

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE UN GRUPO SELECTO DE
HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS (PAH), EN ACEITES Y GRASAS
VEGETALES COMESTIBLES.**

JULIE ALEXANDRA BAUTISTA OTÁLORA

Directores:

ELENA STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE UN GRUPO SELECTO DE
HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS (PAH), EN ACEITES Y GRASAS
VEGETALES COMESTIBLES.**

JULIE ALEXANDRA BAUTISTA OTÁLORA

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar al título de Químico(a)**

Directores:

ELENA STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

Dedicatoria:

*“A las personas que más amo en el mundo,
las que me dieron su apoyo incondicional
y por quienes son todos mis esfuerzos:
mi madre Maria Eugenia,
mis hermanas Diana, Leidy y Victoria ”.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque sin su presencia nunca hubiera podido alcanzar esta meta.

A mi madre, que con su trabajo y sacrificio, me dio estudio y me impulso a ser alguien en la vida.

A mi familia, que me ayudaron en el proceso de aprendizaje por medio de su confianza y apoyo incondicional.

A la Dra. Elena Stashenko y el Dr. Jairo Martínez, por su dirección en la ejecución de este proyecto, y su gran vocación docente. A los estudiantes de doctorado William Salgar y Deyanira Caballero, por su colaboración y sus enseñanzas.

Al Laboratorio de Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, que suministró el soporte financiero para la realización del proyecto.

A mis amigos, Katika, Alejandra, Victicor, Alegando, Mónica, Ligis y Andresillo; compañeros de trasnochos, rumbas, sufrimientos, y millones de alegrías, gracias porque ustedes saben que han sido una pieza importante en mi vida en estos últimos años.

Gracias a todos los adoro los que han contribuido con este sueño. Dios los siga bendiciendo.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de la varianza)
B[a]P	Benzo[a]pireno
B[e]P	Benzo[e]pireno
B[k]F	Benzo[k]fluoranteno
CE	Comunidad Europea
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector por arreglo de diodos)
DL₅₀	Dosis Letal media
DMF	Dimetilformamida
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agencia de protección ambiental)
FLD	<i>Fluorescence Detector</i> (Detector de fluorescencia)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HPLC-FLD	<i>High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia)
LEP	Límite de exposición permisible
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido)
LMR	Límite máximo de residuo
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i> (Instituto Nacional de Seguridad Ocupacional y Salud)
NF	No fijado
NMD	Nivel mínimo de detección
NMC	Nivel mínimo de cuantificación
ODS	Octadecilsiloxano

OMS	Organización Mundial de la Salud
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i> (Administración de Salud y Seguridad Ocupacional)
PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon(s)</i> [Hidrocarburo(s) policíclico(s) aromático(s)]
Per	Perileno
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
ppt	Partes por trillón
R²	Coefficiente de determinación
RDL	Rango dinámico lineal
S	Desviación estándar muestral
Sb	Desviación estándar de la pendiente de la recta
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
UV	<i>Ultraviolet</i> (Ultravioleta)

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
1 ESTADO DEL ARTE	22
1.1 ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES	22
1.1.1 Composición química de los aceites y grasas vegetales	22
1.1.2 Propiedades físicas	24
1.2 CONTAMINANTES DE LOS ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES	25
1.3 HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	25
1.3.1 Características químicas de los PAH	26
1.3.2 Fuentes de PAH	29
1.3.3 Toxicidad	33
1.3.4 Genotoxicidad	33
1.3.5 Carcinogenicidad	34
1.3.6 Efecto de la exposición a PAH para los seres humanos	35
1.4 PRODUCCIÓN DE ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES	36
1.4.1 Tipo de aceites	37
1.5 PRODUCCIÓN DE GRASAS	38
1.6 CONTAMINACIÓN DE LOS ACEITES CON PAH	38
1.7 LÍMITE LEGAL	40
1.8 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA (HPLC-FLD)	43
1.9 EXTRACCIÓN DE ANALITOS Y ELIMINACIÓN DE INTERFERENCIAS	46
1.9.1 Extracción de PAH	46
2 CIENCIOMETRÍA	53

2.1	PATENTES	54
3	DESARROLLO EXPERIMENTAL	56
3.1	MATERIALES Y REACTIVOS	56
3.1.1	Reactivos y solventes.....	56
3.1.2	Material de referencia certificado.	56
3.1.3	Material del laboratorio.....	57
3.2	MATERIAL DE MUESTRA	57
3.3	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE PAH POR HPLC	57
3.3.1	Pruebas preliminares para HPLC.....	58
3.3.2	Figuras analíticas de mérito	59
3.4	ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SAPONIFICACIÓN DIRECTA DE MATERIAL	60
3.4.1	Saponificación directa del material.....	61
3.5	ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE LIMPIEZA SPE	64
3.5.1	Pruebas preliminares	65
3.6	EXTRACCIÓN DE PAH EN MUESTRAS DE ACEITES Y GRASAS ACEITES VEGETALES COMESTIBLES	66
3.6.1	Figuras analíticas de mérito.	67
3.7	APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS REALES DEL MERCADO LOCAL	68
4	ANÁLISIS DE RESULTADOS	69
4.1	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR HPLC-FLD DE ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES	69
4.1.1	Pruebas preliminares.	69
4.1.2	Figuras analíticas de mérito	77
4.2	EXTRACCIÓN DE PAH EN ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES	81
4.2.1	Diseño experimental.....	81
4.3	FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	92

4.3.1	Determinación de la reproducibilidad del método de extracción. ..	
	92
4.4	APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS REALES	
	PROVENIENTES DEL MERCADO LOCAL	93
4.4.1	Determinación	93
5	CONCLUSIONES	95
6	RECOMENDACIONES	98
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	BIBLIOGRAFÍA	104
	ANEXOS	109

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de mutación del ADN por el B[a]P [20].	35
Figura 2. Etapas para el desarrollo de la técnica SPE	52
Figura 3. Patentes sobre PAH.....	55
Figura 4. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent 1200 Series</i>	58
Figura 5. La matriz del diseño experimental factorial 2^3	63
Figura 6. Equipo para extracción en fase sólida, Baker Spe-24G (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU).	65
Figura 7. Diagrama de flujo para la extracción de PAH simultáneamente. ..	67
Figura 8. Espectros de absorción: (a) B[a]P, (b) Per, (c) B[e]P y (d) B[k]F. .	70
Figura 9. Efecto de la variación de agua en la fase móvil.	71
Figura 10. Efecto de la viscosidad del solvente orgánico y la acidez de la fase móvil.....	72
Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la resolución y tiempo de análisis de los PAH analizadas por HPLC-DAD	73
Figura 12. Perfil cromatográfico de PAH.....	75
Figura 13. Perfil cromatográfico de PAH, obtenido mediante HPLC-FLD	76
Figura 14. Diagramas de Pareto de efectos para el B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, respectivamente	83
Figura 15. Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción del B[a]P.....	84
Figura 16. Diagrama de flujo para la saponificación de aceites y grasas, y posterior extracción de PAH simultáneamente.	85
Figura 17. Comparación de solventes para la extracción líquido-líquido de los PAH de aceites y grasas posterior a la saponificación.	86
Figura 18. Evaluación de las variables en el proceso de SPE.	89
Figura 19. Cromatogramas del extracto de una muestra comercial de aceite de oliva, analizados por HPLC, por el método previamente estandarizado. .	93

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Características físicas y químicas de los principales PAH pesados encontrados en los aceites y grasas comestibles [8]	27
Tabla 2. Análisis cuantitativo en la base de datos <i>Web of Science</i> [35]. ..	53
Tabla 3. Especificaciones técnicas del material de referencia certificado.....	56
Tabla 4. Selección de los parámetros de operación del equipo de cromatografía líquida	58
Tabla 5. Variables y niveles del diseño experimental factorial 2^3 , empleados	63
Tabla 6. Experimentos realizados para las tres variables del diseño factorial	64
Tabla 7. Experimento para la optimización del proceso de SPE.	66
Tabla 8. Longitud de onda de máxima excitación y emisión para cada analito	69
Tabla 9. Parámetros cromatográficos para el análisis selectivo de PAH	74
Tabla 10. Gradiente de elución del método por cromatografía líquida	74
Tabla 11. Tiempo de retención de los PAH para el método desarrollado por HPLC.....	76
Tabla 12. Porcentaje de recuperación de los PAH con el procedimiento de extracción propuesto a muestras de aceites y grasas vegetales comestibles	77
Tabla 13. Linealidad y sensibilidad del método por cromatografía líquida.....	78
Tabla 14. Niveles de detección y cuantificación de los PAH analizados.....	79
Tabla 15. Repetibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por HPLC para los PAH.	79
Tabla 16. Repetibilidad de áreas en el método desarrollado por HPLC para los PAH.	80
Tabla 17. Reproducibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por HPLC para los PAH.	80

Tabla 18. Reproducibilidad de áreas en el método desarrollado por HPLC para los PAH.	80
Tabla 19. Medida del error experimental del análisis de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, para la evaluación del diseño factorial 2^3	81
Tabla 20. Condiciones favorables para la saponificación de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, respectivamente.	84
Tabla 21. Condiciones para la saponificación de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per	85
Tabla 22. Parámetros de operación constantes durante el desarrollo del diseño experimental de SPE.	87
Tabla 23. Experimento para la optimización del proceso de SPE.....	88
Tabla 24. Condiciones más favorables para el proceso de <i>clean-up</i> de cada una de los PAH.....	91
Tabla 25. Condiciones más favorables para el proceso de <i>clean-up</i> en la extracción simultánea de un grupo selecto de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles	91
Tabla 26. Porcentajes de recuperación evaluados en diferentes días para estimar la reproducibilidad en el proceso de extracción de los PAH.....	92
Tabla 27. Concentración (ng/g) de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles analizados	94

LISTADO DE ANEXOS

Anexos A. Proceso de producción de aceite.....	109
Anexos B. Proceso de producción de grasas.	110
Anexos C. Lista de PAH clasificados por la EPA como tóxicos y cancerígenos.....	111
Anexos D. Curva de calibración del B[a]P.	112
Anexos E. Curva de calibración de la Σ B[k]F, B[e]P, Per.	112
Anexos F. Resultados, obtenidos por el <i>software</i> estadístico <i>Statgraphics Centurion XVI</i> , de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para el proceso de saponificación del B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per.	113
Anexos G. Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción de Σ B[k]F, B[e]P, Per.....	114

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE UN GRUPO SELECTO DE PAH, EN ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES*

Autor: BAUTISTA OTÁLORA, Julie Alexandra **

Palabras claves: aceites vegetales, grasas vegetales, PAH, saponificación, SPE, HPLC-FLD.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) representan una de las clases más grandes e importantes de carcinógenos ambientales. Su presencia en los alimentos, genera productos de baja calidad y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores; pueden producir efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, entre otros. Estos efectos adversos han hecho que organizaciones internacionales regulen con fundamento científico las cantidades de PAH potencialmente peligrosas para la salud y sean sometidos a monitoreo en el medio ambiente y productos alimenticios. Debido a su naturaleza lipofílica, los PAH se solubilizan con facilidad en los aceites y grasas comestibles vegetales, que son una fuente importante de alimentación.

En el presente proyecto se desarrollaron los métodos analíticos para el análisis de los PAH: B[a]P, B[k]F, B[e]P y Per se analizaron simultáneamente usando cromatografía líquida con detector de Fluorescencia (HPLC-FLD). Adicionalmente, se estudió la recuperación de los analitos en muestras de aceites y grasas vegetales comestibles mediante saponificación con KOH, extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida (SPE); para ello se diseñó un experimento factorial que involucró los principales factores, siendo la concentración del KOH y la temperatura de la saponificación, las variables de mayor incidencia sobre la eficiencia.

Se evaluó el contenido de éstas sustancias en muestras de aceites y grasas vegetales comestibles aleatorias provenientes del mercado local, con la metodología de extracción y análisis propuesta. Finalmente se dispone de una metodología analítica cromatográfica confiable y reproducible para la determinación de un grupo selecto de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles, y así poder ofrecer un respaldo técnico a los organismos de control nacionales en eventuales exportaciones del producto y, garantizar la seguridad alimentaria a los ciudadanos.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores: Dra. Elena Stashenko y Dr. Jairo Martínez.

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION AND QUANTIFICATION OF A SELECT GROUP OF PAH IN VEGETABLE OILS AND FATS EDIBLE *

Author: BAUTISTA OTÁLORA, Julie Alexandra **

Keywords: vegetable oils, vegetable fats, PAH, saponification, SPE, HPLC-FLD.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) represent one of the largest and most important classes of environmental carcinogens. Their presence in food, produces low quality products are a health risk to consumers, can produce mutagenic and carcinogenic effects, physical developmental disorders, among others. These side effects have made international science-based regulating the amounts of PAH are potentially dangerous to health and are subject to environmental monitoring and food products. Due to its lipophilic nature, PAH are solubilized easily in edible vegetable oils and fats, which are an important source of food.

In this project we developed analytical methods for analysis of PAH: B [a] P, B [k] F, B [e] P and Per were also analyzed using HPLC with fluorescence detector (HPLC-FLD).

Additionally, we studied the recovery of the analytes in samples of edible vegetable oils and fats by saponification with KOH, liquid-liquid extraction and solid phase extraction (SPE) for this factorial experiment was conducted involving the main factors being the KOH concentration and temperature of the hydrolysis, the main factors affect the efficiency.

We evaluated the content of these substances in samples of edible vegetable oils and fats random from the local market, with the extraction and analysis methodology proposed. Finally we have a reliable chromatographic analytical methodology and reproducible for the determination of a select group of PAHs in edible vegetable oils and fats, so we can provide technical support to national control agencies in possible exports of the product and ensure safety food to citizens.

* Project level

** Faculty of Science, School of Chemistry, Directors: Dr. Elena E. Stashenko and Dr. Jairo R. Martínez.

INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados en las últimas décadas sugieren que, si bien la predisposición genética es un factor importante, la aparición de cáncer en el hombre también está estrechamente relacionada con los factores ambientales. En particular, la atención se ha centrado en el papel desempeñado por carcinógenos químicos existentes en el medio ambiente. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) representan una de las clases más grandes e importantes de carcinógenos ambientales [1].

Los PAH constituyen un importante grupo de contaminantes, que se encuentran en todos los campos ambientales, y son principalmente los productos de la combustión incompleta de las actividades naturales (e.g., fuegos forestales, erupciones volcánicas) y antropogénicas (e.g., ignición de combustibles fósiles, procesos industriales y tubo de escape de vehículos). Hasta ahora, se han encontrado más de 400 tipos de PAH, y de sus derivados [2-4].

Los PAH son una familia diversificada de contaminantes orgánicos lipofílicos, compuestos por dos o más anillos aromáticos fusionados. Debido a sus múltiples fuentes potenciales de contaminación, los PAH se encuentran distribuidos en la naturaleza. Por tanto, la exposición humana es prácticamente inevitable, lo que plantea un importante problema de salud pública debido a su reconocida actividad carcinógena, ya que sus metabolitos se unen al ADN y pueden inducir una mutación y el cáncer. La exposición humana a los PAH está en un 88-98% relacionada con los alimentos [5]. La presencia de PAH en los alimentos, genera productos de baja calidad y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores; pueden producir efectos mutagénicos y carcinogénicos, alteraciones en el desarrollo corporal, entre otros. Estos efectos adversos han hecho que organizaciones internacionales regulen con fundamento científico las

cantidades de PAH potencialmente peligrosas para la salud y sean sometidos a monitoreo en el medio ambiente y productos alimenticios. [2].

Entre los 16 PAH que son clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de la Protección Ambiental (EPA) sobre la base de su ocurrencia y la carcinogenicidad, se encuentran benzo[a]pireno (B[a]P), benzo[k]fluoranteno (B[k]F), benzo[e]pireno (B[e]P) y perileno (Per); que se clasifican como PAH pesados, por el contenido de más de 4 anillos aromáticos [4].

Debido a su naturaleza lipofílica, los PAH se solubilizan con facilidad en los aceites y grasas comestibles vegetales, que son una fuente importante de alimentación. Esta contaminación puede ser un resultado de la absorción de un medio ambiente contaminado o de los métodos de preparación de alimentos. En el caso específico de aceites vegetales, se tiene conocimiento sobre las principales fuentes de su contaminación: (a) la contaminación del material vegetal, principalmente a través del aire; (b) el secado del material vegetal con humo antes de la extracción; (c) la contaminación a través de la extracción con disolventes [6, 7].

Los siguientes son los principales problemas asociados con el análisis de los PAH a saber: (a) la mayoría de los PAH están presentes en pequeñas cantidades (partes por billón o partes por trillón) en el medio ambiente (aire, agua y suelo), o en alimentos y, además, pueden sufrir pérdidas durante la preparación o extracción de la muestra; (b) muchos compuestos orgánicos pueden ser co-extraídos con los PAH e interferir con su posterior análisis, identificación y cuantificación; (c) la mayoría de los PAH son similares estructuralmente, lo que puede hacer difícil su separación y una identificación inequívoca. En la industria de aceites y grasas, un método fiable y rápido para la determinación de un grupo selecto de PAH, es muy importante para

fines del control del proceso; además, permitirá estimar el nivel de PAH pesados en lugar de su análisis completo [2, 6].

La naturaleza de los procesos de combustión, la variedad de la materia orgánica y los combustibles fósiles, exigen que una técnica en particular deba ser capaz de manejar mezclas complejas; teniendo en cuenta esto, cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son sin duda las técnicas de elección. El poder de resolución, velocidad de análisis y bajos límites de detección son ventajas importantes que ofrecen estas técnicas [7].

Una de las desventajas de GC es la posible degradación de algunos PAH cuando se exponen a altas temperaturas durante la separación y, además, algunos PAH isómeros tales como B[a]P, B[k]F, B[e]P y Per son difíciles de separar completamente cuando se usa una columna inadecuada; por estas razones, y debido a la volatilidad de los PAH; HPLC es frecuentemente una técnica de análisis de elección [6, 7].

En la HPLC, además de la fase estacionaria, la fase móvil (ya sea régimen isocrático o gradiente de elución), y la temperatura de la columna permite, diferentes posibilidades de separación y detección que ofrece alto nivel de versatilidad aprovechando las características espectrales de los PAH. La detección de fluorescencia (FLD) ofrece mejores resultados que la detección ultravioleta (UV) debido a su mayor sensibilidad y selectividad para los analitos. Además, las longitudes de onda de fluorescencia se pueden escoger para mejorar la especificidad y la selectividad hacia los PAH individuales presentes en la mezcla, a fin de minimizar las interferencias procedentes de las muestras [7].

La mayoría de los métodos utilizados para el aislamiento de PAH de aceites o grasas consisten en procedimientos que consumen tiempo: saponificación de grasas, extracción por solvente, y la extracción de columna o *clean-up*.

Actualmente hay una demanda alta de métodos analíticos rápidos, de costos adecuados, “limpios” y suficientemente sensibles para poder controlar la contaminación en el ambiente y establecer las concentraciones requeridas en análisis de alimentos.

Por lo anterior, en el presente proyecto se desarrollaron los métodos analíticos para el análisis de los PAH: B[a]P, B[k]F, B[e]P y Per se analizaron simultáneamente usando cromatografía líquida con un detector de fluorescencia (FLD). Se evaluó el contenido de estas sustancias en muestras de aceites y grasas vegetales comestibles provenientes del mercado local, con la metodología de extracción propuesta.

La Universidad Industrial de Santander dispone de una metodología analítica cromatográfica confiable y reproducible para la determinación de un grupo selecto de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles, y por ende, puede ofrecer un respaldo técnico a los organismos de control nacionales en eventuales exportaciones del producto y, contribuir a garantizar la seguridad alimenticia de los ciudadanos.

1 ESTADO DEL ARTE

1.1 ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES

Los aceites y grasas se encuentran en la naturaleza como constituyentes de muchos tejidos animales y vegetales, de donde pueden ser extraídos por métodos industriales. La diferencia más simple entre los aceites y las grasas radica en su consistencia a la temperatura de 15 °C; los aceites funden a temperaturas inferiores, mientras las grasas lo hacen a temperaturas superiores [8, 9].

Los aceites y grasas vegetales se obtienen a partir de frutos y semillas ricos en grasa; las plantas a las que pertenecen estos frutos y semillas se agrupan bajo el nombre de plantas oleaginosas. Se obtiene aceite de las semillas de ajonjolí, girasol, soya, maní, algodón, mostaza; del germen del maíz, de la nuez del coco y del cacao, de la palma y la aceituna [8-10].

Los lípidos juegan papeles de importancia en el organismo. El primero es su función energética, es decir, su aporte calórico a la dieta; el segundo es funcional, puesto que intervienen en la estructura de las células especialmente a nivel de las membranas. Las grasas son fuentes de ácidos grasos, es así como, las grasas ingeridas retardan la secreción de jugo gástrico y tienden a hacer que el alimento permanezca por más tiempo en el estómago prolongando así la sensación de saciedad [9].

1.1.1 Composición química de los aceites y grasas vegetales

Químicamente, los aceites y grasas son mezclas de triglicéridos, es decir, de ésteres de ácidos grasos y glicerol. Entre los ácidos grasos saturados los más importantes son el palmítico y el esteárico, y entre los insaturados, el oléico y el linoléico [8, 9].

Los ácidos grasos insaturados presentan puntos de fusión más bajos que sus homólogos saturados, y esta temperatura disminuye a medida que aumenta la insaturación. Esto explica porqué la existencia de sustancias grasas que son líquidas (aceites) y otras que son sólidas (grasas). Cuanto mayor es la insaturación de un aceite o grasa, más bajo es su punto de fusión [8-10].

