



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN MUESTRAS DE
ACEITE COMESTIBLE POR MEDIO DE
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

CRISTINA URIBE ALVAREZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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: Profesor: DRA. JOSEFINA ELIZALDE TORRES

VOCAL: Profesor: DRA. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ

SECRETARIO: Profesor: DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT

1er. SUPLENTE: Profesor DRA. SILVIA CITLALI GAMA GONZÁLEZ

2° SUPLENTE: Profesor: DRA. MA. ELENA BRAVO GÓMEZ

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA: DR. RAFAEL VÁZQUEZ-DUHALT

SUSTENTANTE: CRISTINA URIBE ALVAREZ

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael por haberme enseñado a ser una persona académicamente mejor, por ser mi tutor de licenciatura y de maestría y por mantener siempre un espíritu emprendedor ante los problemas de la investigación. A la Dra. Marcela, a la Dra. Lucia y a Rosa por siempre estar dispuestas a explicarme y ayudarme con los proyectos y hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar. A las integrantes de mi comité tutorial por sus correcciones y enseñanzas.

DEDICATORIAS.

A mi padre por ser una inspiración y un modelo a seguir. Por ser mi maestro, mi papi, mi coach y haberme brindado siempre cariño, atención, disciplina y por nunca haber faltado a una fecha importante e inclusive a un juego.

A mi mami por ser siempre cariñosa, por su buen humor y por su mal humor que acaba en buen humor, por cuidar mi salud, por buscar siempre lo mejor para mi y por ser mi amiga.

A mi hermano por estar siempre cerca, por seguirnos siempre a donde sea, por hacerlo siempre divertido y sobre todo gracias por cuidarme.

A toda mi familia por todos los momentos que hemos pasado, gracias a mis padrinos por cuidarme y siempre estar al pendiente de mi, a mis abuelos por ser tan divertidos y cariñosos conmigo, después de todo soy la consentida y a mi abuela por haberme cuidado mucho y darme tanto cariño.

A mis amigos que son como mi familia Neus, Mau, Mona, Lau y Carlos por estar desde el principio y porque estoy segura, seguirán hasta el final, y Ale que no estuviste en el principio, pero seguro estarás en el final. A Soei, Vian y Nelly por ser tan de colores y tan divertidos. A mis amigos de la prepa por la cantidad de experiencias compartidas.

A mis amigas del tocho que me enseñaron a confiar en la persona que tienes al lado y a formar un equipo. Fran y Offe, después de 20 años de conocernos, son personas muy especiales para mi.

A mis amigos del IBT de mi generación, colombianos y anexos, sobre todo Ponchito, David y a todos los chavos de mi laboratorio, gracias por darme una familia en Cuernavaca y a Rosita por siempre estar al pendiente de lo que se me olvida en el laboratorio, por apurarme y apoyarme en todo.

A todos aquellos que han pasado por mi vida compartiéndome un poco de luz y sabiduría.

ABREVIATURAS

ATDSR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EM-GC	Espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases
EPA	Environmental Protection Agency (EUA)
FC	Unidades de fluorescencia
HPA	Hidrocarburos poliaromáticos
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
DL ₅₀	Dosis letal 50
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
MEE	Matrices de excitación-emisión
MFO	Multioxidasas de función mixta
NOM	Norma Oficial Mexicana
PM	Material particulado
PM _{2.5}	Material particulado de diámetro menor a 2.5 µm
PM ₁₀	Material particulado de diámetro menor a 10 µm
ppb	Partes por millardo
ppm	Partes por millón
PST	Partículas Sólidas Totales
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SIMAT	Sistema de Monitoreo Atmosférico
SMARNAT	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales
VF	Volumen de fluorescencia

ÍNDICE DE CONTENIDO

<u>RESUMEN.</u>	<u>6</u>
<u>INTRODUCCIÓN.</u>	<u>7</u>
1. Hidrocarburos poliaromáticos	8
1.1 Biotransformación y toxicidad.....	11
1.2 Contaminación en alimentos.....	14
1.3 Hidrocarburos poliaromáticos como problema de contaminación en la Ciudad de México.....	15
2. Fluorescencia.....	17
3. Establecimiento de una metodología analítica.....	21
<u>ANTECEDENTES.</u>	<u>23</u>
<u>HIPÓTESIS.</u>	<u>25</u>
<u>OBJETIVOS.</u>	<u>26</u>
1. Objetivos Particulares.....	26
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	<u>27</u>
1. Reactivos y equipo.....	27
2. Procedimiento Analítico.....	27
2.1 Obtención de Matrices de emisión-excitación	27
2.2 Obtención de muestras de las estaciones de monitoreo ambiental del SIMAT ..	29
3. Obtención de muestras de en puestos de comida ambulantes.....	33

