

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA UNA ALTERNATIVA
PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS (HAP's) EN MATRICES BIOLÓGICAS.
APLICACIÓN: JAMÓN AHUMADO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA EN ALIMENTOS

PRESENTA

DOLORES GABRIELA ROJAS GUTIÉRREZ

MÉXICO, DF.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Silvia de Jesús Mendoza Arellano

Vocal Prof. Zoila Nieto Villalobos

Secretario Prof. Araceli Patricia Peña Álvarez

1er Suplente Prof. Gabriela Alatorre García

2do Suplente Prof. Erika María Ramírez Maya

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 101 DEPg, Química Analítica, Edificio B, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

Asesor del Tema

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Supervisor Técnico

M. en C. Carmen Labastida Rubio

Sustentante

Dolores Gabriela Rojas Gutiérrez

DEDICO ESTE TRABAJO:

CON CARIÑO, ADMIRACIÓN Y GRAN AGRADECIMIENTO A:

DIOS:

**Gracias por ayudarme a cumplir una de mis metas
y por colocarme en este camino**

MIS PADRES:

**Francisco Rojas Morales
Dolores Gutiérrez Martínez**

**Quienes con mucho cariño y sacrificio
hicieron de mí y de todos sus hijos unos profesionistas.**

**Gracias por todo su apoyo.
Todo lo que hago es por y para ustedes**

A MIS HERMANOS:

Eulalia, Alberto, Héctor, César y Sonia

Gracias por ser mis más grandes ejemplos de vida.

Los quiero mucho

A MI ALMA GEMELA:

David Alejandro Reyes Delgado

**Gracias por todo tu apoyo,
por estar conmigo incondicionalmente y
por formar parte de mi vida.**

Te amo

MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO A:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Y EN ESPECIAL A LA FACULTAD DE QUÍMICA**

**Por haberme brindado los medios necesarios para
lograr uno de mis principales objetivos
y hacer de mí una persona útil**

**DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL
PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) DE LA UNAM**
**Por la beca y recursos otorgados al proyecto PAPIIT IN 203302: Extracción de
contaminantes orgánicos en adsorbentes con matrices biológicas dispersas.**

DRA. ARACELI PEÑA ÁLVAREZ

**Gracias por todo el apoyo brindado, por compartir un poco de
su experiencia y por confiar en mí.**

M EN C CARMEN LABASTIDA RUBIO

**Gracias por la comprensión, ayuda y dedicación
que puso para la realización de
este proyecto.**

INDICE

	Página
Resumen	1
1 .Antecedentes	2
1.1 <i>El ahumado</i>	2
1.2 <i>Producción de humo</i>	2
1.3 <i>Ahumado o aplicación del humo</i>	3
1.4 <i>Composición del humo</i>	5
1.5 <i>Aspectos sanitarios y situación legal del humo</i>	7
1.6 <i>Composición y degradación térmica de la madera</i>	7
1.7 <i>Influencia de la naturaleza de la madera</i>	10
1.8 <i>Características físicas y químicas de los HAP's</i>	11
1.9 <i>Fuente, origen y formación de los HAP's</i>	14
1.10 <i>Metabolismo y toxicidad de los HAP's</i>	14
1.11 <i>Formación de los HAP's durante el proceso de ahumado</i>	16
1.12 <i>Normatividad e investigaciones en México</i>	17
2. Fundamentos Analíticos	19
2.1 <i>Cromatografía de Gases Capilar (CGC)</i>	19
2.1.1 <i>Gas portador y columna cromatográfica</i>	20
2.2 <i>Espectrometría de masas (EM)</i>	20
2.3 <i>Acoplamiento CGC/EM</i>	21
2.4 <i>Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)</i>	22
Objetivos	26
3. Parte Experimental	27
3.1 <i>Material y reactivos</i>	27
3.2 <i>Muestras</i>	27
3.3 <i>Preparación y almacenamiento de disoluciones</i>	29

3.4 Procedimiento.....	29
3.4.1 Preparación de la muestra, reactivos e instrumentos.....	30
3.4.1.1 Acondicionamiento y conservación de las muestras.....	30
3.4.1.2 Acondicionamiento y almacenamiento del adsorbente.....	31
3.4.1.3 Acondicionamiento y almacenamiento del retenedor.....	31
3.4.1.4 Condiciones cromatográficas.....	31
3.4.2 Optimización del método de extracción.....	32
3.4.3 Extracción de HAP's por DMFS.....	32
3.4.4 Identificación de HAP's.....	33
3.4.5 Cuantificación de HAP's.....	33
4. Resultados y discusión.....	35
4.1 Selección del método de extracción.....	35
4.2 Optimización del método de extracción.....	35
4.3 Identificación y confirmación de los HAP's por CGC-EM.....	37
4.4 Cuantificación.....	39
4.4.1 Curvas de calibración.....	39
4.4.2 Recobro de HAP's en adsorbente/retenedor.....	41
4.4.3 Recobro de HAP's en muestras fortificadas.....	42
4.4.4 Cuantificación de HAP's en jamón ahumado.....	44
4.5 Extracción de HAP's por Microextracción en Fase Sólida (MEFS) y Extracción Soxhlet (ES).....	47
4.5.1 Extracción de HAP's por MEFS.....	47
4.5.2 Extracción de HAP's por ES.....	49
5. Conclusiones.....	52
Anexo A.....	53
Anexo B.....	55
Anexo C.....	56
Bibliografía.....	62

Resumen

El ahumado es uno de los métodos más antiguos empleados para conservar los alimentos. Este métodos además de alargar la vida de anaquel de la carne, le proporciona un sabor, color, olor y textura que los hacen un alimento exquisito y de gran aceptación.

En México los productos ahumados se consumen frecuentemente sin embargo, como su producción es en su mayoría artesanal, la calidad no es homogénea y pueden llegar a formarse compuestos tóxicos si no se controla adecuadamente el proceso de ahumado¹.

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) son un grupo de compuestos orgánicos que se forman durante el ahumado y es bien sabido que son agentes potencialmente carcinogénicos.

Al ser los HAP's compuestos altamente peligrosos es necesario que se profundice en su estudio y en la forma de poder identificarlos y cuantificarlos en este tipo de productos, mediante procedimientos analíticos sensibles ya que la presencia de éstos origina un serio problema de seguridad alimentaría.

El objetivo de este proyecto es extraer y cuantificar la presencia de este grupo de compuestos en alimentos ahumados (jamón ahumado) mediante cromatografía de gases capilar (CGC) y Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).

Se desarrolló y optimizó un método de extracción de los HAP's en jamón ahumado el cual involucra la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) utilizando C₁₈ como adsorbente y Florisil como retenedor de grasa.

Para la identificación y cuantificación de los HAP's se utilizó Cromatografía de Gases Capilar (CGC) y Cromatografía de Gases Capilar - Espectrometría de Masas (CGC-EM).

La DMFS presenta porcentajes de Recuperación mayores al 70 %, además, permite extraer de forma eficiente y selectiva a los HAP's en estudio.

Se cuantificó al Naftaleno en una concentración de 91.976 ± 9.763 ppb obteniéndose un coeficiente de variación de 10.606 % lo que nos indica que la extracción es reproducible.

1. Antecedentes

1.1 El ahumado

El ahumado, es decir, el uso de humo de una fogata a cielo abierto, es uno de los métodos más antiguos de conservar carne. Se conoció ya en tiempos prehistóricos y ha conservado su importancia hasta la actualidad.

El ahumado es, por definición, la operación que consiste principalmente en someter un producto alimenticio a la acción de los productos gaseosos que se desprenden de la combustión de ciertos vegetales.

En sus orígenes, al ahumar un producto el objetivo era aumentar su vida media al impedir la descomposición bacteriana sin embargo, con el tiempo, se observó que los productos ahumados conferían ciertas características sensoriales agradables sobre el producto. La generación de humo, es el resultado de las diferentes reacciones incompletas que ocurren entre los constituyentes de la madera y el aire.

La composición del humo depende de la naturaleza de la madera y de las condiciones de combustión tales como el tipo de ahumador y la temperatura de calentamiento ².

1.2 Producción de humo

La producción del humo se realiza en diversos tipos de generadores y puede efectuarse según los procedimientos llamados: “en dos etapas” y por “carbonización”. Los generadores más utilizados para la generación de humo son:

- a) *Generador convencional de humo*: el humo se produce por combustión lenta de las virutas de madera, esta combustión puede efectuarse ya sea por incandescencia o por calentamiento con una resistencia eléctrica. En este método el flujo de aire es importante y la temperatura de combustión puede alcanzar los 800 °C, el valor de este parámetro puede controlarse reduciendo la cantidad de aire introducido y con la humedad de la madera.

- b) *Generador de humo por fricción*: un bloque de madera compacto de 50x100 mm se comprime contra la superficie de un rotor dentado que gira a gran velocidad. Bajo el efecto de la fricción se produce la pirolisis de la madera, la temperatura de combustión alcanza los 400 °C, este parámetro se controla ajustando la velocidad del rotor.
- c) *Generador de humo húmedo*: una mezcla gaseosa de vapor a baja presión y de aire u oxígeno se lleva a una temperatura de entre 300 – 400 °C, esta mezcla pasa a través de las virutas de madera produciendo así su pirolisis.
- d) *Generador de humo fluido*: las virutas de madera se introducen en un reactor con aire comprimido, por otro lado entra aire precalentada a 300 – 400 °C y mantiene al aserrín en suspensión bajo la forma de capa fluida. El aserrín permanece 10 segundos en el reactor y es pirolizado a una temperatura de 350 °C.
- e) *Producción de humo en 2 etapas*: en la primera etapa gas nitrógeno o carbónico calentados a 300 – 400 °C pasa a través del aserrín y produce su pirolisis; en la segunda etapa oxígeno o aire a 200 °C, se mezclan con el humo. El oxígeno caliente acelera las reacciones de oxidación, de condensación y de polimerización de los componentes del humo. Las condiciones óptimas son una temperatura de combustión de 400 °C, un flujo de nitrógeno de 1500 l/día y una temperatura de oxidación de 200 °C.
- f) *Producción de humo por carbonización*: el aserrín es introducido y comprimido en un tubo cilíndrico en donde queda aprisionado muy poco aire. Una resistencia eléctrica calienta el aserrín hasta 400 °C. En estas condiciones, la carbonización requiere muy pequeñas cantidades de aire y es más eficaz cuanto menos aire este presente ².

1.3 Ahumado a aplicación del humo.

El humo se produce en toda combustión incompleta de materia orgánica. Antiguamente en el ahumado doméstico, la carne se conservaba con el humo del hogar o chimenea. Sin embargo, hoy en día se han desarrollado procesos de ahumado controlados y más precisos. El principal objetivo de los últimos ha sido estandarizar, en lo posible, el humo. Estos procesos implican generadores de humo de combustión lenta, con ahumadores calentados eléctricamente o con gas, o con productores de humo por fricción con discos de acero giratorios, este último empleando principalmente madera de nogal americano.

En base al nivel de la temperatura del humo y de las características de este, se distinguen tres tipos de ahumado o aplicación del humo: ahumado tradicional en caliente o frío, ahumado electrostático y tratamiento por condensados de humo (humo líquido).

a) Ahumado tradicional.

Recordemos que los ahumadores se componen de dos celdas o gabinetes, en uno se produce el humo el cual pasa a la siguiente celda en donde se pondrá en contacto con el producto a ahumar. Este humo se encuentra libre de partículas de alquitrán, cenizas e impurezas ya que ha sido filtrado. En general, el ahumado puede efectuarse a diferentes temperaturas, distinguiéndose dos modos principalmente: frío y caliente.

El *ahumado en frío*, se realiza sobretodo a piezas gruesas o con una cierta integridad anatómica, productos fermentados, secos o cocidos y en pastas finas. La temperatura se mantiene entre 20 y 25 °C y no excede los 28 °C y se va regulando con la entrada de aire. La humedad generalmente es de 70 – 80 % y se controla por la entrada de vapor o por la humidificación del aserrín. La duración del tratamiento es de algunas horas o varios días en donde es muy importante controlar la velocidad de circulación del humo para evitar la formación de corteza en la superficie del producto.

El *ahumado caliente* se efectúa principalmente a productos picados cocidos. Según la temperatura en que se realiza, el producto sufre un comienzo de cocción o una cocción verdadera. El ahumado en caliente puede comenzar a los 30 -35 °C y terminar a los 50-55 °C o incluso hasta los 75 – 80 °C. En estas condiciones es indispensable introducir vapor de agua en el ahumador para evitar que los productos se sequen.

La circulación del humo debe ser rápida y en torbellino; además de que la humedad debe ser mayor al 80 %.

b) Ahumado electrostático.

El efecto de un campo eléctrico y la ionización de las partículas del humo con un electrodo y la precipitación de estas en el producto a tratar (considerado como otro electrodo) refuerza la acción del humo sobre el alimento. Este tipo de ahumado disminuye el tiempo y permite el trabajo en continuo.

c) Tratamiento con aromas de humo y condensados (humo líquido)

Esta tecnología está basada en la obtención de humo producido por un generador clásico, se distingue del proceso tradicional o de los procesos electrostáticos, en el sentido de que, por motivos principalmente higiénicos, el producto no se somete directamente a la acción del humo.

Estos condensados de humo se comercializan bajo diferentes formas:

- en estado de soluciones acuosas o hidroalcohólicas, en concentraciones del 2-10 % de extracto activo de humo recogido y purificado.
- en solución del 3-5 % en vinagre
- en polvo sobre soporte de sal, de especias o goma arábiga de 0.2-5 %

Existen varios modos de aplicación de estos condensados en donde los más practicados son: adición a la mezcla, remojo por 5 – 60 segundos, inyección y pulverización.

El humo líquido se emplea principalmente como aromatizante aunque también tiene cierta acción antimicrobiana³.

1.4 Composición del humo

El humo usado para ahumar alimentos consta de dos componentes, uno formado por partículas y otro formado por gas. El componente de partículas en suspensión, está constituido por un aerosol de gotitas líquidas, uniformemente dispersas en la fase gaseosa, más partículas grandes de cenizas, alquitrán u hollín. La fase gaseosa, contiene hidrocarburos, formaldehído y otros aldehídos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, fenoles y muchos otros constituyentes.

Los principales compuestos identificados en el humo son:

1. *Fenoles*. El papel de los compuestos fenólicos en los productos ahumados es el de impartir aroma, fungen como antioxidantes y por tal motivo mantienen por más tiempo el producto. La cantidad y naturaleza de los fenoles está relacionada con la temperatura de la pirolisis de la madera, así como la técnica utilizada. La cantidad de fenoles en el producto varía de 0.06 – 5000 ppm aunque en la mayoría de los casos la concentración se sitúa entre 10 - 200 ppm. Entre la familia de los fenoles los que se hayan en el humo y los productos cárnicos ahumados son: guayacol, siringol, cresol y vainillina.

2. *Carbonilos (aldehídos y cetonas)*. Estos compuestos ejercen un papel mayor a nivel de coloración y menos al nivel de sabor del producto. El hecho de que en el humo estén presentes no significa que sea el único medio por el que debieran estar presentes en los productos cárnicos pues también se forman debido a la oxidación de las grasas y durante la fermentación. Algunos compuestos carbonílicos encontrados en el humo son: acetofenona, 2-metil-ciclopentenona, 3-metil-ciclopenta-1,2-diona.
3. *Ácidos*. Los ácidos funcionan principalmente como bacteriostáticos, además, ejercen un papel sobre el conjunto de las cualidades de un alimento ahumado. Algunos de los ácidos presentes en el humo y en los productos ahumado son: acético, propiónico, butírico y valérico.
4. *Lactonas, ésteres, furanos y alcoholes*. Su influencia sobre los productos humados no está bien precisada, aunque, parece que influyen a nivel del sabor. En el humo encontramos a: metil butirato, acetol acetal (ésteres), butirolactona, 2-butenólido (lactonas), alcohol amílico, alil-alcohol (alcoholes).
5. *Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)*. El 3,4 benzopireno es considerado como indicador de contaminación. Las medidas preventivas para limitar el contenido de HAP's en productos ahumados son: durante la producción de humo, disminuir la temperatura de pirolisis y durante el ahumado, interponiendo un filtro entre el humo y el producto.

En la Figura 1 se muestran algunos de estos compuestos.

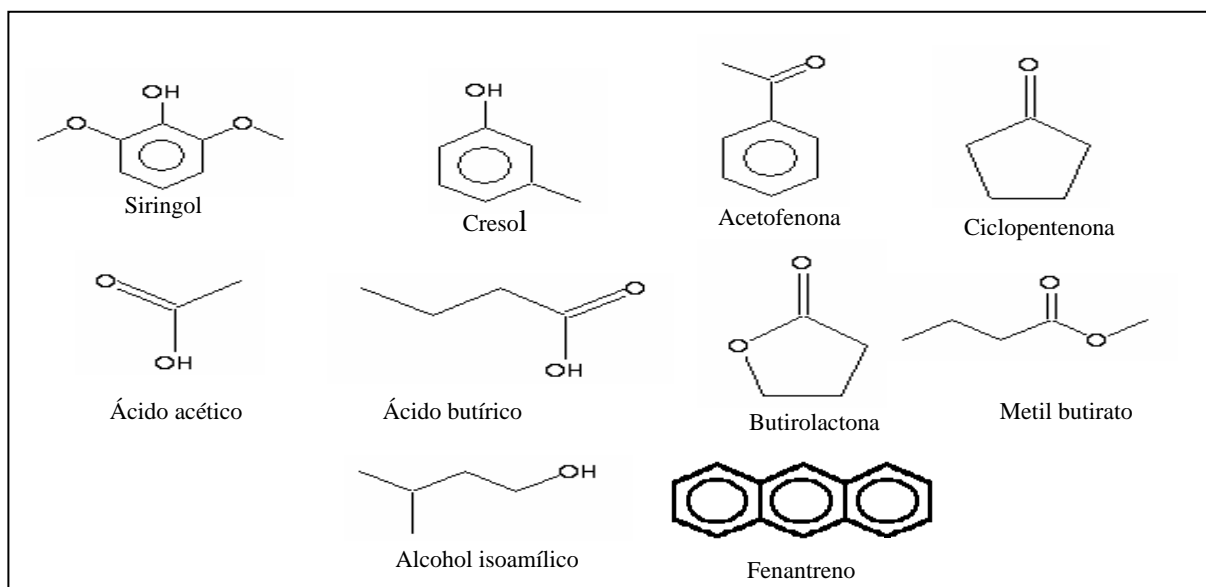


Figura 1. Estructuras de los principales constituyentes del humo

1.5 Aspectos sanitarios y situación legal del humo

El conocimiento actual de los constituyentes del humo usado para la conservación de alimentos, no está aún totalmente definido y, en consecuencia, todavía no puede hacerse una evaluación definitiva del ahumado. Dentro de los HAP's, el Benzo (a) Pireno es uno de los compuestos que se sabe es carcinogénico y generalmente se considera como la principal sustancia de importancia toxicológica presente en el humo, juntamente con otros compuestos policíclicos.

La concentración de 1.0 µg de Benzo (a) Pireno por Kg de porción comestible del producto ahumado se considera la cantidad máxima aceptable. Es posible mantener la concentración de Benzo (a) Pireno en este nivel máximo si el proceso de ahumado se realiza correctamente.

En el ahumado en frío las cantidades de Benzo (a) Pireno depositadas en la superficie del producto parecen ser más pequeñas que en el ahumado en caliente.