Además de los triglicéridos, existen en los aceites y grasas diversos componentes menores. Entre estos se deben mencionar:

- Los monoglicéridos y diglicéridos; son el resultado de reacciones hidrolíticas en las materias primas o durante la transformación, pero no ocasionan problemas particulares en los productos finales. En estos compuestos el glicerol se encuentra esterificado únicamente con uno o dos ácidos grasos, lo que le permite tener buenas propiedades emulsificantes.
- Los fosfolípidos, los cuales provienen de la esterificación de la glicerina con ácidos grasos y ácido fosfórico; los más comunes son la lecitina y la cefalina. Los subproductos recuperados se venden como lecitina comercial para su uso en margarinas y confitería que requiere un emulsificador soluble en grasas.
- Esteroles como el fitosterol que es un alcohol policíclico complejo.
- Vitaminas E y buenos contenidos de alfa y beta-carotenos, precursores de la vitamina A. Muchos aceites, particularmente si se obtienen de semillas inmaduras, contienen niveles apreciables de pigmentos de clorofila que dan un tinte verdoso a las grasas.

- Otros entre los cuales se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos, aldehídos y cetonas.

La acidez es un parámetro indicador de la cantidad de ácidos grasos libres presentes en un aceite y se expresa en porcentaje de ácido oleico, porque es el ácido graso mayoritario en muchos aceites. Para la legislación colombiana, las condiciones de los productos grasos que se encuentran en el mercado para consumo directo del público tendrán que cumplir los valores físico-químicos, según la Resolución del Ministerio de Salud 000126 del 22 de febrero de 1964 [9].

1.1.2 Propiedades físicas

En la producción de los aceites y grasas vegetales el peso específico, la viscosidad y el punto de fusión son las propiedades físicas de los aceites que revisten más interés para el proceso. En razón de las grandes semejanzas entre las moléculas de triglicéridos que hay en los diferentes aceites y grasas, las densidades y viscosidades de estos no varían significativamente [11-12].

El peso específico de casi todas las grasas en estado líquido no tiene diferencias notables. Los valores usuales están entre 0.914 y 0.964 kg/L a 15 °C. Las densidades de las grasas en estado sólido son mucho más altas (1 a 1.06 kg/L) que las de las grasas líquidas. Los puntos de fusión de las grasas y aceites comerciales son indicaciones poco precisas de las propiedades de los productos. La fusión comienza en una gama más amplia de temperaturas y aumenta con la longitud de la cadena de ácidos grasos. El índice de yodo da una indicación del grado de insaturación de los aceites y grasas, expresado como el número de centigramos de yodo absorbidos por gramo de grasa o aceite. El índice de refracción aumenta con el peso

molecular y tiene una relación que crece de modo aproximadamente lineal con el grado de insaturación de las grasas neutras. Se usa para probar la pureza de los productos y supervisar las operaciones de hidrogenación e isomerización [12].

El valor de saponificación es una indicación de la hidrólisis de las grasas. Se mide como el peso en miligramos del hidróxido de potasio requerido para hidrolizar un gramo de grasa.

1.2 CONTAMINANTES DE LOS ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES

Las grasas y aceites obtenidos por fusión, prensado o extracción con disolventes, contienen cantidades variables de impurezas no glicéridas, las cuales consisten principalmente en ácidos grasos libres. Sin embargo, se encuentran apreciables cantidades de otras sustancias. Entre éstas, figuran: material sólido, material líquido, rafinosa, fosfatos de inositas, clorofilas, proteasas, PAH, entre otras; no todas las impurezas de los aceites y grasas son indeseables [11].

1.3 HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Hidrocarburos policíclicos aromáticos son una clase de compuestos reconocidos como cancerígenos y procedentes de la combustión incompleta de compuestos orgánicos y los procesos geoquímicos. A altas temperaturas los compuestos orgánicos se fragmentan parcialmente en pequeños arreglos moleculares inestables (pirólisis), sobre todo los radicales, que se recombinan para dar PAH relativamente estables (pirosíntesis) [1,2]. La aromatización también puede ocurrir a bajas temperaturas (100-150 °C), pero requiere mucho más tiempo y se originan grandes cantidades de PAH

alquilados. Este es el caso de la formación natural de combustibles fósiles, que resultan de la degradación de materia orgánica durante un período de miles de años [12].

Debido a la amplia distribución de los PAH en el medio ambiente y su naturaleza lipofílica, aceites y grasas comestibles pueden ser altamente contaminados con estas sustancias xenobióticas.

Los PAH son compuestos químicos que poseen anillos aromáticos unidos, no contienen heteroátomos o sustituyentes. Se encuentran en los aceites debido a su carácter lipofílico. Los PAH livianos (contienen de 1 a 4 anillos aromáticos) se eliminan durante las etapas de refinación; los PAH pesados (contienen desde 5 anillos aromáticos), son removidos mediante tratamiento con carbono [12-13]. Los estudios han mostrado que una de las principales fuentes de PAH en el organismo proviene de alimentos como cereales, aceites y grasas [12].

1.3.1 Características químicas de los PAH

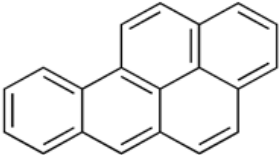
Los PAH pertenecen a una gran clase de compuestos que proceden de la combustión incompleta de la materia orgánica. Comprenden varios compuestos cancerígenos, genotóxicos; entre estos, el B[a]P es el más estudiado, debido a su alta toxicidad y porque ha sido elegido como marcador de la presencia de PAH. La persistencia de los PAH como partículas finas asociadas con el aire, es un asunto importante no sólo porque en la atmósfera podrán ser transportados a largas distancias, sino también porque pueden sufrir reacciones químicas. Estas transformaciones pueden conducir a su degradación o transformaciones en productos más tóxicos que el compuesto de origen [15,16].

Los sistemas conjugados de orbitales π de los PAH son los responsables de su estabilidad química. Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es pequeña. Dependiendo de su carácter aromático, los PAH absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en muchos disolventes orgánicos, pero prácticamente insolubles en agua, tanto menos cuanto mayor sea su peso molecular [17].

Químicamente, los PAH reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce la saturación, conservándose el sistema de anillos. La mayoría de los PAH sufre fotooxidación, siendo ésta una forma para eliminarlos de la atmósfera. La reacción de fotooxidación más frecuente es la formación de endoperóxidos, que pueden convertirse a quinonas. Los PAH reaccionan rápidamente con óxidos de nitrógeno o HNO_3 . El hecho de que los PAH sean considerados cancerígenos o no, al reaccionar con otras sustancias no significa que se inactiven como tales; por el contrario, muchos de ellos se transforman en cancerígenos más potentes que el correspondiente compuesto progenitor [17,18].

En la **Tabla 1**, se muestran las características físicas, químicas y algunos parámetros toxicológicos de los PAH pesados encontrados en aceites y grasas comestibles.

Tabla 1. Características físicas y químicas de los principales PAH pesados encontrados en los aceites y grasas comestibles [8].

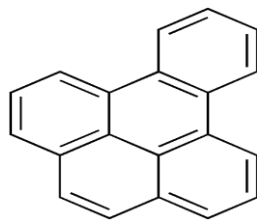
PAH	Benzo[<i>a</i>]pireno, $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$
	
Propiedades fisicoquímicas	CAS: 50-32-8, peso molecular: 252.31 g/mol; Color: Cristal amarillo; punto de ebullición: 495 °C; punto de fusión: 179 °C; solubilidad: Benceno, tolueno y xileno; ligeramente en etanol y metanol. En agua 3.8 µg/L a 25 °C.

Parámetros toxicológicos

LMR: 1 µg/kg , DL₅₀: No reportado

PAH

Benzo[e]pireno, C₂₀H₁₂



Propiedades fisicoquímicas

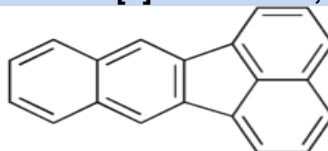
CAS: 192-97-2, peso molecular: 252.31 g/mol; Color: sólido blanco; punto de ebullición: 472 °C. Punto de fusión: 179 °C; solubilidad: Éter y acetona. En agua 4 µg/L a 25 °C

Parámetros toxicológicos

LMR: No reportado, DL₅₀: No reportado

PAH

Benzo[k]fluoranteno, C₂₀H₁₂



Propiedades fisicoquímicas

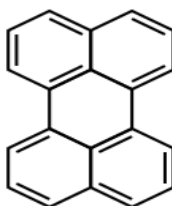
CAS: 207-08-9, peso molecular: 252.31 g/mol; Color: sólido amarillo, en solución con acetona su color es violeta; punto de ebullición: 480 °C; punto de fusión: 215.7 °C; solubilidad: Benceno, tolueno y xileno; ligeramente en etanol y metanol.

Parámetros toxicológicos

LMR: 1-2 µg/kg , DL₅₀: No reportado

PAH

Perileno, C₂₀H₁₂



Propiedades fisicoquímicas

CAS: 198-55-0, peso molecular: 252.31 g/mol; Color: amarillo brillante; punto de ebullición: 468 °C; punto de fusión: 276 °C; solubilidad: Tolueno y acetona.

Parámetros toxicológicos

LMR: No reportado , DL₅₀:No reportado

1.3.2 Fuentes de PAH

1.3.2.1 Fuentes naturales

1.3.2.1.1 Transformación de compuestos orgánicos

Relativamente rápida (de días a años) en determinados suelos y sedimentos (PAH diagénicos). Bajo condiciones anóxicas o en condiciones de hipoxia, ciertos compuestos como quinonas y fenoles entre otros, pueden ser reducidos a PAH [19].

1.3.2.1.2 Biosíntesis

Directa por organismos (PAH biogénicos). Existe una amplia variedad de compuestos aromáticos que son sintetizados por organismos, particularmente bacterias, hongos y algunos insectos; no obstante esta fuente no es cuantitativamente importante [19].

1.3.2.1.3 Los incendios forestales

Con o sin intervención del hombre, son una fuente de hidrocarburos aromáticos que ha sido ampliamente descrita. En zonas rurales poco urbanizadas e industrializadas puede ser la principal fuente y en otras zonas su contribución al total de emisiones también puede ser importante. Los compuestos así formados, se asocian habitualmente a materia particulada. Se ha descrito que la concentración de PAH en suelos está fuertemente influenciada por las cenizas resultantes de la combustión de madera [19-20].

1.3.2.1.4 Fugas naturales de petróleo

Ya que los PAH se encuentran de forma natural en los combustibles fósiles (el crudo de petróleo o el carbón), como resultado de una lenta transformación biogénica (millones de años) de materia orgánica a

temperaturas moderadas (100-300 °C) para formar combustibles fósiles (PAH petrogénicos). Las concentraciones suelen ser bajas, alrededor del 1% y, en todo caso, dependen en gran medida del origen del crudo. Este proceso de formación favorece la formación de alquilderivados, de forma que los PAH no sustituidos tienen una concentración relativa más baja. [18-20].

1.3.2.1.5 Erupciones volcánicas

Las elevadas temperaturas que se alcanzan en los magmas volcánicos hacen posible la formación de PAH, fundamentalmente de elevado peso molecular.

1.3.2.2 Fuentes antrópicas

1.3.2.2.1 Tráfico

El transporte por carretera, así como de otro tipo de vehículos a motor que usen combustibles fósiles, representa una importante fuente de emisión de PAH ya que además de los constituyentes de éstos, las temperaturas de un motor de combustión son lo suficientemente altas para convertir una fracción del combustible en PAH vía pirólisis. La cantidad emitida por los vehículos depende de muchos factores aunque fundamentalmente del tipo de motor y de la edad del vehículo/motor. Otros factores que influyen son los hábitos de conducción ocasionados por la topografía, la calidad de las vías o la temperatura externa. Debido al tráfico rodado, y como consecuencia del desgaste de los neumáticos, el polvo de la carretera también es una fuente adicional de PAH. Estos compuestos emitidos a la atmósfera por los vehículos se distribuyen entre la fase gaseosa y particulada en función de la presión de vapor del compuesto, cantidad de materia particulada existente y temperatura. Posteriormente son degradados fotoquímicamente o depositados sobre las superficies de las calles, donde entran a formar parte

de la escorrentía superficial. Las diferencias en el perfil de distribución en suelos y plantas podía ser debido a diferentes mecanismos de degradación (mayor fotodegradación en el caso de plantas) y por las distintas propiedades de deposición, ya que los compuestos encontrados en las plantas se encuentran principalmente en fase gas, fácilmente adsorbidos por éstas, mientras que los PAH depositados en suelos, eran compuestos de más anillos, principalmente en fase particulada y fácilmente eliminados de las hojas por la lluvia o el viento [19].

1.3.2.2.2 Las plantas de producción de aluminio

Representan un proceso industrial históricamente asociado con emisiones y vertidos de PAH. El aluminio metálico se obtiene por reducción electrolítica de alúmina pura (Al_2O_3) disuelta en un baño de criolita fundida (Na_3AlF_6) que actúa como electrolito. Los electrodos de carbono sumergidos en el electrolito y que actúan como ánodo se consumen durante el proceso y es necesario un aporte continuo suministrado generalmente por una pasta que es mezcla de coke de petróleo y brea de alquitrán mineral. Además de las temperaturas elevadas necesarias en la fundición de la alúmina, al menos seis PAH carcinogénicos se han encontrado en la brea utilizada en el proceso de reducción de aluminio, por lo que resulta una fuente importante de contaminación para el agua, aire y suelo [18-20].

1.3.2.2.3 Industria del hierro y acero

Las emisiones proceden fundamentalmente de los procesos térmicos que usan carbón y coque, es decir, plantas de sinterización, plantas de coque y hornos. Los PAH formados en los procesos de combustión dependen de varios factores, como tipo de combustible, proceso de manufactura o los dispositivos utilizados para el control de las emisiones; no obstante, el primer factor es el más importante.

1.3.2.2.4 Plantas de generación de energía

Muchas plantas de generación de calor y electricidad (centrales térmicas) queman combustibles fósiles y producen como subproductos residuos líquidos, sólidos y gaseosos que son ricos en PAH. Estas fuentes, liberan PAH al medio ambiente por la formación de éstos durante el proceso industrial o bien a través de la pirólisis de los combustibles mencionados para producir energía. Estos PAH no se degradan en la atmósfera, sino que son adsorbidos sobre las partículas suspendidas en el aire, entrando en los medios acuáticos y terrestres por deposición atmosférica [20].

1.3.2.2.5 Incineradoras de residuos industriales y municipales

La incineración es una valiosa forma de eliminar y reducir residuos pero el principal inconveniente de este proceso es la emisión de compuestos tóxicos, incluyendo los PAH. Estos residuos pueden introducirse al medio por tres vías: los gases de chimenea, los residuos sólidos (cenizas) y las aguas residuales de las incineradoras. Por otro lado, en cenizas degradadas, aparecen Naf y Fen como los más abundantes más en concordancia con los predominantes en los gases de chimenea.

1.3.2.2.6 Combustión doméstica

Está bien documentado que la combustión de sólidos, especialmente madera y otro tipo de biomasa, en hornos pequeños y plantas de combustión de tamaño medio, ocasionan emisiones relativamente altas de estos compuestos, debido a las deficientes condiciones de combustión en instalaciones anticuadas. Esto también puede crear problemas de contaminación de aire a nivel local, en zonas de alta densidad de población, especialmente en invierno. Se han identificado como componentes principales en extractos de hollín domésticos, hidrocarburos de cinco y seis anillos aromáticos, como el B[b]F y B[e]P como mayoritarios [19].

1.3.3 Toxicidad

Los PAH son conocidos por ser tóxicos en concentraciones de ppb y letales en concentraciones de ppm. Varios trabajos han indicado su toxicidad. En los perros, una sola dosis oral de 10,5 g/animal dado durante un período de 7 días induce anemia. Tras la administración oral de antraceno a 100 mg/kg/día a ratas durante 4 días se observó aumento de la actividad en la mucosa intestinal carboxilesterasa y la muerte después de la administración oral diaria de 120 mg/kg de benzo[a]pireno a los ratones de 1 a 4 semanas. Tras la administración de acenafteno a 700 mg/kg/día a ratones durante 90 días, aumentó el peso del hígado y se observó hipertrofia celular. Otros efectos tóxicos observados debido a los PAH incluyen disminución del peso corporal, agrandamiento del hígado con edema celular y la congestión del parénquima hepático, toxicidad reproductiva, la destrucción de los ovocitos, y la inflamación de las células renales [20].

1.3.4 Genotoxicidad

Genotoxicidad o mutagenicidad es la capacidad de un compuesto extranjero o un efecto de xenobióticos de una reorganización de la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN) con sus consiguientes repercusiones. Esto ocurre como resultado de múltiples transformaciones metabólicas que tienen lugar en los PAH. Estas transformaciones la mayoría de las veces conducen a la formación de derivados electrofílicos capaces de realizar una interacción covalente con centros nucleofílicos de macromoléculas, que se traduce en la mutagenicidad. El mecanismo de la mutagenicidad de los PAH se ha investigado sobre todo con el benzo[a]pireno y 7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-7,8,9,10 tetrahidro-benzo[a]pireno como compuestos modelo. Varias obras en apoyo de la genotoxicidad de los PAH se han llevado a cabo y han mostrado que el espectro mutacional inducido por 7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-

7,8,9,10-tetrahidro-benzo[a]pireno presenta una prevalencia de transversiones de guanina> timosina (G>T) debido a la rotación de aducción guanina [15].

1.3.5 Carcinogenicidad

El interés sobre los PAH se ha debido principalmente a sus propiedades cancerígenas. Los seres humanos están expuestos a mezclas complejas de PAH, que se han implicado en la inducción de cáncer de pulmón, piel, estómago y mama. Cabe señalar que todos los estudios sobre la carcinogenicidad de los PAH se han realizado con ratones y roedores, ya que no es posible evaluar el riesgo para la salud humana, solo en casos de estudios de exposiciones accidentales. Por lo tanto, se basan en los datos de los animales para estimar el riesgo de exposición a los seres humanos. Los datos de la extrapolación de riesgo para la salud de los animales, pueden no ser absolutamente exactos debido a las diferencias en la enzima que activa los PAH en las especies [20]. La mayoría de los datos disponibles en humanos son la inhalación y la absorción percutánea de los PAH a partir de una amplia gama de exposiciones ocupacionales, debido, a que la correlación absoluta con la exposición a otras sustancias químicas es menor. Existe una correlación entre el sitio del desarrollo del tumor y la vía de la administración. Por ejemplo aplicaciones oral, cutánea, e intratraqueal resultaron en cáncer gástrico, la piel y de pulmón, respectivamente [21].

1.3.5.1 Carcinogénesis de los PAH

La carcinogénesis de los PAH es básicamente resultado de su capacidad para unirse al ADN, provocando una serie de efectos perturbadores que terminan en la iniciación del tumor. Los receptores de los PAH juegan un papel muy importante en esto. La carcinogénesis inducida de los PAH es

muy compleja y varía con el compuesto aislado [20-21]. Con fines ilustrativos, la carcinogénesis inducida por el benzo[a]pireno se puede observar en la **Figura 1**.

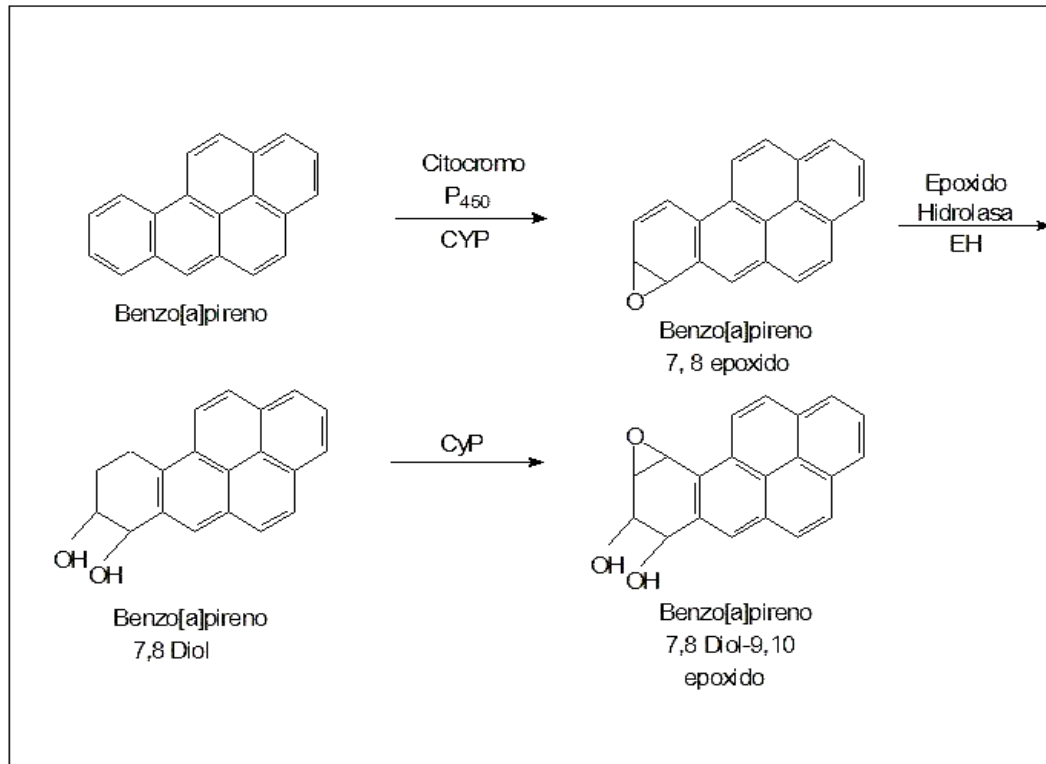


Figura 1. Mecanismo de mutación del ADN por el B[a]P [20].

