCBs and PCP in blood plasma from individuals with high PCB exposure living on the Chukotka Peninsula in the Russian Arctic. *J. Environ. Monit.* 6:758-765.

Rimmer, A. D., Johnson, P. D., Brown, R. H. (1996). Determination of phenoxy acid herbicides in vegetation, utilizing high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and methylation with trimethylsilyldiazomethane prior to

gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A.* 755:245-250.

Persson, B.-A., Fakt, C., Ervik, M., Ahnoff, M. (2006). Interference from a glucuronide metabolite in the determination of ramipril and ramiprilat in human plasma and urine by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 40:794–798.

AOAC/FAO/IAEA/IUPAC. (2000). Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals.

EURACHEM, Eurachem Guide. (1998). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. A focus for analytical chemistry in Europe.

ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2005). ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1).

Horwitz, W. (1982). Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry.* 54:67A-76A.

Gómez-Catalán, J., To-Figueras, J., Rodamilans, M., and Corbella, J. (1991) Transport of organochlorine residues in the rat and human blood. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20:61-66.

Sandanger, T. M., Brustad, M., Odland, J. O., Doudarev, A., and et al. (2003). Human plasma levels of POPs, and diet among native people from Uelen, Chukotka. *J. Environ. Monit.* 5:689-696.

Miller, J. N., Miller, J. C. (2000). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Tercera Edición. Prentice Hall. España.

Hoffmann, E. and Stroobant, V. (2004). *Mass Spectrometry, Principles and Applications*. Second Edition. John Wiley & Sons, LTD

Athanasiadou, M. (2003). *Brominated flame retardants and related compounds in Baltic Sea wildlife*. Department of Environmental Chemistry, Stockholm University. Thesis Doctoral Dissertation.

Letcher, R.J., Li, H. X. and Chu, S. G. (2005). Determination of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (HO-PCBs) in Blood Plasma by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 29:209-216.

Hovander, L., Athanasiadou, M., Asplund, L., Jensen, S., and Klasson-Wehler, E. (2000). Extraction and Cleanup Methods for Analysis of Phenolic and Neutral Organohalogenes in Plasma. *Journal of Analytical Toxicology*. 24:696-703.

Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2005). NHANES III, Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, Georgia.

Fängström, B., Athanasiadou, M., Grandjean, P., Weihe, P. and Bergman, A. (2002). Hydroxylated PCB Metabolites and PCBs in Serum from Pregnant Faroese Women. *Environ Health Perspect.* 110:895-899.

Patterson, D. Jr, Todd, G., Turner, W., Maggio, V., Alexander, L., Needham, L. (1994). Levels of non-ortho-substituted (coplanar), mono- and di-ortho-substituted polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in human serum and adipose tissue. *Environ Health Perspect.* 102:195-204.

Heudorf, U., Angerer, J., Drexler, H. (2002). Polychlorinated biphenyls in the blood plasma: current exposure of the population in Germany. *Rev Environ Health.* 17:123-134.

Bates, M., Buckland, S., Garrett, N., Ellis, H., Needham, L., Patterson, D., Jr, Turner, W., Russell, D. (2004). Persistent organochlorines in the serum of the non-occupationally exposed New Zealand population. *Chemosphere.* 54:1431-1443.

Glynn, A., Wolk, A., Aune, M., Atuma, S., Zettermark, S., Maehle-Schmid, M., Darnerud, P., Becker, W., Vessby, B., Adami, H. (2000). Serum concentrations of

organochlorines in men: a search for markers of exposure. *Sci Total Environ.* 263:197-208.

Longnecker, M., Wolff, M., Gladen, B., Brock, J., Grandjean, P., Jacobson, J., Korrick, S., Rogan, W., Weisglas-Kuperus, N., Hertz-Picciotto, I., Ayotte, P., Stewart, P., Winneke, G., Charles, M., Jacobson, S., Dewailly, E., Boersma, E., Altshul, L., Heinzow, B., Pagano, J., Jensen, A. (2003). Comparison of polychlorinated biphenyl levels across studies of human neurodevelopment. *Environ Health Perspect.* 111:65-70.

Park, J., Linderholm, L., Charles, M., Athanasiadou, M., Pretrik, J., Kocan, A., Drobna, B., Trnovec, T., Bergman, A., and Hertz-Picciotto, I. (2007). Polychlorinated Biphenyls and Their Hydroxylated Metabolites (OH-PCBs) in Pregnant Women from Eastern Slovakia. *Environ Health Perspect.* 115:20-26.

VII. PIE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de la reacción de derivatización con TMSDM, mostrando la conversión del grupo (HO-) del 4-HO-CB146 a (CH₃O- o MeO-).