Las temperaturas de combustión comprendidas entre 300 y 400 °C pueden considerarse óptimas para la calidad del humo y el bajo contenido de hidrocarburos policíclicos³.

1.6 Composición y degradación térmica de la madera

La combustión completa de la madera conduce a la formación, por una parte, de agua y gas carbónico y por otra parte de un residuo mineral que son las cenizas.

La producción de humo es una reacción de combustión menos completa en la que se lleva a cabo:

- una descomposición, bajo la acción de calor de los polímeros constituyentes de la madera en moléculas orgánicas de bajo peso molecular.
- reacciones de oxidación, polimerización y condensación.

Según la temperatura, se distinguen las siguientes fases:

- a) Deshidratación hasta aproximadamente los 170 °C
- b) Pirolisis endotérmica de la hemicelulosa, hasta los 270 °C
- c) Pirolisis exotérmica de la celulosa y la lignina, hasta los 400 °C, con formación de carbón de madera

- d) Combustión del carbón de madera, formado en la fase (c), pudiendo alcanzar la temperatura de 1200 °C
- e) Condensación y formación de nuevas sustancias a partir de los compuestos resultantes de la pirolisis (fases b, c, d)
- f) Oxidación de los productos de condensación y de los formados en la pirolisis en presencia de oxígeno
- g) Nueva pirolisis a partir de los compuestos formados y repetición de las fases e y f.

Los tres componentes mayoritarios de la madera son la celulosa (40-60%), la hemicelulosa (20-30%) y la lignina (20-30%); los componentes menores son, entre otros las resinas y los componentes etéreos. En la Figura 2 se muestran las estructuras químicas de los tres constituyentes mayoritarios de la madera.

El comportamiento de la madera durante su degradación térmica (pirolisis) puede equipararse a la suma de las descomposiciones térmicas de los tres principales componentes por separado⁴.

La pirolisis de la celulosa es una reacción que se efectúa en dos tiempos, la reacción inicial es una hidrólisis ácida seguida de una deshidratación para obtener glucosa; le segunda etapa conduce a la formación de ácido acético, agua, y en ocasiones de pequeñas cantidades de furanos y fenoles los cuales se forman principalmente en la pirolisis de la hemicelulosa y la lignina.

La pirolisis de la hemicelulosa conduce a la formación de furfural, furano y sus derivados así como a toda una gama de ácidos carboxílicos.

Los compuestos obtenidos por la descomposición térmica de la lignina se consideran como determinantes pues confieren a los productos ahumados el aroma característico, estos compuestos son, fenoles y los ésteres fenólicos tales como el guayacol y el siringol.

La combustión de maderas tiernas conduce principalmente a la formación de guayacoles mientras que las maderas duras producen más siringoles.

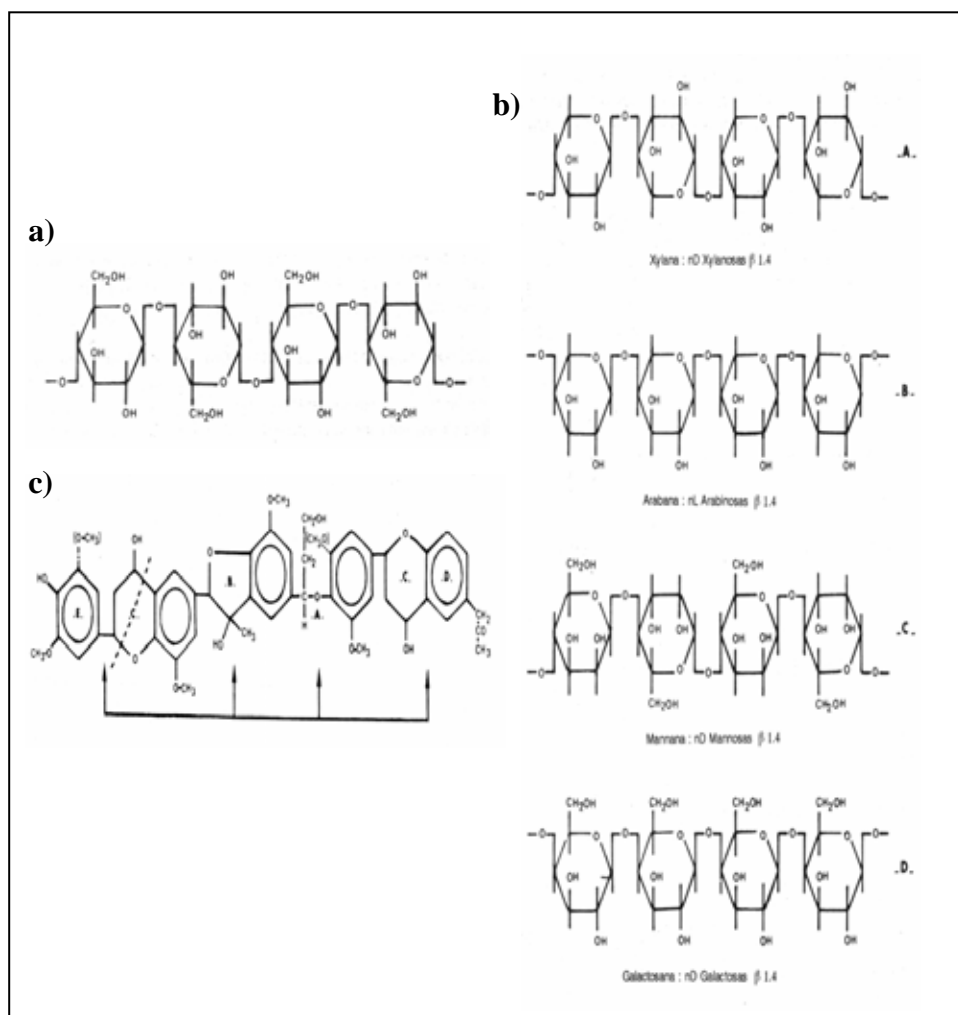


Figura 2. Constituyentes de la madera
 a) Celulosa, b) Hemicelulosa, c) Lignina

Las sustancias volátiles pueden descomponerse durante la pirólisis en radicales metilenos e hidrógenos. La dimerización de los radicales metilenos en etileno seguido de polimerización, ciclación y deshidrogenación, conducen a la formación de 3,4 benzo pireno (Figura 3).

La presencia de otros HAP's puede explicarse por la hipótesis de que a partir del Naftaleno y ciclaciones sucesivas se da lugar a la adición de otro anillo aromático y surgen así el resto de los HAP's². El mecanismo se ilustra en la Figura 4.

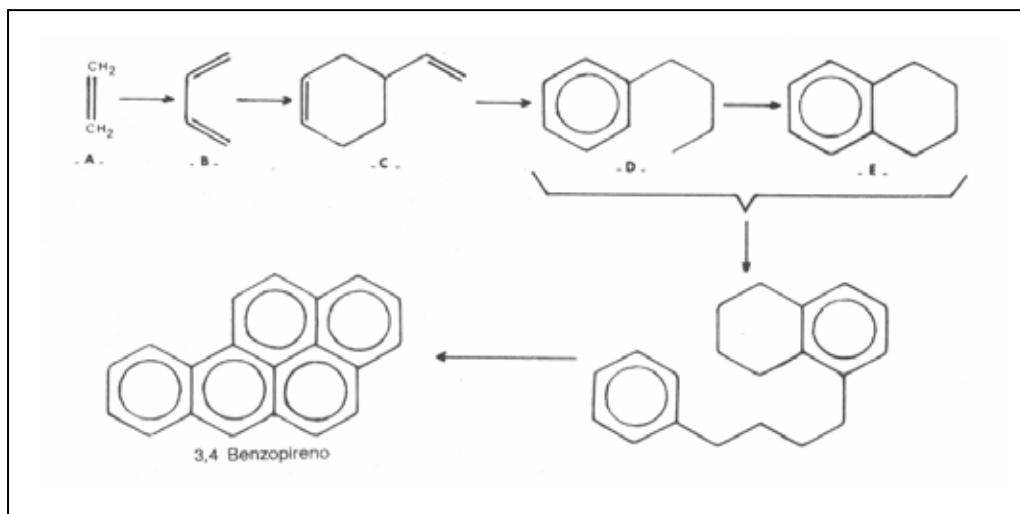


Figura 3. Mecanismo de formación de 3,4 benzopireno

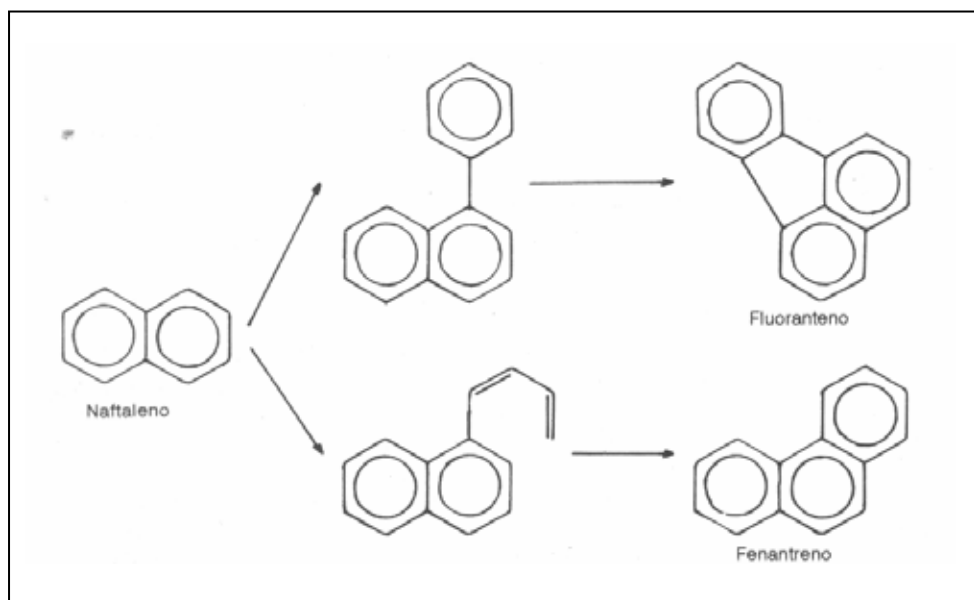


Figura 4. Formación de HAP's a partir de Naftaleno

1.7 Influencia de la naturaleza de la madera

La naturaleza de la madera pirolizada condiciona la composición del humo y por consiguiente sus propiedades. Las maderas duras como el roble, haya, nogal, caoba, fresno, son las más utilizadas ya que producen un aroma superior al obtenido con maderas tiernas. Además, al ser maderas no resinosas disminuye la probabilidad de formación de compuestos carcinogénicos.

Diversos estudios indican que la composición del humo obtenido por la pirolisis de maderas duras son más ricos en compuestos aromáticos totales y en compuestos ácidos, que los obtenidos por la combustión de maderas blandas.

Por otro lado, maderas blandas como el álamo, abedul, sauce y pino son poco utilizadas pues proporcionan un aroma menos intenso, además, son maderas resinosas que representan un riesgo para la salud del consumidor ya que su alto contenido de compuestos resinosos da lugar a la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's).

El grado de humedad también induce variaciones en la composición del humo, una alta humedad produce un humo con escasa cantidad de fenoles y con gran cantidad de ácidos y de compuestos carbonílicos, por consecuencia el producto ahumado será más ácido².

1.8 Características físicas y químicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son compuestos orgánicos formados al menos por dos anillos fusionados de benceno, los cuales difieren en el número y posición del anillo. Representan un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes que se forman durante la combustión incompleta de carbón, petróleo y gasolina, basuras y otras sustancias orgánicas como tabaco y carne preparada en la parrilla.

El Naftaleno es el más sencillo de los HAP's y los compuestos aromáticos de interés tienen hasta 5 y 6 anillos. Los HAP's individuales difieren sustancialmente en sus propiedades físicas y químicas y para reflejar este intervalo se seleccionaron los 16 HAP's, considerados por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), Organización Mundial de la Salud (OMS) y Comunidad Económica Europea (CEE), como contaminantes prioritarios debido a sus efectos carcinogénicos.

En la Figura 5 se presentan la estructura de los 16 HAP's y en la Tabla 1 sus características físicas y químicas que permiten predecir su comportamiento en el ambiente.

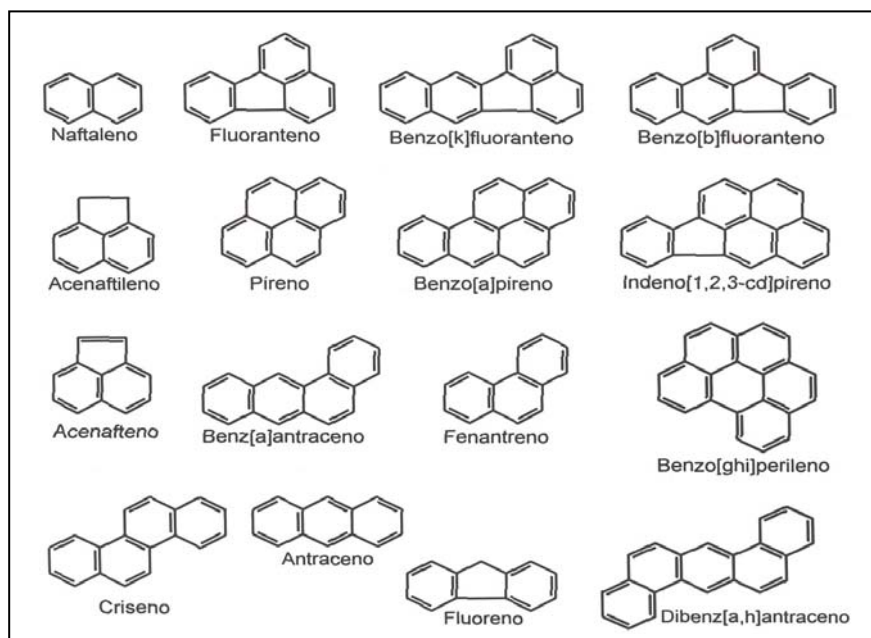


Figura 5. Estructura de los 16 HAP's considerados como prioritarios por la EPA

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los HAP's

Nombre (abreviaturas, en inglés)	Fórmula	P.M. (g/mol)	P.F. (°C)	P.E. (°C)	V ^M (cm ³ /mol)	F a 25°C	p ^s	S (g/mol)
Naftaleno (NA)	C ₁₀ H ₈	128.19	80.5	218	148	0.2830	10.4	31
Acenaftileno (Ay)	C ₁₂ H ₈	152.20	95.0	270	---	----	0.89	---
Acenafteno (AE)	C ₁₂ H ₁₀	154.21	96.2	277	173	0.1980	0.30	3.8
Fluoreno (F)	C ₁₃ H ₁₀	166.20	116	295	188	0.1260	0.09	1.9
Fenantreno (PA)	C ₁₄ H ₁₀	178.20	101	339	199	0.1770	0.02	1.1
Antraceno (A)	C ₁₄ H ₁₀	178.20	216	340	197	0.0129	0.001	0.045
Pireno (P)	C ₁₆ H ₁₀	202.26	156	360	214	0.0506	0.0006	0.132
Fluoranteno (FI)	C ₁₆ H ₁₀	202.26	111	375	217	0.1410	1.2 x 10 ⁻³	0.26
Criseno (CH)	C ₁₈ H ₁₂	228.30	255	448	179	0.0053	5.3 x 10 ⁻⁷	---
Benzo(a)antraceno (BaA)	C ₁₈ H ₁₂	228.30	160	435	248	0.0462	2.8 x 10 ⁻⁵	0.0482
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	168	481	268	0.0385	---	0.0015
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	217	481	268	0.0126	5.2 x 10 ⁻⁸	0.0008
Benzo(a)pireno (BaP)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	175	495	263	0.0328	7 x 10 ⁻⁷	0.0038
Benzo(ghi)perileno (BP)	C ₂₂ H ₁₂	276.34	277	525	277	0.0032	---	2.6 x 10 ⁻⁴
Dibenz(a,h)antraceno (DA)	C ₂₂ H ₁₄	278.36	270	524	300	0.0040 (a 267°C)	3.7 x 10 ⁻¹⁰	0.0006
Indeno(1,2,3-cd)pireno (IP)	C ₂₂ H ₁₂	276.00	164	---	---	---	1.3 x 10 ⁻⁸	5.3 x 10 ⁻⁴

P.M: Peso Molecular, P.F: Punto de Fusión, P.E: Punto de Ebullición, VM: Volumen Molar
F: Proporción de Fugacidad, PS: Presión de Vapor, S: Solubilidad

A temperatura ambiente los HAP's se encuentran normalmente en estado sólido. Las características comunes de estas sustancias son puntos de fusión y ebullición elevados, presión de vapor baja y solubilidad en agua muy baja, la cual decrece al aumentar el peso molecular y tamaño de la molécula. Son solubles en disolventes orgánicos y por tanto, lipofílicos.

Como regla general, la persistencia del compuesto incrementa al aumentar el tamaño de la molécula. Por ejemplo, la relativa baja persistencia del Naftaleno y otros compuestos de bajo peso molecular indican su escasa capacidad de bioacumulación mientras que los compuestos de mayor peso molecular, como el Benzo (a) Pireno, son altamente persistentes y por tanto bioacumulables.

Desde el punto de vista químico son inertes, las reacciones que pueden sufrir e inducir así a pérdidas de HAP's son la fotodescomposición y las reacciones con óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ozono y radicales hidroxilo.

La principal vía de degradación de estos compuestos incluye procesos químicos, fotolíticos o metabólicos asociados a microorganismos. En algunos casos se dan conjuntamente más de una, dependiendo de condicionantes como la temperatura, el oxígeno y microorganismos disponibles. Entre los procesos químicos se incluyen los tratamientos de cloración y ozonización del agua, entre los fotolíticos la acción conjunta de oxígeno y luz solar. La actividad de los microorganismos se desarrolla normalmente a través de un co-metabolismo de los HAP's con materia orgánica nutriente⁵.

Al ser considerados compuestos orgánicos persistentes (COP), pueden permanecer en el ambiente durante largos periodos de tiempo sin ser alterados ni modificadas sus propiedades tóxicas.

Los HAP's se han clasificado en dos grandes grupos, el primer grupo se encuentra constituido por los HAP's de bajo peso molecular, formados por dos a tres anillos aromáticos, entre los que se destacan el Naftaleno y el Fluoreno. En el segundo grupo destacan aquellos compuestos formados por cuatro a siete anillos aromáticos a los cuales se les denomina HAP's de alto peso molecular, destacando por su nivel de toxicidad el Dibenzo (a,h) Antraceno y el Benzo (a) Antraceno. Con base en ello, se ha observado una relación estrecha entre el tamaño del compuesto y su solubilidad, ya que a mayor peso

molecular disminuye su solubilidad en agua. Sin embargo, aumenta la toxicidad, el carácter lipofílico y la persistencia en el medio ^{6,7}.

1.9 Fuente, origen y formación de los HAP's

La fuente más importante de HAP's es la combustión incompleta de cualquier material orgánico que contenga carbono e hidrógeno. Esto puede ocurrir naturalmente por incendios forestales, actividad volcánica y procesos diagénicos pero se reconoce que la mayoría de los HAP's detectados en matrices ambientales provienen de fuentes antropogénicas debidas a la quema de madera y combustibles fósiles. El mecanismo exacto de la formación de los HAP's no se ha establecido con certeza. Sin embargo, se ha postulado su formación a partir de una reacción de radicales libres y de la adición intermolecular o polimerización de pequeñas moléculas.