1.3.6 Efecto de la exposición a PAH para los seres humanos

La mayoría de los estudios que se han llevado a cabo en el laboratorio sobre el efecto de los PAH en la salud se han realizado más en animales que en seres humanos debido a las implicaciones éticas. Por lo tanto no existen prácticamente estudios publicados sobre los efectos en la salud humana después de la exposición oral a los PAH. En la mayoría de los seres humanos se dan los casos de exposición a una mezcla de PAH por inhalación y la exposición cutánea. Otro inconveniente asociado a estos datos es que todos los informes sobre la exposición humana a los PAH

tienen los mismos sujetos expuestos a otros potenciales productos químicos cancerígenos en situaciones laborales y ambientales. La información de efectos sobre la salud de estas mezclas es, pues, limitada a sus potenciales derivados cancerígenos de una serie de estudios epidemiológicos. Se correlacionó el riesgo de cáncer gástrico con el consumo de un vino sellado con una sustancia parecida al alquitrán obtenida a través de ebullición y destilación de abeto y pino, y que contiene PAH. El humo del tabaco, que contiene PAH, se ha implicado en el cáncer de pulmón [15]. Muchos estudios epidemiológicos se han llevado a cabo en los trabajadores expuestos a carga pesada de los PAH, sobre todo los que trabajan en las minas de carbón, las obras de asfalto, las fundiciones de aluminio, etc. A pesar de que las concentraciones a las que estos trabajadores son expuestos aún no están claras, el aumento de riesgo de cáncer de pulmón se observó entre los trabajadores [22].

1.4 PRODUCCIÓN DE ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES

Los aceites y grasas vegetales se obtienen a partir de frutos y semillas ricas en grasas; las plantas a las que pertenecen estos frutos y semillas se agrupan bajo el nombre de plantas oleaginosas. Se obtienen de las semillas de ajonjolí, girasol, soya, maní, algodón, mostaza; del germen del maíz, de la nuez del coco y del cacao, de la palma y de la aceituna [8-9].

El proceso de extracción varía de acuerdo con el tipo de materia prima, pero fundamentalmente comprende la separación de la parte del fruto a la semilla rica en grasa, el triturado y la extracción del aceite mediante la utilización de presión y/o solventes.

La refinación se realiza mediante el tratamiento del aceite con una solución acuosa alcalina, generalmente de hidróxido de sodio o carbonato de sodio, con el objeto de neutralizar los ácidos grasos libres presentes; la decoloración tiene como finalidad eliminar los pigmentos vegetales como clorofilas y carotenoides, para lo cual se agita el aceite con tierras raras que absorben los pigmentos; la desodorización elimina las impurezas volátiles indeseables mediante una destilación con corriente de vapor a baja presión; el fraccionamiento, que incluye la winterización, permite eliminar los sólidos presentes mediante cristalización y posterior filtración; la hidrogenación o endurecimiento es la clásica reacción de adición de hidrógeno en los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados con el objeto de comunicar a el aceite una mayor estabilidad frente a la oxidación y un aumento en el punto de fusión [8].

1.4.1 Tipo de aceites

1.4.1.1 Aceites de oliva

Los aceites se clasifican de muchas maneras, una de ellas es según el proceso utilizado para su obtención. Los aceites obtenidos por proceso de prensado de la semilla de oliva son conocidos como aceite de oliva. El aceite de oliva se comercializa como aceite nativo o virgen de tres calidades: extra, fino y corriente según el número del prensado y el contenido de ácidos grasos libres; extra, si es el resultado del primer prensado, de color verde pálido, aroma suave y bajo contenido de ácidos grasos libres; las sucesivas expresiones implican un oscurecimiento gradual del color verde debido a la mayor extracción de clorofila y un aumento en la intensidad del aroma y en el contenido de ácidos grasos libres [24].

Los aceites de oliva vírgenes se clasifican así:

- Aceite de Oliva Extra Virgen

- Aceite de Oliva Virgen
- Aceite puro

1.4.1.2 Aceite refinados

Son los obtenidos de las semillas oleaginosas expresamente autorizadas y sometidos a refinación completa previa su utilización para consumo humano [24].

1.5 PRODUCCIÓN DE GRASAS

Las operaciones de modificación de los aceites, incluidas la hidrogenación, la interesterificación y la cristalización fraccionada, generaran productos con propiedades funcionales específicas que ofrecen flexibilidad en los usos finales de los aceites vegetales [23-24].

Principalmente los aceites se obtienen mediante los siguientes procesos:

- Hidrogenación
- Interesterificación
- Cristalización fraccionada

1.6 CONTAMINACIÓN DE LOS ACEITES CON PAH

La contaminación de aceites y grasas comestibles con PAH varía ampliamente; los aceites vegetales refinados generalmente presentan bajos niveles de PAH si se les compara con los crudos. Esto puede atribuirse, al menos en parte, a la reducción de los PAH observada a través de la refinación. La desodorización parece tener poco efecto en los PAH de alto peso molecular y elimina principalmente PAH livianos, mientras que el tratamiento con carbón activado, es una estrategia eficaz para reducir la alta concentración de PAH pesados. Para entender más las etapas que contribuyen tanto a la contaminación como a la eliminación de los aceites y

grasas con PAH, es importante tener una idea básica del proceso de producción de estos. En los **anexos A y B** se puede observar el proceso de producción de aceites y grasas comestibles [4].

Diversas vías de contaminación por PAH en los aceites vegetales han sido sugeridas. Los procesos de secado de las semillas con fuego directo para la producción de aire caliente, puede ser responsable de la contaminación por los PAH principales de algunos aceites vegetales, el proceso de refinado puede reducir drásticamente la cantidad de estos contaminantes [21].

La contaminación del aire con polvo y partículas que contienen grandes cantidades de PAH generados pirolíticamente puede contaminar las plantas o la materia prima a través de las precipitaciones atmosféricas durante el período de crecimiento y la mayor parte de esta contaminación superficial, se pueden transferir al producto final. Alto contenido de PAH se encuentra en aceites de oliva virgen italianos que se derivan de las plantas expuestas a las emisiones industriales del campo condensado (el B[a]P y fenantreno, por encima de 60 y 3800 ppb, respectivamente) y, en menor medida, en los aceites vírgenes procedentes de las plantas expuestas a los escapes de vehículos. También la práctica de quemar el campo después de la cosecha puede ser una operación sospechosa lo que se refiere a la contaminación por PAH. Los análisis de muestras de colza, purificada en el laboratorio por lavado de las semillas con disolventes orgánicos en un baño de ultrasonidos, reveló que las partículas sólidas, que contaminan semillas de colza durante la recolección, transporte y almacenamiento, ha contribuido a la contaminación por PAH en la medida de 36% (PAH livianos) 64% (PAH pesados) en promedio [21].

Los aceites vegetales están contaminados principalmente por la contaminación ambiental que sufren las materias primas, el secado de semillas, la extracción con solvente, la quema de suelos, los materiales de

acondicionamiento, los residuos de aceites minerales y la migración de agua contaminada a los suelos [22].

Una forma diferente de contaminación puede deberse al contacto con los residuos de aceite mineral, rico en PAH alquilados de origen natural que han sido generadas por procesos geoquímicos. Por ejemplo, la práctica de guardar y transportar las semillas oleaginosas en sacos de yute tratada con aceites minerales (antes de la hilatura de las fibras de yute) puede causar la migración de los PAH a los alimentos. Trazas de los aceites lubricantes usados para el mantenimiento de plantas de extracción pueden ser encontradas en los aceites vegetales [21].

1.7 LÍMITE LEGAL

Debido a que los compuestos aromáticos policíclicos son sustancias cancerígenas sin umbral, es difícil establecer la mínima dosis posible que pueda afectar la salud de una persona. Además no todas las personas son vulnerables de la misma forma, ya que la posibilidad de desarrollar cáncer es un proceso que involucra varias etapas y puede ser influenciado por la susceptibilidad individual y otros factores tales como la edad, sexo, etnia, estado de salud, nutrición y polimorfismo genético, además de la dificultad de extrapolar los datos de toxicidad de los animales a los seres humanos, aún no ha sido posible fijar los niveles de PAH que constituyen un riesgo para la salud [21].

A pesar de esto, algunos países han fijado los niveles de PAH a controlar:

- Para la Unión Europea los niveles límite tolerables para los PAH pesados en aceites son de 1 ppb y un máximo total de 5 ppb de PAH pesados.

- En España, los niveles límite tolerables para los PAH pesados en aceites son de 2 ppb y un máximo total de 5 ppb de PAH pesados.
- En Alemania, los niveles límite tolerables para los PAH pesados en aceites son de 1 ppb, un máximo total de 5 ppb de PAH pesados y 25 ppb para PAH totales [14].

En Colombia no existen Normas para los PAH y la deficiencia de estudios y en parte el desconocimiento de la existencia de estas sustancias han incidido en la falta de acciones que prevengan, reduzcan, minimicen, mitiguen y controlen la emisión de estas sustancias a la atmósfera. Por tanto investigaciones pioneras como esta, están enfocadas a dar a conocer el impacto que pueden tener estos compuestos en la salud humana y la importancia que hay que darle a los mismos para poder tomar medidas. Importancia que se podría reflejar en el desarrollo de nuevas investigaciones y de políticas de control para darle cumplimiento al numeral 6 del artículo 1 de la Ley 99 de 1993 “Principios Generales Ambientales” que dice textualmente:

La formulación de las políticas ambientales tendrá en cuenta el resultado del proceso de investigación científica, no obstante, las autoridades ambientales y los particulares darán aplicación al principio de precaución conforme al cual, cuando existe peligro de daño grave e irreversible la falta de certeza científica absoluta no deberá utilizarse como razón para postergar la adopción de medidas eficaces para impedir la degradación del medio ambiente.

Además, el mismo artículo cita lo siguiente en su numeral 3: *“Las políticas de población tendrán en cuenta el derecho de los seres humanos a una vida saludable y productiva en armonía con la naturaleza”*. Por lo que es evidente

que las entidades ambientales y de la salud den la importancia necesaria a la contaminación generada por los PAH con acciones eficaces y eficientes [25].

Las principales organizaciones mundiales tienden a considerar aquellos PAH que tienen una presencia más significativa en cuanto a peligrosidad y frecuencia. Algunos PAH son clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA, sobre la base de su ocurrencia y la carcinogenicidad. Los PAH, cuyo monitoreo se recomienda, se presentan en el **Anexo C** [25].

La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite de 0.2 mg/m³ de PAH y el Límite de Exposición Permisible (LEP) para vapor de aceite mineral que contenga PAH es 5 mg/m³ promediado durante un período de exposición de 8 horas [26].

El Instituto Nacional de Seguridad Ocupacional y Salud de EEUU (NIOSH) recomienda que el nivel promedio para productos de alquitrán en el aire del trabajo no sobrepase 0,1 mg/m³ durante una jornada diaria de 10 horas en una semana de 40 horas. Existen otros límites de exposición en el trabajo para productos que contienen PAH, tales como carbón, alquitrán y aceite mineral [27].

El gobierno federal de USA ha establecido una serie de normas y recomendaciones para proteger a las personas contra los posibles efectos de salud causados por consumir, tomar o respirar PAH. La US-EPA ha indicado que no es probable que la ingestión o absorción diaria de las siguientes cantidades de PAH cause efectos dañinos en la salud: 0.3 mg de antraceno, 0.06 mg de acenafteno, 0.04 mg de fluoranteno, 0.04 mg de fluoreno y 0.03 mg de pireno por kg de peso corporal de la persona [26-28].

Para evaluar la contribución del benzo[a]pireno al aire ambiente, cada Estado miembro de la Unión Europea controlará otros PAH relevantes como mínimo

los siguientes: benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*j*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno y dibenzo[*a,h*]antraceno. Para la evaluación de las concentraciones de benzo[*a*]antraceno en el aire ambiente instituye un umbral superior de evaluación en porcentaje del valor objetivo 60% (0.6 ng/m³) y un umbral inferior de evaluación en porcentaje del valor objetivo 40% (0.4 ng/m³) [28].

1.8 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA (HPLC-FLD)

Las dos técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de los PAHs son la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) con detección por fluorescencia o por espectrofotometría ultravioleta (HPLC-FD /HPLC-UV). Ambas técnicas están propuestas por la EPA como los métodos oficiales 8100 y 8310 respectivamente, para análisis de PAHs en el medio ambiente. La espectrofluorimetría sincrónica, también ha sido aplicada al análisis de estos compuestos aunque sólo se puede aplicar a aquellos PAHs que presenten fluorescencia. También se ha utilizado cromatografía de fluidos supercríticos con detectores compatibles con GC y HPLC. La mayor parte de los PAHs pueden ser analizados por cromatografía de gases, incluidos los PAHs clasificados por la EPA como contaminantes prioritarios. Los detectores más empleados para el análisis de PAHs por GC son los de ionización de llama (FID, *flame ionization detector*) y principalmente el de espectroscopia de masas (MS, *mass spetrometry*). Los detectores de captura de electrones (ECD, *electron capture detector*) y de fotoionización (PID, *photoionization detector*) se utilizan menos. Aunque la cromatografía de gases se mantiene como la técnica de elección para el análisis traza de compuestos orgánicos por el continuo progreso y desarrollo de diferentes tipos de detectores,

columnas, fases estacionarias y técnicas de inyección, la cromatografía de líquidos es más rápida, de aplicación casi universal, y aplicable para la mayoría de los compuestos termolábiles y para compuestos que responden bien a un sistema de detección particular, como por ejemplo analitos que fluorescen (o que pueden ser derivatizados y dar un compuesto fluorescente). Aunque no compite con la cromatografía de gases en términos de alta eficacia, la gran variedad de fases estacionarias son capaces de proporcionar una selectividad única para la preparación de los isómeros que normalmente son difíciles de separar en cromatografía de gases. La HPLC se puede dividir en dos amplias categorías: fase normal y fase inversa. En Cromatografía en fase normal una fase estacionaria polar (normalmente gel de sílice) se utiliza para retener analitos polares mientras que las separaciones en fase inversa se basan en las fuerzas atractivas entre solutos no polares y un grupo funcional no polar (C18), que está enlazado químicamente al soporte de gel de sílice. La mayoría de las separaciones se realizan actualmente en fase inversa debido a su mayor campo de aplicación. Existen pocos compuestos que sean retenidos permanentemente en la columna y, además, las columnas suelen ser más robustas. Entre los detectores utilizados en cromatografía de líquidos el de fluorescencia es el más utilizado. Aunque la detección UV es casi universal para los PAHs, el detector de fluorescencia ofrece una mayor sensibilidad y selectividad para la detección de estos compuestos en matrices complejas como es el caso del tejido de mejillón. Seleccionando las longitudes de onda adecuadas se puede alcanzar un elevado grado de selectividad para cada PAH individual o bien llegar a un compromiso entre varios PAHs que eluyen en un tiempo próximo [29].

HPLC es una técnica analítica para la separación y determinación de los solutos orgánicos e inorgánicos en las muestras, especialmente; farmacéutica, alimentaria, ambiental, industrial, entre otras; en un proceso de cromatografía de líquido a líquido (muestra diluida- fase móvil), que penetra a

través de un sólido poroso (fase estacionaria) y libera el flujo de solutos a través del detector. La fase estacionaria más utilizada está compuesta de sílice a la cual se une el grupo octadecilsiloxano (ODS), un grupo no polar conformado por 18 carbonos que constituyen un ambiente con características no polares; ésta retendrá con mayor fuerza los analitos menos polares. En consecuencia, el orden de elución es del más polar al menos polar. Una bomba de alta presión es necesaria para obligar el paso de la fase móvil a través de la columna en las tasas de flujo típico de 0.1-2 mL/min [17,18].

Los disolventes utilizados en los procedimientos de HPLC son agua combinada con metanol o acetonitrilo, aunque cualquier combinación miscible de agua y/o disolventes orgánicos puede ser utilizada en función de las necesidades específicas de la aplicación. El agua que se utiliza como disolvente a menudo contiene sales o tampones químicos que se añaden para ayudar en la separación de los elementos constitutivos del analito [29].

Los detectores de fluorescencia son probablemente los más sensibles entre los detectores de HPLC que existen actualmente. Por lo general, la sensibilidad de este detector es de 10 -1000 veces mayor que la del detector de UV. Los detectores de fluorescencia son muy específicos y selectivos entre los otros detectores ópticos. Esto es usado como una ventaja en la medición de determinadas especies fluorescentes en muestras [30].

1.9 EXTRACCIÓN DE ANALITOS Y ELIMINACIÓN DE INTERFERENCIAS

1.9.1 Extracción de PAH

La capacidad de la instrumentación analítica disponible, hace posible detectar contaminantes en muestras medioambientales en concentraciones inferiores a $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos requerimientos de detección hacen necesario que se tomen precauciones especiales en los procesos de extracción, purificación y análisis. La preparación de la muestra, continúa siendo una etapa larga y crítica en el estudio de los contaminantes orgánicos de muestras ambientales. En pocas ocasiones, las muestras naturales pueden ser analizadas directamente, ya que su naturaleza ha de ser compatible con la técnica de detección. El análisis necesita de un tratamiento de la muestra cuya etapa principal es la extracción de analitos a partir de la matriz. La elección de la técnica de extracción resulta de establecer un compromiso entre la eficacia y la reproducibilidad de la misma, la facilidad del procedimiento (considerando coste y tiempo), el grado de automatización, las medidas de seguridad y el número de muestras que se pueden extraer simultáneamente. Son varias las técnicas descritas en la literatura para la extracción de PAH en distintas matrices ambientales y la comparación entre las distintas técnicas ha sido ampliamente estudiada en distintas matrices como plantas particulado atmosférico, sedimentos marinos aunque en menor medida en organismos marinos. Se puede afirmar, sin embargo, que una vez que la etapa de extracción está optimizada no hay diferencias significativas en cuanto a efectividad se refiere. Independientemente de la técnica de extracción, una de las decisiones más importantes es la selección del disolvente a usar. Es necesario tener en cuenta numerosas propiedades como: selectividad, coeficientes de distribución, solubilidad, miscibilidad con la matriz de la muestra etc., pero la eficacia de un disolvente en la etapa de

extracción va a depender principalmente de la afinidad del analito por el disolvente, de la relación de fases (volumen de disolvente/volumen muestra) y del número de etapas de extracción. Generalmente los solutos se disolverán en disolventes que posean propiedades de atracción intermoleculares similares. Los analitos apolares se extraen mejor con un disolvente apolar como un hidrocarburo alifático (hexano). Para analitos más polares se suele utilizar acetona, acetonitrilo o un disolvente clorado. La acetona se utiliza mucho, ya que su miscibilidad con agua facilita la solubilización de muestras húmedas y, además, no es tóxica [15, 21, 31].

Las etapas básicas para la determinación de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles son: muestreo, extracción del analito, limpieza, identificación, y cuantificación. En la etapa de muestreo la matriz a evaluar, debe ser representativa y la misma debe ser correctamente procesada. Mientras que en el análisis debe cumplirse con las siguientes condiciones: la extracción debe ser completa; la limpieza debe ser efectiva; la resolución cromatográfica debe ser adecuada; la determinación cuantitativa debe responder a la sensibilidad del detector y el método debe ser reproducible [20].

La separación de PAH de los aceites y grasas vegetales comestibles, así como la eliminación de interferencias, se debe realizar por una técnica compatible con el método de análisis instrumental utilizado. Por lo tanto hay que considerar las propiedades de la matriz, los tipos de compuestos a analizar, los niveles de concentración de los analitos en la muestra y las consideraciones cualitativas y cuantitativas de los resultados que se obtendrán, para la elección adecuada del tratamiento de preparación de la muestra [19].

Una vez mencionadas las etapas de preparación de la muestra y análisis de los analitos en los aceites y grasas comestibles, se procede a la explicación

detallada de cada uno, de tal forma que se siga una ruta clara para la determinación de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles.

1.9.1.1 Eliminación de lípidos: saponificación.

Uno de los componentes mayoritarios de los aceites y grasas vegetales que pueden estar unidos a los analitos y que son otra de las interferencias a eliminar para el análisis de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles, son los lípidos, los cuales incluyen además de los triglicéridos, otros compuestos como fosfolípidos, ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico y linoléico en mayor cantidad) y otras sustancias derivadas solubles en grasa [11].

La extracción por saponificación alcalina con solvente es el método más utilizado comúnmente para el análisis de PAH en alimentos. Este método es utilizado para eliminar grasas, pigmentos y otros contaminantes orgánicos, que pueden interferir con la determinación analítica. La digestión alcalina fue adoptada como un método oficial propuesto por la administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos. Se llama saponificación a la hidrólisis de una grasa por un álcali. Sus productos son el glicerol y las sales alcalinas de los ácidos grasos, que reciben el nombre de jabones [21].

Este proceso rompe el enlace éster de los lípidos y las matrices de muestra. En la mayoría de los procedimientos de extracción, se utiliza para realizar la saponificación una solución acuosa de KOH a una concentración de 60-80% (p/v). La cantidad de KOH requerido varía de acuerdo con el contenido lipídico en la muestra. También el etanol es necesario para estabilizar la solución saponificada y prevenir la precipitación del material jabonoso [21].

El método de saponificación permite alcanzar una concentración considerable de la fracción de PAH. Saponificación alcalina directa implica el tratamiento del extracto con KOH etanólica caliente, que se prepara

disolviendo 30 g de KOH en 30 mL de agua caliente y aforando el volumen a 300 mL con metanol y se lleva a calentamiento con reflujo a temperatura constante. Este proceso transfiere la interferencia a la fase acuosa [32].

Los métodos de extracción se emplean para lograr la separación de los analitos de la matriz, y efectuar su concentración antes de su análisis. La extracción con solventes se selecciona por la eficiencia, es decir, la afinidad del compuesto a extraer con el solvente de extracción, proporción de fases, número de extracciones a realizar. En esta extracción, los compuestos de interés se recuperan del volumen de la muestra y el solvente se puede remover del extracto recuperado sin afectar la composición de la muestra [32].