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 34

- 1. Cuantificación de HPAs en las muestras.....34
- 2. Muestras de estaciones de monitoreo.....53
- 3. Muestras de puestos de comida.....58

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS. 61

BIBLIOGRAFÍA 62

Anexo I. Matrices de Emisión-Excitación de HPAs, muestras de estaciones de monitoreo y puestos de comida.....66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos poliaromáticos.....	9
Tabla 2. Ubicación de las muestras de aceite colocadas en las estaciones de monitoreo atmosférico del SIMAT.....	31
Tabla 3. VBC de compuestos en acetonitrilo a una concentración de 10 ng/ml	45
Tabla 4. VBC obtenidos y esperados a partir de las MEE de mezclas de HPAs a una concentración de 10 ng/ml	48
Tabla 5. Volumen de fluorescencia de las matrices de excitación-emisión de cada compuesto.....	49
Tabla 6. Resultados de la concentración de HPAs para las diferentes zonas de muestreo de las estaciones del SIMAT.....	54
Tabla 7. Valores de los indicadores de la NOM para PST en las estaciones de monitoreo que reportaron este contaminante en 2008. (SIMAT-2008)	56
Tabla 8. Valores de los indicadores de la NOM para PM ₁₀ en las estaciones de monitoreo que reportaron este contaminante en 2008. (SIMAT-2008).....	56
Tabla 9. Valores de los indicadores de la NOM para PM _{2.5} en las estaciones de monitoreo que reportaron este contaminante en 2008. (SIMAT-2008).....	57
Tabla 10. Resultados de la concentración de HPAs para muestras de aceite tomadas de puestos de comida.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Esquema de Jablonoski. Representación de los mecanismos moleculares para producir fluorescencia.....	19
Fig 2. Esquema del funcionamiento de un espectrofluorómetro.....	20
Fig 3. Mapa de la ubicación las estaciones del SIMAT (INEGI 2009).....	32
Fig 4. Matriz de excitación-emisión de antraceno en acetonitrilo.....	34
Fig 5. Matriz de excitación-emisión de benzo(a)pireno en acetonitrilo.....	35
Fig 6. Matriz de excitación-emisión de 2,3-benzoantraceno en acetonitrilo.....	36
Fig 7. Matriz de excitación-emisión de criseno en acetonitrilo.....	37
Fig. 8. Matriz de excitación-emisión de pireno en acetonitrilo.....	37
Fig. 9. Matriz de excitación-emisión de fenantreno en acetonitrilo	38
Fig. 10. Matriz de excitación-emisión de aceite de maíz comercial 1.2.3.....	39
Fig. 11. Compuestos utilizados como antioxidantes en aceite maíz comercial.....	40
Fig. 12. Curva patrón de antraceno en acetónirilo realizada a 250 nm de λ de excitación y a 400 nm de λ emisión.	41
Fig. 13. Curva patrón de criseno en acetónirilo realizada a 270 nm de λ de excitación y a 364 nm de λ emisión.....	42
Fig. 14. Curva patrón de benzo(a)pireno en acetónirilo realizada a 290 nm de λ de excitación y a 406 nm de λ emisión.	42
Fig. 15. Curva patrón de fenantreno en acetónirilo realizada a 250 nm de λ de excitación y a 392 nm de λ emisión.	43
Fig. 16. Matriz de excitación-emisión de antraceno en acetonitrilo.	44
Fig. 17. Matriz de excitación-emisión de criseno y antraceno en acetonitrilo.....	45
Fig. 18 Matriz de excitación-emisión de antraceno y 2,3 benzoantraceno en acetonitrilo.	46

Fig. 19 Matriz de excitación-emisión de criseno y 2,3 benzoantraceno en acetónitrilo.....	47
Fig. 20. Curva patrón del volumen bajo la curva de las MEE de antraceno en acetónitrilo.	50
Fig. 21. Matriz de excitación-emisión de una muestra de aceite contaminada con 5 ng/ml de una mezcla de HPAs.	52
Fig. 22. Matriz de excitación-emisión de la muestra de aceite de maíz comestible del área de Tlanepantla recolectada después de un mes.....	53
Fig. 23. MEE de una muestra de aceite de maíz recolectada de un puesto de comida ubicado en la carretera federal México-Cuernavaca.....	59

RESUMEN.