Por otra parte se ha comprobado su formación cuando se expone la materia orgánica a temperaturas elevadas de combustión, mediante un proceso de pirolisis y de condensación de los reactivos.

De esta manera, la formación de los HAP's puede ser atribuida a la combustión incompleta de madera, material orgánico y combustibles fósiles. Diversas investigaciones a nivel mundial revelan la presencia de estos compuestos en aire, suelo, alimentos y cosméticos.

Los HAP's son sustancias ampliamente distribuidas en el ambiente, siendo su origen muy diverso, ya que es posible encontrarlos en el agua, en el aire, en el humo de cigarros, formando parte de los componentes de la gasolina, en los gases de escape de los automóviles, en la superficie del suelo y en los productos asados, ahumados y rostizados ⁵.

1.10 Metabolismo y toxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los HAP's son altamente liposolubles y por lo tanto rápidamente absorbidos en el tracto intestinal de los mamíferos y otros organismos. Están distribuidos en una amplia variedad de tejidos con una marcada tendencia para localizarse en tejidos adiposos. Los HAP's por sí mismos son compuestos relativamente no reactivos con respecto a macromoléculas biológicas en condiciones fisiológicas. Sin embargo, requieren activación metabólica para manifestar genotoxicidad, incluyendo mutagenicidad y carcinogenicidad. Una vez que han

entrado al cuerpo, el sistema de defensa celular trabaja para “remover” estas sustancias extrañas mediante el metabolismo.

El metabolismo de los HAP's en los mamíferos se da principalmente en el hígado y es catalizado por el sistema enzimático del citocromo P₄₅₀, aunque otras enzimas metabólicas también están incluidas. Iniciado el metabolismo, los HAP's se convierten en moléculas más polares y solubles en agua para ser excretados fuera del organismo, hasta completar su remoción o el proceso de detoxificación biológica (Figura 6). Sin embargo, el metabolismo de algunos HAP's también genera intermediarios reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes (aductos) con ácidos nucleicos, resultando de esta manera genotóxicos⁸. El metabolismo de los HAP's es complejo. En general, los compuestos lipofílicos originales se convierten mediante epóxidos intermedios en fenoles, dioles y tetroles que si son solubles en agua, éstos a su vez pueden conjugarse con el ácido sulfúrico y el glucurónico o con el glutatión. El mecanismo es el siguiente:

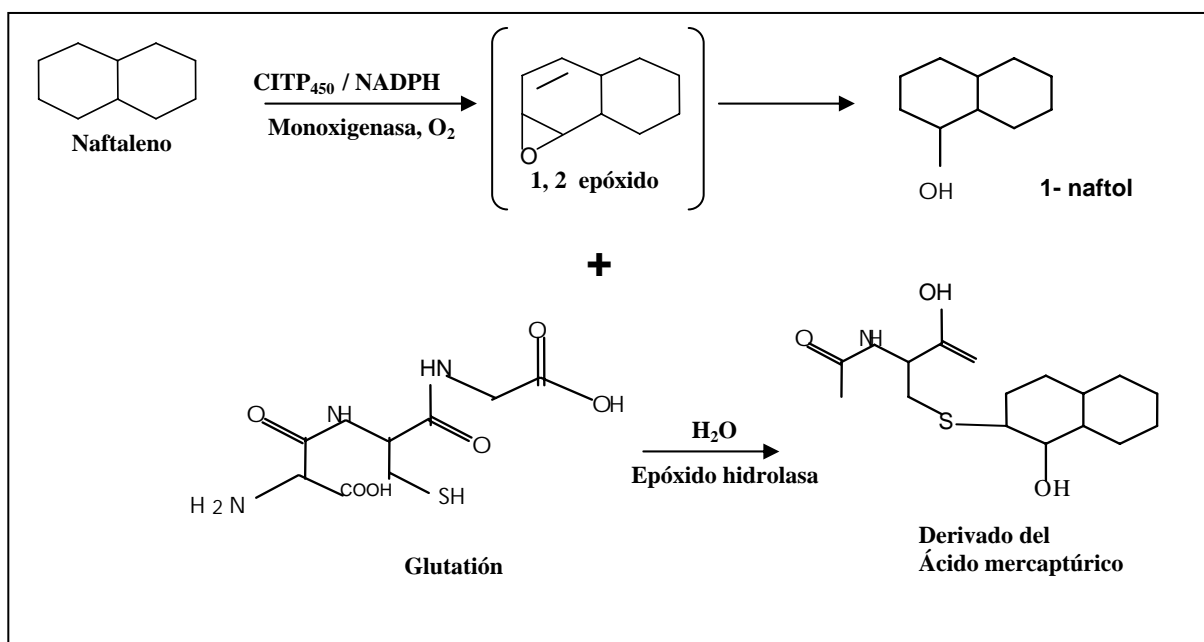


Figura 6. Metabolismo de los HAP's

Este metabolismo produce en su mayor parte una desintoxicación, pero algunos HAP's se activan a especies (principalmente diolepóxidos) que se unen al ADN y también a la hemoglobina, produciendo así mutaciones que finalmente evitan que las células se reproduzcan normalmente y como consecuencia la capacidad de generar tumores.

Los metabolitos y sus conjugados como el derivado del ácido mercaptúrico se excretan en la orina y las heces, pero los no conjugados que se excretan en la bilis pueden hidrolizarse por la acción de las enzimas de la flora intestinal y reabsorberse ⁸.

Debido a su alta toxicidad, en países como Alemania, Italia y Suiza se ha establecido una concentración máxima de 1.0 ug/Kg de Benzo (a) Pireno en alimentos ahumados, mientras que en EUA el límite para este compuesto es de 0.03 µg/Kg. Por otra parte, México no cuenta con ninguna reglamentación que establezca los límites permisibles de HAP's en productos ahumados, siendo un país en el cual el consumo de productos ahumados no resulta tan limitado ⁷.

1.11 Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos durante el proceso de ahumado

Se originan cuando la temperatura de combustión de la madera asciende hasta los 400°C, a partir del Naftaleno (Figura 7), que es un componente del humo que consta de dos anillos aromáticos, al que se le puede adicionar fácilmente otro anillo aromático ⁴.

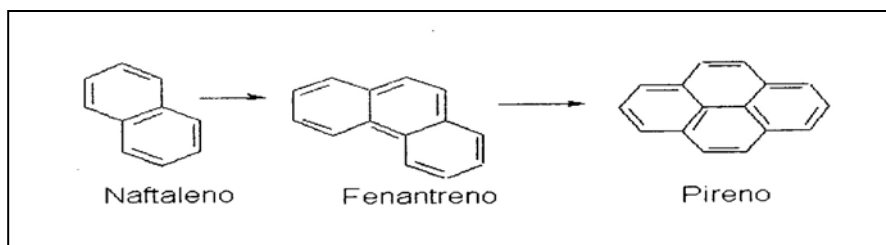


Figura 7. Formación de HAP's a partir del Naftaleno

En el caso de los alimentos que se encuentran en contacto directo con la parrilla, se forman a partir de las grasas por un exceso de calor y de la proximidad de la fuente calórica debido a la formación de radicales libres ⁹.

Se debe considerar que la concentración de HAP's en los alimentos ahumados es poco constante y la razón principal para esa variación esta asociada a los diversos procedimientos utilizados para ahumar como son: el tipo y la composición de la madera, tipo de generador de humo, tiempo de ahumado, etc.

1.12 Normatividad e investigaciones en México

La única norma en la que se especifican límites máximos permisibles para HAP's individuales es la *NOM-138-semarnat-2003* que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y especificaciones para su caracterización y restauración y es muy específica para hidrocarburos del petróleo que provienen de derrames y/o fugas tanto recientes, como pasivos ambientales ¹⁰.

Muchas de las investigaciones que se han realizado en México han sido para cuantificar el grado de contaminación en diferentes matrices, en la Tabla 2 se enlistan algunas de ellas, indicando la matriz en la que fueron medidos los HAP's y su localización.

Puede apreciarse que en la mayoría de los trabajos no se analizan compuestos individuales sino la suma de HAP's, que normalmente se refiere a los 16 HAP's definidos por la EPA. Para fines de comparación sería muy importante que el método de extracción y cuantificación fuera el mismo. Mucho de lo que se ha hecho en suelos y sedimentos esta relacionado con actividades petroleras, prácticamente no existen datos de concentración de HAP's en diferentes fuentes de emisión y su destino en el ambiente ¹⁰.

Tabla 2. Concentraciones de HAP's en diferentes matrices

HAP's	Concentración	Matriz	Localización	Método de análisis	Referencia
Σ HAP's	60 – 910 ngm ⁻³	Partículas en aerosoles	Cd. de México	EcoChemPA S 2000	Marr y col. 2004
Σ HAP's	4.85 – 9.40 ngm ⁻³ abril – nov 1997	Aire	Cd. De México	Sonicación/ CG/MS	Calderón-Segura y col. 2004
Σ HAP's	6.91 – 53.91 μ gg ⁻¹ 2.57 – 10.97 μ gg ⁻¹	Suelo arcilloso Suelo arenoso	Samaria, Tabasco	Soxhlet/CG-FID	Gutiérrez y Zavala 2002
Cry Nap BaP Acy	4.21 μ gg ⁻¹ 3.82 μ gg ⁻¹ 3.60 μ gg ⁻¹ 3.11 μ gg ⁻¹	Suelo	Morelia, Michoacán	Extracción/ CG-FID	Iturbe y col. 2003
Σ HAP's	92 – 280 mgKg ⁻¹ 252 – 478 mgKg ⁻¹ 0.03 – 20 mgKg ⁻¹	Suelo con: - derrames antiguos - derrames recientes - nivel de fondo	Planicie aluvial en Tabasco	Soxhlet/CG-FID	Cram y col. 2004
Σ HAP's 2-3 anillos 4-5 anillos	0.67 – 8.9 μ gg ⁻¹ 0.09 – 0.56 μ gg ⁻¹ 0.34 – 8.34 μ gg ⁻¹	Sedimentos marinos	Chetumal, Quintana Roo	Soxhlet/CG-FID	Noreña-Barroso y col. 1998
Σ HAP's	7.6 – 813 ngg ⁻¹	Sedimentos marinos	Bahía Todos Santos, Baja C.	Sonicación/ CG-MS-SIM	Macías- Zamora, y col. 2002
Σ HAP's	1.1 – 11.6 μ gg ⁻¹ 0.6 – 12.4 μ gg ⁻¹ 3.8 – 11.3 μ gg ⁻¹ 2.2 – 18.2 μ gg ⁻¹	Sedimentos en Lagunas de Veracruz	Salada El llano La Mancha Mandinga	Soxhlet/CG-FID	Botello y col. 2001
Σ HAP's Pyr Cry Phe	102 μ gg ⁻¹ (R) 563 μ gg ⁻¹ (I) 19.3 μ gg ⁻¹ (R) 118 μ gg ⁻¹ (I) 18.3 μ gg ⁻¹ (R) 84.8 μ gg ⁻¹ (I)	Hojas de pino	Cd. de México en zonas residenciales (R) e industriales (I)	Extracción en columnas abiertas/ CG-MS	Hwang y col. 2003
Σ HAP's	0.01 – 0.24 μ gg ⁻¹	Bivalvos <i>Crassostrea virginica</i>	Tabasco	Soxhlet/CG-FID	Gold-Bouchot y col. 1997
Σ HAP's	77.06 – 762.24 μ gg ⁻¹	Peces	Chetumal,	Soxhlet/CG-FID	Noreña-Barroso y col. 2004
Σ HAP's	22.86 μ gg ⁻¹ 18.16 μ gg ⁻¹ 13.19 μ gg ⁻¹ 10.24 μ gg ⁻¹	Bivalvos <i>Crassostrea palmula</i> <i>Myrytella strigata</i> <i>Crassostrea coteziensis</i> <i>Crassostrea iridescens</i>	Pacífico Subtropical Mexicano	Soxhlet/CG-FID	Botello y col. 2002
Σ HAP's	0.22 – 2.8 μ gL ⁻¹	Agua	Laguna de Mecoacán, Tabasco	Agitación/CG-FID	Díaz-González y col. 1994
Σ HAP's	448 – 2000 mg kg ⁻¹	Petróleo	Tabasco	Soxhlet/CG-FID	Cram y col. 2004

2. Fundamentos analíticos

2.1 Cromatografía de Gases (CG)

Esta técnica permite separar mezclas de compuestos volatilizándolos al inicio de la columna cromatográfica. La elusión se produce por el flujo de un gas inerte de gran pureza (fase móvil), que circula de manera continua a lo largo de la columna durante la corrida. En la fase estacionaria de la columna se lleva a cabo la retención selectiva de los componentes de la mezcla a separar debido a fenómenos de adsorción y desorción, por lo cual, los componentes viajan a través de la columna con diferentes velocidades, dependiendo éstas del peso y de la afinidad que presenten hacia el adsorbente. Los componentes separados se detectan a la salida del sistema por medio de un detector. La señal se integra y se envía a un sistema de captura y análisis de datos ¹¹.

Las principales ventajas de la cromatografía de gases son: resolución, selectividad, sensibilidad, sencillez, velocidad y resultados cuantitativos confiables. Su principal desventajas es que únicamente se pueden manejar muestras volátiles; de lo contrario, no pasa a través de la columna.

En la Figura 8 se muestra esquemáticamente un sistema cromatográfico.

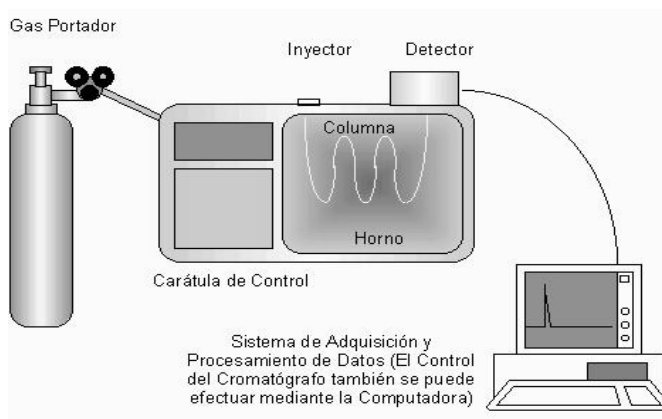


Figura 8. Sistema cromatográfico

2.1.1 Gas portador y columna cromatográfica

La elección de la fase móvil en cromatografía de gases influye en el funcionamiento de la columna y el detector. El Helio, Nitrógeno e Hidrógeno son los gases más utilizados. Los flujos de los gases se controlan generalmente mediante un regulador de presión de dos niveles, colocados en el cilindro del gas como primera etapa y por reguladores de flujo instalados en el cromatógrafo como etapa final. El intervalo de presiones de entrada oscila entre 4.68-23.44 KPa (10-50 Psi), lo que produce flujos de 0.5-2.0 mL/min en columnas capilares.

El propósito de la columna cromatográfica es efectuar la separación de los analitos. Para ellos se emplean diferentes tipos de columnas capilares y empacadas. Las primeras, generalmente presentan una longitud de 15-30 metros, una mayor resistencia física, una reactividad menor frente a los componentes de la mezcla y una alta flexibilidad. Las columnas empacadas pueden ser de acero inoxidable o vidrio con un diámetro de 3-6 mm y una longitud de 1-5 metros.

La temperatura óptima de la columna es una variable importante para la separación de los componentes de la muestra, así como la fase y las dimensiones de la columna. Para muestras con amplios intervalos de puntos de ebullición o diferentes polaridades, resulta de gran utilidad poder modificar la temperatura de la columna durante la separación, lo cual se conoce como temperatura programada. En general, al incrementarse la temperatura, se reduce el tiempo de retención y como consecuencia la resolución ¹¹.

2.2 Espectrometría de masas (EM)

El nombre de espectrometría de masas abarca diversas formas que se emplean para medir las masas de los iones y su abundancia en fase gaseosa. Este proceso consta de 3 pasos:

1. generación de moléculas, fragmentos y átomos en fase gaseosa.
2. Ionización de las mismas
3. Separación según su relación masa/carga

La espectrometría de masas constituye una de las herramientas más versátiles y poderosas del análisis químico. Desde su comienzo, la EM se ha empleado de manera eficaz para analizar pequeñas moléculas y átomos. Recientemente se han expandido sus aplicaciones para incluir el análisis de casi todo tipo de muestras, gracias a la variedad de fuentes diseñadas para vaporizar e ionizar las moléculas ó átomos que inicialmente no son gases.

El fundamento consiste en introducir la muestra en forma de gas, líquido o sólido para ser inmediatamente vaporizadas mediante diferentes técnicas. Las moléculas gaseosas obtenidas se ionizan en el espacio entre las dos placas cargadas. Los iones son acelerados por un campo eléctrico y se enfocan mediante campos eléctricos, rendijas, o ambas cosas. El poder de aceleración se encentra en el orden de Kilovolts. La fuente es la región donde las moléculas se introducen, se transforman a vapor, se ionizan y se aceleran. Los iones acelerados pasan de la fuente a alguno de los diversos tipos de analizadores de masas. En la mayoría de los analizadores de masas, los iones se separan en el espacio debido a su relación masa/carga y chocan con el transductor en distintos momentos.

Esta pequeña corriente de iones es amplificada por el transductor y el equipo electrónico asociado para producir la señal de salida. Al graficar la corriente iónica de salida contra el tiempo como m/z , se obtiene un espectro de masas.

El espectro de masas nos da indicios de la masa del compuesto y su patrón de fragmentación, así como su abundancia. Estas evidencias permiten elucidar la estructura de los analitos presentes ¹¹.

2.3 Acoplamiento CG-EM

Una de las principales ventajas de la espectrometría de masas es que permite identificar especies moleculares y atómicas a partir de los datos del espectro de masas. Sin embargo, una de las principales dificultades consiste en establecer cuáles son las distintas especies que puedan estar presentes en una mezcla de compuestos que se introducen en la fuente.

La ventaja de los métodos cromatográficos consiste en permitir separar los materiales en sus componentes moleculares. Sin embargo, una de las principales limitaciones es que con

frecuencia no se identifican los componentes que se eluyen. Por las ventajas y limitaciones complementarias de la espectrometría de masas y la cromatografía, probablemente en la actualidad una de las herramientas de análisis más poderosas es la aplicación del espectrómetro de masas como detector para identificar los componentes de mezclas desconocidas separados por cromatografía ¹².

2.4 Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

La dispersión de matriz en fase sólida es una técnica analítica que permite manejar directamente muestras sólidas, semisólidas y viscosas. Provee un mecanismo que rompe y dispersa simultáneamente la muestra sobre un adsorbente que puede utilizarse posteriormente como material de empaque de una columna, generando así una fase con características cromatográficas únicas.

La aplicación de la DMFS, ha mostrado ser capaz de resolver problemas analíticos difíciles, y presenta numerosas ventajas respecto a los métodos convencionales de extracción. Reduce significativamente el tiempo de análisis, reduce el gasto de solventes y por lo tanto el volumen de residuos. Además de que permite la extracción selectiva de los analitos y provee resultados comparables a los obtenidos por métodos clásicos u oficiales.

En 1989 se introdujo un nuevo proceso para la extracción de muestras sólidas, la dispersión de matriz en fase sólida. Este proceso combina varias técnicas que permiten romper la estructura del tejido, y al mismo tiempo generar un material que posee características cromatográficas únicas para la extracción de los compuestos de interés de una muestra dada.