Este paso preparatorio tiene por objeto la extracción de hidrocarburos policíclicos aromáticos en el resto de los lípidos, que son disueltos por el mismo solvente que los PAH. Los tres procedimientos más utilizados para este fin son: separación líquido-líquido, complejación con cafeína y la saponificación [25].

1.9.1.2 Extracción líquido-líquido por lotes.

La extracción líquido-líquido es una técnica útil en el análisis de matrices acuosas de carácter ambiental. Su principio se basa en la distribución o reparto de un analito entre una fase acuosa y el solvente de extracción, el cual en su mayoría de veces es de baja polaridad como hexano, cloroformo o diclorometano. El cociente entre la concentración del analito en la fase orgánica y su concentración en la fase acuosa, se conoce con el nombre de coeficiente de partición; el cual depende del tipo de solvente orgánico elegido, la temperatura, el pH de la muestra y la cantidad de materia orgánica, entre otros factores. Por esta razón se hace necesario establecer

los valores de estos parámetros durante la aplicación de esta técnica, para lograr obtener buenos porcentajes de recuperación y reproducibilidad.

En la técnica de extracción líquido-líquido por lotes se utiliza un embudo de separación en el cual se coloca la muestra a un pH adecuado, según la naturaleza de los analitos, seguido de la adición de volúmenes determinados de solvente. La mezcla se agita y se retira la fase orgánica que contiene el analito, operación que puede ser repetida varias veces; los extractos son unidos, concentrados y analizados [33].

1.9.1.3 Limpieza de los extractos.

Extracción en fase sólida (SPE). Es el método de extracción y *clean-up* usado ampliamente en el campo de biomédica y ambiental, especialmente para el análisis de trazas. Este proceso es simple y rápido, involucra varios mecanismos de separación: adsorción, afinidad e intercambio iónico. La técnica se usa para contaminantes de baja, mediana y alta polaridad, dependiendo del sorbente utilizado.

Dos principales ventajas caracterizan esta técnica: la utilización de pequeñas cantidades de solvente y la operación rápida. Como consecuencia de la primera se utiliza poco material de vidrio, mientras que debido a la segunda hace posible que un gran número de extracciones se lleven a cabo en corto tiempo. Volúmenes grandes de muestra pueden ser manejados, usando pequeñas cantidades de solvente y fase sólida. Dependiendo del rendimiento total de la muestra y de los compuestos a ser analizados, la extracción puede ser realizada tanto en cartuchos como en discos de membrana.

Los contaminantes orgánicos en la muestra son adsorbidos en la superficie sólida, de la cual son eluidos por un solvente seleccionado apropiadamente, de acuerdo con la polaridad de los analitos.

Las etapas seguidas para la SPE son las siguientes:

- ✓ Acondicionamiento del cartucho: mediante la adición de uno o dos volúmenes de solvente, correspondiente al de la columna, empleando tres solventes de diferente polaridad (por ejemplo, hexano, acetonitrilo, metanol) en forma secuencial, para preparar el material adsorbente de la columna y asegurar la retención reproducible de los compuestos de interés. El primer solvente que se adiciona corresponde a la polaridad de la columna, para eliminar posibles interferencias; seguido por uno o dos solventes de diferente polaridad, asegurándose que el último solvente tenga igual polaridad del solvente en que se encuentra la muestra.
- ✓ Adición de la muestra: ésta se aplica sobre el cartucho y corre a través de él con diferencia de presión (con ayuda de bomba de vacío), manteniendo una velocidad de flujo constante de 1-10 mL/min para lograr buenos rendimientos.
- ✓ Lavado de la columna: el lavado se hace con un solvente cuya polaridad sea diferente a la de los analitos. Elimina interferencias de la columna retenidas durante la aplicación de la muestra. Además es necesario secar la columna, si es posible bajo flujo de nitrógeno, antes de la elución de la muestra.
- ✓ Elución de los analitos: los analitos son eluidos de la columna utilizando para ello 2-10 volúmenes del solvente apropiado, es decir, aquel que tenga la misma polaridad de los analitos.

Los extractos de muestra se deben concentrar mediante la evaporación del solvente. En la **Figura 2** se muestra el procedimiento, en el cual los compuestos de interés se retienen y las impurezas pasan a través del tubo [34].

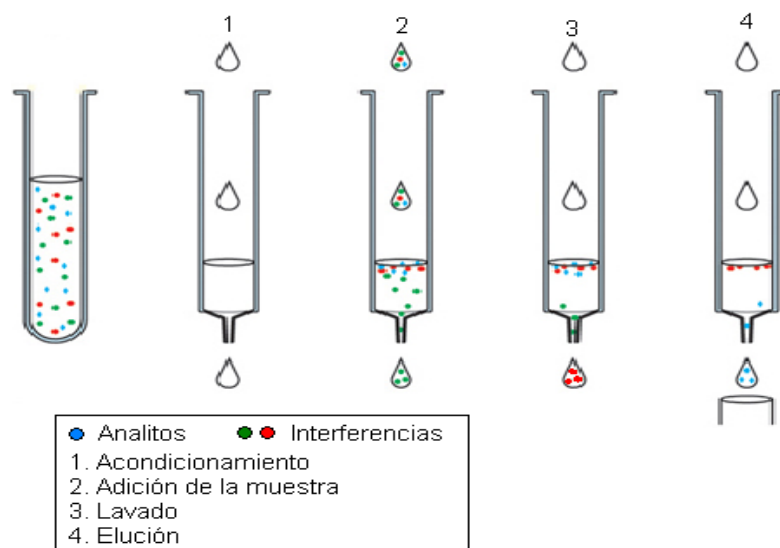


Figura 2. Etapas para el desarrollo de la técnica SPE.

La selección del material adsorbente se basa en la polaridad de los contaminantes a ser analizados. Los adsorbentes hidrofóbicos retienen analitos no polares y permiten que las sustancias polares pasen a través de la columna y los adsorbentes hidrofílicos realizan el proceso contrario.

2 CIENCIOMETRÍA

La cienciometría es un instrumento que permite cuantificar la actividad científica. Ésta analiza a la ciencia como una disciplina o actividad económica, comparan las políticas de investigación desarrolladas por distintos países y sus resultados desde una perspectiva económica y social. Los recursos más utilizados son diferentes bases de datos y motores de búsqueda.

Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones sobre las técnicas o métodos para la separación y cuantificación de los PAH, se realizó un estudio cienciométrico usando las bases de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Version 3.0)* y *Scopus*.

Tabla 2. Análisis cienciométrico en la base de datos *Web of Science* [35].

(Nº de registros)	WEB OF SCIENCE		
	1 (103)	2 (2,323)	3 (154,903)
AÑO	2010 (207)	2010 (315)	2010 (18259)
	2006 (361)	2005 (180)	2005 (14094)
PAÍS	España (13)	EE.UU. (78)	EE.UU. (125)
	Bélgica (12)	Japón (18)	Inglaterra (122)
	Italia (4)	España (14)	India (44)
FUENTE DE PUBLICACIÓN	<i>Journal of Chromatography A</i> (825)	<i>Journal of Chromatography A</i> (370)	<i>Journal of Chromatography A</i> (8,229)
	<i>Chemosphere</i> (573)	<i>Analytica Chimica Acta</i> (106)	<i>Journal of Chromatography B</i> (4,133)
TIPO DE PUBLICACIÓN	Journal (4,989)	Journal (2,235)	Journal (152,270)
	Book (262)	Book (143)	Book (5,373)

Fecha de búsqueda: 29 de Marzo de 2011

1. *Topic= (PAHs in oils and fats edible) AND Topic= (HPLC) Timespan=2000-2010.*
 2. *Topic= (analysis of PAHs) AND Topic= (HPLC) Timespan=2000-2010.*
 3. *Topic= (B[a]P) AND Topic= (HPLC) Timespan=2000-2010.*
-

En la **Tabla 2** se observa que en los últimos 10 años se incrementó el número de publicaciones dedicadas a la determinación de PAH por diferentes técnicas cromatográficas especialmente, B[a]P, presente en aceites y alimentos [35].

En una investigación realizada por *Moret S.*, titulada “*HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils*”, se observa que usó el método de HPLC-FLD para determinar PAH en los aceites de oliva. Estos compuestos a veces pueden contaminar los aceites vegetales, debido a sus características lipofílicas, que son un problema importante para su extracción y purificación de las matrices lipídicas. Los resultados muestran la distribución de los PAHs ligeros y pesados en aceites de oliva extra virgen y aceite de oliva refinado; el contenido de PAH es menor en las muestras de aceite refinado [21].

Las metodologías desarrolladas en estos trabajos de investigación se refieren al análisis de PAH en diversos grupos. Por ejemplo, generalmente se realiza por grupos según su clasificación toxicológica, e.g. El B[a]P es clasificado por la IARC como probablemente carcinógeno, por lo cual es importante poder llevar a cabo su cuantificación sin que se presente co-elución con sus isómeros estructurales B[e]P, B[k]F y Per.

2.1 PATENTES

La información recopilada por la base de datos *SCOPUS* muestra que la mayor parte de las patentes relacionadas con el estudio de PAH, empleando HPLC, se encuentran en la Oficina de Patentes de Estados Unidos (USPO) y

en la *World Intellectual Property Organization* (WIPO) (**Figura 3**). Estas patentes están enfocadas en el desarrollo de los métodos para la detección sensible de benzo[a]pireno y algunos de sus isómeros estructurales [36].

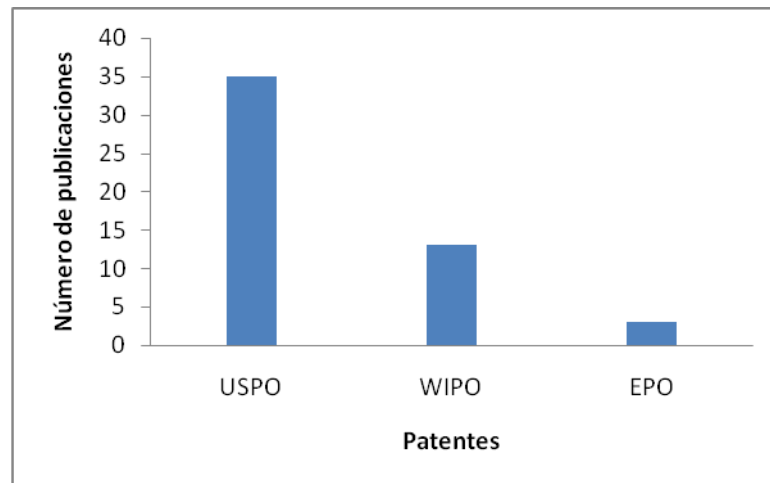


Figura 3. Patentes sobre PAH.

Fuente: *Scopus*. Periodo de observación 2000-2010. Fecha de consulta: 29 de Marzo de 2011. **Ecuación 1.** TITLE-ABS-KEY("Analysis PAH") AND TITLE-ABS-KEY("HPLC")

3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos y solventes.

Se emplearon los siguientes reactivos: diclorometano de J.T. Baker (México D.F., México), hidróxido de potasio Riedel de Haen de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), ciclohexano de Riedel de Haen de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza) acetona de Merck (Darmstand, Alemania), ácido fosfórico 85% Riedel de Haen de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), ácido fórmico 99% de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), agua HPLC de J.T. Baker (México D.F., México), *n*-hexano de Merck (Darmstand, Alemania), metanol HPLC de J.T. Baker (México D.F., México), acetonitrilo HPLC Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), acetonitrilo pestanal Riedel de Haen de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), etanol absoluto de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza).

3.1.2 Material de referencia certificado.

En la **Tabla 3** se muestran las especificaciones de las sustancias empleadas como referencia en el desarrollo del proyecto.

Tabla 3. Especificaciones técnicas del material de referencia certificado.

Sustancias	Pureza, %	Número de Lote	Proveedor
Benzo[a]pireno	100	B8070218	Sigma-aldrich
Benzo[e]pireno	100	LB58124	Sigma-aldrich
Benzo[k]fluoranteno	99,2	B0090320	Sigma-aldrich
Perileno	98,5	B9030286	Sigma-aldrich

3.1.3 Material del laboratorio.

Se emplearon los siguientes materiales de laboratorio: balanza analítica AG 285 mettler Toledo, rotaevaporador R-200/205 Buchi rotaevapor, Shaker L002051 IKA*MS 3 basic (Wilmington, EE.UU), plancha de calentamiento D91126/MR HEI-ESTÁNDAR de Heidolph (Schwabach, Alemania), estufa secadora PL-325 Fisher Scientific, baño de agua recirculatorio CFT-25 Colepalmer (Illinois, EE.UU), cronómetro digital Cassio, baño ultrasónico LC-20H de Ultrasonic (Darmstadt, Alemania), pipetas volumétricas 1, 2, 5, 10 mL, balones aforados de 50, 100, 250 mL, vasos de precipitado de 25, 50, 100, 600 mL, equipo de reflujo, embudos de decantación, tubos de ensayo de Scott (Texas, EE.UU), micropipetas 2-20, 25-250, 100-1000 μ L, puntas plásticas para micropipetas, tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL de Brand (Wertheim, Alemania), jeringas plásticas, filtros de membrana en polivinil dimetilformamida (PVDF) de 0.45 μ m de Millipore (Sao Pablo, Brasil), microjeringa para inyección de 50 μ L de Agilent Technologies (Melbourne, Australia), cartuchos ODS de J.T. Baker (México D.F., México).

3.2 MATERIAL DE MUESTRA

Las muestras de aceites (oliva extra virgen, canola, girasol y soya refinados) y las muestras de grasas (margarina vegetal y grasa vegetal) se recolectaron de manera aleatoria en los diferentes centros de distribución de mercado en la ciudad de Bucaramanga.

3.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE PAH POR HPLC

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 (**Figura 4**), que consta de un desgasificador *Agilent*

Technologies G1322A, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, un inyector manual *Agilent Technologies G1328B* y un detector de fluorescencia (FLD) *G1321A*, equipado con una columna apolar Kinetex XB-C18 (4,6 mm x 100 mm x 2.6 μ m). El software *Agilent Chemstation LC* fue utilizado para el procesamiento de los datos.



Figura 4. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1200 Series*.

3.3.1 Pruebas preliminares para HPLC.

El análisis simultáneo de los hidrocarburos poliaromáticos: benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, benzo[k]fluoranteno y perileno, se desarrolló con la exploración de diferentes condiciones, tales como la composición de la fase móvil, temperatura del solvente y longitud de onda (**Tabla 4**).

Tabla 4. Selección de los parámetros de operación del equipo de cromatografía líquida.

Longitud de onda
Se realizó un barrido en el rango de 200-600 nm, tomando los espectros de emisión y absorción de cada uno de los analitos, cuya longitud de onda de trabajo en cromatografía líquida fue en la cual se presentó la mayor absorbancia, tanto para la longitud de excitación como para la de emisión.
Fase móvil
Diferentes fases móviles fueron probadas, <i>i.e.</i> metanol: agua, acetonitrilo: agua, acetonitrilo: agua: ácido ortofosfórico, utilizando una temperatura de 25 °C y un flujo de 0.5 mL/min.
Temperatura de la fase móvil
Se trabajaron tres temperaturas, 25, 30 y 45 °C, con la finalidad de establecer el efecto sobre los tiempos, orden de elución y resolución de los analitos, y la presión en la columna.

3.3.2 Figuras analíticas de mérito

De acuerdo con las buenas prácticas del Laboratorio se determinaron las siguientes figuras de mérito, para lo cual fue se desarrolló una curva de calibración por el método de estándar externo.

- Solución *stock*: Se preparó 1 mL de solución *stock* de: benzo[*a*]pireno, benzo[*e*]pireno, benzo[*k*]fluoranteno y perileno en acetonitrilo grado HPLC de 50 ppm cada una de las sustancias.
- Soluciones de trabajo: Se calcularon los volúmenes necesarios de solución *stock* para preparar soluciones de 1 mL cuyas concentraciones son: 0.03, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 partes por billón (ppb).
- Repetibilidad y reproducibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas cromatográficas. Los coeficientes de variación para el área y tiempo de retención permitieron evaluar la repetibilidad del método, esto se hizo en un punto de la curva de calibración. La reproducibilidad fue medida a través de la determinación de los coeficientes de variación para el área y tiempo de retención de la inyección de una misma solución *stock* por analistas diferentes.
- Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método. La linealidad y sensibilidad del método se evaluaron empleando la curva de calibración realizada en el rango de 0.03-800 ppb. La linealidad se evaluó en el rango de concentraciones en el cual la respuesta del detector a los analitos posee un comportamiento lineal, este valor se reportó como el cuadrado del coeficiente de varianza. La pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95% permitió establecer la sensibilidad.

- Determinación de los niveles de detección y cuantificación. Usando las curvas de calibración individuales obtenidas del procesador de datos se calculó $S_{y/x}$, para el nivel de detección se tomó tres veces este valor y para el nivel de cuantificación, como el doble del nivel de detección, es decir, seis veces el valor $S_{y/x}$.
- La exactitud expresada como el porcentaje de recuperación, para esto se adquirió una muestra de aceite vegetal refinado en el cual se puede garantizar un bajo porcentaje de PAH. Esta muestra se enriqueció con una solución *stock* de concentración conocida y se le aplicó el procedimiento de extracción, y se analizó el extracto por el método cromatográfico desarrollado por HPLC.

3.4 ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SAPONIFICACIÓN DIRECTA DE MATERIAL.

La extracción de los PAH, se realizó mediante el procedimiento de saponificación directa del material y posterior extracción de los PAH con un solvente.

La saponificación es el proceso de hidrólisis alcalina de ésteres. Cuando la muestra se calienta con una base, un éster carboxílico es hidrolizado al ácido correspondiente y a un alcohol. Si el éster carboxílico proviene de un ácido graso se genera un jabón altamente soluble en agua. Una base promueve la hidrólisis de ésteres porque proporciona el reactivo fuertemente nucleofílico OH^- . Esta reacción es irreversible, puesto que un anión carboxilato estabilizado por resonancia demuestra poca tendencia a reaccionar con un alcohol.

3.4.1 Saponificación directa del material

En un balón de 100 mL se pesó 1 g de aceite vegetal refinado, el cual fue sometido a saponificación directa con una solución de KOH en etanol (1.0, 1.5 y 2.0 M), mediante un sistema de reflujo.

Después del calentamiento, a la solución jabonosa se adicionaron 5 mL de agua destilada. Los PAH se aislaron de la solución jabonosa por extracción líquido-líquido por lotes con 5 mL x 3 (*n*-hexano y ciclohexano). Los extractos colectados se concentraron a sequedad con nitrógeno seco. El extracto se reconstituyó con solución agua: DMF (1:1, 1:2 (v/v)) (2 mL) y se realizó posteriormente el proceso de *clean-up*.

3.4.1.1 Estudio del efecto de la concentración de KOH requerido para la saponificación

Para determinar la concentración de KOH etanólico (5 mL) requerido para que ocurra la saponificación completa en las muestras de aceites y grasas vegetales comestibles, se usaron 5 mL de solución de KOH etanólico de concentraciones: 1.0, 1.5 y 2.0 M.

3.4.1.2 Estudio del efecto del tiempo de saponificación

Para determinar el tiempo de calentamiento requerido para que ocurra la saponificación completa en las muestras de aceites y grasas vegetales comestibles, se usó un tiempo de reacción de 30, 60 y 90 min.

3.4.1.3 Estudio de la temperatura de la saponificación

Para la determinar la temperatura de calentamiento requerida para que ocurra la saponificación completa en las muestras de aceites y grasas vegetales comestibles se evaluaron temperaturas de 60, 70 y 80 °C.

3.4.1.4 Estudio del solvente de extracción

Para establecer por medio del área del pico cromatográfico de los analitos (HPLC-FLD), el solvente con mayor capacidad de extracción de los PAH de las muestras de aceites y grasas vegetales comestibles, se usó *n*-hexano y *n*-hexano-diclorometano 70:30 (v/v).

3.4.1.5 Diseño experimental

Para el análisis de los parámetros de extracción se utilizó un diseño experimental factorial completo a dos niveles (2^3), el cual permitió determinar la significancia en la extracción de las variables evaluadas tomando como variable de respuesta del sistema de detección, el área cromatográfica para cada uno de los compuestos [37].

Las variables de extracción escogidas para el análisis fueron:

- La temperatura de extracción. Este parámetro es de gran importancia ya que la temperatura es determinante en la velocidad de reacción de saponificación.
- El tiempo de extracción, puesto que es proceso que involucra una reacción y este parámetro es determinante para que la hidrólisis de los ácidos grasos se lleve a cabo por completo.
- El efecto de la concentración de la base en la saponificación. Ya que la base es la que promueve la hidrólisis al proporcionar OH^- altamente nucleofílicos a la reacción.

Para ello se eligen los extremos del dominio experimental para cada variable tal como se indica en la **Tabla 5**.

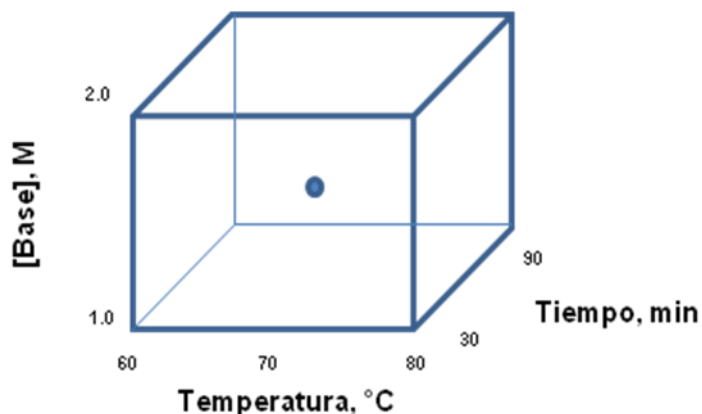


Figura 5. La matriz del diseño experimental factorial 2^3 .

Está representada geoméricamente por un cubo, en el cual cada esquina es un experimento y cada arista une los dos niveles de cada variable; el área limitada por éstas se conoce como la región experimental.