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) son xenobióticos orgánicos semivolátiles generados a partir de la combustión incompleta de compuestos de carbono que se liberan a la atmósfera. En el aire se condensan con partículas de polvo a las que estamos expuestos por vía respiratoria, oral y dérmica. Dependiendo del HPA ingerido, se puede presentar anemia, teratogenicidad, carcinogenicidad, melanosis de colon, hepatomegalia, esplenomegalia, etc. En humanos es difícil evaluar los efectos individuales de los HPAs ya que se encuentran mezclados, no son los únicos contaminantes a los que estamos expuestos y se desconoce a qué concentración. En función de su estructura los HPAs presentan patrones específicos de fluorescencia la cuál puede utilizarse como técnica de medición para determinar concentraciones del orden de ppm. El objetivo de esta tesis fue el de desarrollar una metodología para medir cuantitativamente los HPAs presentes en muestras de aceite comestible recolectadas de diversos puntos de la Ciudad de México y zonas conurbadas, las cuales se usaron para cocinar alimentos.

Se realizaron las matrices de excitación-emisión (MEE) de diferentes marcas de aceite comestible y de 14 PAHs a una concentración de 10 ng/mL. Se realizó una curva patrón con el HPA que tenía el valor de VBC más cercano al promedio de todos los HPAs analizados. Basados en esta curva medimos de manera cuantitativa la concentración de HPAs totales en una muestra en equivalentes de antraceno considerando que la intensidad de fluorescencia y la concentración total de HPAs son directamente proporcionales.

Se desarrolló un método cuantitativo efectivo, preciso y lineal para la determinación de HPAs disueltos en aceite. El método tiene un límite de detección de 1 ng/ml y las muestras no necesitan ser tratadas por lo que no se generan desperdicios y se disminuyen los costos de análisis, además de que la metodología puede ser utilizada con otras matrices.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un problema grave de contaminación mundial, sobre todo en grandes ciudades como la Ciudad de México (Comisión Nacional Metropolitana, 2001; Baez y col., 1988). En esta ciudad el número creciente de automóviles sobrepasa los 4.5 millones (IIJ, 2008) y hay cerca de 35 mil industrias localizadas dentro de las zonas conurbadas y localizadas dentro de una cuenca que favorece la retención de emisiones contaminantes. Todo esto ha provocado que se agudice la contaminación del aire de la ciudad (Comisión Nacional Metropolitana, 2001). Dentro de los múltiples contaminantes que se liberan a la atmósfera, están los hidrocarburos poliaromáticos (HPA) resultantes de la combustión incompleta del carbón y combustibles fósiles (Chung-Yih y col., 2006). La importancia de los HPAs radica en el potencial tóxico o carcinógeno para humanos y animales (Pott 1775, IARC 1983; WHO, 1998). En el aire, los HPAs tienden a asociarse a partículas de polvo, las cuales se sedimentan contaminando agua y suelo.

Las emisiones industriales y automotrices son responsables de gran parte de la generación de HPAs, aumentado con la edad del vehículo y con la falta de uso de catalizador (INEM, 2006; Boström y col., 2002). Nos pareció interesante analizar los HPAs depositados en el aceite comestible ya que su lipofilidad les permite disolverse y acumularse en el aceite utilizado en puestos de comida localizados en zonas de alto tráfico vehicular y en zonas industrializadas. Los alimentos fritos que venden estos negocios son consumidos por un gran número de personas.

Este proyecto consistió en el desarrollo de una metodología para cuantificar la presencia de los HPAs en cantidades de ppm, ya que las técnicas utilizadas comúnmente como HPLC-UV, HPLC-espectroscopía de fluorescencia, GC-FID, EM-GC, etc. son complejas, requieren de tratamiento previo de las muestras utilizando solventes y generando muchos residuos, aumentando los costos del análisis y contaminando. Las técnicas mencionadas son lentas o no son sensibles a concentraciones del orden de ppm de los analitos a detectar. Para desarrollar dicha metodología decidimos aprovechar que los HPAs en solución presentan espectros de fluorescencia altamente específicos.

Después de desarrollar la metodología, decidimos colocar muestras de aceite en diferentes estaciones de Monitoreo Ambiental coordinadas por el Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT) de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) para observar la relación entre la concentración de HPAs obtenida, el tipo de zona en donde la muestra fue colocada y la concentración de PMs reportados. También aplicamos la metodología establecida a muestras de aceite comestible recolectadas directamente de puestos de comida frita en diferentes zonas donde sabemos que hay exposición a contaminación por deposición de HPAs.

1. Hidrocarburos poliaromáticos (HPAs)

Los HPAs son xenobióticos orgánicos semivolátiles altamente hidrofóbicos cuya estructura química consta de dos o más anillos fusionados. Se generan a partir de la combustión incompleta de material orgánico y se liberan al medio ambiente en cantidades medibles como ppm (Böstrom y col. 2002). En la atmósfera se encuentran en fase gaseosa cuando su estructura es de 2 anillos bencénicos, cuando tienen de 2-4 anillos se pueden presentar como gases o como partículas (Thornhill, 2007). En caso de estar conformados por más de 5 anillos se presentan como partículas sólidas que en forma condensada se asocian con partículas que no tienen composición definida (polvo, hollín, polen, etc.).