La DMFS involucra la molienda de la muestra, ya sea sólida, semisólida o viscosa, con un soporte sólido como el C₁₈, que es sílica derivatizada con octadecilsilicio. Este tipo de material es el mismo que se utiliza para empacar las columnas de extracción en fase sólida. La única diferencia es que en la DMFS dicho adsorbente es utilizado de una forma diferente.

El soporte sólido tiene el propósito de servir como abrasivo al molerlo junto con la muestra en un mortero con la ayuda de un pistilo, las fuerzas mecánica y de cizalla, permiten romper la estructura del tejido, dividiendo el material en pequeñas piezas.

El proceso adquiere mayores dimensiones, al emplear un soporte sólido con una fase orgánica unida, ya que los componentes de la muestra son dispersados sobre las partículas.

Pero al mismo tiempo se lleva a cabo la interacción de la muestra con la fase orgánica que recubre dichas partículas. Los componentes de la muestra se distribuyen sobre la superficie en base a su polaridad relativa: los componentes no-polares se dispersan en la fase orgánica no-polar; las moléculas pequeñas, muy polares (agua) se asocian con los silanoles presentes en la superficie y el interior de los poros del soporte de sílica y con los componentes de la matriz capaces de formar puentes de hidrógeno y las moléculas menos polares se distribuyen en la superficie de la estructura bifásica que se forma con los lípidos del tejido dispersados en la fase unida ¹³.

2.5 Factores que afecta el análisis por DMFS

La DMFS junto con la Extracción en Fase Sólida (EFS) son una forma de cromatografía y en general se aplican los mismos principios. La DMFS posee características que la diferencian de la EFS y la hacen más compleja, en comparación con un proceso cromatográfico estándar. La DMFS se diseñó principalmente para romper y dispersar los componentes de una muestra sólida, con un soporte sólido unido a una fase orgánica que puede ser utilizado posteriormente como material de empaque de una columna de EFS, de la que pueden eluirse los componentes de interés. De esta forma, la muestra dispersada pasa a formar parte de la columna y en sentido estricto es parte del sistema cromatográfico.

Las interacciones dinámicas involucradas no se comprenden del todo. Sin embargo se conocen varios factores que han mostrado afectan la eficiencia del proceso, entre ellos:

- a) La naturaleza del soporte sólido.

Hasta la fecha, todos los artículos publicados que involucran la DMFS, utilizan soportes a base de sílica. Un aspecto positivo de usar soportes a base de sílica es la presencia de grupos silanoles sin derivatizar, los cuales tienen un papel importante, ya que son capaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua y, permiten obtener una muestra seca que de otra forma no sería posible obtener.

- b) Tamaño de partícula

Se han utilizado partículas de 40 μm de diámetro, también se han utilizado materiales que contienen mezclas de partículas entre 40-100 μm que presentan buenos resultados y presentan

la ventaja de ser más económicos. Partículas de menor tamaño no se recomiendan porque se generan flujos lentos.

c) La naturaleza de la fase unida

La mayoría de las aplicaciones de la DMFS utilizan materiales de fase-reversa, como el C₁₈ y C₈. Existen algunas dudas, acerca de que la presencia y la naturaleza de la fase unida jueguen un papel importante en la DMFS. Se cree que una fase-unida lipofílica, es esencial para romper y dispersar la muestra. También se cree que la fase lipofílica permite la formación de una nueva fase o bi-capa que se semeja a una membrana celular.

Dos puntos que han demostrado ser esenciales para la EFS y la DMFS son: pre-lavar los soportes-sólidos para eliminar posibles interferencias y pre-acondicionarlos con un solvente.

d) La naturaleza de la muestra

Debido a que la matriz pasa a formar parte de la fase cromatográfica, es de esperarse que habrá variaciones en los resultados y recobros de los analitos al cambiar de una matriz a otra.

Mientras que la fase-unida esta inmóvil sobre el soporte sólido, los componentes de la matriz dispersa no lo están. Por esta razón, ciertos componentes de la matriz se eluyen por clases de compuestos o fracciones, dependiendo del solvente que se emplea para eluir y las interacciones dinámicas entre los componentes de la matriz dispersa y la fase sólida. De esta forma los analitos tienden a eluir en fracciones que no son del todo predecibles por su distribución relativa en la fase sólida o el solvente de elución. Esto se explica por el hecho de que analitos de ciertas clases químicas co-eluyen con los componentes de la matriz, en las mismas fracciones. En muchos casos las interferencias pueden ser removidas utilizando un cartucho de EFS posterior a la DMFS.

Las interacciones de la matriz con la fase sólida y la fase móvil afectan de forma importante el orden de elución de los compuestos de la columna de DMFS.

e) Modificaciones de matriz

Así como para las columnas de EFS en ocasiones es necesario alterar las muestras para modificar el estado de ionización de los componentes de la muestra y asegurar que ciertas interacciones entre la fase unida al soporte sólido y/o el solvente de elución ocurran. En la DMFS pueden adicionarse ácidos, bases, sales, agentes quelantes o antioxidantes antes de moler la muestra y/o aditivos en el solvente de elución para aumentar la eficiencia del proceso.

f) La naturaleza del solvente de elución y la secuencia de adición

Así como la polaridad relativa del solvente de elución y la naturaleza de la fase unida al soporte sólido juegan un papel importante en la EFS que determina lo que permanece en la columna y lo que se eluye, en la DMFS también se tienen que considerar la retención y la elución de los componentes de la matriz. Como se ha mencionado, muchos de los analitos de interés eluyen con los componentes de la matriz, no obstante, la secuencia y el diseño del perfil de elución puede ayudar a retener los componentes de la muestra en la columna y recuperar los analitos de interés, con alto grado de especificidad. Esto no siempre se logra y es entonces cuando el uso de co-columnas y otras técnicas de limpieza pueden ser utilizadas ¹³.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) seguida de Cromatografía de Gases Capilar (CGC) como un método alternativo para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en matrices biológicas.

Objetivos particulares:

- Determinar las condiciones óptimas para la extracción de HAP's en jamón ahumado utilizando Dispersión de Matriz en Fase Sólida.
- Identificar y cuantificar la presencia de los principales HAP's en jamón ahumado por Cromatografía de Gases Capilar (CGC).

3. Parte experimental

3.1 Materiales y reactivos

- ✓ Jeringa de vidrio de 5mL (B-D YALE, Brasil)
- ✓ Jeringas cromatográficas de 10, 50, 100 y 500 μ L (Hamilton, USA)
- ✓ Frits ½ pulgada (Varian, USA)
- ✓ Discos de papel filtro de ½ pulgada (Whatman)
- ✓ Viales con tapa de rosca con capacidad de 4.0, 10.0 y 20.0 mL.(Supelco, USA)
- ✓ Mortero y Pistilo de Ágata (Supelco, USA)
- ✓ Estándares
 - Naftaleno (99.6 % pureza, Chem Service)
 - Acenafteno (98 % pureza, Chem Service)
 - Fenantreno (99 % pureza, Chem Service)
 - Antraceno (98 % pureza, Merck)
 - Fluoranteno (98 % pureza, Chem Service)
 - Criseno (98 % pureza, Aldrich)
 - Benzo (a) Pireno (98 % pureza, Aldrich)
- ✓ Octadecil silano (Chromabond Sorbenz C₁₈ PAH, Macherey-Nagel)
- ✓ Florisil (Septra FL – PR, 165 μ m, Phenomenex, USA)
- ✓ Florisil (60 – 100 Mesh, Baker, USA)
- ✓ Isoctano R.A (Merck, USA)
- ✓ Hexano R.A (Aldrich, USA)
- ✓ Diclorometano R.A (Merck, USA)
- ✓ Tolueno R.A (Merck, USA)
- ✓ Metanol R.A (Merck, USA)

3.2 Muestras

Para el desarrollo y optimización de esta metodología fue necesario elegir una matriz con bajo contenido de grasa que permitiera una adecuada extracción de los compuestos en estudio y que no presentará interferencias durante el análisis cromatográfico.

En este caso la principal interferencia son los lípidos contenidos en las matrices biológicas como tejidos animales y alimentos.

Para desarrollar la metodología y optimizar el método por DMFS se utilizó jamón de pierna cocido sin ahumar “*San Rafael*” con un contenido graso, reportado en el cuadro nutrimental del empaque, de 3.0 %.

Las muestras que se analizaron por el método de DMFS fueron:

1. Jamón de pierna ahumado de la marca “*Tangamanga*” con bajo contenido de grasa (3.0 %).
2. Jamón cocido “*San Rafael*” (con 3.0 % de grasa) el cual procedimos a ahumar bajo las siguientes condiciones: se pesaron 100.0 g de jamón cocido y se colocaron en una charola con pequeños orificios para permitir el paso del humo proveniente de la pirolisis de la madera. Para realizar el ahumado se utilizó virutas de caoba que se calentaron con una parrilla eléctrica hasta su combustión. Una vez generado el humo, el jamón estuvo en contacto con éste por 35.0 min, la temperatura del humo fue de 50.0 °C.
3. Humo: durante el ahumado del jamón cocido se aprovecho la formación del humo para recolectar éste en viales de vidrio para posteriormente realizarle una MEFS y comprobar si en éste estaban presentes los HAP’s.
4. Jamón de pierna liofilizado. Para obtener la muestra liofilizada se pesaron 10.0 g de jamón ahumado finamente picado, se colocaron en matraces de bola y se congelaron con nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se colocaron en la liofilizadora (*Heto Drywinner, modelo DW*) durante 8.0 horas. La muestra de jamón liofilizada se pulverizó en un mortero de ágata y se guardo en un vial de vidrio con tapa de rosca.

Las muestras de jamón cocido y ahumado fueron adquiridas en un supermercado, es importante mencionar que en la muestra de jamón ahumado la etiqueta mencionaba que el procedimiento de ahumado había sido por ahumado natural.

3.3 Preparación y almacenamiento de disoluciones

Disoluciones estándar de HAP's. Se pesaron por separado 10.54 mg de Naftaleno (99.6% pureza), 9.41 mg de Acenafteno (98% pureza), 11.22 mg de Fenantreno (99% pureza), 13.74 mg de Antraceno (98% pureza), 12.66 mg de Fluoranteno (98% pureza), 8.30 mg de Criseno (98% pureza) y 12.27 mg de Benzo (a) Pireno (98% pureza) los cuales se disolvieron y aforaron a 10.0 ml con tolueno. Estas disoluciones se colocaron por separado en frascos de color ámbar con tapón de rosca y se almacenaron en refrigeración.

Disolución estándar de trabajo. De las disoluciones estándar de HAP's se tomó el volumen necesario para preparar 10.0 ml (en tolueno) de una mezcla de los 7 HAP's a una concentración aproximada de 50.0 ppm. De esta solución se prepararon diluciones de 10.0 y 1.0 ppm.

Estas tres disoluciones se colocaron por separado en viales de vidrio de color ámbar con tapón de rosca y se almacenaron en refrigeración.

3.4 Procedimiento

El procedimiento seguido para la optimización del método DMFS y la extracción de HAP's por el mismo se muestra en la Figura 9. Enseguida se describe cada una de los pasos del procedimiento.

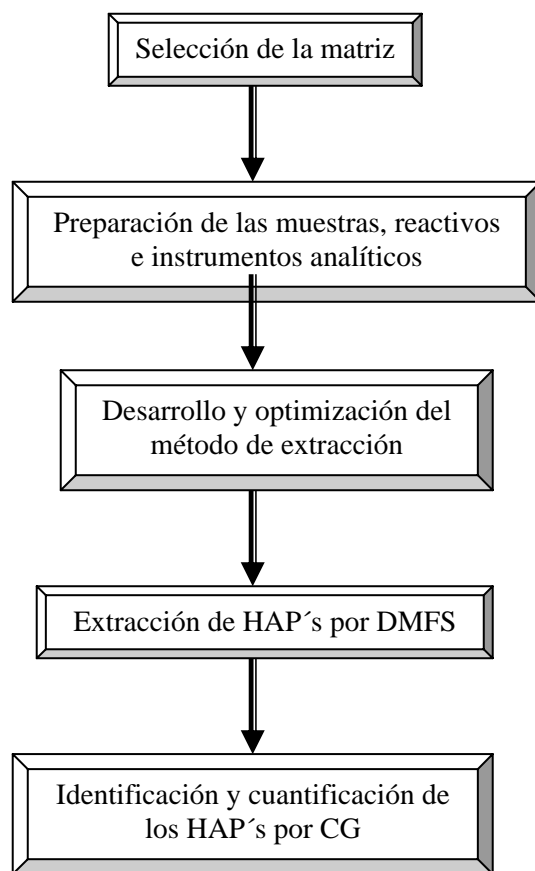


Figura 9. Esquema analítico

3.4.1 Preparación de la muestra, reactivos e instrumentos analíticos

3.4.1.1 Acondicionamiento y conservación de las muestras.

Se pesaron y picaron finamente por separado, en una licuadora 100.0 g de las muestras de jamón cocido y de jamón ahumado. Las muestras picadas fueron empacadas en porciones de aproximadamente 1.0 g en papel aluminio y se guardaron en bolsas plásticas de cierre hermético. Ambas muestras fueron almacenadas en congelación hasta su análisis.

La muestra de jamón liofilizado se guardo en un vial de vidrio con tapa de rosca y se almaceno a temperatura ambiente en un lugar seco.

3.4.1.2 Acondicionamiento y almacenamiento del adsorbente

El C₁₈ (octadecil silano) utilizado como adsorbente para la DMFS fue acondicionado antes de su uso para eliminar impurezas que interfirieran con el análisis.

Se pesaron 7.0 g de adsorbente y se colocaron en una columna de vidrio. Una vez empacado el C₁₈ en la columna, se adicionaron 20.0 ml de hexano, cuando este disolvente terminó de eluir se adicionó 20.0 ml de metanol y después 20.0 ml de diclorometano y finalmente 20.0 ml de hexano. Una vez que eluyó el último disolvente el C₁₈ permaneció en la columna hasta que éste estuviera seco.

El adsorbente se guardó en un vial de vidrio con tapa de rosca y se almacenó a temperatura ambiente.

3.4.1.3 Acondicionamiento y almacenamiento del retenedor

Se pesaron 30.0 g de Florisil y se colocaron en un vial de vidrio color ámbar. El Florisil fue activado a 300.0 °C durante 8.0 horas y almacenado en estufa a 100 °C hasta su uso.

3.4.1.4 Condiciones cromatográficas

Para el análisis cualitativo y cuantitativo se utilizó un Cromatógrafo de gases capilar Hewlett Packard modelo 5890 serie II Plus equipado con un sistema de inyección en columna (Cold on-Column) siempre 3.0 °C arriba de la temperatura del horno (Oven-Track) y detector de ionización de flama, columna capilar de sílice fundida HP-5 (5.0 % metilfenil siloxano), 30.0 m x 0.25 mm x 0.25 µm.

El programa de temperatura utilizado para el análisis fue: 60.0 °C durante 1.0 min incrementándose 10.0 °C/min hasta alcanzar los 250.0 °C incrementándose nuevamente 5.0 °C/min hasta llegar a 300.0 °C, se mantuvo esta temperatura durante 5.0 min. La temperatura del detector fue de 300.0 °C.

Para la confirmación de los resultados se utilizó un Cromatógrafo de Gases 6890N acoplado a un Detector Selectivo de Masas 5973 Agilent Technologies con inyector split/splitless y columna capilar de sílice fundida de 30.0 m x 0.32 mm x 0.25 µm; ZB-5M (Zebron Phenomenex, USA).

Gas acarreador: Helio con flujo de 1.0 ml/min.

Programa de Temperatura: temperatura inicial de 60.0 °C isotérmica durante 1.0 min, incrementándose 5.0 °C/min hasta los 210.0 °C e incrementándose nuevamente 10.0 °C/min hasta llegar a 280.0 °C, manteniendo esta temperatura por 5.0 min.

Los análisis se realizan a 70.0 eV utilizando el modo Barrido Total del Espectro (SCAN, por sus siglas en inglés).

Temperatura de la línea de transferencia: 280.0 °C, Temperatura de la fuente de ionización: 230.0 °C, Temperatura del analizador (cuadrupolar):150.0 °C. Temperatura del inyector: 280.0 °C en modo splitless (4.0 min).

3.4.2 Optimización del método de extracción

Para el desarrollo y optimización del procedimiento se realizaron diferentes experimentos variando los siguientes parámetros: proporción de adsorbente y retenedor (C₁₈/Florisol), cantidad de muestra, tiempo de dispersión, tipo de disolvente o mezclas de disolventes para la elusión de los compuestos y velocidad de evaporación.

3.4.3 Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos por DMFS

Para la extracción de los HAP's se pesaron por separado 0.25g de jamón ahumado, 0.5 g de adsorbente y 0.75 g de Florisol. La muestra de jamón se colocó en un mortero de ágata y se dejó macerar durante 30.0 min con 250.0 µL de isooctano. Transcurridos los 30.0 min de reposo de la matriz, ésta se mezcló durante 80.0 seg con el adsorbente (C₁₈) en forma homogénea y ligeramente fuerte utilizando el pistilo de ágata. Posteriormente en una jeringa de vidrio de 5.0 mL se colocó un disco de papel filtro seguido del retenedor de grasa (Florisol), se golpeó ligeramente y se colocó otro disco de papel filtro, enseguida se colocó la muestra mezclada con el adsorbente. Finalmente se colocó otro disco de papel filtro y se compacto fuertemente con el émbolo.

Una vez preparado el cartucho se procedió a eluir a los analitos con 6.0 mL de Hexano/Diclorometano (2:1). Se recuperan los primeros 4.0 mL y se evapora lentamente con una corriente de N₂ hasta un volumen final de 1.0 mL. Se inyectó 1.0 µL en el cromatógrafo de gases.

3.4.4 Identificación de HAP's

Para la identificación de los HAP's se inyectó 1.0 µL de una disolución estándar (1.0 ppm) en el cromatógrafo de gases para obtener los tiempos de retención de cada uno de los compuestos y de esta forma poder compararlos con los tiempos de retención obtenidos en los extractos de las muestras.

Para confirmar la presencia de los compuestos identificados en los extractos éstos fueron inyectados en el Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas bajo las condiciones descritas en el punto 3.4.1.4.

3.4.5 Cuantificación de HAP's

Para la cuantificación de HAP's se prepararon curvas patrón a las siguientes concentraciones: 0.15, 0.25, 0.35, 0.50, 0.75 y 1.0 ppm.

La cuantificación de HAP's en jamón ahumado se realizó por quintuplicado siguiendo el procedimiento de extracción descrito en el punto 3.4.3, inyectándose 1.0 µL de cada extracto.

Linealidad y Precisión

La linealidad y precisión del sistema cromatográfico se evaluaron inyectando las 6 soluciones a las concentraciones mencionadas, con estos puntos se construyeron las curvas de calibración (Figura 11) para cada uno de los HAP's estudiados y se obtuvieron los coeficientes de correlación para cada curva. Su preparación siguió el mismo procedimiento de extracción que para las muestras de jamón ahumado (descrito en el punto 3.4.3), la fortificación se llevó a cabo en el paso de maceración con isoctano, dejando en contacto 30.0 min antes de la dispersión.

Límite de detección

El límite de detección del sistema se determinó con la inyección de la mezcla estándar a 0.15 ppm, concentración mínima utilizada a la cual los compuestos estudiados se separan y resuelven adecuadamente.

Recobro

El recobro para los compuestos provenientes de soluciones estándar se realizó inyectando por triplicado una mezcla estándar a 0.5 ppm y determinando el 100.0 % de área para cada HAP's.