Tabla 5. Variables y niveles del diseño experimental factorial 2^3 , empleados.

Variable	Niveles		
	Alto	Central	Bajo
A: Temperatura, °C	80	70	60
B: Tiempo, min	90	60	30
C: Concentración base, M	2.0	1.5	1.0

Con el diseño factorial completo, se efectúan aleatoriamente todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar, resultando en ocho experimentos, los cuales se muestran en la **Tabla 6**. Además el tamaño del error experimental fue calculado realizando cinco experimentos adicionales en el punto central de la región de trabajo explorada tal y como se observa en el cubo de la **Figura 5**. Los ensayos se realizaron enriqueciendo muestras de aceites vegetales; para ello se utilizó aceite vegetal refinado adquirido en el mercado local (blancos de la matriz).

Tabla 6. Experimentos realizados para las tres variables del diseño factorial.

N° Experimentos	Temperatura, °C	Tiempo, Min	[Base], M
1	80	90	1.0
2	70	60	1.5
3	80	90	2.0
4	60	90	2.0
5	70	60	1.5
6	60	90	1.0
7	70	60	1.5
8	60	30	1.0
9	80	30	1.0
10	70	60	1.5
11	70	60	1.5
12	60	30	2.0
13	80	30	2.0

En el análisis de los resultados del diseño experimental se usó la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico Statgraphics Centurion versión 16 (*Statpoint Technologies*, Virginia, E.E.U.U.), gracias a la licencia de prueba de 30 días.

3.5 ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE LIMPIEZA SPE

Las columnas empleadas en la extracción en fase sólida (1000 mg fase octadecilo C₁₈ y 6 mL de volumen) fueron adquiridas de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE.UU), al igual que el procesador de columnas Baker Spe-24G, mostrado en la **Figura 6**.



Figura 6. Equipo para extracción en fase sólida, Baker Spe-24G (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU)

3.5.1 Pruebas preliminares

Para esta técnica se evaluó el solvente de la muestra y el solvente de elución, trabajando bajo el siguiente procedimiento:

- ✓ **Acondicionamiento:** Considerando las características apolares del extracto a limpiar por SPE, se adicionaron volúmenes de solventes correspondientes al de la columna (5 mL) de solvente de la muestra y agua adicionados respectivamente en orden decreciente de polaridad, para el acondicionamiento del cartucho de octadecilsiloxano, para preparar este material absorbente y asegurar la retención reproducible de los compuestos de interés.
- ✓ **Volumen de la muestra:** Se empleó un volumen de muestra de 12 mL de una solución *stock* de PAH en acetonitrilo de 5 ppb, valor recomendado para cartuchos de 1000 mg de relleno.
- ✓ **Lavado del cartucho:** Los PAH son insolubles en agua, solvente empleado en esta etapa del proceso, para eliminación de interferencias de la matriz; se trabajó con 10 mL de este solvente. Seguidamente se dejaron secar los cartuchos.

- ✓ Solvente de elución: Debido a las diferentes características fisicoquímicas de los analitos se probaron *n*-hexano y *n*-hexano-diclorometano 70:30 (v/v), adicionando cantidades de 5 mL, para recuperar la mayor cantidad de analitos que interactúan con la fase estacionaria del cartucho. El extracto obtenido fue llevado a sequedad y reconstituido en acetonitrilo, se almacenó bajo refrigeración para su posterior análisis cromatográfico.
- ✓ Flujo: Se probó un flujo de 1 y 2 gotas por segundo.

Con la revisión bibliográfica y las pruebas preliminares se determinaron las variables más críticas durante el proceso de limpieza de SPE de los extractos, los experimentos realizados se resumen en la **Tabla 7**

Tabla 7. Experimento para la optimización del proceso de SPE.

Experimento	A (Solvente de la muestra)	B (Solvente de elución)
1	DMF-Agua (1:1 v/v)	<i>n</i> -Hexano
2	DMF-Agua (1:2 v/v)	<i>n</i> -Hexano
3	DMF-Agua (1:1 v/v)	<i>n</i> -Hexano-Diclorometano
4	DMF-Agua (1:2 v/v)	(70:30 v/v)

Para evaluar el comportamiento de las variables, se trabajó con una solución *stock* de PAH, se realizó un blanco de solvente y finalmente se compararon las áreas cromatográficas de estos extractos con las obtenidas de la solución *stock* no sometida al proceso de *clean-up*.

3.6 EXTRACCIÓN DE PAH EN MUESTRAS DE ACEITES Y GRASAS ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

En la **Figura 7**, se muestra el procedimiento de extracción para el análisis simultáneo de PAH por la técnica de HPLC.

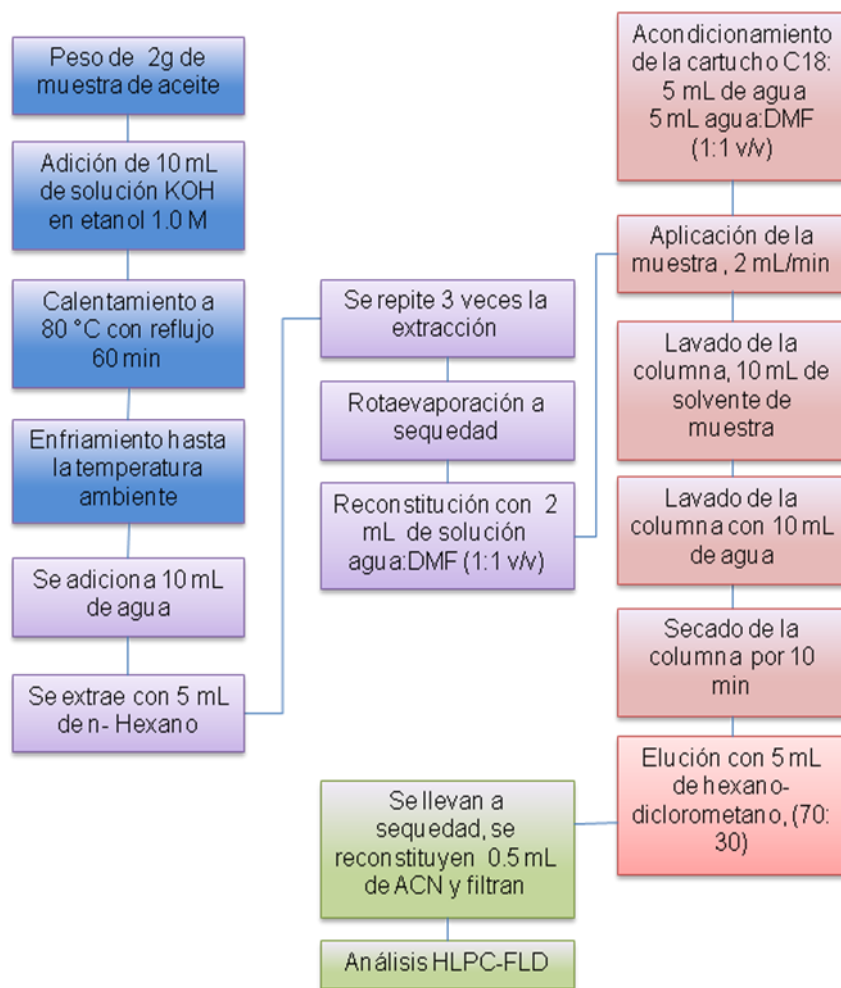


Figura 7. Diagrama de flujo para la extracción de PAH simultáneamente.

3.6.1 Figuras analíticas de mérito.

3.6.1.1 Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.

El procedimiento de extracción se desarrolló por triplicado por dos analistas a una muestra aceite vegetal refinado enriquecido con una solución *stock* de PAH, para comparar los coeficientes de variación de los porcentajes recuperación de cada analista y, de esta forma hallar la reproducibilidad del método de extracción.

3.7 APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS REALES DEL MERCADO LOCAL

Se llevó a cabo, un análisis cualitativo y cuantitativo, de cinco muestras comerciales de aceites y grasas vegetales comestibles, vendidas en el mercado de la ciudad de Bucaramanga.

Se realizó el proceso de extracción descrito anteriormente, realizando cada una de las extracciones por duplicado, la determinación se realizó comparando los t_R con cada una de los PAH de referencia, con los picos observados en los cromatogramas obtenidos de los extractos de las matrices oleaginosas, analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas; esto para el proceso de HPLC-FLD. La identificación de los analitos se realizó por comparación de los tiempos de retención t_R con los obtenidos con los patrones bajo las mismas condiciones del método.

4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR HPLC-FLD DE ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES

4.1.1 Pruebas preliminares.

Para el análisis de benzo[a]pireno (B[a]P), benzo[e]pireno (B[e]P), benzo[k]fluoranteno (B[k]F) y perileno (Per), simultáneo en los aceites y grasas vegetales comestibles, se estudiaron diferentes condiciones de operación del equipo cromatográfico, con las cuales se seleccionaron: la composición de la fase móvil, temperatura del solvente y la longitud de onda.

4.1.1.1 Selección de la longitud de onda.

En el barrido de longitud de onda en el rango de 200-600 nm, tomando los espectros de emisión y absorción de cada uno de los analitos, se encontraron cuatro longitudes de onda para el análisis simultáneo por cromatografía líquida de B[a]P, B[e]P, B[k]F y Per. Estas longitudes fueron de 287, 292 y 290 nm, para las longitudes de onda de excitación, de 418 y 430 nm, para las longitudes de onda de emisión (**Tabla 8**).

Tabla 8. Longitud de onda de máxima excitación y emisión para cada analito.

No.	Sustancias	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm
1	Benzo[a]pireno	292	430
2	Benzo[e]pireno	290	418
3	Benzo[k]fluoranteno	290	430
4	Perileno	287	418

En la **Figura 8**, se muestran los espectros UV de absorción para cada uno de los analitos.

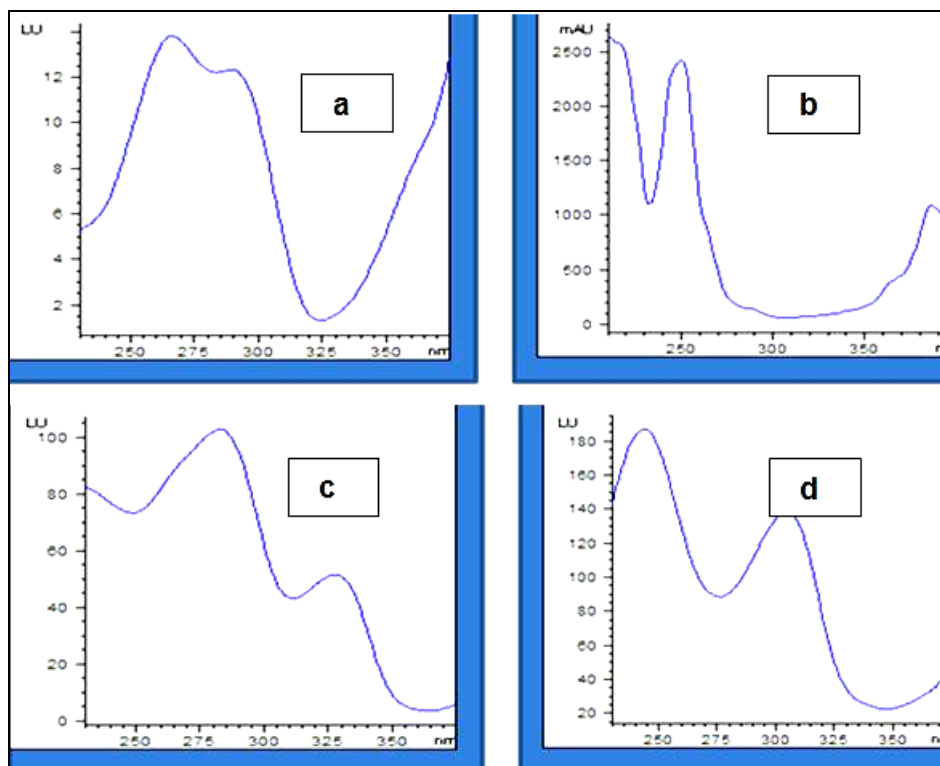


Figura 8. Espectros de absorción: a. B[a]P; b. Per; c. B[e]P y d. B[k]F.

4.1.1.2 Selección de la fase móvil.

Fueron probadas diferentes fases móviles, *i.e.* metanol: agua: ácido ortofosfórico; acetonitrilo: agua, acetonitrilo, se usó una temperatura de 25 °C y un flujo de 0.5 mL/min.

En la **Figura 9**, se muestran perfiles de B[a]P, B[e]P, B[k]F y Per, obtenidos mediante una corrida isocrática de la mezcla agua: acetonitrilo, en diferentes proporciones (70:30 y 80:20). Un efecto directo del incremento en la cantidad de acetonitrilo en la composición de la fase móvil se reflejó en el aumento de la sensibilidad del detector y en la reducción de la duración del cromatograma. Sin embargo, un aumento en la cantidad de agua produjo un ensanchamiento de los picos, sin mejorar su resolución.

La fase móvil conformada por acetonitrilo: agua proporcionó la mejor respuesta del detector y permitió una aceptable resolución de los picos.

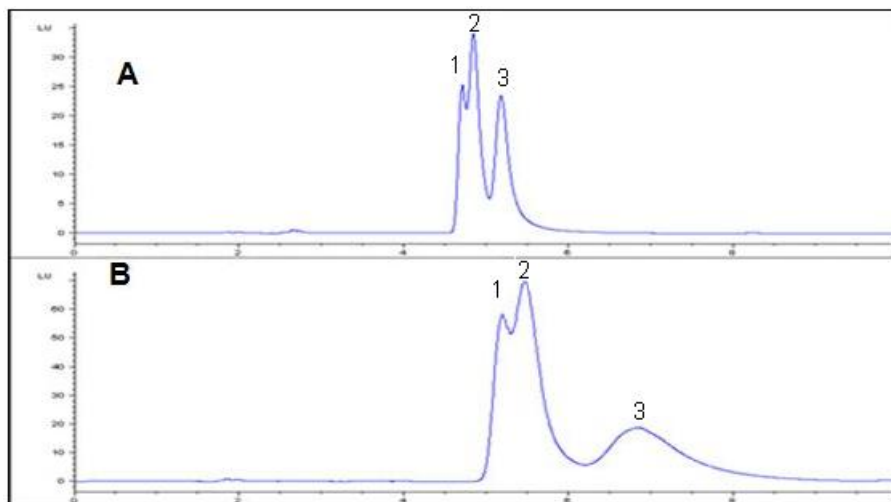


Figura 9. Efecto de la cantidad de agua en la fase móvil sobre separación de picos cromatográficos de: 1. B[k]F, 2. B[e]F y Per, 3. B[a]P. Análisis isocrático por HPLC-FLD de los PAH, en la columna apolar Kinetex XDB-C18. Fase móvil: A. Agua: acetonitrilo (70:30), B. Agua: acetonitrilo (80:20).

En la **Figura 10**, se muestra como la acidez de la fase móvil no contribuyó en nada para separar y resolver mejor los picos correspondientes a los analitos, ya que si comparamos la figura A y la B no hay diferencia significativa y al contrario el ácido aumenta el tiempo de retención de los analitos. La fase móvil conformada por acetonitrilo: agua, es la que mejor respuesta del detector y resolución provee.

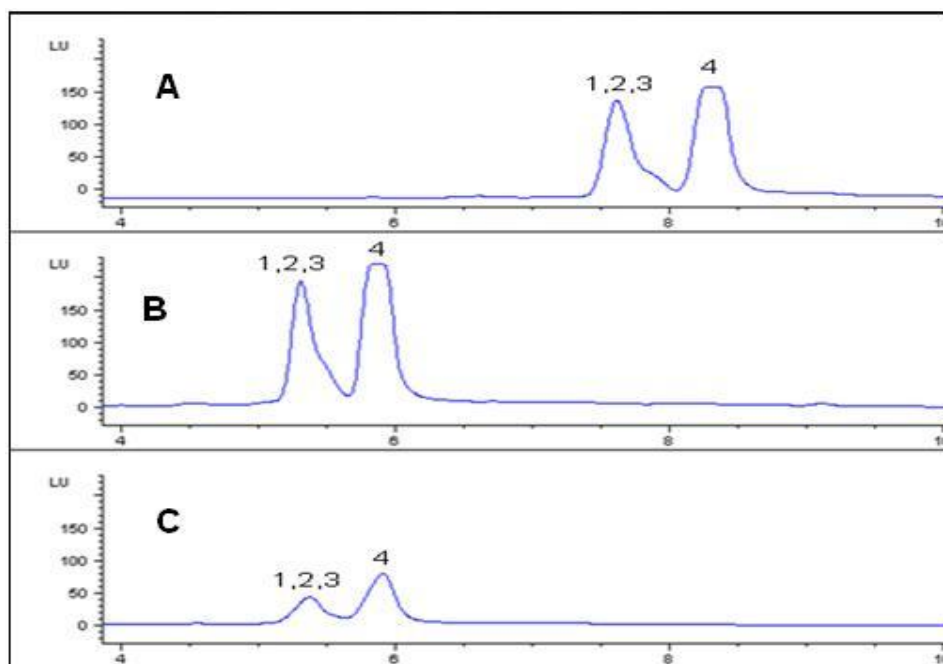


Figura 10. Efecto de la viscosidad del solvente orgánico y la acidez de la fase móvil sobre la resolución de picos de: 1. B[k]F, 2. B[e]F, 3. Per, 4. B[a]P. Análisis por HPLC-FLD de PAH. Cromatogramas típicos obtenidos, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C₁₈. Fase móvil: A. Agua: ácido ortofosfórico: metanol (90:10), B. Agua: acetonitrilo (70:30), C. Acetonitrilo (100%).

4.1.1.3 Selección de temperatura para la fase móvil

La temperatura del termostato se mantuvo en tres niveles: 25, 30 y 40 °C, respectivamente, como se muestra en la **Figura 11**. El efecto inmediato de un aumento en la temperatura de la fase móvil fue la disminución del tiempo de análisis de los compuestos; sin embargo, la resolución entre el pico 2 y 3 es mejor a 25 °C, razón por la cual, se desarrolló el método a una temperatura nominal de 25°C.

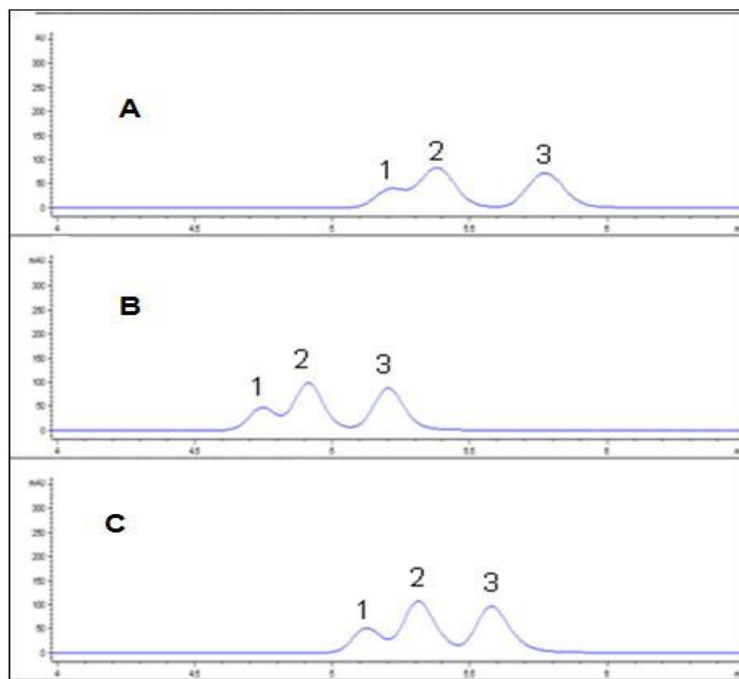


Figura 11. Efecto de la temperatura de la columna, sobre la resolución y tiempo de análisis de los PAH analizadas por HPLC-DAD. Columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C₁₈. 1. B[k]F; 2. B[e]F, Per; 3. B[a]P. Fase móvil: agua: acetonitrilo (70:30). A. 25 °C; B. 30 °C; C. 40 °C.

La viscosidad de la fase móvil es una de las principales razones de selectividad de una mezcla de solventes, sin embargo, a la bomba cuaternaria del equipo de cromatografía líquida, puede extenderse su tiempo de vida, con el uso de una temperatura favorable que disminuya la viscosidad de la mezcla de solventes empleada en el método de análisis. Además, si se tiene en cuenta que las pruebas se realizaron con un sistema de detección DAD, que es menos sensible que el FLD, la diferencia en la separación lograda de los analitos no es significativa, debido que al utilizar las condiciones en las que se logró la mejor separación en un equipo cromatográfico con sistema de detección FLD el aumento de la sensibilidad para una misma concentración, hace que los picos 1 y 2 se solapen nuevamente.

Con base en las diferentes pruebas preliminares desarrolladas para la implementación del método por cromatografía líquida para el análisis de PAH, se encontraron las mejores condiciones de operación, que se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Parámetros cromatográficos para el análisis selectivo de PAH.

Parámetros	Especificaciones
Solvente	Agua: Acetonitrilo
Temperatura de la columna, °C	25
Flujo, mL/min	0.5
Volumen de inyección, µL	5

La adecuada separación se logró con el gradiente que se reporta en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Gradiente de elución del método por cromatografía líquida.

Tiempo, min	Solvente, %	
	Agua	Acetonitrilo
0	10	90
1	10	90
5	70	30
6	70	30
8	10	90
10	0	100
15	0	100
17	10	90
22	10	90

En la **Figura 12**, se muestra el perfil cromatográfico de una mezcla de patrones de referencia de benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, benzo[k]fluoranteno y berileno, obtenido bajo las condiciones especificadas en la **Tabla 9** y **10**.