Los HPAs se generan durante los incendios forestales, las erupciones volcánicas, el funcionamiento de motores de combustión interna, el refinamiento del petróleo, el consumo de tabaco, la gasificación de carbono, en las plantas de producción de aluminio, en las fundidoras de acero y hierro, en las plantas térmicas y en las de asfalto (Straif y col. 2006). Además, los HPAs se utilizan en la producción de pesticidas, tintas, plásticos y asfalto (ATSDR, 1995).


Las emisiones de los vehículos producen partículas conteniendo HPAs y Nitro/HPAs de entre 0.05 y 1.00 μm , por lo que al respirarse son suficientemente pequeños como para alcanzar a los alveolos pulmonares presentando una gran absorbencia (Koss y Tesseraux, 1999). Dichas partículas permanecen en el aire pegadas a

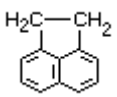

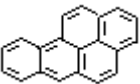
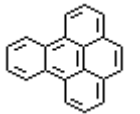
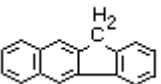

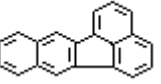
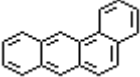
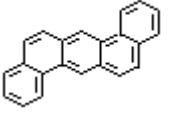
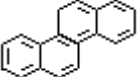
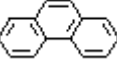
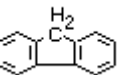
partículas de polvo; si llegan a depositarse en agua (lagos, ríos) sedimentan en el fondo por no ser solubles; en caso de caer al suelo existen microorganismos que los degradan en unas semanas o meses e inclusive pueden llegar a filtrarse contaminando los mantos subterráneos (Böstrom y col., 2002).

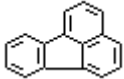
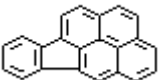


Existen más de 100 diferentes HPAs que generalmente se producen como mezclas. La mayoría son sólidos cristalinos color blanco o ligeramente amarillento. La EPA (Environmental Protection Agency) ha clasificado a 16 HPAs como contaminantes químicos prioritarios. En la tabla 1 se muestran sus estructuras químicas y algunas de sus propiedades fisicoquímica- En general, los HPAs presentan estructuras cíclicas con enlaces conjugados que los hacen fluorescentes- Además, tienen puntos de ebullición mayores a 250°C, lo que los hace poco volátiles. (EPA, 2008). Por otra parte la ATSDR ha clasificado a 17 contaminantes prioritarios que incluyen a los mencionados en la tabla 1 más el benzo(e)pireno (ATSDR, 1995). Ambas clasificaciones se basan en la alta toxicidad de dichos HPAs, a que exhiben efectos tóxicos representativos, a que existe mayor probabilidad de exponerse a éstos porque se encuentran en mayores concentraciones en sitios de desechos y a que algunos tienen posibles propiedades carcinógenas (ATSDR, 1995). Algunos de estos HPAs presentan actividad carcinogénica, mutagénica o inmunosupresora (Koss y Tesseraux 1999).

Los HPAs tienden a participar en reacciones de sustitución electrofílica aromática, involucrando la sustitución de un electrófilo por un protón, en donde el anillo bencénico funciona como fuente de electrones o base, por lo que reacciona con compuestos deficientes de electrones o ácidos.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos poliaromáticos.

HPA	Formula	Aspecto	Propiedades
Acenaftileno C ₁₂ H ₈ PM: 152.2		Sólido blanco	mp: 92°C ρ: 0.899