El recobro para los analitos en muestras fortificadas se realizó fortificando jamón cocido (por triplicado) con la mezcla estándar a 0.5 ppm, la extracción de los analitos se llevó acabo de la misma forma que para jamón ahumado (punto 3.4.3).

4. Resultados y Discusión

4.1 Selección del método de extracción

Para la determinación de HAP's en jamón ahumado se propuso utilizar la Dispersión de Matriz en Fase Sólida por que es un método que se ha utilizado ampliamente para la determinación de drogas, pesticidas, herbicidas y otros contaminantes de diferentes matrices biológicas. Este método ofrece ventajas como: menor tiempo de análisis, volúmenes pequeños de disolventes, poca cantidad de muestra; sobre otros métodos de extracción como Extracción Soxhlet, Extracción en Fase Sólida, Extracción Líquido-líquido y Microextracción en Fase Sólida.

4.2 Optimización del método de extracción

La optimización del método de extracción es el punto más importante en el esquema analítico ya que de este depende la eficiencia del método y la confiabilidad de los resultados.

Para determinar las condiciones óptimas se requirió de un trabajo exhaustivo en la optimización de los parámetros que permitieran una extracción selectiva, rápida y sensible de los compuestos en estudio. De esta forma se variaron distintos parámetros como: proporción de adsorbente y retenedor (C₁₈/Florisil), cantidad de muestra, tiempo de dispersión, tipo de disolvente o mezclas de disolventes para la elusión de los compuestos y velocidad de evaporación, hasta seleccionar las condiciones que permitieran una adecuada extracción de los HAP's desde la matriz.

Selección de la proporción adsorbente/retenedor

Debido a que la matriz se encuentra en contacto con el adsorbente durante la dispersión, es importante seleccionar la cantidad adecuada de éste para permitir que la dispersión y las interacciones propias de la matriz con el adsorbente se lleven a cabo sin que haya un exceso de adsorbente.

Para el caso del retenedor, la cantidad a utilizar de éste debe ser tal que permita la retención de los compuestos que interfieren con el análisis cromatográfico (principalmente grasa), pero sin retener a los compuestos en estudio.

Para la optimización de este parámetro se tomo como referencia la proporción utilizada en trabajos previos ¹⁴.

Selección de la cantidad de muestra

Debido que los HAP's se encuentran en niveles de traza es importante elegir la cantidad necesaria de muestra que permita que éstos se puedan extraer ya que si se excede en la cantidad de matriz puede haber mayores interferencias durante el análisis (principalmente grasa).

Para la selección de este parámetro nos apoyamos en trabajos previos en donde 0.25 g de muestra permiten extraer los compuestos en estudio sin la interferencia de otros compuestos propios de la matriz ¹⁴.

Selección del tiempo de dispersión.

El tiempo de dispersión de la matriz y el adsorbente es determinante en el desarrollo del método, pues deben estar perfectamente distribuidas y dispersadas, procurando que toda la muestra este en contacto con el adsorbente. El tiempo de dispersión seleccionado se tomo a partir de trabajos previos en donde un tiempo de 80.0 seg permite una dispersión adecuada entre la matriz y el adsorbente ¹⁴.

Selección del disolvente para la elusión

Considerando las características fisicoquímicas de los analitos se examinó cuál disolvente sería el más selectivo para extraer los HAP's desde la matriz sin extraer otros compuestos que interfirieran. Por las características de los compuestos en estudio se pudo elegir entre varios disolventes o mezclas de éstos, pero se eligió una mezcla de Hexano: Diclorometano (2:1) la cual había sido probado en trabajos anteriores y había extraído de manera eficiente a los HAP's sin extraer compuestos que interfirieran con el análisis cromatográfico ¹⁴.

Selección de la velocidad de evaporación

La mayor pérdida de HAP's en los diferentes métodos de extracción se da como consecuencia de una inadecuada concentración de los extractos por lo que es necesario que ésta se realice con cuidado.

Se concentraron diferentes muestras variando los tiempos de evaporación y el flujo de N₂, para evitar pérdidas mayores se decidió que la evaporación se haría con una corriente ligera de Nitrógeno y en un lapso de 20.0 min o hasta concentrar a 1.0 mL.

A continuación se presentan las condiciones utilizadas en este trabajo para la extracción de HAP's utilizando Dispersión de Matriz en Fase Sólida:

- Proporción adsorbente (C₁₈)/ retenedor de grasa (Florisil) de 1:1.5
- Cantidad de matriz: 0.25 g
- Un tiempo de dispersión de la matriz con el adsorbente: 80.0 seg
- Mezcla de disolventes para la elusión: Hexano/ Diclorometano (2:1)
- Concentración con corriente ligera de N₂

4.3 Identificación y confirmación de HAP's por CGC – EM

Para la identificación de los HAP's se determinaron las condiciones cromatográficas óptimas que permitieran una separación y resolución adecuada de los compuestos y de los estándares utilizados. Se inyectó en el cromatógrafo de gases 1.0 µL de la mezcla estándar a 1.0 ppm, con la finalidad de obtener los tiempos de retención de cada uno de los HAP's. De igual forma se inyectó 1.0 µL de la mezcla estándar (1.0 ppm) en el Cromatógrafo de Gases Capilar – Espectrometría de Masas (CGC-EM) para obtener los tiempos de retención y los iones moleculares de cada compuesto los cuales se utilizaran para la identificación de los HAP's presentes en la matriz.

Los espectros de masas con los que se identificaron los compuestos estudiados se encuentran en el Anexo C.

La Figura 10 muestra el cromatograma de la mezcla estándar de HAP's. Se observa una excelente resolución de los 7 HAP's en un tiempo total de análisis de aproximadamente 24.0 min.

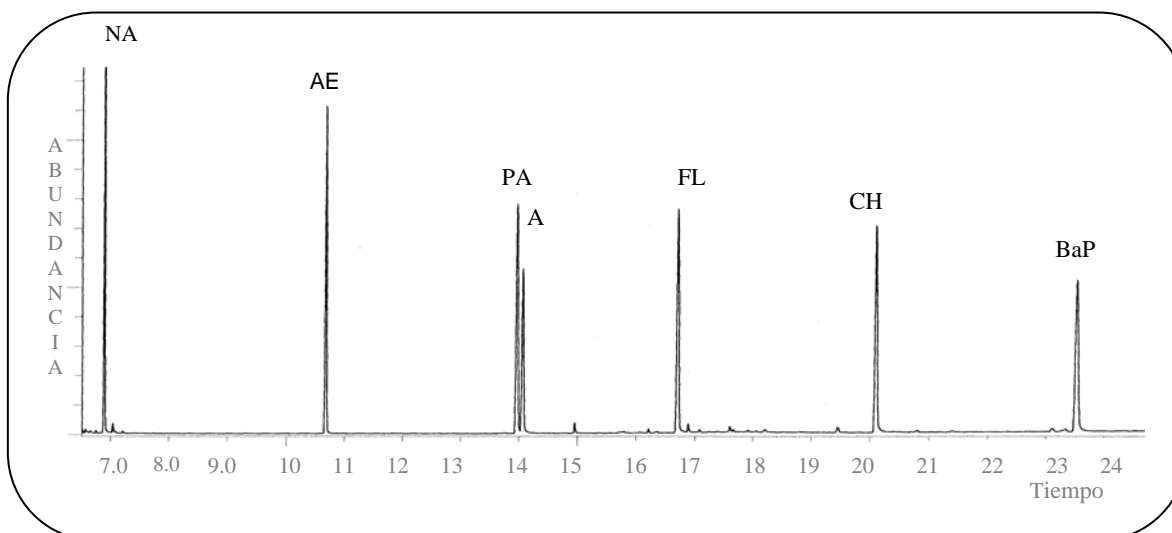


Figura 10. Cromatograma del análisis de la disolución estándar de HAP's (10.0 ppm). Identificación: Naftaleno (NA), Acenafeno (AE), Fenantreno (PA), Antraceno (A), Fluoranteno (FL), Criseno (CH), Benzo (a) Pireno (BaP). Condiciones cromatográficas descritas en el punto 3.4.1.4

En la Tabla 3 se presentan los tiempos de retención y los iones moleculares de cada uno de los HAP's

Tabla 3. Iones moleculares y tiempos de retención de los HAP's

Compuesto	Tiempo de retención (min.) ^A	Tiempo de retención (min.) ^B	Ion Molecular ^C (UMA)
NA	6.883	8.828	128
AE	10.673	13.247	154
PA	13.961	16.961	178
A	14.061	17.079	178
FI	16.699	20.027	202
CH	20.097	24.679	228
BaP	23.527	30.702	252

A. Datos obtenidos por inyección de la mezcla estándar a 10.0 ppm en el CGC-DIF. Condiciones cromatográficas descritas en el punto 3.4.1.4

B y C. Datos obtenidos por inyección de la mezcla estándar a 10.0 ppm en el CG-EM. Condiciones cromatográficas descritas en el punto 3.4.1.4

4.4 Cuantificación

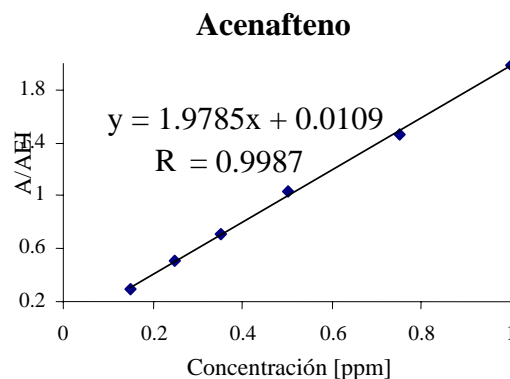
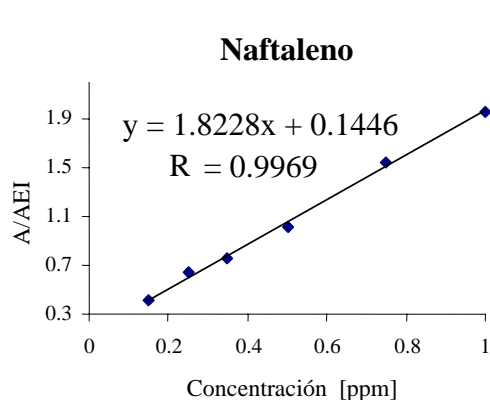
4.4.1 Curvas de Calibración

Para la cuantificación de los HAP's en jamón ahumado se realizaron curvas de calibración de 7 HAP's utilizando jamón fortificado con una mezcla estándar a 6 diferentes concentraciones: 0.15, 0.25, 0.35, 0.50, 0.75 y 1.0 ppm utilizando como estándar interno el Pentadecano a una concentración de 0.5 ppm.

Las curvas de calibración de los analitos estudiados (Tabla 4 y Figura 11) muestran coeficientes de correlación aceptables, en todos los casos > 0.9900 .

Tabla 4. Áreas relativas para construir las curvas de calibración de los HAP's

Concentración (ppm)	Área de compuesto / Área del estándar interno (Pentadecano)						
	NA	AE	PA	A	FL	CH	BaP
0.15	0.412	0.292	0.332	0.229	0.354	0.290	0.265
0.25	0.643	0.502	0.506	0.363	0.617	0.497	0.465
0.35	0.753	0.708	0.697	0.523	0.805	0.739	0.660
0.50	1.020	1.038	1.000	0.726	1.105	1.089	1.010
0.75	1.547	1.465	1.415	0.998	1.597	1.516	1.483
1.0	1.958	1.992	2.006	1.415	2.345	2.133	2.105
Límite de detección (ppb)	80	100	125	55	95	100	150



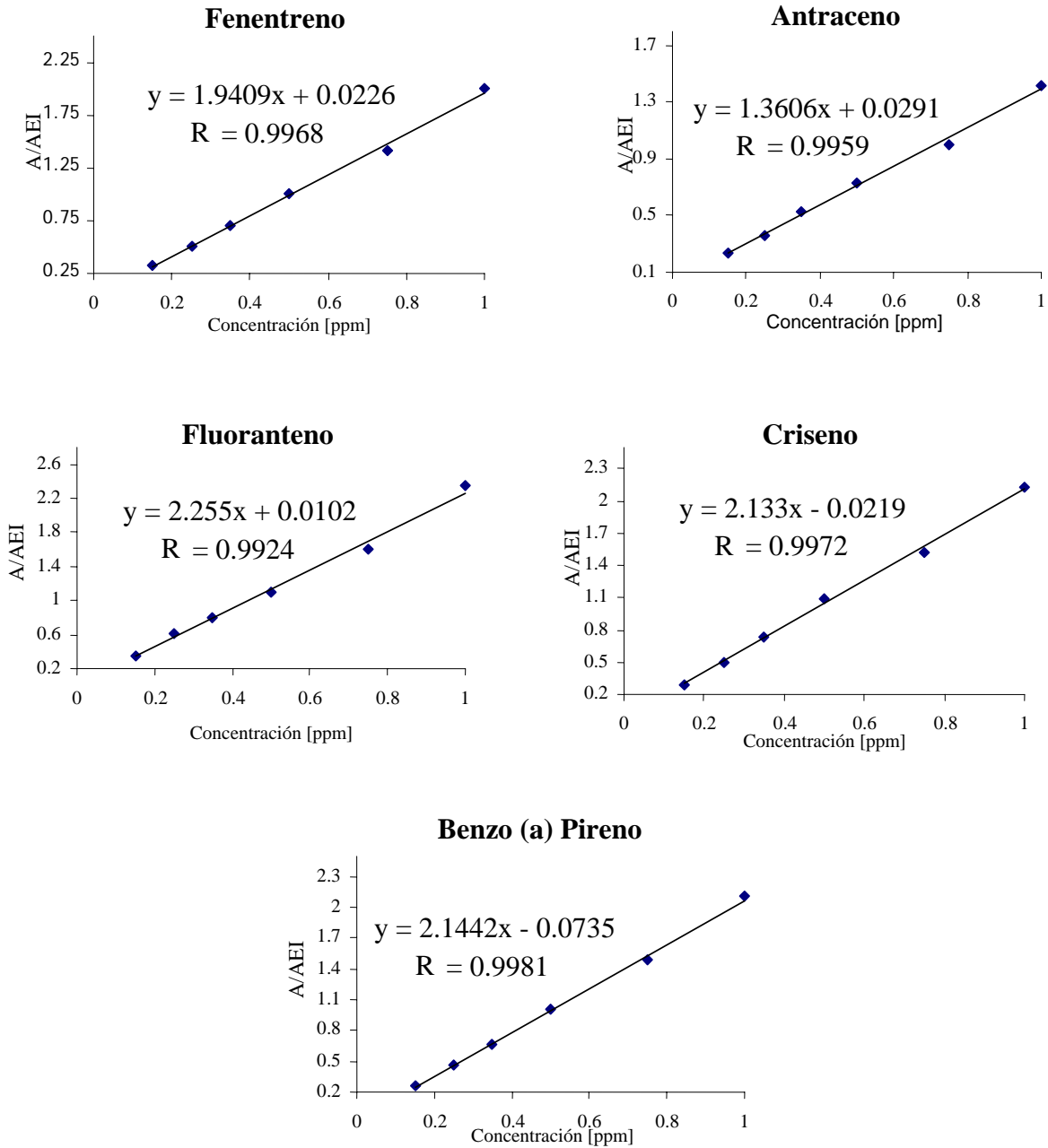


Figura 11. Curvas de calibración de los HAP's estudiados

4.4.2 Recobro de HAP's en adsorbente/retenedor

En cada uno de los pasos de una metodología es muy común que ocurran pérdidas del analito, por tal motivo es indispensable que se determine el % de Recobro o recuperación de éstos después de cada punto crítico dentro del proceso de extracción.

Para determinar el % de Recobro se procedió a fortificar C₁₈ con la mezcla estándar a 0.5 ppm, posteriormente se siguió el mismo proceso de extracción que para la matriz (descrito en el punto 3.4.3). De los extractos obtenidos se inyectó 1.0 µL en el Cromatógrafo de Gases Capilar, el procedimiento se realizó por triplicado.

Por otro lado se inyectó por triplicado 1.0 µL de la mezcla estándar a 0.5 ppm para conocer la respuesta de cada uno de los HAP's y de esta manera considerarla como 100% de área para el cálculo del % de Recobro en el blanco (adsorbente/retenedor) y las muestras. En la Tabla 5 se presentan las áreas de cada HAP del estándar a 0.5 ppm.

En la Tabla 6 se presentan el % de Recobro de los 7 HAP's analizados en adsorbente/retenedor.

Tabla 5. Área de HAP's disolución estándar (0.5 ppm)

n = 3	Área NA	Área AE	Área PA	Área A	Área FI	Área CH	Área BaP
1	879	1864	1891	1314	1951	1816	1836
2	884	1949	1875	1339	1968	1855	1842
3	921	1860	1892	1312	1904	1845	1826
X	894.67	1891	1886	1321,67	1941	1838.67	1834.67
DE	22.94	50.27	9.54	15.04	33.15	20.26	8.08
% CV	2.56	2.66	0.51	1.14	1.71	1.10	0.44

n: Número de muestras analizadas, X: Promedio, DE: Desviación Estándar, CV: Coeficiente de Variación

Tabla 6. % de Recobro en adsorbente/retenedor

n=3	Área NA	Área AE	Área PA	Área A	Área FI	Área CH	Área BaP
1	341	1553	1626	1077	1913	1662	--
2	289	1418	1351	896	1574	1535	--
3	272	1350	1466	959	1880	1681	--
X	300.67	1440.33	1481.00	977.33	1789	1626	--
DE	35.95	103.33	138.11	91.88	186.93	79.38	--
% CV	11.96	7.17	9.33	9.40	10.45	4.88	--
% Recobro	33.61	76.17	78.53	73.95	92.17	88.43	--

n: Número de muestras analizadas, X: Promedio, DE: Desviación Estándar, CV: coeficiente de Variación

El % CV para la inyección directa de los HAP's es aceptable y se encuentra $< 3.0\%$ como se indica en la Tabla 5; lo que nos muestra que existe una buena reproducibilidad en la inyección y en la respuesta de los compuestos.

En el Recobro de los HAP's en el adsorbente/retenedor (Tabla 6) vemos que éste es aceptable, en la mayoría de ellos es superior al 70.0% sin considerar al Naftaleno cuyo % de Recobro es de 33.61 probablemente debido a que por ser el HAP más ligero hay mayor pérdida de éste durante la concentración del extracto.

La menor pérdida se da con el Fluoranteno cuyo % de Recobro es del 92.17 .

Respecto al Benzo (a) Pireno, éste permaneció retenido en el Florisil por lo que no pudo realizarse su extracción y por lo tanto no se determinó su % de Recobro en el adsorbente/retenedor.

Es importante mencionar que para realizar el % de Recobro en el adsorbente/retenedor se utilizó un retenedor (Florisil) de diferente marca al que se había estado utilizando el cual retuvo al B(a)P por lo que para determinar el % de Recobro en la matriz se cambió nuevamente la marca del retenedor para evitar la retención de este HAP.

El CV en general es $< 12.0\%$, teniendo la menor variación para el Criseno (4.88%) y la mayor para el Naftaleno (11.96%) lo cual es bastante aceptable considerando que estamos analizando concentraciones del orden de ppb (ng/ml).

4.4.3 Recuperación de HAP's en muestras fortificadas

Conocidos los % de Recobro en el adsorbente/retenedor fue necesario determinar el % de Recobro de cada HAP en jamón fortificado para determinar el porcentaje efectivo de recuperación de los analitos, es decir, de la misma manera en que se extraerán del jamón ahumado.