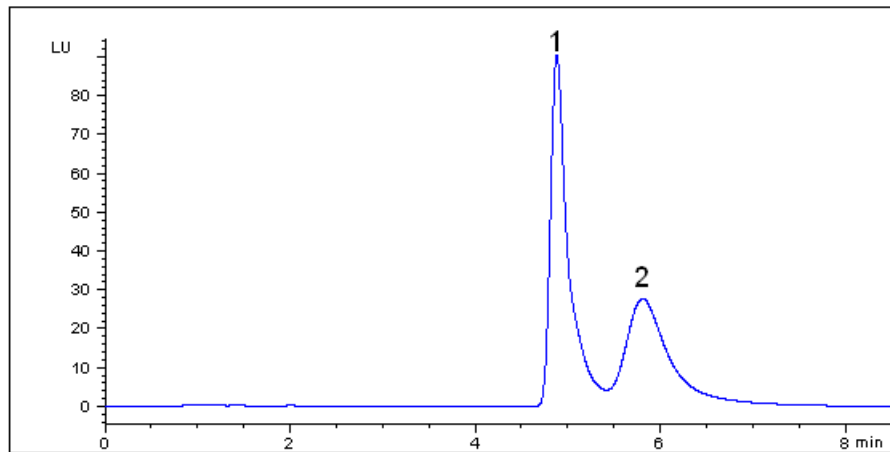


Figura 12. Perfil cromatográfico de PAH.

Obtenido mediante HPLC-FLD. Columna apolar Kinetex XB C₁₈, empleando agua: acetonitrilo. Flujo de 0.5 mL/min. Temperatura 25 °C. Fase móvil con el gradiente seleccionado como aparece en la **Tabla 10**. 1. Σ B[k]F, B[e]P, Per; 2. B[a]P.

Para la metodología implementada, se calcularon los valores de factor de respuesta, debido a que no fue posible la separación de B[k]F, B[e]P y Per mediante la columna apolar Kinetex XB C₁₈, se realizó la cuantificación de estos analitos como sumatoria. Esto, no obstante, cumple con el requisito de la norma que recomienda no superar una concentración máxima de residuos de 7.5 ppb, para la sumatoria de los PAH pesados. Como se sabe, el factor de respuesta es la relación directa que hay entre la concentración del analito y su respectiva área; es así, como a mayor factor de respuesta menor será el área cromatográfica y la sensibilidad del detector para el analito dado. Los valores encontrados para los factores de respuesta para B[a]P, B[k]F, B[e]P y Per muestran como el perileno es el que presenta mayor factor de respuesta de los analitos que componen el pico 1, que corresponde a las sustancias Σ B[k]F, B[e]P, Per. Los valores encontrados para el factor de respuesta, así como los tiempos de retención de cada analito, que fueron determinados inyectándolos individualmente, se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Tiempos de retención de los PAH para el método desarrollado por HPLC-FLD.

N°	Sustancias	t _R , min ± S	Factor de respuesta
1	Benzo[e]pireno	4.86±0.01	0.00103
2	Benzo[k]fluoranteno	4.87±0.03	0.00072
3	Perileno	4.87 ± 0.01	0.00197
4	Benzo[a]pireno	5.57 ± 0.02	0.00074

n=5

El tiempo de retención de una sustancia en cromatografía líquida de alta eficiencia está directamente relacionado con la estructura química del compuesto y éste, a su vez, con dos factores primordiales: la afinidad con el relleno de la fase estacionaria y la naturaleza de la fase móvil.

La fase reversa está frecuentemente utilizada para la mayoría de aplicaciones de HPLC. Las sustancias con la menor constante de distribución son aquellas cuya polaridad es más alta que la de los analitos de la mezcla.

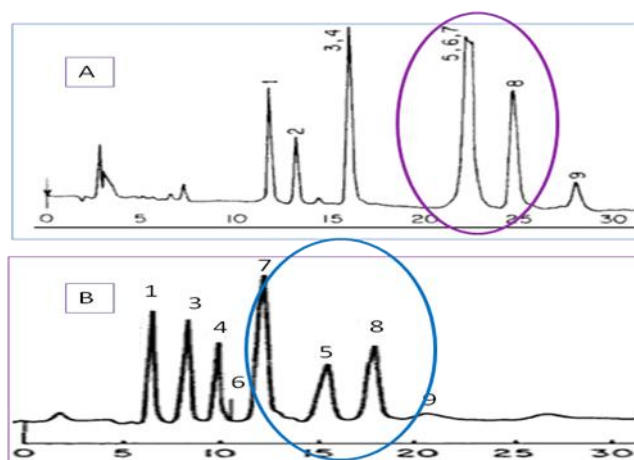


Figura 13. Perfil cromatográfico de PAH, obtenido mediante HPLC-FLD [38]. Columna apolar. A. Zorbax C₁₈ (monomérica). B. Vydac201TP (polimérica). 1. Fluoranteno; 2. Pireno; 3. B[a]A; 4. Criseno; 5. B[k]F; 6. B[e]P; 7. Perileno; 8. B[a]P; 9. Dibenz[ah]A. Fase móvil. Acetonitrilo: Agua (82:18).

Para la adecuada separación de los cuatro compuestos patrón, *i.e.*, benzo[*a*]pireno, benzo[*e*]pireno, benzo[*k*]fluoranteno y perileno, se recomienda usar una columna cromatográfica apolar, polimérica. Para este tipo de compuestos isoméricos, su retención en la columna varía con su forma, especialmente con las características planares de las moléculas a separar. En el caso de una columna monomérica, como es el tipo de columna utilizada, se espera, que este tipo de compuestos isoméricos no serán separados completamente por esta columna, para permitir una resolución adecuada y cuantificación de cada compuesto individual, tal como se muestra en la **Figura 13**.

4.1.2 Figuras analíticas de mérito

4.1.2.1 Determinación del porcentaje de recuperación.

A la muestra blanco, aceite refinado, se le adicionó una alícuota de una solución *stock* de PAH, de concentración conocida, y se desarrolló el procedimiento de extracción propuesto (véase numerales 4.2.1.2; 4.2.2 y 4.2.3), para el análisis simultáneo de estos analitos. El porcentaje de recuperación de los analitos estuvo entre 94 – 103% (**Tabla 12**), acorde con lo recomendado por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de los PAH usando el procedimiento de extracción propuesto a partir de muestras de aceites y grasas vegetales comestibles.

Sustancias	Recuperación, %
B[<i>a</i>]P	103
Σ B[<i>k</i>]F, B[<i>e</i>]P, Per	94

4.1.2.2 Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método de HPLC.

Por medio de la curva de calibración se establecieron los parámetros referentes a la respuesta individual de cada analito y su comportamiento. Las muestras se analizaron en orden creciente de concentración (**Tabla 13**).

Tabla 13. Linealidad y sensibilidad del método por cromatografía líquida.

Sustancias	Ecuación	R ²	RDL, ppb
B[a]P	Y=3.6726X	0.9968	0.3-800
Σ B[k]F, B[e]P, Per	Y=1.8642X	0.9964	1-400

El método por cromatografía líquida para el análisis de los PAH es aplicable en el rango de concentraciones de 0.3 - 800 ppb. La linealidad del método tuvo el comportamiento adecuado ($R^2=0.9964 - 0.9968$). La sensibilidad para detectar los analitos en las condiciones del método cromatográfico fue alta, debido a que las pendientes de las curvas de calibración variaron entre 1.8642 - 3.6726 ppb/LU y, la incertidumbre en las mediciones realizadas, para cada analito no superó 0.001. Las curvas de calibración para cada uno de los analitos se encuentran en los **Anexos D y E**.

4.1.2.3 Determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación.

Se desarrolló el cálculo mediante el método estadístico; en la **Tabla 14**, se observan los niveles mínimos de detección (NMD) y niveles mínimos de cuantificación (NMC) para los PAH analizados por el método cromatográfico que se reporta en la **Tabla 10**.

Tabla 14. Niveles mínimos de detección y cuantificación de los PAH analizados.

Sustancias	NMD, ppb	NMC, ppb	LMR, ppb*
B[a]P	0.9	1.8	3
Σ B[k]F, B[e]P, Per	1.7	3.4	7.5

* LMR: Límites máximos de residuos adoptados por algunos países europeos para los aceites

Límites máximos de residuos (LMR) adoptados, por algunos países europeos para los aceites ($\mu\text{g}/\text{Kg}$), se extrapolaron a la cantidad de muestra oleaginosa utilizada (1 g) y volumen de aforo final del extracto para su respectivo análisis por la técnica HPLC-FLD (1.5 mL). Estos valores se encuentran por encima de los NMD del método cromatográfico, cuyo rango es de 0.9 a 1.7 ppb, para los PAH seleccionados.

4.1.2.4 Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad para los tiempos de retención y el área.

Se escogió un punto de la curva de calibración, cuya concentración fue de 5 ppb, y se inyectaron 5 μL de solución patrón cinco veces, con esto, se estimó la repetibilidad de las mediciones. Los resultados para la calificación del método, en cuanto a tiempos de retención y áreas cromatográficas, se observan en las **Tablas 15 y 16**, respectivamente.

Tabla 15. Repetibilidad de los tiempos de retención de los PAH seleccionados, analizados por el método HPLC-FLD.

Sustancias	t_R promedio, min	S	CV, %
B[a]P	5.62	0.063	1.1
Σ B[k]F, B[e]P, Per	4.81	0.024	0.5

n=5

Tabla 16. Repetibilidad de áreas cromatográficas de los PAH seleccionados, analizados por el método HPLC-FLD.

Sustancias	Área promedio, LU	S	CV, %
B[a]P	20.0	0.42	7.4
Σ B[k]F, B[e]P, Per	35.7	0.79	4.2

n=5

Tabla 17. Reproducibilidad de los tiempos de retención de los PAH seleccionados, analizados por el método HPLC-FLD.

Sustancias	t _R promedio Día 1, min	t _R promedio Día 2, min	S	CV, %
B[a]P	5.62	5.57	0.037	0.66
Σ B[k]F, B[e]P, Per	4.80	4.79	0.013	0.27

n=5

Tabla 18. Reproducibilidad de áreas cromatográficas de los PAH seleccionados, analizados por el método HPLC-FLD.

Sustancias	Área promedio Día 1, LU	Área promedio Día 2, LU	S	CV, %
B[a]P	25.5	26.9	1.02	3.9
Σ B[k]F, B[e]P, Per	37.6	36.8	0.57	1.5

n=5

La repetibilidad se expresó como los coeficientes de variación del método cromatográfico, en lo que respecta a los tiempos de retención y las áreas cromatográficas de los PAH, cuyos valores se encuentran acordes con las exigencias de las BPL, y los valores para estos parámetros cromatográficos, no superaron el 1.1% y el 7.4%, para t_R y área respectivamente.

Los coeficientes de variación del método cromatográfico se usaron para la determinación de la reproducibilidad, referidos a los tiempos de retención y

las áreas cromatográficas de los analitos, empleando una solución *stock* de los analitos (5 ppb), inyectada cinco veces en dos días deferentes, Los respectivos datos promedio por día, se encuentran en la **Tabla 17 y 18**. Los valores están dentro de los rangos permitidos por las BPL e indican que el método fue reproducible, porque los coeficientes de variación no superaron el 0.7% y el 3.9%, para t_R y áreas cromatográficas, respectivamente.

4.2 EXTRACCIÓN DE PAH EN ACEITES Y GRASAS VEGETALES COMESTIBLES

4.2.1 Diseño experimental

En la **Tabla 19** se aprecia el tratamiento de los datos según el diseño experimental, empleado basado en la determinación de los efectos significativos. Se comparó el tamaño de cada efecto con la variación causada por el error experimental, el cual se midió con el quintuplicado del punto central, donde el CV fue el parámetro estadístico utilizado. Se encontraron valores de 7.6 y 7.3% para B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, respectivamente.

Tabla 19. Medida del error experimental del análisis de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, para la evaluación del diseño factorial 2^3 .

Sustancias	Área, LU	S	CV, %
B[a]P	35	2.7	7.6
Σ B[k]F, B[e]P, Per	124	9.2	7.3

n=5

4.2.1.1 Análisis de la varianza

Los resultados del diseño experimental se analizaron mediante la metodología de ANOVA, usando el *software* estadístico *StatGraphics*

Centurion versión 16 (*Statpoint Technologies*, Virginia, E.E.U.U.) con licencia de prueba de 30 días. Con este diseño se estudian 7 efectos: tres principales, tres interacciones dobles y una interacción triple para el B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per.

El análisis de varianza ANOVA, para la variable de respuesta, medida en área cromatográfica (LU), se encuentra en el **Anexo F**, donde se resume el análisis estadístico realizado para el diseño experimental. Para cada factor, se muestran dos términos: la **Razón-F**, que mide la contribución de cada factor en la variación de la respuesta y el **Valor-P**, el cual es una medida de la significancia estadística de cada uno de estos valores, de manera que, para este estudio, los factores considerados como significativos en el proceso de saponificación, fueron aquellos que presentaron un valor $p < 0.05$, que es el valor de probabilidad o nivel de confianza del 95%.

En la tabla ANOVA (**Anexo G**) y los diagramas de Pareto, que aparecen en la **Figura 14**, se observa el factor significativo para el proceso de saponificación del B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, fue correspondiente a la interacción de segundo orden entre la concentración de hidróxido de potasio y la temperatura del proceso, junto con el efecto principal de la concentración de KOH, predominante en la extracción de Σ B[k]F, B[e]P, Per.

Gráfico de Pareto estandarizado para Benzo[a]pireno

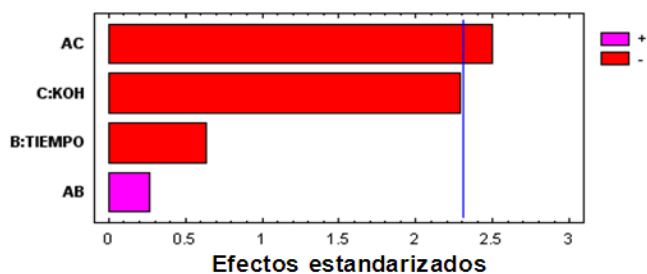


Gráfico de Pareto estandarizado para Σ BkF, BeP, Per

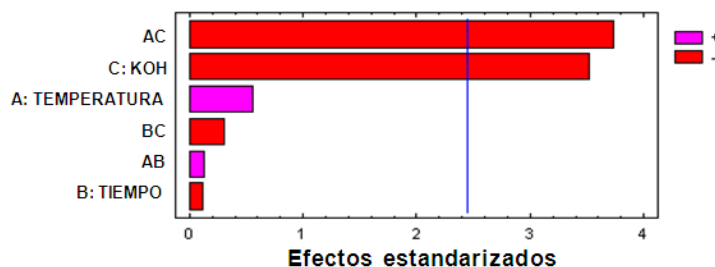


Figura 14. Diagramas de Pareto de efectos para el B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, respectivamente. A: Temperatura; B: Tiempo; C: [KOH]; AC: interacción de 2^{do} orden entre A y C; BC: interacción de 2^{do} orden entre B y C; AB: interacción de 2^{do} orden entre A y B.

La evaluación de los efectos de interacción, es decir, cuando la respuesta de un factor depende drásticamente del nivel de otro factor, pueden ser interpretados gráficamente (**Figura 15**), e.g., en el caso del B[a]P, se encontró que las mejores condiciones de extracción para el B[a]P fueron: temperatura de 80 °C, tiempo de saponificación de 30 min y una concentración de KOH 1.0 M.

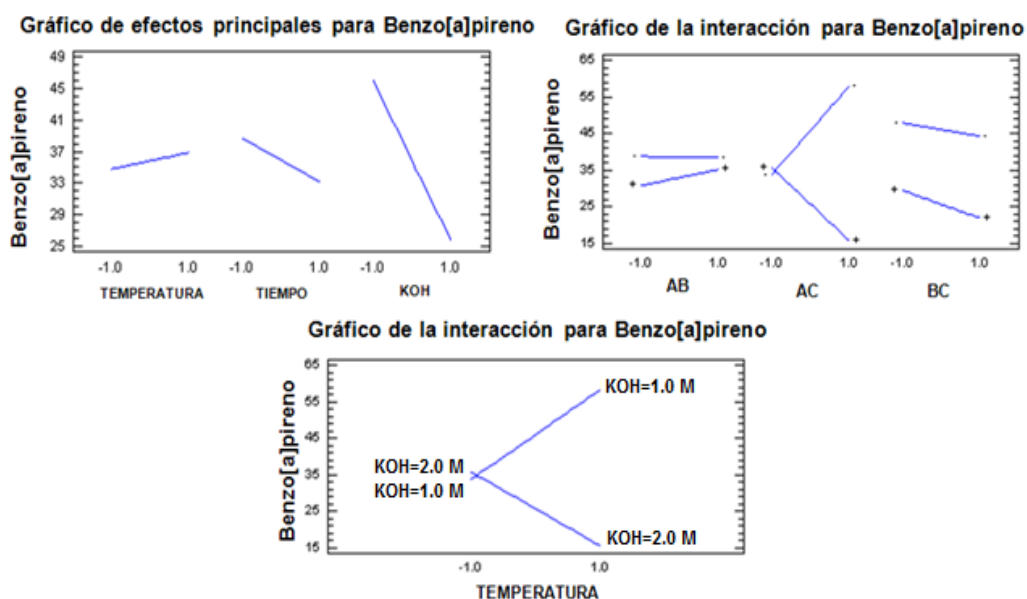


Figura 15. Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción del B[a]P. A: Temperatura; B: Tiempo; C: [KOH]; AC: interacción de 2^{do} orden entre A y C; BC: interacción de 2^{do} orden entre B y C; AB: interacción de 2^{do} orden entre A y B.

Al unificar estas condiciones, según las gráficas de interacciones y las de los efectos principales, se pueden determinar las mejores condiciones para la extracción simultánea del B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, respectivamente.

4.2.1.2 Mejores condiciones de extracción

Para el análisis simultáneo de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, es necesario minimizar la pérdida de los analitos durante el proceso de saponificación. En la **Tabla 20**, se muestran las condiciones de saponificación encontradas.

Tabla 20. Condiciones favorables para la saponificación de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, respectivamente.

Sustancias	Temperatura, °C	Tiempo, min	Concentración KOH, M
B[a]P	80	30	1.0
Σ B[k]F, B[e]P, Per	80	30	1.0

Las condiciones establecidas para el proceso de saponificación se observan en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Condiciones para la saponificación de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per.

Variables	Especificaciones
Temperatura, °C	80
Tiempo, min	30
Concentración KOH, M	1.0

Los posteriores procedimientos de saponificación de las muestras de aceites y grasas vegetales comestibles fueron realizados como se ilustra en la **Figura 16**.

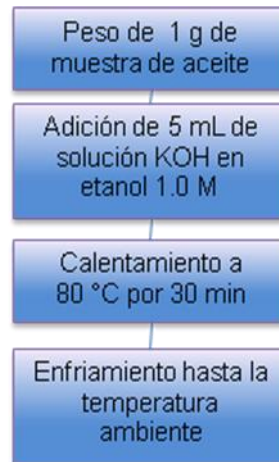


Figura 16. Diagrama de flujo para la saponificación de aceites y grasas y posterior extracción de PAH simultáneamente.

4.2.2 Extracción líquido-líquido

Teniendo en cuenta las mejores condiciones de saponificación para las muestras, se procedió a evaluar el poder de extracción de algunos disolventes apolares como el ciclohexano y *n*-hexano. Para esto, se realizó previamente la saponificación de una muestra de aceite refinado con las

condiciones de saponificación obtenidas del diseño experimental previamente realizado.

Los PAH “pesados”, con 4-6 anillos aromáticos tienen polaridades bajas, se espera entonces que estos compuestos sean extraídos mejor con disolventes apolares. En la **Figura 17**, se observa el comportamiento de los disolventes apolares utilizados en la extracción, la cual se realizó 3 veces con alícuotas de 5 mL. Los resultados indican que el *n*-hexano permite una recuperación mayor de los analitos de la muestra.

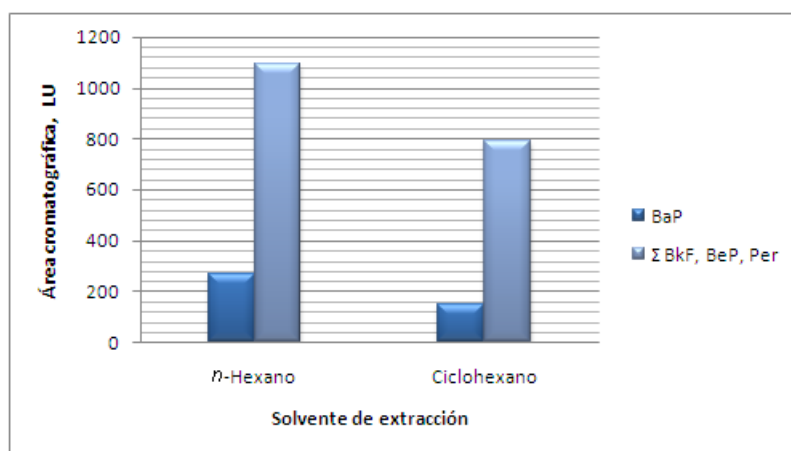


Figura 17. Comparación de solventes para la extracción líquido-líquido de los PAH de aceites y grasas, posterior a su respectiva saponificación.

Por lo general, los disolventes de moléculas pequeñas son mejores que los disolventes de moléculas grandes y pueden proporcionar disoluciones de menor viscosidad, es así como, en una serie homóloga hay una disminución del poder disolvente y un incremento de la viscosidad cuando se aumenta el peso molecular. El *n*-hexano y el ciclohexano tienen una viscosidad de 0.31 y 0.98, respectivamente. Así, los resultados muestran el comportamiento esperado, y una mayor recuperación lograda con el *n*-hexano, para los analitos en estudio.