Figura 2. Cromatograma de un punto control a una concentración de 15 ppb, analizado en modo SIM para la detección y cuantificación de PCBs

Figura 3. Cromatograma de una muestra individual de plasma analizada en modo SIM identificando los siguientes MeO-PCBs (CH₃O-PCBs): **a**, 4-MeO-CB107; **b**, 4-MeO-CB146; **c***, 4-MeO-CB187 + 4-HO-CB187-¹³C₁₂; **d**, 4MeO-CB172.

VIII. TABLAS

Tabla 1. Límite de detección (**LOD**) y límite de cuantificación (**LOC**), para PCBs e HO-PCBs

Congénere PCBs	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
PCB 28	1.97	4.32
PCB 52	1.45	3.24
PCB 101	1.22	2.72
PCB 99	1.50	3.45
PCB 118	1.50	3.45
PCB 153	1.19	2.62
PCB 105	1.27	2.78
PCB 138	1.12	2.46
PCB 187	2.16	4.96
PCB 183	1.63	3.58
PCB 128	1.77	3.89
PCB 156	1.77	3.89
PCB 180	2.58	5.66
PCB 170	2.01	4.40
Metabolito HO-PCBs*		
4-HO-CB-107	0.85	1.76
4-HO-CB-146	0.44	0.91
4-HO-CB-187	0.38	0.80
4'-HO-CB-172	0.49	1.02

* Identificados como MeO-PCBs o CH₃O-PCBs.

Tabla 2. Verificación de linealidad para PCBs e HO-PCBs

Linealidad			
PCBs			
	Tr (minutos)	Pendiente ^a	Coefficiente de correlación
PCB 28	13.71	1.22 ± 0.11	0.998
PCB 52	14.36	1.14 ± 0.10	0.998
PCB 101	16.31	1.26 ± 0.16	0.996
PCB 99	16.46	1.24 ± 0.13	0.997
PCB 118	17.95	1.23 ± 0.13	0.997
PCB 153	18.54	1.00 ± 0.10	0.997
PCB 105	18.74	1.42 ± 0.14	0.998
PCB 138	19.39	0.98 ± 0.09	0.998
PCB 187	19.87	0.72 ± 0.09	0.996
PCB 183	20.03	0.72 ± 0.09	0.996
PCB 128	20.26	0.80 ± 0.08	0.998
PCB 156	20.88	1.02 ± 0.09	0.998
PCB 180	21.26	0.86 ± 0.08	0.998
PCB 170	22.00	0.61 ± 0.03	0.999
Metabolito HO-PCBs*			
4-HO-CB-107	20.56	1.27 ± 0.09	0.9990
4-HO-CB-146	20.97	1.26 ± 0.09	0.9990
4-HO-CB-187	22.10	1.03 ± 0.05	0.9995
4'-HO-CB-172	23.27	1.10 ± 0.06	0.9992

a = pendientes ± límites de confianza, * Identificados como MeO-PCBs o CH₃O-PCBs.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación para la metodología, obtenidos con puntos control en plasma fortificado con PCBs e HO-PCBs (identificados como MeO-PCBs).

Congéneres PCB e HO-PCBs	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Recuperación* %R
PCB 28	15	102.17
	50	103.98
PCB 52	15	101.43
	50	104.46
PCB 101	15	100.51
	50	104.22
PCB 99	15	102.02
	50	104.96
PCB 118	15	104.58
	50	107.02
PCB 153	15	102.79
	50	105.52
PCB 105	15	101.46
	50	105.32
PCB 138	15	102.96
	50	105.27
PCB 187	15	102.30
	50	105.45
PCB 183	15	102.42
	50	105.07
PCB 128	15	102.34
	50	104.86
PCB 156	15	101.48
	50	104.20
PCB 180	15	108.49
	50	105.19
PCB 170	15	93.29
	50	100.71
4-HO-CB-107	5	101.43
	15	101.39
4-HO-CB-146	5	95.87
	15	101.46
4-HO-CB-187	5	92.37
	15	98.56
4'-HO-CB-172	5	101.87
	15	94.39

*De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la guía AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 2000, se aceptan porcentajes de recuperación para 15 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 70 a 120% y para 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 60 a 120%.

Tabla 4. Precisión de la metodología, expresada como repetibilidad y precisión intermedia, obtenida con puntos control en plasma fortificado con PCBs e HO-PCBs (identificados como MeO-PCBs).