Acenafteno $C_{12}H_{10}$ PM: 154.2		Sólido blanco	mp: 95°C bp: 279°C ρ : 1.024 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: $3.9 \cdot 10^4$
Antraceno $C_{14}H_{10}$ PM: 178.2		Sólido incoloro, que muestra fluorescencia azul al exponerse a luz ultravioleta.	mp: 216.4°C bp: 342°C ρ : 1.283 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 73
benzo(a)pireno $C_{20}H_{12}$ PM: 252.3		Sólido amarillo	mp: 178.1°C bp: 496°C ρ : 1.351 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 3.8
benzo(e)pireno $C_{20}H_{12}$ PM: 252.3		Sólido amarillo pálido	mp: 178.7°C bp: 493°C Sol _{H2O 23°C} $\mu\text{g/L}$: 5.07
benzo(b)fluoranteno $C_{20}H_{12}$ PM: 252.3		Sólido incoloro	mp: 168.3°C bp: 481°C Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 1.2
benzo(ghi)perileno $C_{22}H_{12}$ PM: 276.3		Sólido amarillo verdoso pálido	mp: 278.3°C bp: 545°C ρ : 1.329 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 0.26
benzo(k)fluoranteno $C_{20}H_{12}$ PM: 252.3		Sólido amarillo pálido	mp: 215.7°C bp: 480°C Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 0.76
benzo(a)antraceno $C_{18}H_{12}$ PM: 228.3		Sólido incoloro	mp: 160.7°C bp: 400°C ρ : 1.226 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 14
dibenzo(a,h)antraceno $C_{22}H_{14}$ PM: 278.4		Sólido incoloro	mp: 266.6°C bp: 524°C ρ : 1.282 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 0.5
Criseno $C_{18}H_{12}$ PM: 228.3		Sólido incoloro, que muestra fluorescencia azul al exponerse a luz ultravioleta.	mp: 253°C bp: 448°C ρ : 1.274 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 2
Fenantreno $C_{14}H_{10}$ PM: 178.2		Sólido incoloro	mp: 100.5°C bp: 340°C ρ : 0.980 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: $1.29 \cdot 10^3$
Fluoreno $C_{13}H_{10}$ PM: 166.2		Sólido blanco	mp: 116°C bp: 295°C ρ : 1.203 Sol _{H2O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 198

Fluoranteno $C_{16}H_{10}$ PM: 202.3		Sólido amarillo pálido	mp: 108.8°C bp: 375°C ρ : 1.252 Sol _{H₂O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 260
Indeno(1,2,3-c,d)pireno $C_{22}H_{12}$ PM: 276.3		Sólido amarillo	mp: 163.6°C bp: 536°C ρ : 1.329 Sol _{H₂O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 0.26
Naftaleno $C_{10}H_8$ PM: 128.2		Sólido blanco	mp: 81°C bp: 217.9°C ρ : 1.154 Sol _{H₂O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 3.17
Pireno $C_{16}H_{10}$ PM: 202.3		Sólido incoloro	mp: 150.4°C bp: 393°C ρ : 1.271 Sol _{H₂O 25°C} $\mu\text{g/L}$: 135

Datos tomados del "The Merck Index, 12th Ed."

1.1 Biotransformación y toxicidad

La exposición a los HPAs ocurre por tres vías principalmente: respiratoria, dérmica y oral. La ruta de administración condiciona el tejido en que puede generarse un tumor. Por ejemplo en caso de ingesta, existe el riesgo de adenoma colorectal y cáncer pancreático (WHO 1998).

Las principales fuentes de exposición a HPAs son la inhalación de humo de tabaco, de madera quemada, humo de automóviles e industriales y la ingesta a través de alimentos ya sea por deposición en éstos, por crecimiento de plantas en suelos contaminados o por el procesamiento de los alimentos (WHO, 1998). Al ser compuestos de naturaleza hidrofóbica los HPAs atraviesan membranas celulares fácilmente, absorbiéndose principalmente en tejido pulmonar, tracto gastrointestinal y tejido epitelial; dependiendo de la vía de exposición los HPAs y sus metabolitos pueden hallarse en casi todos los tejidos en roedores acumulándose en tejido graso, riñón, hígado, glándulas adrenales y ovarios (WHO, 1998).

La biotransformación de los HPAs tiene como fin hacerlos más hidrosolubles para favorecer su eliminación. Al ser estructuralmente parecidos, su metabolismo es semejante y puede darse de dos formas, una es por la vía del citocromo P450 y la

otra es por medio de un sistema de oxidasas de función mixta (MFO) que catalizan varias reacciones. En este punto cabe recordar que la Fase I comprende la oxidación, reducción ó hidrólisis de la molécula original. El principal sistema responsable de la oxidación de sustratos está constituido por el sistema citocromo P450 (CYP) que es una familia de hemoproteínas con actividad de monooxigenasas. En los mamíferos, el CYP se encuentra presente en la mitocondria y en diversos tipos de membranas celulares, siendo particularmente activo en el hígado y específicamente abundante en retículo endoplasmático liso (microsomias). En la Fase II, participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena tales como ácido glucorónico, sulfatos, acetatos, el glutatión o algunos aminoácidos. Las enzimas que están involucradas en este proceso son principalmente, la UDP-glucuronosiltransferasa (UDPGTSs) y la glutatión-S-transferasa (GSTs). La ruta principal para compuestos electrofílicos es la conjugación con glutatión, mientras que los compuestos nucleofílicos son conjugados con ácido glucorónico. El objetivo final de ambas fases es transformar los compuestos xenobióticos en compuestos hidrofílicos y así facilitar su excreción a través de la orina o la bilis (Stephen, 1994; Oost et al., 2003; Orellana y Guajardo, 2004).