4.2.3 Extracción en fase sólida: proceso de limpieza.

4.2.3.1 Pruebas preliminares

Considerando las características apolares del extracto a limpiar por extracción en fase sólida (SPE), en la **Tabla 22**, se muestran los parámetros de operación del equipo que se mantuvieron constantes en el desarrollo de la búsqueda de las mejores condiciones de operación para el proceso de SPE.

Tabla 22. Parámetros de operación durante el desarrollo del diseño experimental de SPE.

Parámetro	Condición	Observaciones
Acondicionamiento	1. 5 mL de metanol 2. 5 mL de solvente de la muestra	No se deja secar el cartucho entre la adición de cada disolvente y posterior a la adición del último de la serie.
Volumen de la muestra	12 mL	No dejar secar el cartucho
Lavado del cartucho	10 mL de agua	Dejar secar el cartucho por 10 min
Flujo	1 a 2 gotas por segundo	

El paso de secado durante 10 minutos garantiza que el extracto quede libre de agua y así no dificulte el paso de concentración, el cual necesitaría temperaturas elevadas, para su eliminación.

4.2.3.2 Variables a evaluar

✓ Disolvente de la muestra: La concentración del solvente orgánico en la muestra es un parámetro crítico, porque si su concentración es muy baja, podría no ser suficiente para solubilizar los PAH “pesados”, pero si su concentración es muy alta, la retención de los analitos afectaría la recuperación de los mismos, necesitando más cantidad de solvente de elución.

✓ Solvente de elución: Debido a las diferentes características fisicoquímicas de los analitos, se probaron *n*-hexano y *n*-hexano-diclorometano (70:30, v/v), adicionando cantidades de 5 mL, para recuperar la mayor cantidad posible de analitos, que interactúan con la fase estacionaria del cartucho. El extracto obtenido se llevó a sequedad y se reconstituyó en acetonitrilo, luego, se almacenó, bajo refrigeración, para su posterior análisis cromatográfico.

Con base en los resultados de la revisión bibliográfica y las pruebas preliminares, se determinaron las variables más críticas para el proceso de limpieza de los extractos con SPE; los experimentos realizados se resumen en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Experimento para la optimización del proceso de SPE.

Experimento	A (Solvente de la muestra)	B (Solvente de elución)
1	DMF-Agua (1:1, v/v)	<i>n</i> -hexano
2	DMF-Agua (1:2, v/v)	
3	DMF-Agua (1:1, v/v)	<i>n</i> -hexano-diclorometano (70:30, v/v)
4	DMF-Agua (1:2, v/v)	

Para evaluar el comportamiento de las variables, se trabajó con una solución *stock* de PAH, se realizó un blanco de disolvente y, finalmente, se compararon las áreas cromatográficas de estos extractos con las obtenidas de la solución *stock* no sometida al proceso de limpieza (*clean-up*).

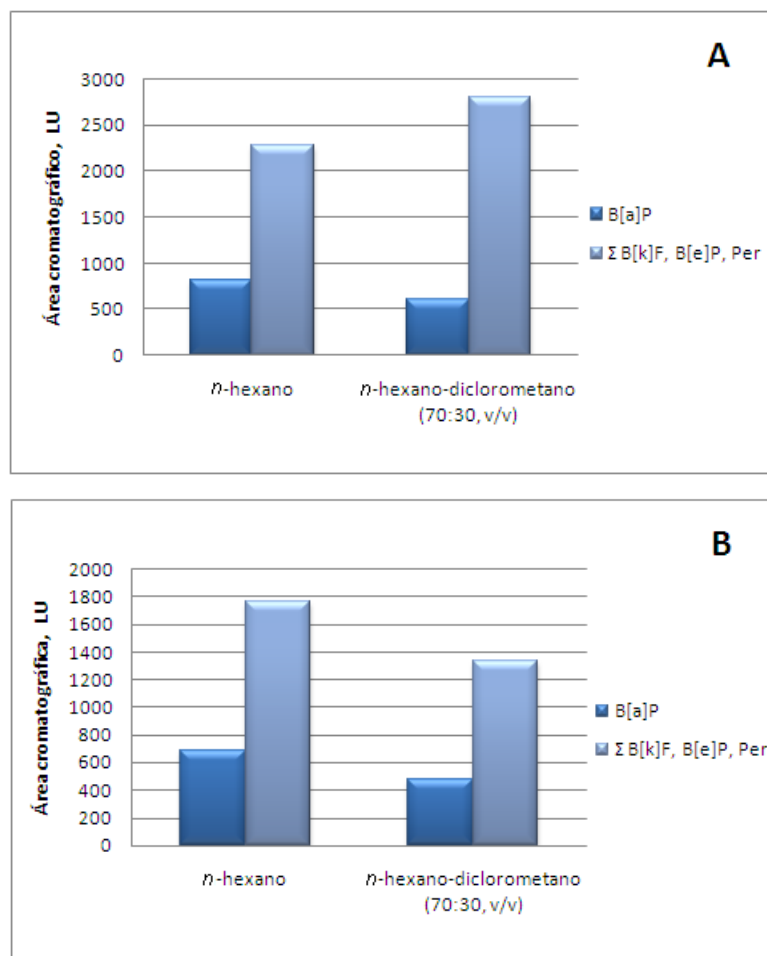


Figura 18. Evaluación de las variables en el proceso de SPE.

A. Disolvente de muestra utilizado DMF-agua (1:1, v/v), con los diferentes solventes de elución; **B.** Disolvente de muestra utilizado DMF-agua (1:2, v/v) con los diferentes solventes de elución.

En la **figura 18A**, se observa cómo, al utilizar DMF-agua (1:1, v/v) como solvente de muestra, se obtienen mayores áreas cromatográficas de los picos correspondientes a B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per; en comparación con las obtenidas en la **Figura 18B**, cuando se utilizó la mezcla DMF-agua (1:2, v/v) como solvente de muestra; la concentración de agua en el solvente de muestra disminuye la solubilidad de los analitos en éste y, por lo tanto, su recuperación.

En el caso de la elución, debido al carácter apolar de todos los analitos analizados y teniendo en cuenta la importancia que poseen la recuperación y la cuantificación del B[a]P, se escogió como solvente de elución el *n*-hexano, que mostró un mayor grado de recuperación para este analito.

La recuperación para el B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per fue de 103 y 94 %, respectivamente. Éstos porcentajes se calcularon comparando las áreas cromatográficas reportadas por el equipo de cromatografía líquida de los extractos obtenidos mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE) aplicando las mejores condiciones encontradas, con las áreas cromatográficas de los picos de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per arrojadas de una solución *stock* PAH de igual concentración de los analitos en los extractos (200 ppb) inyectada directamente, sin aplicar el procedimiento de limpieza por SPE.

4.2.4 Mejores condiciones de *clean-up*

Para el análisis simultáneo del grupo selecto de PAH, fue necesario que durante el proceso de *clean-up* de los extractos, no ocurriera la menor pérdida de los analitos. Sin embargo, no fue posible trabajar con las mejores condiciones para cada uno de los compuestos de interés (**Tabla 24**), y se debió escoger las condiciones en las que se obtuvo mayor recuperación de B[a]P, teniendo en cuenta su carácter tóxico a bajas concentraciones y la necesidad de su determinación en los productos alimenticios.

Tabla 24. Condiciones más favorables para el proceso de *clean-up* de cada uno de los PAH.

Sustancias	Solvente de muestra	Solvente de elución
Σ B[k]F, B[e]P, Per	DMF-Agua (1:1, v/v)	<i>n</i> -Hexano-Diclorometano (70:30, v/v)
B[a]P	DMF-Agua (1:1, v/v)	<i>n</i> -Hexano

Sin embargo, fue posible trabajar bajo condiciones que permitieran extraer la mayoría de los compuestos, y para este grupo de PAH, las mejores condiciones para recuperarlos, después de la respectiva limpieza (*clean-up*) se indican en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Condiciones más favorables para el proceso de limpieza (*clean-up*) después de la extracción simultánea de un grupo selecto de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles.

Variables	Especificaciones
Solvente de muestra	DMF-Agua (1:1, v/v)
Solvente de elución	<i>n</i> -Hexano

Las condiciones del proceso de limpieza (*clean-up*) empleadas durante el desarrollo del proyecto, correspondieron a las mejores logradas; debido a que son las que muestran recuperación más alta y, teniendo en cuenta que el B[a]P que es el analito de más interés, por ser cancerígeno. Este último presentó la mayor recuperación.

De manera que la etapa de *clean-up* se hizo de la siguiente forma: el acondicionamiento del cartucho de SPE C₁₈ se realizó mediante la adición de de metanol (5 mL) y de DMF-agua (1:1, v/v) (5 mL), consecutivamente; sin dejar secar el cartucho se adicionaron 2 mL de la muestra y se lavó el tubo de la muestra con DMF-agua (1:1, v/v) (10 mL), lavando posteriormente con

agua (10 mL) y llevando a sequedad durante 10 min. Seguidamente, se eluyó con *n*-hexano (5 mL). Por último, la fracción colectada se llevó a sequedad y se reconstituyó en 1.5 mL de acetonitrilo, se pasó por un filtro de 0.25 µM de diámetro de poro y se analizó en el equipo de HPLC-FLD.

4.3 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

4.3.1 Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.

La metodología de extracción fue desarrollada en diferentes días, pero siguiendo las mismas condiciones; con los resultados obtenidos se evaluó el coeficiente de variación para los porcentajes de recuperación para cada día (**Tabla 26**).

Tabla 26. Porcentajes de recuperación evaluados en diferentes días para estimar la reproducibilidad en el proceso de extracción de los PAH.

Sustancias	Recuperación promedio, % Día 1	Recuperación promedio, % Día 2	S	C.V, %
Σ B[k]F, B[e]P, Per	103.1	96.6	4.6	4.7
B[a]P	93.9	85.8	5.7	6.4

n=3

Como se observa en la **Tabla 26**, la reproducibilidad del método de extracción medida por medio de los coeficientes de variación, están acordes con las BPL, ya que sus valores no superan el 6.4% (recomendado, no mayor de 10%).

4.4 APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS REALES PROVENIENTES DEL MERCADO LOCAL

Se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo, de cinco muestras comerciales de aceites y grasas vegetales comestibles adquiridas en los principales supermercados de la ciudad de Bucaramanga.

4.4.1 Determinación

Se realizó el proceso de extracción, descrito anteriormente, a cinco muestras de aceites y grasas vegetales comestibles, por duplicado, y se compararon con los t_R y espectros UV-Vis de cada uno de los PAH de referencia, con los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos en los extractos de las muestras, analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas. Los resultados se muestran en la **Figura 19**.

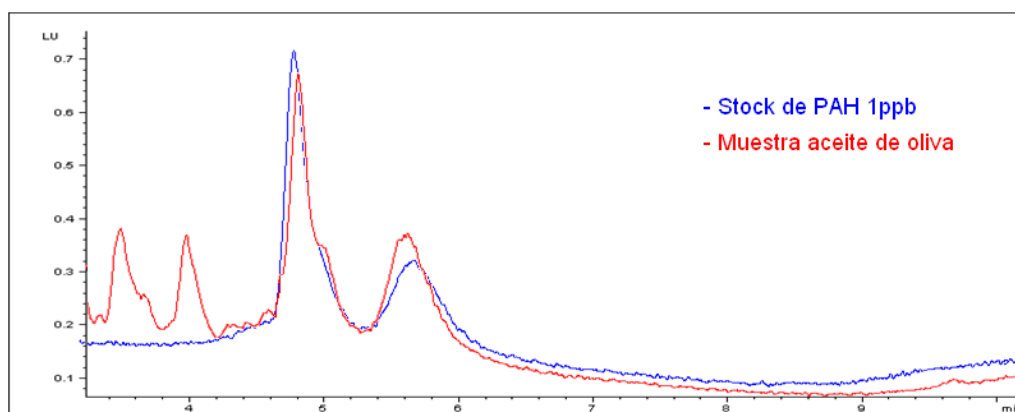


Figura 19. Cromatogramas del extracto de una muestra comercial de aceite de oliva, analizados por HPLC, por el método previamente estandarizado.

El método fue aplicado para determinar la concentración de los PAH en 3 muestras de aceites y 2 muestras de grasas vegetales comestibles; se obtuvieron buenos resultados. En la **Tabla 27**, se observa cómo para la mayoría de muestras de aceites y grasas vegetales comestibles, la cantidad

de B[a]P se encontraba por debajo del nivel mínimo de cuantificación, excepto la grasa vegetal, que contenía 2.7 ng/g de B[a]P, pero este valor no supera el nivel mínimo de residuos permitido. El rango de las concentraciones de la Σ B[k]F, B[e]P y Per, en las muestras de aceites y grasa vegetales comestibles, se encontraban de 3.4 a 5.0 ng/g. Se observó que el nivel mínimo de residuos no es superado en ninguna de las muestras analizadas; así los mayores valores de PAH se encuentran como era de esperarse por su método de producción en el aceite de oliva extravirgen y grasa vegetal, ya que estos procesos no cuentan con un procedimiento de refinación que permite la disminución del contenido de PAH en éstos.

Tabla 27. Concentración (ng/g) de PAH en aceites y grasas vegetales comestibles analizados.

PAH	Aceite refinado de canola y girasol	Aceite de oliva Extravirgen	Aceite de soya	Margarina vegetal	Grasa vegetal
Σ B[k]F, B[e]P, Per	3.9	5.0	3.4	<3.4 ^a	4.1
B[a]P	<1.8 ^a	2.0	1.9	<1.8 ^a	2.7
Total PAH pesados	5.2	6.9	5.3	4.4	6.9

^a NMC, Nivel mínimo de cuantificación.

De acuerdo con los cromatogramas obtenidos de los PAH aislados de aceites y grasas vegetales comestibles, adquiridas en los principales supermercados de la ciudad de Bucaramanga, se estableció que: en dichas muestras los PAH, a saber: benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, benzo[k]fluoranteno y perileno, se encuentran presentes por debajo del nivel mínimo de su cuantificación por equipo de HPLC-FLD, pero por encima del nivel mínimo de su detección.

5 CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo, se implementó la técnica de cuantificación de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per, por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia (HPLC-FLD). Para su extracción de aceites y grasas vegetales comestibles, se utilizó la técnica de saponificación, extracción líquido-líquido y, finalmente, como técnica de limpieza, SPE. El proceso de extracción y limpieza fue evaluado acorde con su eficiencia (% de recuperación) y reproducibilidad.
2. Se logró cumplir las normas establecidas por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), se obtuvieron con respecto a la reproducibilidad de los tiempos de retención, t_R , (CV de 0.5 - 1.1%), factores de respuesta, R_f , y las áreas cromatográficas (CV de 4.2 - 7.4%); se obtuvieron coeficientes de determinación altos ($R^2 > 0.99$), usando el método de calibración externa; se garantizó la realización reproducible del análisis cualitativo y cuantitativo de B[a]P y la sumatoria de sus isómeros estructurales B[k]F, B[e]P y Per.
3. Utilizando la técnica de extracción establecida (saponificación, extracción líquido-líquido y SPE), se lograron porcentajes de recuperación de 103 y 94% para el B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P y Per, respectivamente. Se utilizó *n*-hexano como solvente de extracción de los PAH, después de la saponificación de la muestra oleaginosa. El extracto obtenido se sometió a un proceso de *clean-up* en cartuchos C_{18} . Las condiciones para la saponificación y la extracción líquido-líquido fueron: concentración de base (1.0 M), la temperatura para la saponificación (80 °C); disolvente para la extracción líquido-líquido (*n*-Hexano), así como, el solvente de

muestra (DMF: Agua (1:1, v/v)) y el solvente de elución (*n*-Hexano) para el proceso de limpieza (*clean-up*).

4. El método cromatográfico desarrollado permitió la detección y cuantificación de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P y Per, con NMD de 0.9 y 1.7 ppb y NMC de 1.8 y 3.4 ppb, respectivamente, que se encuentran por debajo de los recomendados por la Unión Europea, en su Resolución N°208/2005.
5. Para validar el método desarrollado, se realizó la extracción y análisis de diferentes muestras de alimentos, que se adquirieron en el mercado local del área metropolitana de Bucaramanga. Los valores de B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P y Per, determinados en el estudio, en aceites y grasas vegetales comestibles provenientes del mercado local fueron <1.8 a 2.7 ng/g para el B[a]P y <3.4 a 5.0 ng/g para la Σ B[k]F, B[e]P y Per. Estos resultados fueron comparados con los valores estipulados por algunas organizaciones mundiales como la Unión Europea, y se determinó que aunque se evidencia la presencia de este grupo selecto de PAH, los rangos de concentración no superan los límites máximos legales establecidos por estas entidades, pero se encuentran muy cerca de éstos en algunos casos.
6. El método cromatográfico no permite la resolución de los picos correspondientes a los analitos B[k]F, B[e]P y Per, debido a que al ser isómeros de estructuras apolares no basta con una columna apolar para su separación, además de la fase estacionaria que debe ser polimérica. Sin embargo, debido a la carencia de una normatividad o legislación que determine límites máximos de B[k]F, B[e]P y Per en aceites y grasas vegetales comestibles y al estar clasificados por la IARC como 2B

(posiblemente carcinógeno), algunas organizaciones mundiales recomiendan no exceder una cantidad total de 5 ppb para este tipo de PAH. Es así, como al cuantificar la sumatoria de B[k]F, B[e]P y Per podemos determinar si excede los valores recomendados por las organizaciones mundiales.

6 RECOMENDACIONES

1. Se puede realizar la cuantificación de B[k]F, B[e]P y Per, así como de otros analitos mediante un método cromatográfico por HPLC-FLD, con una columna C₁₈ apolar con fase estacionaria polimérica para así poder evaluar la recuperación del método para cada uno de los analitos.
2. Aplicar el método implementado a una mayor variedad de aceites y grasas vegetales comestibles, ya que por su naturaleza lipofílica estos representan una fuente importante de PAH en la dieta humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KLEIBOHMER W., Environmental analysis, Handbook of Analytical Separations, Vol. 3, *Elsevier Science B.V.*, (2001), p.p 39-65.
- [2]<http://dsp-psd.communication.gc.ca/Collection/H48-10-1-16-1988E.pdf>:
Fecha de consulta: 15 de julio de 2010.
- [3] KUMMER V., Morphological and functional disorders of the immature rat uterus after postnatal exposure to benz[a]anthracene and benzo[k]fluoranthene. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27 (2009), p.p. 253–258.
- [4] TEIXEIRA V.H., PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chemistry*, 104 (2007), p.p. 106–112.
- [5] REY S. L., MARTÍNEZ C. E. y GARCÍA S. M., Effects of a chemical company fire on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant foods. *Food Chemistry* 108 (2008), p.p 347–353.
- [6] HENDRIKSE P. W., DIEFFENBACHER A., Determination of benzo[a]pyrene in oils and fats by reversed phase high performance liquid chromatography. *pure&app/ chem.*, 63 (1991), p.p. 1659-1666.
- [7] PUPIN A. M., TOLEDO M. C. F. Benzo[a]pyrene in olive oils on the Brazilian market. *Food Chemistry*, 55 (1996), p.p. 185-188.
- [8] KAIRUZ L. A. CIVETTA. Introducción al estudio de la composición de los alimentos. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales. *Editorial Guadalupe Ltda.* Bogotá, D.C. (2002), p.p. 145-151.

[9] RENJIFO F. S. Ministro de Salud Pública. Resolución del Ministerio de Salud 000126 del 22 de febrero de 1964.

[10] BOGUSZ M.J., Rapid determination of benzo[a]pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography–mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004), p.p. 1-7.

[11] ALTON B. E. Aceites y grasas industriales. *Editorial Reverté* 2^{da} Ed. Barcelona (1961), p.p. 474.

[12] www.si3ea.gov.co/si3ea/documentos/documentacion/.../Capitulo202.pdf
Fecha de consulta: 30 de Diciembre de 2010.

[13] CAREY F. A. Química orgánica. *McGraw Hill* 3^{ra} Ed. Madrid (1999), p.p. 379.

[14] LAGE M.A., CORTIZO J.L., Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control*, 16 (2005), p.p. 59–64.

[15] PURCARO G., MORET S., CONTE L. S., Rapid validated method for the analysis of benzo[a]pyrene in vegetable oils by using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1176 (2007), p.p. 231–235.

- [16] SOTERO P., ARCE R., Major products in the photochemistry of perylene adsorbed in models of atmospheric particulate matter, *J. of Photochem. and Photobiol. A: Chemistry*, 199 (2008), p.p. 14–22.
- [17] <http://www.chemie.de/lexikon/e/Benzopyrene/> Fecha de consulta: 10 de agosto de 2009.
- [18] MASTANDREA C., CHICHIZOLA C. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 39 (2005), p.p. 27-36.
- [19] SORIANO J.A., Evaluación y seguimiento del contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (pahs) en mejillón silvestre la costa de Galicia y Cantábricos después del vertido del b/t Prestige. Tesis de Grado. *Universidade da Coruña*. Coruña (2009).
- [20] LEO M. L. y NOLLET, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Handbook of water analysis, New York (2006), p.p. 580-595.
- [21] MORET S., PIANI B., BORTOLOMEAZZI R., HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, Springer Berlin / Heidelberg, 205 (1997), p.p. 116-120.
- [22] CABALLERO S. N. Análisis y determinación de la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) contenidos en el material particulado respirable (pm10) en la localidad de Puente Aranda de Bogotá en la zona de alta actividad industrial y alto flujo vehicular. Tesis de Grado. *Universidad de la Salle*, Bogotá D.C (2006).

[23] http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/alimento/Apuntes/TCAC-T5-Refinacion-aceites.pdf. Fecha de consulta: 10 enero de 2011.

[24] www.uam.es/.../1-TCAC%2005%20Generalidades%20de%20aceites.pdf
Fecha de consulta: 10 enero de 2011.