Para determinar el % de Recobro se fortificó una muestra de jamón con la mezcla estándar a 0.5 ppm y se procedió a extraer los HAP's por DMFS como se describe en el punto 3.4.3, este procedimiento se realizó por triplicado ($n=3$).

Para el cálculo del % de Recobro en muestras de jamón fortificado se tomó como 100% el área de cada HAP obtenida en el recobro en adsorbente/retenedor fortificado.

Para el caso del Benzo (a) Pireno se consideró como 100% de área a la obtenida por inyección directa del estándar a 0.5 ppm registrado en la Tabla 5.

En la Tabla 7 se muestran los recobros de los HAP's extraídos de las muestras de jamón fortificado.

Tabla 7. % de Recobro en jamón fortificado con HAP's

n =3	Área NA	Área AE	Área PA	Área A	Área Fl	Área CH	Área BaP
1	242	1767	1984	1270	2008	1839	368
2	222	1791	1795	1295	1816	1902	251
3	199	1707	1737	1174	1969	2032	539
X	221	1755	1839	1246.3	1931	1924.3	386
DE	21.5	43.2	129.1	63.8	101.4	98.4	144.8
% CV	9.7	2.4	7.0	5.1	5.2	5.1	37.5
%Recobro	73.5	121.8	124.1	127.5	107.9	118.3	21.0

n: Número de muestras analizadas, X: Promedio, DE: Desviación Estándar, CV: Coeficiente de Variación

De la Tabla anterior discutiremos que de acuerdo con los resultados de % de Recobro el método DMFS permite extraer de manera eficiente y selectiva a los HAP's teniendo % de Recobro que van desde 73.5 hasta 127.5 %. Lo que nos sugiere que probablemente existan interacciones propias de la matriz con los analitos o las interferencias de la matriz son mayores a concentraciones bajas, lo cual permite un mayor % de Recobro que el que se tiene con el adsorbente/retenedor.

Para el caso del Benzo (a) Pireno se calculo directamente de la solución estándar debido a que el % de Recobro del adsorbente/retenedor fortificado no se calculó por retención de éste en el Florisil. Como se observa en la Tabla 6 se obtuvo un % de Recobro efectivo de 21.0 % el cual es muy bajo, además el CV es demasiado alto (37.52%) lo cual indica que no es reproducible la extracción para el Benzo (a) Pireno, además, este es el HAP del que menor recuperación se obtiene.

Si observamos los coeficientes de variación (CV) es claro que estos son aceptables encontrándose en general < 10 % (excepto el Benzo (a) Pireno) lo que nos indica que el método de extracción es reproducible.

En la Figura 12 A y B se muestra el cromatograma de una extracción de jamón cocido sin ahumar (blanco de matriz) y el cromatograma de una extracción de jamón fortificado con HAP's respectivamente.

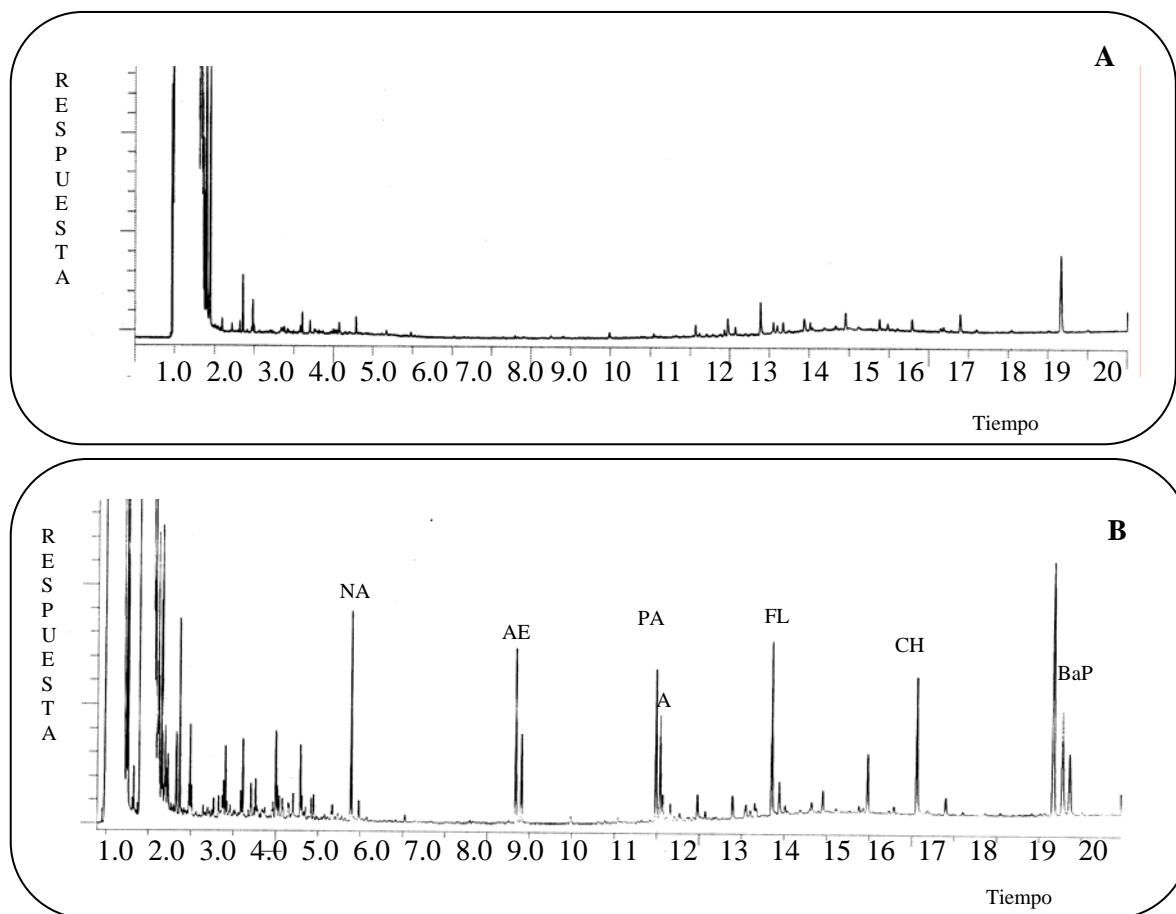


Figura 12. (A) Cromatograma del análisis del jamón sin ahumar . (B) Cromatograma de la extracción de HAP's del jamón fortificado a 1.0 ppm. Identificación: Naftaleno (NA), Acenafteno (AE), Fenantreno (PA), Antraceno (A), Fluoranteno (Fl), Criseno (CH), Benzo (a) Pireno (BaP). Condiciones cromatográficas descritas en el punto 3.4.1.4

4.4.4 Cuantificación de HAP's en jamón ahumado

Se extrajeron, utilizando el procedimiento por DMFS (descrito en el punto 3.4.3), los HAP's que pudiesen estar presentes en el jamón ahumado como consecuencia del proceso de ahumado.

El análisis de la muestra se realizó por quintuplicado (n=5) y cada extracto fue analizado bajo las condiciones cromatográficas descritas en el punto 3.4.1.4.

Comparando los tiempos de retención de los cromatogramas obtenidos por cada una de las muestras analizadas con el de la mezcla estándar, se identificó al Naftaleno (Figura 13).

Para confirmar la presencia de este, se inyectó 1.0 μL de los mismos extractos en el sistema acoplado CGC-EM.

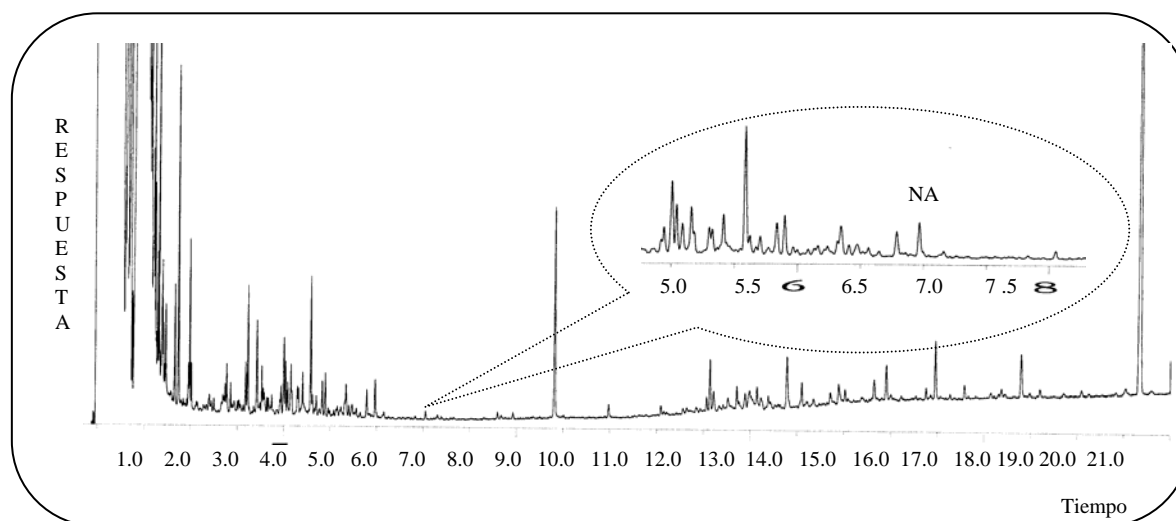


Figura 13. Cromatograma del extracto obtenido por DMFS de jamón ahumado.

NA. Naftaleno. Condiciones cromatográficas descritas en el punto 3.4.1.4

Debido a que sólo se identificó al Naftaleno en los extractos procedentes del jamón ahumado para su cuantificación se utilizó la curva estándar de Naftaleno que se muestra en la Figura 11.

Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de Naftaleno en jamón ahumado

n=5	Naftaleno [ppb]
1°	87.697
2°	87.697
3°	99.218
4°	104.704
5°	80.565
X	91.976
DE	9.763
CV	10.615

n: Número de muestras analizadas, X: Promedio, DE: Desviación Estándar, CV: Coeficiente de Variación

El promedio de las cinco repeticiones nos muestra que la concentración del Naftaleno en el jamón ahumado es de 91.976 ± 9.763 ng/g (ppb), el % CV que se obtuvo es aceptable e indica que hay reproducibilidad en los resultados.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 7 en donde se indica que el método DMFS permite extraer de forma eficiente y selectiva a los 7 HAP's con los que se fortificó una muestra de jamón natural se quiso comprobar este resultado con los resultados obtenidos utilizando Microextracción en Fase Sólida y Extracción Soxhlet (método utilizado para este tipo de análisis).

En este punto no se optimizaron las metodologías pues solo se pretendió tener un resultado preliminar para confirmar. El procedimiento y el equipo utilizado para ambos métodos de extracción se describe en el Anexo A.

4.5 Extracción de HAP's en jamón ahumado por Microextracción en Fase Sólida (MEFS) y Extracción Soxhlet (ES)

4.5.1 Extracción de HAP's por MEFS

En trabajos previos realizados en el laboratorio se vio que la MEFS permite extraer los HAP's de forma selectiva y eficiente así que se realizó la extracción del jamón fortificado con la mezcla estándar a 10 ppm utilizando las condiciones de extracción propuestas en el trabajo mencionado¹⁵.

El resultado (Figura 14) de la MEFS en jamón fortificado muestra que se lograron extraer cuatro de los siete HAP's con los que se fortificó la muestra de jamón, estos compuestos corresponden a Naftaleno, Acenafteno, Fenantreno y Antraceno.

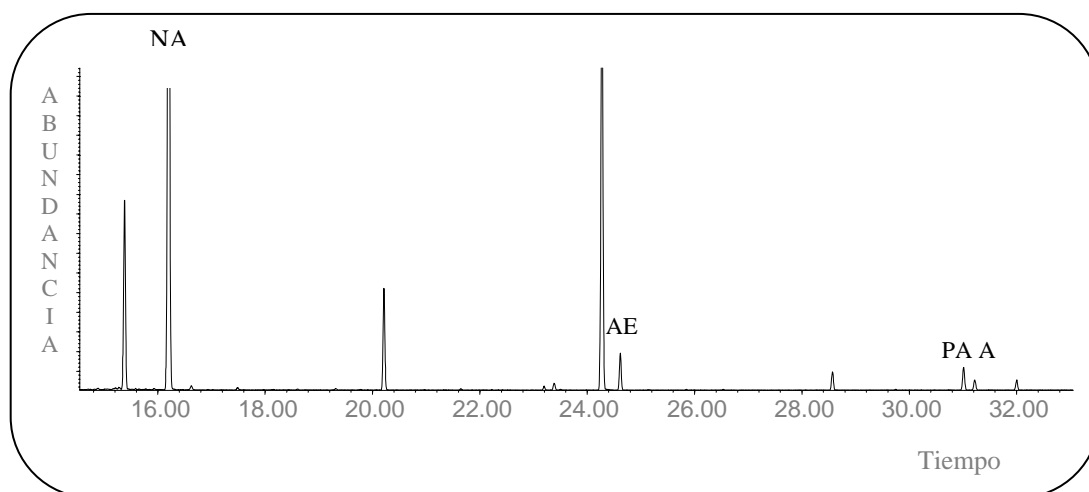


Figura 14. Cromatograma Iónico Total (TIC) de la extracción de HAP's por MEFS en jamón fortificado. NA .Naftaleno, AE. Acenafteno, PA. Fenantreno, A. Antraceno. Condiciones cromatográficas descritas en el Anexo B

Fluoranteno, Criseno y BaP posiblemente no se lograron adsorber en la fibra por ser los HAP's de mayor tamaño o porque el tiempo de extracción no permitió que estos se extrajeran.

De las extracciones realizadas en jamón ahumado, vemos que nuevamente sólo se identificó al Naftaleno (Figura 15) por lo que posiblemente sea el único HAP presente en el jamón ahumado analizado, de esta manera se confirma el resultado obtenido con DMFS.

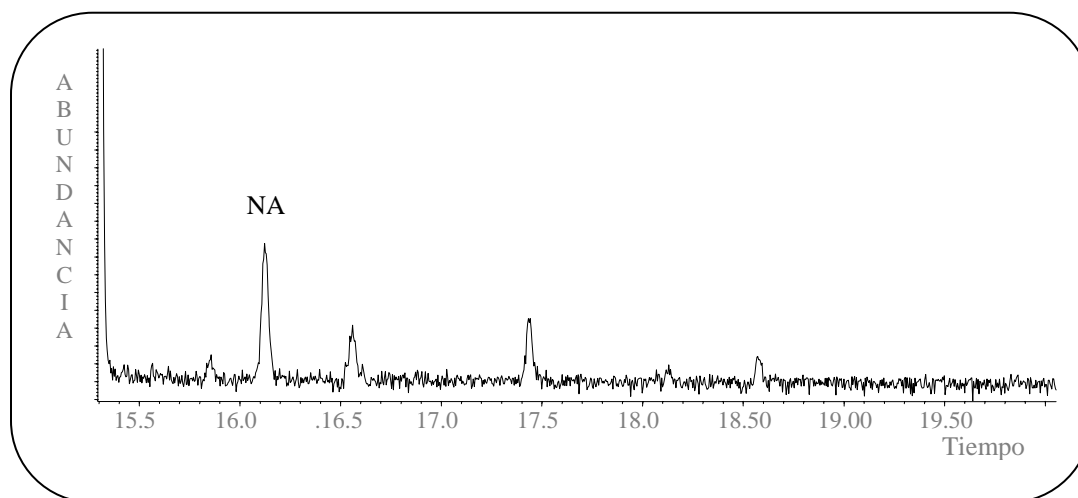


Figura 15. Cromatograma Iónico Total (TIC) de la extracción de HAP's por MEFS en jamón ahumado. NA. Naftaleno. Condiciones cromatográficas descritas en el Anexo B

Una ensayo que también se realizó fue la de ahumar jamón cocido para corroborar que ciertamente sólo el Naftaleno era el HAP presente.

Las condiciones de ahumado fueron las siguientes:

- Cantidad de jamón cocido: 100.0 g
- Tiempo de ahumado: 35.0 min
- Temperatura de ahumado: 50.0 °C
- Madera utilizada: Caoba

Durante el ahumado del jamón se aprovecho la formación del humo para recolectar éste en frascos de vidrio para posteriormente realizar una MEFS a dicho humo y comprobar si en éste estaban presentes los HAP's

En el jamón ahumado con caoba, así como en el humo procedente de la combustión de esta madera sólo se identificó al Naftaleno (Figuras 16 y17).

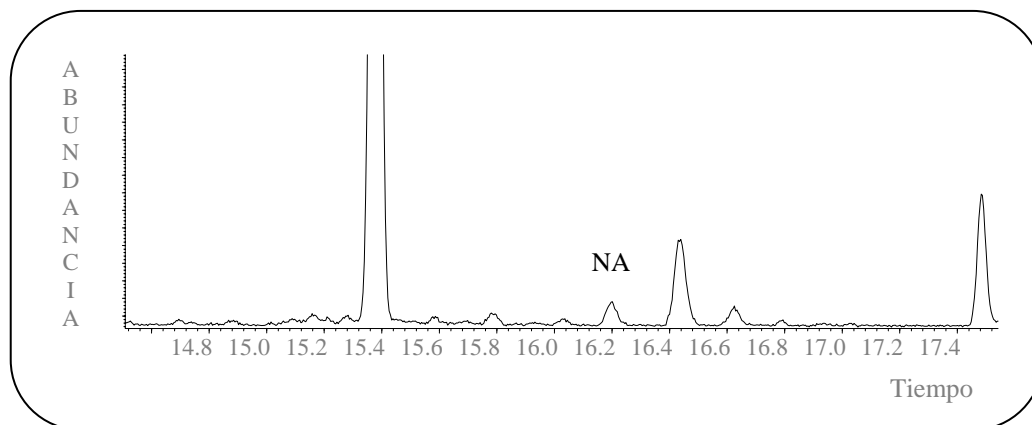


Figura 16. Cromatograma Iónico Total (TIC) de la MEFS de jamón ahumado con caoba. NA. Naftaleno. Condiciones cromatográficas descritas en el Anexo B.

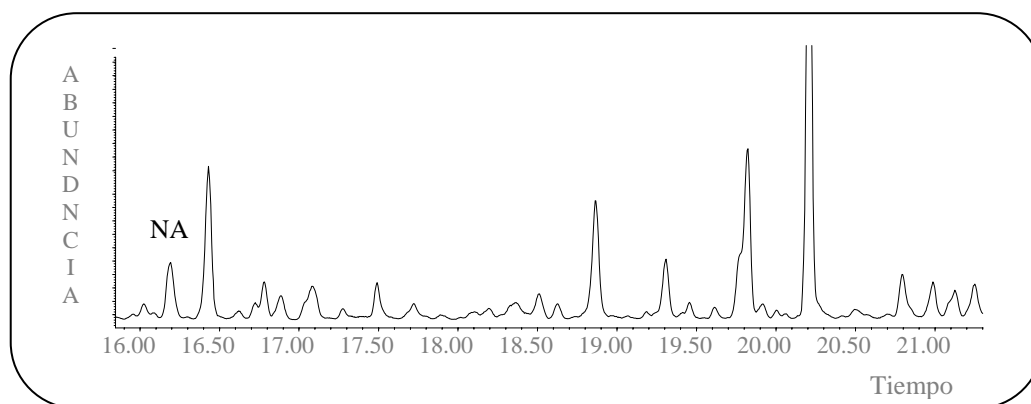


Figura 17. Cromatograma Iónico Total (TIC) de la MEFS del humo procedente de la combustión de caoba. NA. Naftaleno. Condiciones cromatográficas descritas en el Anexo B

4.5.2 Extracción de HAP's por Extracción Soxhlet

Para determinar si la Extracción Soxhlet permite extraer a los compuestos desde la matriz se fortificó una muestra de jamón cocido liofilizado con la mezcla estándar a 1.0 ppm.