Los HPA son precarcinógenos inofensivos, pero al ser epoxidados por el citocromo P450 forman metabolitos intermediarios con características carcinógenas. Los diolepóxidos, tienen en su estructura una región “bahía” o L que es una zona en donde los anillos bencénicos forman una estructura cóncava de diferente densidad electrónica y diferente reactividad que posee propiedades electrofílicas altas que permiten la formación de iones carbonio (Troche y col., 2005). Estos compuestos funcionan como agentes alquilantes que forman aductos covalentes con el ADN y con proteínas produciendo mutaciones en proto/oncogenes y causando tumores en animales. (Koss y Tesseraux, 1999).

Como se mencionó previamente los HPAs se asocian con diferentes tipos de cáncer. La toxicidad depende de la dosis a la que se es expuesto, el tiempo de exposición, la ruta de exposición o de administración, el vehículo de administración, la exposición simultánea a otros agentes químicos, las características del individuo,

el estilo de vida de éste, etc. (ATSDR 1995). Por lo anterior, es difícil evaluar la toxicidad de dichos compuestos en humanos. Sin embargo, se han realizado estudios ocupacionales que muestran los efectos carcinógenos de estas mezclas en personas que trabajan en refinerías, obras de pavimentación, minas de carbón, limpiando chimeneas, etc. (WHO, 1998). También se encontró que los pacientes que tomaron un tipo de laxantes con antraceno (no se reporta la cantidad) presentaron mayor incidencia de melanosis de colon y recto (Badiali y col. 1985).

La EPA ha clasificado como carcinógenos y genotóxicos a los siguientes HPAs: antantraceno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(c)fenantreno, benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, criseno, ciclopenta[cd]pireno, dibenz[a,h]antraceno, dibenzo[a,e]pireno, dibenzo[a,h]pireno, dibenzo[a,i]pireno, dibenzo[a,l]pireno, fluoranteno e indeno(1,2,3-cd)pireno. Existen otros HPAs como son el benzo(ghi)perileno y el benzo(ghi)fluoranteno que únicamente se clasifican como genotóxicos (WHO. 1998). Se ha reportado que el benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno y el dibenzo(a,h)antraceno producen tumores en hígado, glándulas mamarias, y en el tracto respiratorio y gastrointestinal (Neal y Rigdon, 1967).

El SIMAT en su reporte de 2008 indica un incremento en el riesgo de la mortalidad infantil del 18.2% por cada incremento de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en la concentración de partículas finas. Otro estudio que muestra el impacto de una exposición permanente a la contaminación por partículas se puede observar en los resultados del estudio de Churg y Brauer (1997) quienes realizaron autopsias de individuos que pasaron toda su vida en el Distrito Federal. Tomaron muestras de tejido pulmonar de individuos no fumadores y encontraron una cantidad de partículas retenidas en los pulmones mayor a 7.4 veces que la de personas fallecidas que habitaban en Vancouver, que es una ciudad con niveles bajos de partículas.

El fenantreno, el benzo(ghi)pireno, el antraceno, el fluoranteno, el fluoreno, el criseno y el pireno han sido reportados por la EPA como no clasificables como carcinógenos, es decir, no hay evidencia suficiente para sospechar de éstos; sin embargo, se ha comprobado que presentan otros efectos tóxicos. Por ejemplo, el fenantreno que se produce por emisiones vehiculares e industriales, posee

características hepatotóxicas al ser administrado vía intraperitoneal. Se reporta que en ratones la DL₅₀ intravenosa es de 56 mg/kg y la DL₅₀ intraperitoneal es de 700 mg/kg (ATSDR, 1995). El antraceno por su parte causa dermatitis aguda y a una dosis de 2.44 g/kg en ratón produce astenia, leucocitosis, hiperemia de hígado, riñón, corazón, pulmón, etc.; la dosis de 17 g/kg no resultó letal (RISK, 1997).

El benzo(a)pireno [B(a)P] es el HPA carcinogénico más estudiado; se ha reportado que éste induce tumores en ratones, hámster, changos, etc. y en humanos se reporta que causa cáncer de pulmón y de piel. Las ratas alimentadas con B(a)P durante el embarazo presentaron problemas reproductivos, sus crías presentaron defectos congénitos, problemas respiratorios, defectos en el sistema inmune, bajo peso corporal (WHO, 1998), esterilidad, disminución del peso de ovarios y útero, alteración de gónadas y desarrollo alterado de células germinales (RISK 1997).