[25] BURGESS R. M., Evaluating ecological risk to invertebrate receptors from PAHs in sediments at hazardous waste sites, *U.S. Environmental Protection Agency* Narragansett, EPA/600/R-06/162ERASC-011. January (2007).

[26] http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts69.pdf. Fecha de consulta: 10 de enero de 2011.

[27] http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html. Fecha de consulta: 10 de enero de 2011.

[28] http://eurex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2005/l_023/l_02320050126es00030016.pdf. Fecha de consulta: 10 de enero de 2011.

[29] http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/detc_tot.html.
Fecha de consulta: 30 de septiembre de 2009.

[30] *American Oil Chemists Society (AOCS)*, Determination of Benzo[a]pyrene in Edible Oils and Fats. Sampling and analysis of comercial fats and oils. 1997, AOCS Official Method Cd 21-91.

[31] JACOB J. Method development for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental matrices, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Volume 17 (1995), p.p. 563-589.

[32] CABALLERO, D., Implementación de un método cromatográfico para la determinación y cuantificación del colesterol en alimentos, Bucaramanga, (2002). Tesis de Pregrado (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

[33] BRUNER, F., Gas Chromatographic Environmental Analysis Principles, Techniques, Instrumentation, VCH Publishers, Inc., New York, E.E.U.U., 1993, p.p. 185-190

[34] PENTON, Z. E., Advances in Chromatography: sample preparation for Gas Chromatography with Solid-Phase Extraction and Solid Phase Microextraction, Ed. Marcel Decker, Inc., New York (1993), p.p. 206-215.

[35] *Web of Science*. Base de datos. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2011.

[36] *Scopus*. Base de datos. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2011.

[37] PULIDO, H. y DE LA VARA, R., Análisis y diseño de experimentos, McGrawHill, (2008), p.p. 121.

[38] LAWRENCE J., Liquid Chromatography in Environmental Analysis, The Humana Press Inc., New York, E.E.U.U., 1984, p.p. 33.

BIBLIOGRAFÍA

ALTON B. E. Aceites y grasas industriales. *Editorial Reverté* 2^{da} Ed. Barcelona (1961), p.p. 474.

American Oil Chemists Society (AOCS), Determination of Benzo[a]pyrene in Edible Oils and Fats. Sampling and analysis of comercial fats and oils. 1997, AOCS Official Method Cd 21-91.

BOGUSZ M.J., Rapid determination of benzo[a]pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography–mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004), p.p. 1-7.

BRUNER, F., Gas Chromatographic Enviromental Analysis Principles, Techniques, Instrumentation, VCH Publishers, Inc., New York, E.E.U.U., 1993, p.p. 185-190.

BURGESS R. M., Evaluating ecological risk to invertebrate receptors from PAHs in sediments at hazardous waste sites, *U.S. Environmental Protection Agency* Narragansett, EPA/600/R-06/162ERASC-011. January (2007).

CABALLERO S. N. Análisis y determinación de la concentración de hidrocarburos aromático policíclicos (HAP's) contenidos en el material particulado respirable (pm10) en la localidad de Puente Aranda de Bogotá en la zona de alta actividad industrial y alto flujo vehicular. Tesis de Grado. *Universidad de la Salle*, Bogotá D.C (2006).

CABALLERO, D., Implementación de un método cromatográfico para la determinación y cuantificación del colesterol en alimentos, Bucaramanga,

(2002). Tesis de Pregrado (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

CAREY F. A. Química orgánica. *McGraw Hill 3^{ra} Ed.* Madrid (1999), p.p. 379.

HENDRIKSE P. W., DIEFFENBACHER A., Determination of benzo[a]pyrene in oils and fats by reversed phase high performance liquid chromatography. *pure&app/. chem.*, 63 (1991), p.p. 1659-1666.

<http://dsp-psd.communication.gc.ca/Collection/H48-10-1-16-1988E.pdf>: Fecha de consulta: 15 de julio de 2010.

http://eurex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2005/l_023/l_02320050126es00030016.pdf. Fecha de consulta: 10 de enero de 2011.

http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/detc_tot.html. Fecha de consulta: 30 de septiembre de 2009.

http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts69.pdf. Fecha de consulta: 10 de enero de 2011.

http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html. Fecha de consulta: 10 de enero de 2011.

<http://www.chemie.de/lexikon/e/Benzopyrene/> Fecha de consulta: 10 de agosto de 2009.

<http://www.si3ea.gov.co/si3ea/documentos/documentacion/.../Capitulo202.pdf>
Fecha de consulta: 30 de Diciembre de 2010.

http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/alimento/Apuntes/TCAC-T5-Refinacion-aceites.pdf. Fecha de consulta: 10 enero de 2011.

<http://www.uam.es/1-TCAC%2005%20Generalidades%20de%20aceites.pdf>
Fecha de consulta: 10 enero de 2011.

JACOB J. Method development for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental matrices, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Volume 17 (1995), p.p. 563-589.

KAIRUZ L. A. CIVETTA. Introducción al estudio de la composición de los alimentos. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales. *Editorial Guadalupe Ltda.* Bogotá, D.C. (2002), p.p. 145-151.

KLEIBOHMER W., Environmental analysis, Handbook of Analytical Separations, Vol. 3, *Elsevier Science B.V.*, (2001), p.p 39-65.

KUMMER V., Morphological and functional disorders of the immature rat uterus after postnatal exposure to benz[a]anthracene and benzo[k]fluoranthene. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27 (2009), p.p. 253–258.

LAGE M.A., CORTIZO J.L., Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control*, 16 (2005), p.p. 59–64.

LAWRENCE J., Liquid Chromatography in Environmental Analysis, The Humana Press Inc., New York, E.E.U.U., 1984, p.p. 33.

LEO M. L. y NOLLET, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Handbook of water analysis, New York (2006), p.p 580-595.

MASTANDREA C., CHICHIZOLA C. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 39 (2005), p.p. 27-36.

MORET S., PIANI B., BORTOLOMEAZZI R., HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A, Springer Berlin / Heidelberg*, 205 (1997), p.p. 116-120.

PENTON, Z. E., *Advances in Chromatography: sample preparation for Gas Chromatography with Solid-Phase Extraction and Solid Phase Microextraction*, Ed. Marcel Decker, Inc., New York (1993), p.p. 206-215.

PULIDO, H. y DE LA VARA, R., *Análisis y diseño de experimentos*, McGrawHill, (2008), p.p. 121.

PUPIN A. M., TOLEDO M. C. F. Benzo[a]pyrene in olive oils on the Brazilian market. *Food Chemistry*, 55 (1996), p.p. 185-188.

PURCARO G., MORET S., CONTE L. S., Rapid validated method for the analysis of benzo[a]pyrene in vegetable oils by using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1176 (2007), p.p. 231–235.

RENJIFO F. S. Ministro de Salud Pública. Resolución del Ministerio de Salud 000126 del 22 de febrero de 1964.

REY S. L., MARTÍNEZ C. E. y GARCÍA S. M., Effects of a chemical company fire on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant foods. *Food Chemistry* 108 (2008), p.p 347–353.

Scopus. Base de datos. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2011.

SORIANO J.A., Evaluación y seguimiento del contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (pahs) en mejillón silvestre la costa de Galicia y Cantabria después del vertido del b/t Prestige. Tesis de Grado. *Universidade da Coruña*. Coruña (2009).

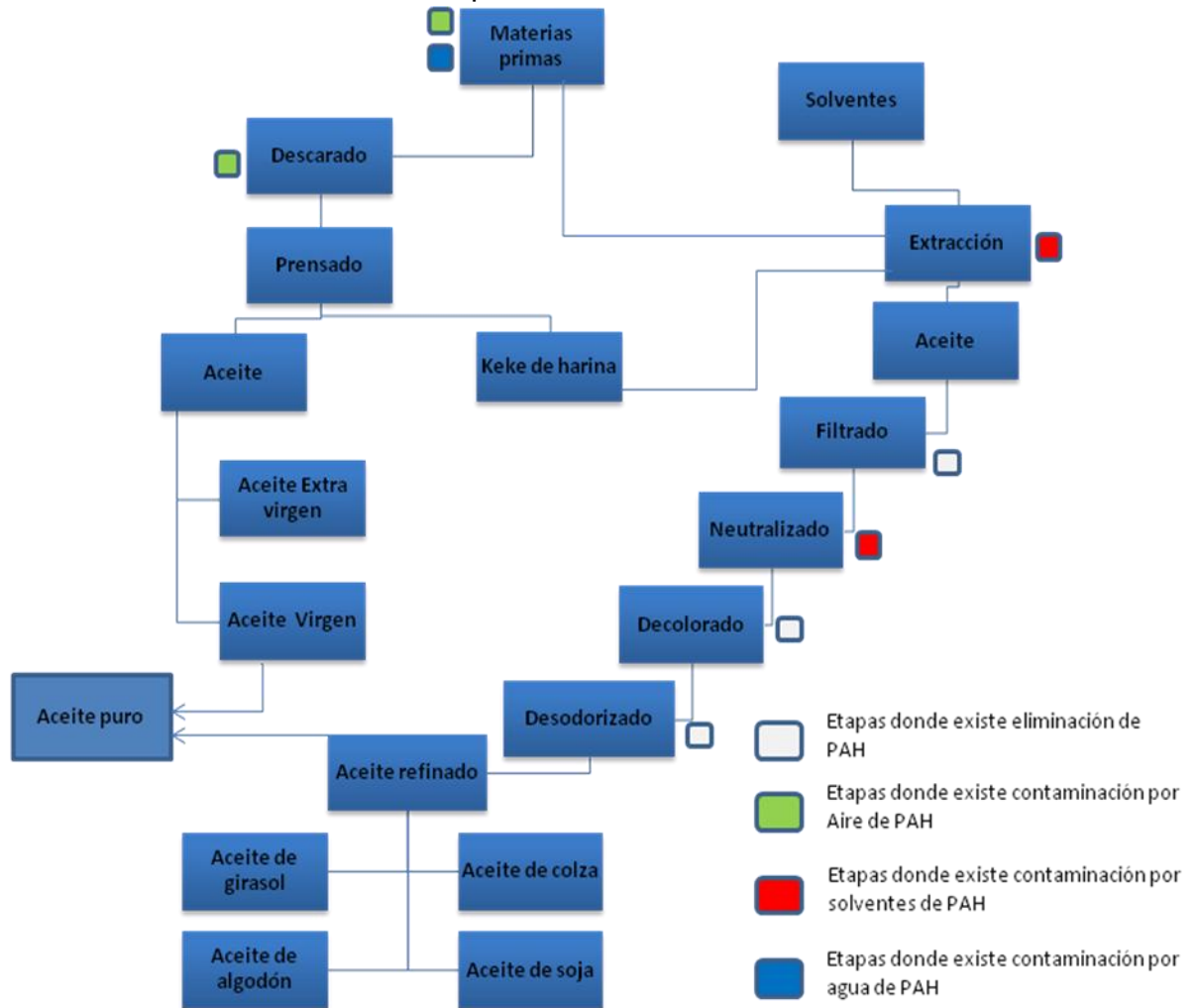
SOTERO P., ARCE R., Major products in the photochemistry of perylene adsorbed in models of atmospheric particulate matter, *J. of Photochem. and Photobiol. A: Chemistry*, 199 (2008), p.p. 14–22.

TEIXEIRA V.H., PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chemistry*, 104 (2007), p.p. 106–112.

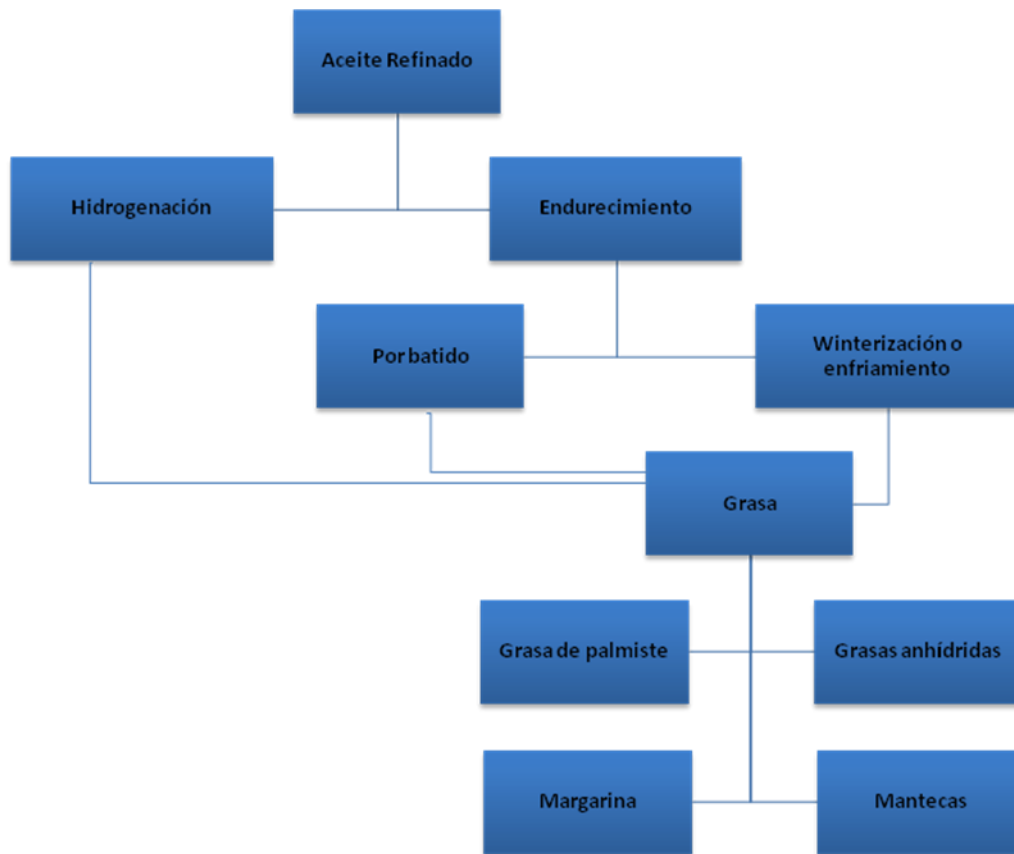
Web of Science. Base de datos. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2011.

ANEXOS

Anexos A. Proceso de producción de aceite.



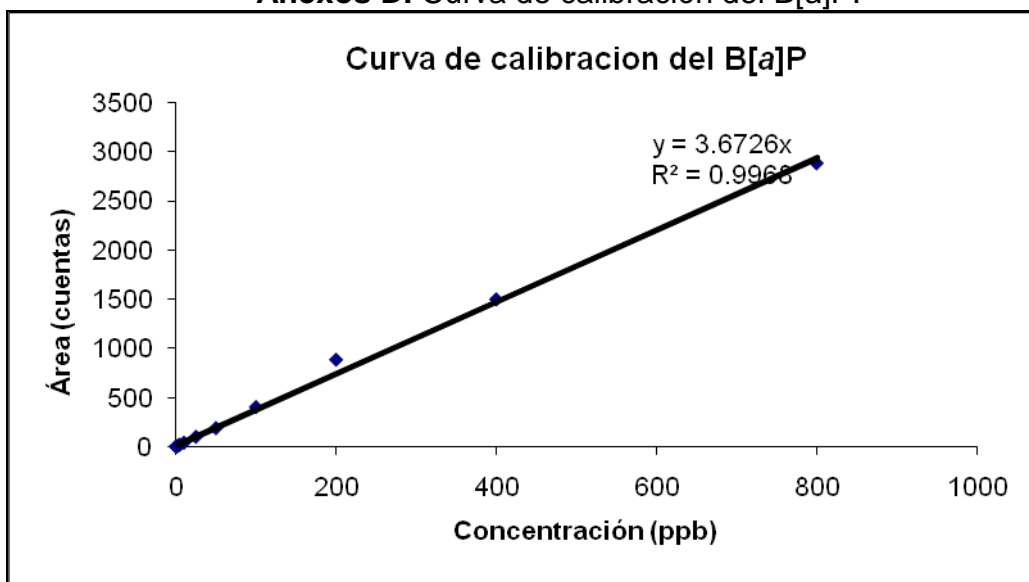
Anexos B. Proceso de producción de grasas.



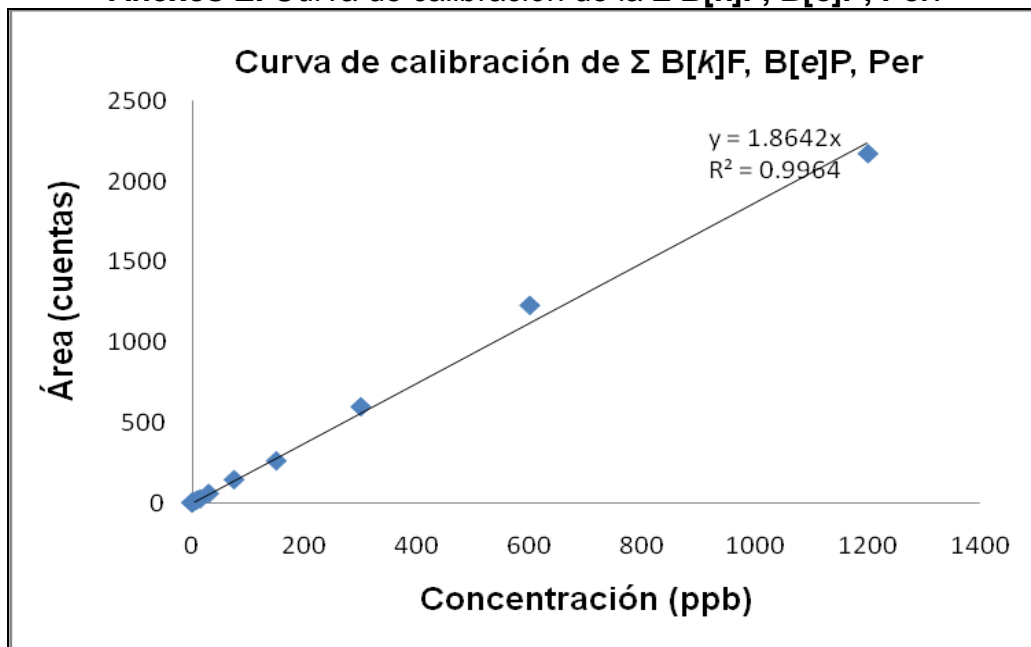
Anexos C. Lista de PAH clasificados por la EPA como tóxicos y cancerígenos.

PAH	PESO MOLECULAR (µg/mol)
Naftaleno	128.17
C1- Naftalenos	142.20
Acenaftileno	152.2
Acenafteno	154.21
C2- Naftalenos	156.23
Fluoreno	166.22
C3-Naftalenos	170.25
Antraceno	178.12
Fenantreno	178.23
C1-Fluorenos	180.25
C4-Naftalenos	184.28
C1-Fenantreno/antracenos	192.26
C2-Fluorenos	194.27
Pireno	202.26
Fluoranteno	202.26
C2-Fenantreno/antracenos	206.29
C3-Fluorenos	208.30
C1-Pireno/fluorantenos	216.29
C3- Fenantreno/antracenos	220.32
Benz[a]antraceno	228.29
Criseno	228.29
C4- Fenantreno/antracenos	234.23
C1-Benzantraceno/crisenos	242.32
Benzo[a]pireno	252.31
Perileno	252.31
Benzo[e]pireno	252.32
Benzo[b]fluoranteno	252.32
Benzo[k]fluoranteno	252.32
C2- Benzantraceno/crisenos	256.23
Benzo[ghi]perileno	276.23
C3- Benzantraceno/crisenos	270.36
Indeno[1,2,3-cd]pireno	276.23
Dibenz[a,h]antraceno	278.35
C4- Benzantraceno/crisenos	284.38

Anexos D. Curva de calibración del B[a]P.



Anexos E. Curva de calibración de la Σ B[k]F, B[e]P, Per.



Anexos F. Resultados, obtenidos por el *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para el proceso de saponificación del B[a]P y Σ B[k]F, B[e]P, Per.

Compuesto		Factores			Interacción		
		A:T (°C)	B:tiempo (min)	C:[KOH] M	AB	AC	BC
Σ B[k]F, B[e]P, Per	Razón-F	0.31	0.01	12.39	0.02	13.95	0.09
	Valor-P	0.597	0.9092	0.0125	0.9049	0.0097	0.7727
B[a]P	Razón-F	0.06	0.40	5.25	0.05	6.25	0.04
	Valor-P	0.818	0.5455	0.0511	0.8274	0.0369	0.8494

Anexos G. Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción de $\Sigma B[k]F$, $B[e]P$, Per.

Gráfico de Efectos Principales para ΣBkF , BeP, Per

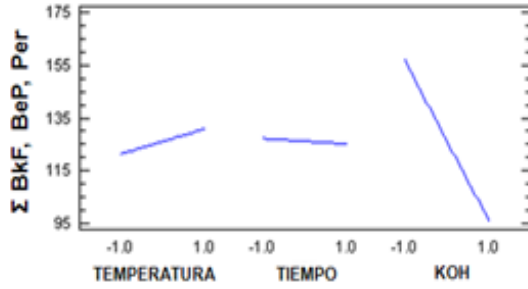


Gráfico de la interacción para ΣBkF , BeP, Per

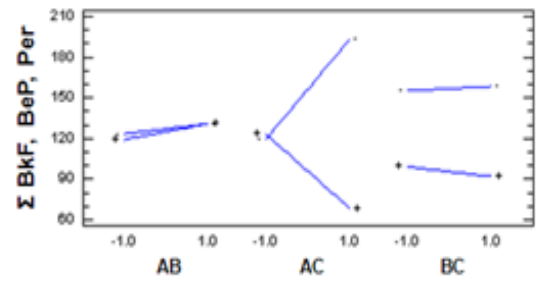


Gráfico de la interacción para ΣBkF , BeP, Per