(El procedimiento seguido para la ES se describe en el Anexo A)

Del extracto obtenido, se inyectó 1.0 μL en el CGC-EM (las condiciones cromatográficas se encuentran descritas en el Anexo B)

En la fracción alifática (hexano) no se identificó ningún HAP's y en la fracción aromática (tolueno) se identificaron: Acenafteno, Fenantreno y Antraceno (Figura 18).

Posiblemente Naftaleno se pierde durante la extracción debido a la alta temperatura, al largo tiempo que se requiere para esta y la concentración del extracto.

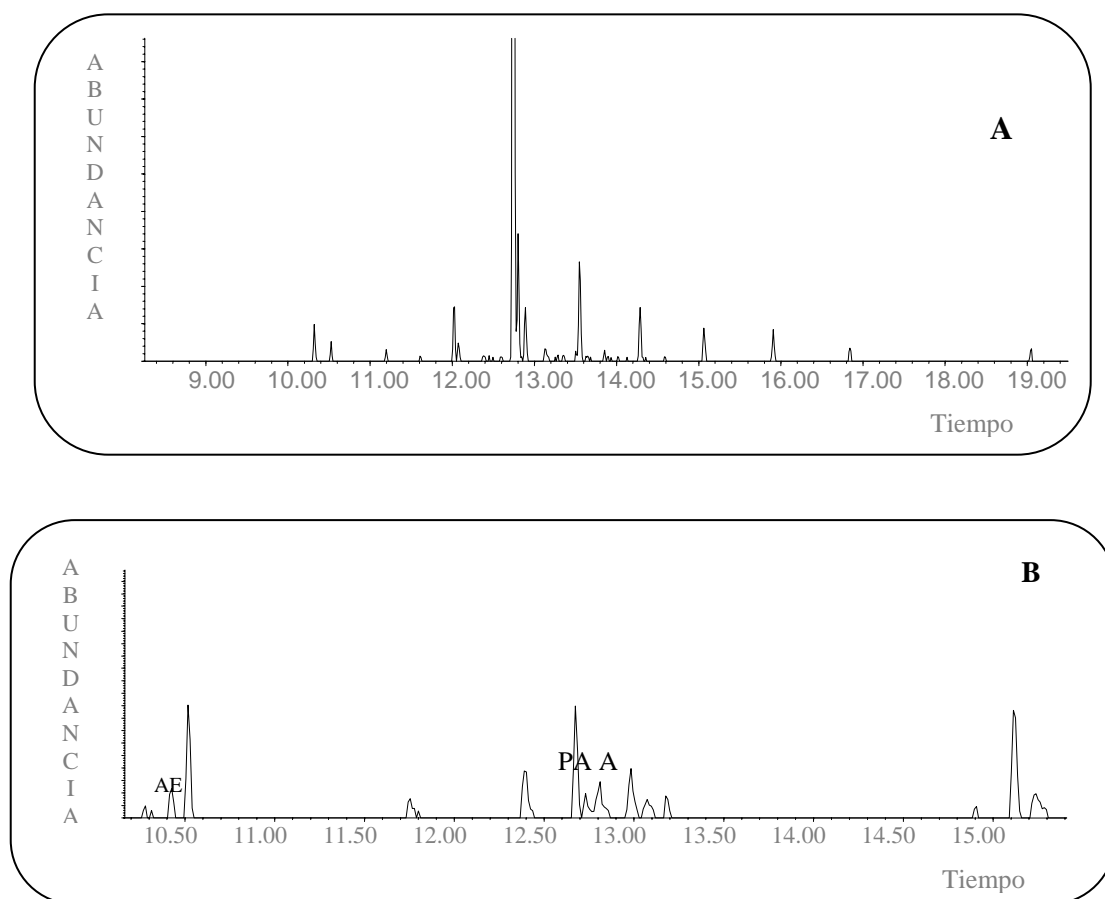


Figura 18. Cromatograma Iónico Total de la fracción alifática (A) y aromática (B) del jamón fortificado obtenido por Extracción Soxhlet AE. Acenafteno, PA. Fenantreno, A. Antraceno

La Figura 18 muestra el cromatograma iónico total (TIC, por sus siglas en inglés) de la fracción aromática (B) en donde sólo se identifican a tres HAP's.

Los espectros de masas con los que se identificaron los compuestos se encuentran en el Anexo C.

Para la Extracción Soxhlet de la muestra de jamón ahumado se procedió como se indica en el Anexo B, los extractos obtenidos fueron inyectados en el CGC – EM.

En esta prueba no se identificó a ninguno de los HAP's incluso no estuvo presente el Naftaleno, el cual posiblemente se perdió durante la extracción o concentración (Figura 19).

Esto nos indica que la Extracción Soxhlet requiere mas cuidado en la concentración del extracto para evitar la perdida de los HAP's más ligeros como el Naftaleno y no permite recuperar por cuantitativamente a los analitos en comparación con otras técnicas como DMFS.

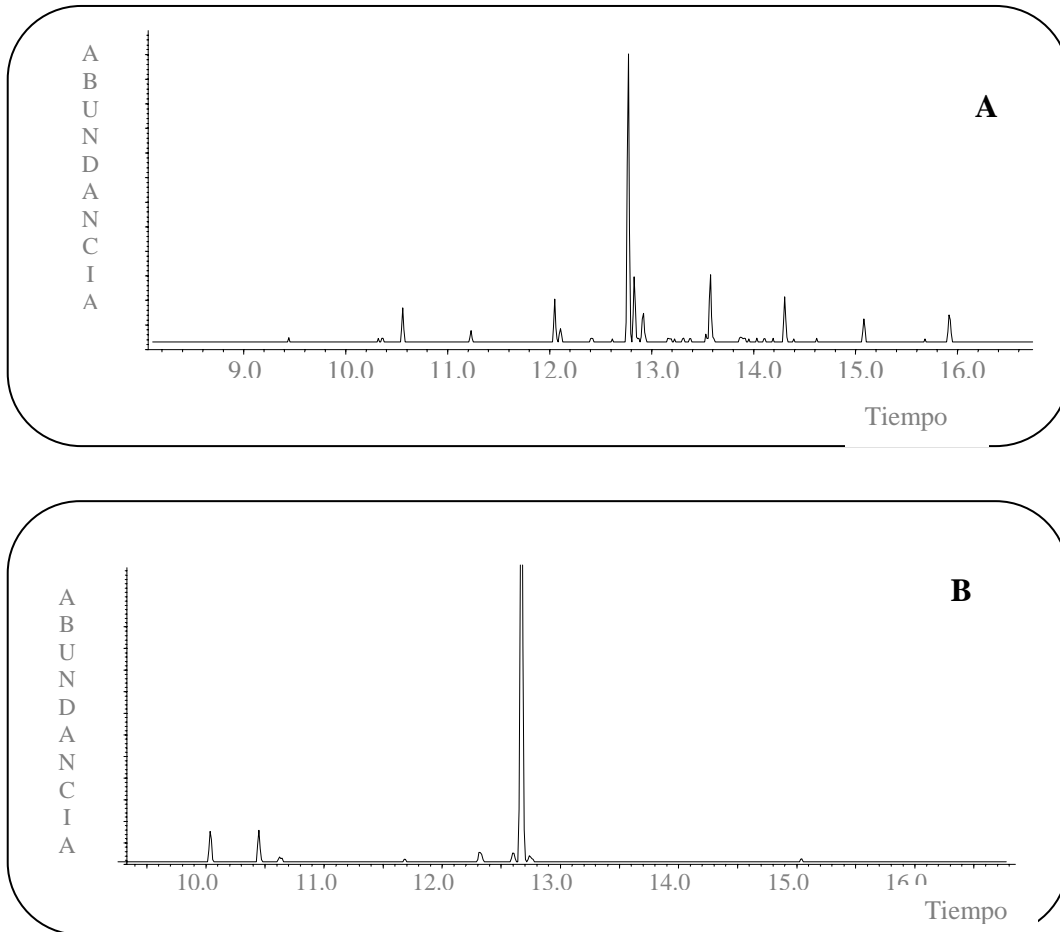


Figura 19. Cromatograma Iónico Total de la fracción alifática (A) y aromática (B) del jamón ahumado obtenido por Extracción Soxhlet.

5. Conclusiones

1. Se desarrolló y optimizó un procedimiento para la determinación de HAP's por DMFS seguido de CGC en jamón ahumado.
2. De acuerdo con los resultados de % de Recobro, el método DMFS permite extraer de manera eficiente y selectiva a los HAP's teniendo % de Recobro > 70.0 %.
3. Los coeficientes de variación (CV) son aceptables encontrándose en general < 10.0 % (excepto el Benzo (a) Pireno) lo que nos indica que el método de extracción es reproducible.
4. Se aplicó el procedimiento desarrollado en jamón ahumado (3.0 % grasa), identificándose y cuantificándose Naftaleno a una concentración de 91.98 ± 9.76 ng/g (ppb), con un Coeficiente de Variación de 10.615 % (% CV) el cual es aceptable, para este tipo de matrices tan complejas, indicando que existe reproducibilidad en los resultados.
5. El método DMFS ofrece ventajas sobre otros métodos de extracción que tradicionalmente se utilizan (extracción Soxhlet) por ejemplo; menor tiempo de análisis, menor cantidad de disolventes, poca cantidad de muestra, menor cantidad de residuos generados y que se aplica a matrices biológicas complejas.

Anexo A

Metodología para la determinación de HAP's en jamón ahumado por Extracción Soxhlet (ES)

Se realizó la saponificación de 1.0826 g de jamón cocido liofilizado (fortificado a 10.0 ppm con 7 HAP's) por 4.0 horas a 60.0°C bajo reflujo con 50.0 mL de solución metánolica de KOH al 20.0 % (p/v) en un equipo Soxhlet. Después de enfriarse, la digestión se colocó en un embudo de separación, se agregó 1.0 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente. Se adicionaron 25.0 mL de hexano, se agitó el embudo y cuando las fases se separaron se recolectó la fase orgánica (hexano) en un frasco de vidrio. Esta extracción se realizó 3 veces y todas las fases orgánicas se recolectaron en el mismo frasco.

El extracto de hexano se secó con Na_2SO_4 y fibra de vidrio silanizada. Este extracto seco se colocó en un matraz de bola y se evaporó a sequedad en un rotavapor (60.0°C), en seguida, se disolvió con 2.0 mL de hexano.

Para la obtención de las fracciones alifática y aromática se utilizó un cartucho de LC-Silica acondicionado sucesivamente con 2.0 mL de hexano, 2.0 mL de diclorometano y finalmente 2.0 mL de hexano.

El extracto se colocó con una jeringa en el cartucho LC-Silica, se eluyeron dos fracciones; la primera fracción (alifática) se eluyó con 2.0 mL de hexano y la segunda fracción (aromática) con 3.0 mL de tolueno. Cada fracción se recolectó por separado.

Se inyectó 1.0 μL de cada fracción en el CGC-EM.

Para la determinación de HAP's en jamón ahumado se pesó 1.028 g de jamón ahumado liofilizado y se procedió de la forma descrita anteriormente.

Metodología para la determinación de HAP's en jamón ahumado por Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

En un mortero de ágata se mezcló 0.25 g de jamón cocido (fortificado a 10.0 ppm con la mezcla estándar de HAP's) y 1.80 g de sal, esta mezcla se colocó en un vial de vidrio, se añadió 4.0 mL de agua destilada y se colocó la tapa con un septum de teflón.

El vial se mantuvo en agitación a 1200 rpm durante 5.0 min a temperatura ambiente, en seguida se colocó la fibra de PDMS-DVB (acondicionada antes de cada extracción a 260.0 °C durante 30.0 min), después de 30.0 min de extracción la fibra se retiró para ser inyectada en el CGC-EM y ser desorbida durante 10.0 min.

Transcurridos los 10.0 min de desorción de los analitos la fibra se retira para ser acondicionada.

Anexo B

Condiciones cromatográficas para Extracción Soxhlet (ES)

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases HP 5890 acoplado a un Detector Selectivo de Masas 5971 Hewlett Packard con inyector split/splitless y columna capilar de sílice fundida de 30.0m x 0.32mm x 0.25 μ m; (ZB-5M)

Se utilizó Helio con un flujo de 1.0 mL/min como gas acarreador, la temperatura de la línea de transferencia fue de 280.0 °C, la temperatura de la fuente de ionización fue 230.0 °C, la temperatura del analizador (cuadrupolar) fue 150.0 °C. La temperatura del inyector fue 280.0 °C en modo splitless (4.0 min)

Los extractos se inyectaron utilizando el modo Barrido Total del Espectro (SCAN) y el modo de Monitoreo Selectivo de Iones (SIM)

El programa de temperatura utilizado fue: inicial de 60.0 °C isotérmica durante 1.0 min, incrementándose 15.0 °C/min hasta 250.0 °C e incrementándose nuevamente 3.0 °C/ min hasta llegar a 315.0 °C , manteniéndose a esta temperatura por 5.0 min.

Condiciones cromatográficas para Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases 6890N acoplado a un Detector Selectivo de Masas 5973 Agilent Technologies con inyector split/splitless y columna capilar de sílice fundida de 30.0 m x 0.32mm x 0.25 μ m; ZB-5M (Zebron Phenomenex, USA).

Se utilizó Helio con un flujo de 1.0 mL/min como gas acarreador, la temperatura de la línea de transferencia fue de 280.0 °C, la temperatura de la fuente de ionización fue 230.0 °C, la temperatura del analizador (cuadrupolar) fue 150.0 °C. La temperatura del inyector fue 270.0 °C en modo splitless (4 min)

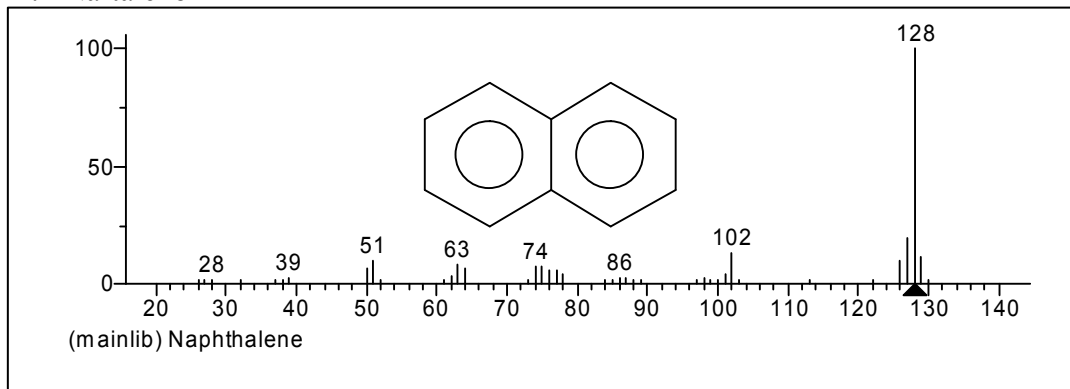
Programa de Temperatura: inicial de 40.0 °C isotérmica durante 1.0 min, incrementándose 5.0 °C/min hasta 210.0 °C e incrementándose nuevamente 10.0 °C min hasta llegar a 320.0 °C, manteniendo esta temperatura durante 5.0 min.

Los análisis se realizaron a 70 eV utilizando el modo Barrido Total del Espectro (SCAN).