1.2 Contaminación de alimentos

Los HPAs pueden encontrarse en cantidades significativas en alimentos, como son vegetales, fruta, carne, alimentos procesados, escabechados, leche y agua. Al cocinar en exceso la comida se producen HPAs adicionales, los cuáles aumentan considerablemente cuando se fríe, ahúma o se cocina con carbón como fuente de calor. Los procesos de cocción generan una mezcla de HPAs y generalmente, se toma el benzo(a)pireno como referencia ya que este compuesto suele constituir del 1 al 15 % de la concentración total de HPAs de la muestra (Vives y col. 2001).

Se reporta en el Reino Unido que el 80% del consumo de B(a)P viene de cereales y aceites (Conte y Moret, 2000). Esto se debe a que las plantas cultivadas para estos alimentos pueden crecer en suelos contaminados por HPAs, o bien se pueden regar con agua contaminada. Además muchos de los pesticidas utilizados contienen HPAs. Cuando se procesan los cereales y aceites pueden contaminarse en el secado de semillas con humo y finalmente al cocinarse están de nuevo expuestos a la contaminación por HPAs por deposición atmosférica (Conte y Moret, 2000).

La Unión Europea ha establecido un límite máximo de B(a)P para alimentos sin preparar, de 0.03 µg/kg. Países como Francia, Alemania, Suiza y Austria han establecido un límite de 1 µg/kg en alimentos ahumados. España por su parte establece un límite para benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(a)fluoranteno, benzo(ghi)pireno, benzo(e)pireno benzo(b)fluoranteno dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-c,d)pireno menor o igual a 2.0 µg de B(a)P/kg de aceite comestible o que la suma de estos no sobrepase de 5 µg/kg (European Commission Regulation (EC) 208/2005). La EPA aprueba el consumo diario de 0.3 mg de antraceno, 0.04 mg de fluoreno y 0.03 mg de pireno/kg de peso del individuo (ATSDR, 1995). En México no se ha establecido una legislación para el control de HPAs presente en alimentos.

1.3 HPA's como problema de contaminación en la ciudad de México

La contaminación en México es mayor en zonas urbanas densamente pobladas e industrializadas con excesivo parque vehicular como es el caso del centro del país (Comisión Nacional Metropolitana, 2001; Baez y col., 1988, IIJ, 2008). El DF con su zona conurbada se encuentra dentro de las 10 ciudades más grandes del mundo y en 2007 contaba con 4.5 millones de automóviles y se estima que actualmente circulan 5.6 millones de autos (IIJ, 2008).

La tasa de emisión de contaminantes de un vehículo depende de la sustancia que se quiera monitorear, de la antigüedad del vehículo, del tipo de combustible y del motor entre otras cosas (WHO, 1998). La edad promedio de los vehículos de pasajeros en el D.F. es de 6.1 años y la del transporte de carga llega a promediar 18 años de antigüedad y aparte, se calcula que el 30% de los vehículos de pasajeros no tienen catalizador lo que aumenta sus emisiones (WHO, 1998). Los vehículos también almacenan HPAs en el aceite aumentando la concentración de éstos con el uso. Después de usarse, este aceite se desecha ya sea al drenaje contaminando el agua y el suelo, o se quema contaminando el aire con los HPAs que libera (Vazquez-Duhalt, 1989).

Los indicadores de calidad del aire en la Ciudad de México señalan que hay un problema de contaminación severo. Se piensa que los contaminantes “criterio” son los más perjudiciales para la salud y el bienestar de los humanos: $-\text{SO}_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{Pb}$, CO , O_3 , H_2S y material particulado (PM) (SIMAT 2008). Este último se refiere a una mezcla compleja de materia suspendida en el aire, se forma en procesos de polinización, incendios, polvo, fertilización de campos, y sobre todo en el transporte. La cantidad de partículas sólidas totales (PST) liberadas es del orden de ng/km en automóviles recientes y llegan a ser mayores de $1000 \text{ mg}/\text{km}$ en automóviles viejos en una ciudad en donde se circulan aproximadamente $150,000,000 \text{ km}/\text{día}$ (WHO, 1998). Las PST se clasifican a su vez en PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$, refiriéndose al diámetro de la partícula, menor a 10 micras y menor a 2.5 micras respectivamente. Los HPAs se pegan a los PMs permaneciendo así en el aire como polvo para posteriormente contaminar los suelos y aguas por deposición (Thornhill, 2007).

La NOM 025 establece el valor máximo de PST y PM_{10} como $210 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 horas y $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio anual, el valor máximo aceptado para $\text{PM}_{2.5}$ es de $65 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 horas y $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio anual.