Congéneres de PCB e HO-PCBs	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidad %CV	Precisión Intermedia %CV
PCB 28	15	1.90	11.71
	50	5.44	4.65
PCB 52	15	2.90	12.77
	50	7.75	4.72
PCB 101	15	2.64	4.49
	50	3.18	4.61
PCB 99	15	2.46	9.60
	50	3.92	4.81
PCB 118	15	2.87	11.11
	50	5.32	4.24
PCB 153	15	3.28	11.33
	50	5.24	4.45
PCB 105	15	1.54	8.50
	50	4.35	3.55
PCB 138	15	3.05	11.26
	50	5.00	3.13
PCB 187	15	2.81	11.32
	50	4.66	3.39
PCB 183	15	2.45	12.53
	50	4.92	4.21
PCB 128	15	2.51	9.22
	50	4.64	3.33
PCB 156	15	2.94	12.02
	50	3.56	1.76
PCB 180	15	8.84	10.39
	50	4.22	1.50
PCB 170	15	4.60	13.28
	50	5.66	2.38
4-HO-CB-107	5	1.99	5.43
	15	14.42	7.66
4-HO-CB-146	5	7.18	6.63
	15	18.01	7.81
4-HO-CB-187	5	8.98	3.58
	15	12.06	4.06
4'-HO-CB-172	5	2.96	2.22
	15	4.40	5.44

*De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la guía AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 2000; se aceptan coeficientes de variación para 15 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de $\leq 20\%$ y para 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de $\leq 30\%$.

Tabla 5. Concentraciones de PCBs e HO-PCBs en los 10 pools formados de las muestras de la población de San Nicolás, Qro.

PCBs (ng/g de lípido)			
	Media aritmética	Desviación estándar	Rango
PCB 28	72	157	(ND-451.7)
PCB 52	60	127	(ND-341.7)
PCB 101	ND	ND	ND
PCB 99	ND	ND	ND
PCB 118	35	111	(ND-350.8)
PCB 153	200	18	(ND-230.8)
PCB 105	27	84	(ND-266.7)
PCB 138	110	95	(ND-195.0)
PCB 187	ND	ND	ND
PCB 183	ND	ND	ND
PCB 128	34	106	(ND-335.0)
PCB 156	19	61	(ND-192.5)
PCB 180	ND	ND	ND
PCB 170	ND	ND	ND
Suma	555		
Metabolitos hidroxilados de los PCBs (ng/g de lípido)			
	Media aritmética	Desviación estándar	Rango
4-HO-CB-107	161	302	(ND-870.8)
4-HO-CB-146	ND	ND	ND
4-HO-CB-187	203	39	(ND-275.0)
4'-HO-CB-172	ND	ND	ND
Suma	364		

ND = No detectable

Tabla 6. Concentraciones de PCBs e HO-PCBs en 4 muestras de la población de San Nicolás, Qro.

PCBs (ng/g de lípido)				
	Muestra 15	Muestra 20	Muestra 19	Muestra 11
PCB 28	311.7	ND	ND	ND
PCB 52	305.8	ND	ND	ND
PCB 101	528.3	ND	ND	ND
PCB 99	422.5	ND	ND	ND
PCB 118	366.7	ND	ND	ND
PCB 153	290.0	ND	ND	209.2
PCB 105	ND	ND	ND	ND
PCB 138	275.8	ND	ND	190.0
PCB 187	254.2	ND	ND	ND
PCB 183	273.3	ND	ND	ND
PCB 128	306.7	ND	ND	ND
PCB 156	284.2	ND	ND	ND
PCB 180	287.5	ND	ND	ND
PCB 170	ND	ND	ND	ND
Metabolitos hidroxilados de los PCBs (ng/g de lípido)				
4-HO-CB-107	385.0	ND	ND	ND
4-HO-CB-146	210.0	ND	ND	ND
4-HO-CB-187	241.7	ND	ND	182.5
4'-HO-CB-172	198.3	ND	ND	ND

ND = No detectable

Tabla 7. Valores establecidos para el control de calidad interno, para cada punto control en plasma fortificado con PCBs e HO-PCBs (identificados como MeO-PCBs).

Congéneres de PCB e HO-PCBs	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$\%R_{\text{prom}} - 2\text{CV}$	$\%R_{\text{prom}} + 2\text{CV}$
PCB 28	15	98.4	106.0
	50		
PCB 52	15	93.1	114.9
	50		
PCB 101	15	95.6	107.2
	50		
PCB 99	15	89.0	120.0
	50		
PCB 118	15	95.2	105.8
	50		
PCB 153	15	97.9	110.6
	50		
PCB 105	15	97.1	106.9
	50		
PCB 138	15	97.1	112.8
	50		
PCB 187	15	98.8	110.3
	50		
PCB 183	15	96.4	117.7
	50		
PCB 128	15	96.2	109.4
	50		
PCB 156	15	95.0	116.0
	50		
PCB 180	15	98.4	104.5
	50		
PCB 170	15	96.6	114.0
	50		
4-HO-CB-107	5	96.9	109.1
	15		
4-HO-CB-146	5	95.3	115.3
	15		
4-HO-CB-187	5	96.7	107.9
	15		
4'-HO-CB-172	5	96.1	114.8
	15		

VI. FIGURAS