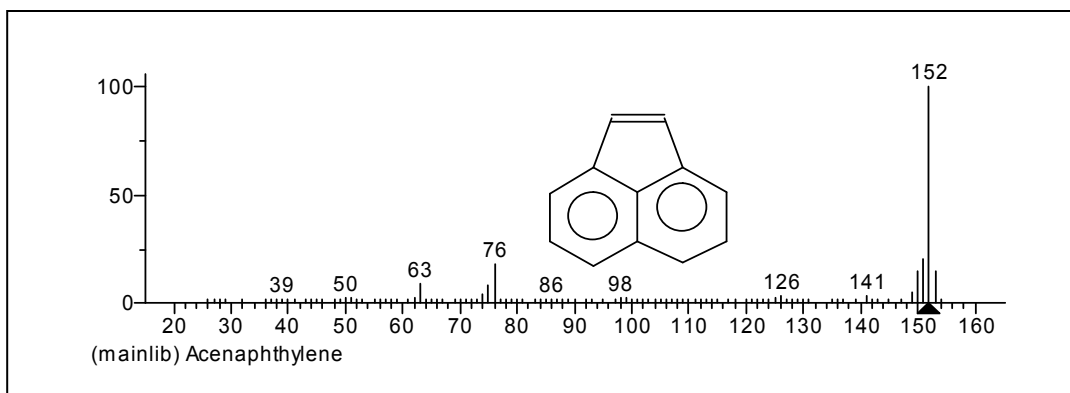
ANEXO C

Espectros de masas de los HAP's

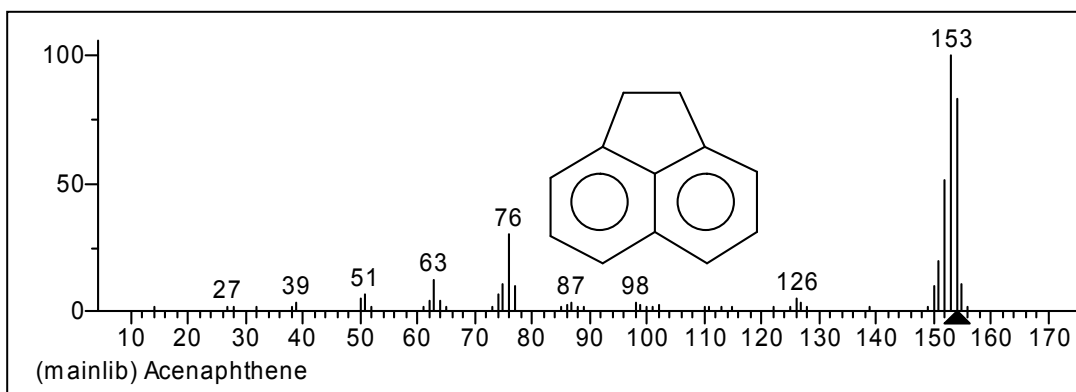
1. Naftaleno



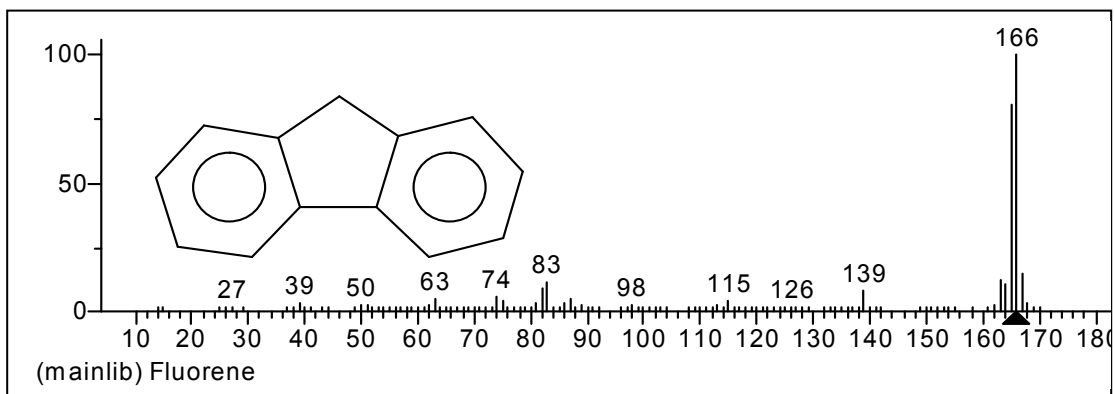
2. Acenaftileno



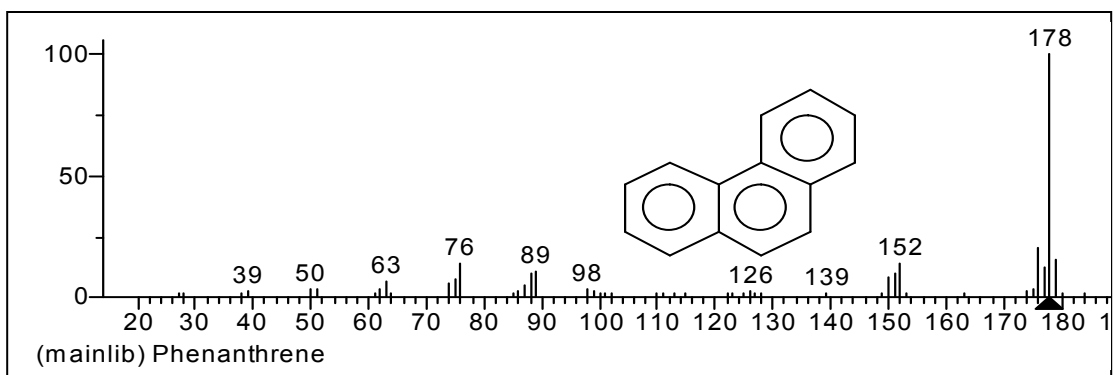
3. Acenafteno



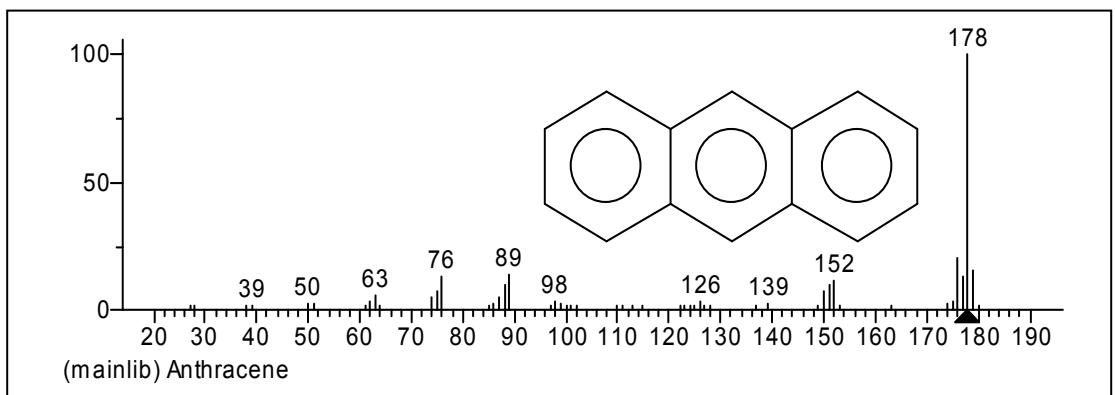
4. Fluoreno



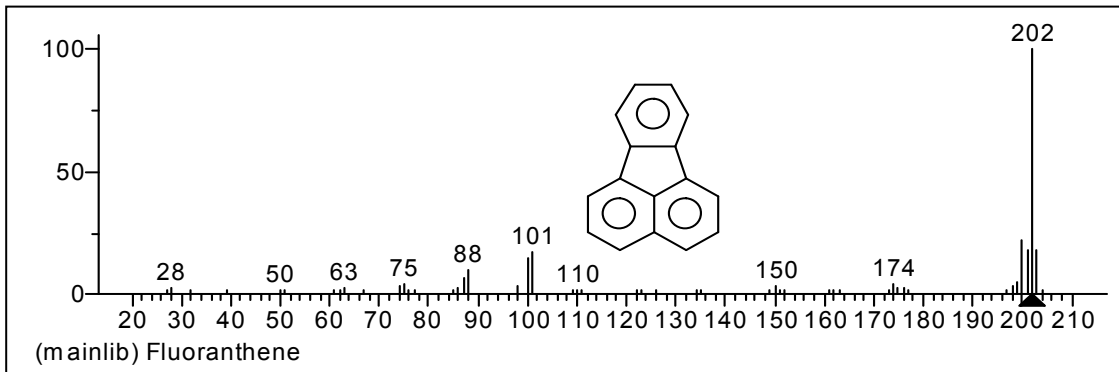
5. Fenantreno



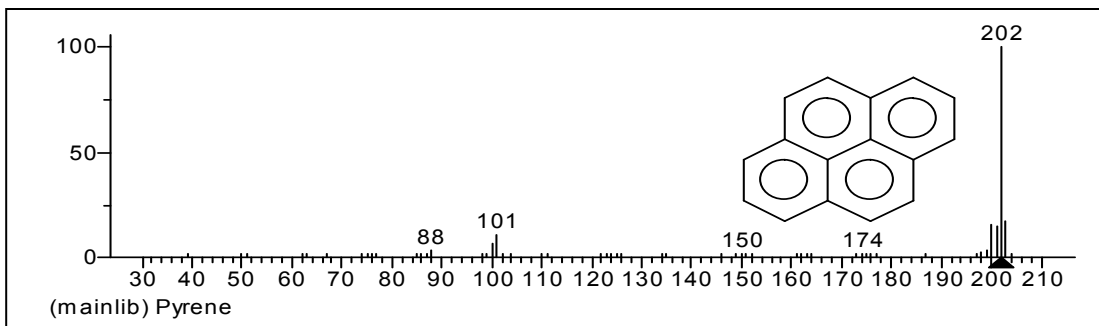
6. Antraceno



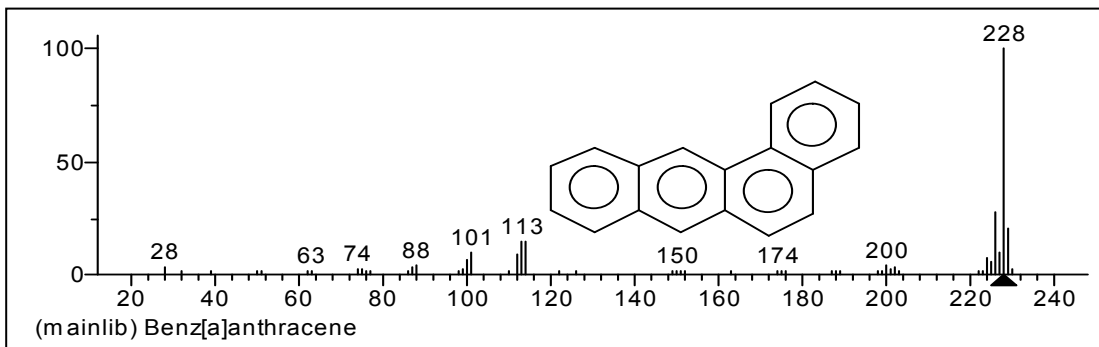
7. Fluoranteno



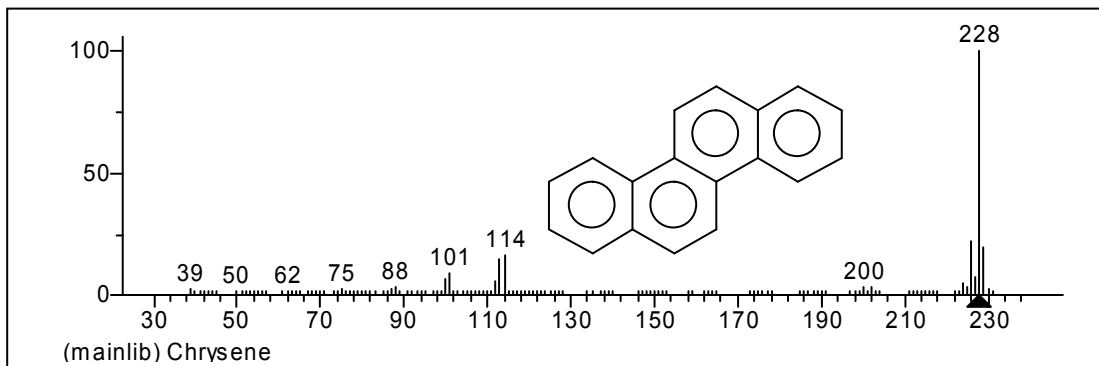
8. Pireno



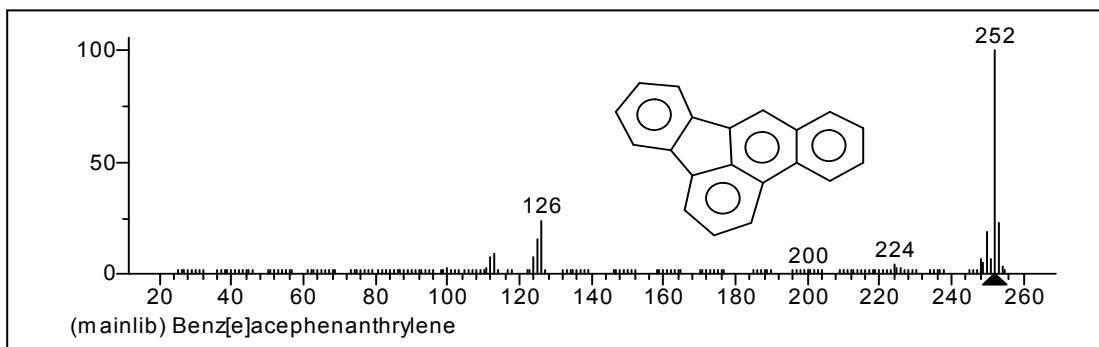
9. Benzo (a) Antraceno



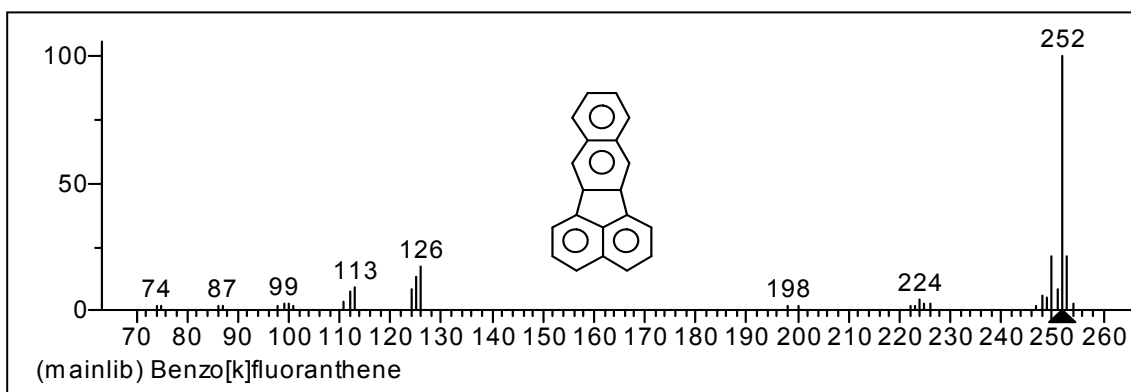
10. Criseno



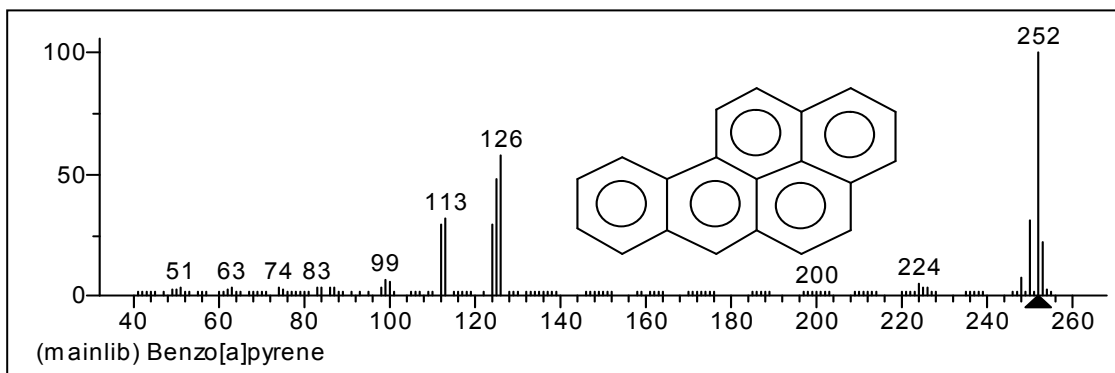
11. Benzo (a) Acenaftileno



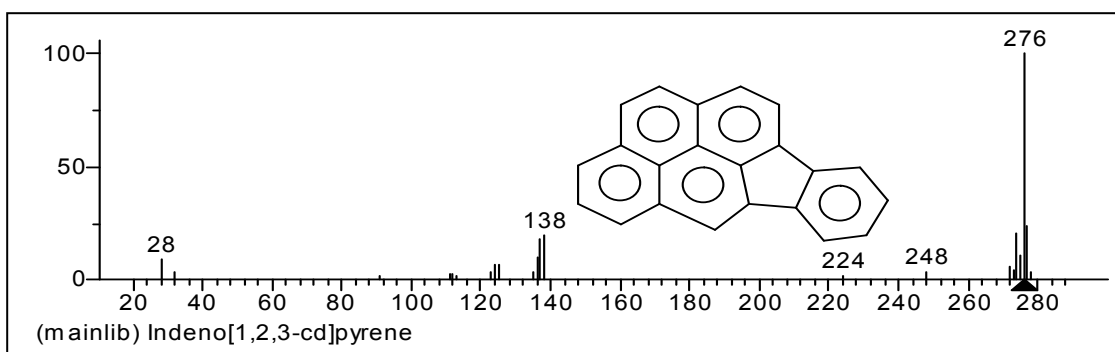
12. Benzo (k) Fluoranteno



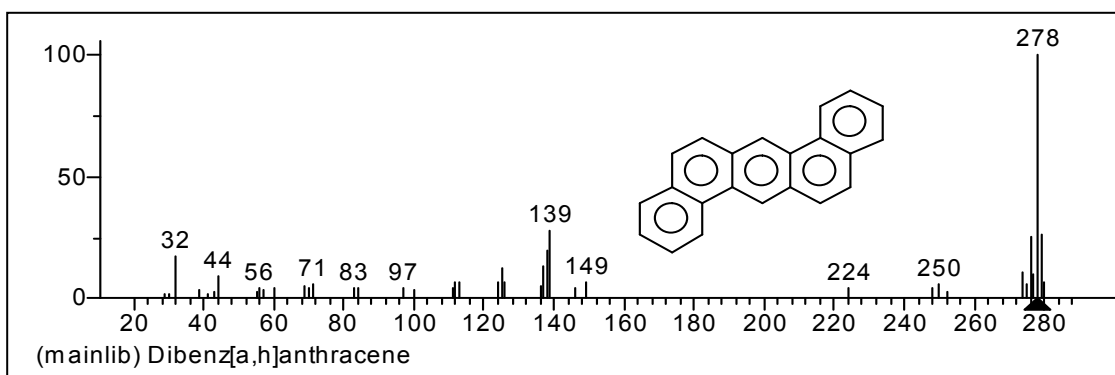
13. Benzo (a) Pireno



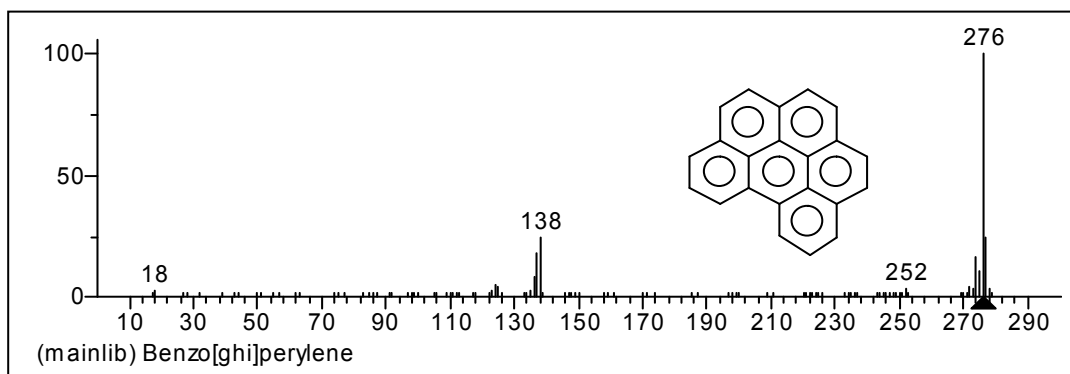
14. Indeno (1,2,3,c,d) Pireno



15. Dibenzo (a,h) Antraceno



15. Benzo (g,h,i) Perileno



Bibliografía

1. García; Guerrero, *"Aplicación del análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos al proceso de elaboración de productos cárnicos ahumados"* (Tesis de licenciatura, UNAM, 1995) ,5-15.
2. Giralda, *"Tecnología de la carne y de los procesos cárnicos"*, traducción de Carlos Compañé Fernández (Zaragoza, España: Editorial Acribia, 1991) ,183-223.
3. Erich, *"Conservación química de los alimentos. Características, usos y efectos"* (Zaragoza, España: Editorial Acribia, 1995), 249-253.
4. Möhler, *"El ahumado"*, traducción de José Romero Muñoz (Zaragoza, España: Editorial Acribia, 1991), 28-35; 64-66.
5. Cram, *"Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos"* (en línea, disponible en <http://www.mtas.es/insht/index.htm>; Internet; accesado el 10 de marzo de 2005)
6. Ruiz-Carvajal, *"Campaña de tóxicos. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos"* (en línea, disponible en <http://www.greenpeace.com.mx>; Internet; accesado el 21 de febrero de 2005).
7. Ruiz Monterrubio, *"Evaluación de la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en alimentos ahumados y enlatados caso tipo: pollo y mejillones"* (Tesis de licenciatura, UNAM, 2004), 12-36.
8. De la Cruz Rodríguez, *"Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3-4 benzopireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento"* (Tesis Digitales UNMSM)

9. Fenema, ***“Química de alimentos”***, (NY, USA: Editorial Board, 2000) 255-291.
10. Fernández Bremanuntz, ***“Las sustancias tóxicas persistentes”***, (México: INE-SEMARNAT, 2004), 173 – 191.
11. Skoog, ***“Análisis Instrumental”*** (México: Editorial Mc Graw-Hill, 1992), 491-536; 705-729.
12. Rubinson, ***“Química Analítica Contemporánea”***, traducción de María Teresa Aguilar Ortega, (México: Editorial Prentice Hall, 1991), 434-491.
13. Barker, ***“Matrix solid-phase dispersion”***, Journal of Chromatography A. 885 (2000), 115-127
14. Luis Aguirre, ***“Desarrollo y comparación de dos métodos analíticos para la extracción y purificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP’s) en muestras biológicas”*** (Tesis de Maestría, UNAM, 2006).
15. Reyes Delgado, ***“Determinación de los principales compuestos orgánicos del mezcal por Cromatografía de Gases Capilar – Espectrometría de Masas”*** (Tesis de Licenciatura en revisión, UNAM)