El gobierno del DF cuenta con 36 estaciones automáticas de monitoreo ambiental, 24 en el Distrito Federal y 12 en el Estado de México. Estas estaciones monitorean el aire de la ciudad cada minuto durante las 24 horas del día. Con estos datos determinan la variación entre temporadas del año observando un promedio mayor de PST en temporadas frías mientras que hay una disminución notable en época de lluvias. A su vez, se observa la variación de la cantidad de contaminantes durante el día y ésta presenta dos picos: uno en la mañana y otro en la tarde ya que de los 20.57 millones de viajes realizados en la zona metropolitana, se realizan el 33% de 6 a 9 de la mañana y se presenta mayor contaminación los viernes y los sábados (Thornhill, 2007). De 2007 a 2008 se ha incrementado en un 6% los niveles de partículas totales suspendidas con un 3% de aumento para las PM_{10} y las $\text{PM}_{2.5}$ (SIMAT, 2008)

Se reporta que en 2007, el 40% de los días del año las PM_{10} excedieron los límites recomendados (Thornhill, 2007). El informe anual del SIMAT de “Calidad de Aire en la Ciudad de México del 2008” señala el incumplimiento de los valores señalados en

la NOM-025 (Norma Mexicana 025 SSA1-1993) para la calidad del aire publicada por la Secretaría de Salud en el Diario Oficial de la Federación el 23/12/1994, para proteger la salud de la población, indicando que alrededor de 7.3 millones de habitantes viven en zonas donde el promedio anual de PM_{10} excede de los $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Estas zonas se encuentran en municipios conurbados del Estado de México en la zona norte y poniente.

Según el INEM (Instituto Nacional de Emisiones de México) los vehículos motorizados son la principal fuente antropogénica de emisión de contaminantes de aire en México. Los vehículos son responsables del 59% de $PM_{2.5}$, 24% de PM_{10} , 34% de compuestos orgánicos volátiles y 28% de otros contaminantes tóxicos, la industria es responsable del 16% de las PM_{10} .

2. Fluorescencia

La fluorescencia es la emisión de luz por un material como consecuencia de la absorción de energía causada por la incidencia de rayos ultravioleta o visibles. Cuando una molécula recibe la energía de una radiación incidente, los electrones de los átomos del material luminiscente se excitan y saltan a un nivel de mayor energía; cuando los electrones vuelven a su estado original, se emite un fotón de luz. La luz producida es de menor energía o sea de mayor longitud de onda que la luz incidente. La diferencia de energía entre la absorción y la emisión es disipada como calor. El intervalo entre la excitación de los electrones y la emisión de luz para fluorescencia debe ser menor a 10^{-8} segundos; en caso de ser mayor a este tiempo se produce un fenómeno conocido como fosforescencia (Harris, 2001).

Las moléculas poseen diferentes estados llamados niveles energéticos y cada uno de ellos tiene diferentes niveles vibracionales. En general, los HPAs tienen un estado electrónico basal (S_0) que es de baja energía y uno o varios estados electrónicos excitados de mayor energía (S_1 , S_2). En la espectroscopía de fluorescencia se excita la muestra mediante la absorción de un fotón de luz, pasa de su estado basal a uno de los distintos estados vibracionales de mayor energía y en una segunda fase las colisiones entre moléculas excitadas y el disolvente provocan

una relajación vibracional; es decir, que la molécula excitada pierde energía vibracional transfiriéndola a las moléculas del disolvente hasta regresar al estado electrónico basal. En caso de haber más de un estado electrónico excitado se da un relajamiento no radiante entre el nivel inferior de un estado electrónico excitado y el nivel superior de otro estado. Posteriormente, la molécula desciende a los niveles de vibración del estado electrónico basal emitiendo un fotón. La fluorescencia se da normalmente del nivel más bajo de energía vibracional del estado S_1 y cae a cualquiera de los niveles de vibración del estado basal por lo que los fotones emitidos tendrán diferentes energías y diferentes frecuencias (Whery, 1976). En la figura 1 se muestra el esquema de Jablonoski el cual representa los mecanismos moleculares para producir fluorescencia.

La fluorescencia es una propiedad que presentan los compuestos que contienen anillos aromáticos. Los compuestos alifáticos con dobles enlaces conjugados también pueden presentarla. Los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en solución. La relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas aumenta proporcionalmente con el número de anillos y con su grado de conjugación (Whery 1976). La fluorescencia que emite un HPA en solución acuosa es altamente específica debido a su estructura. Los HPAs poseen una estructura rígida que impide movimientos vibratoriales y tienen electrones deslocalizados (Christensen y col. 2005). A bajas concentraciones, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración del fluoróforo.

La espectrofluorimetría de fluorescencia nos sirve para hacer un análisis de las diferentes frecuencias de luz absorbida y emitida. Las moléculas excitadas también pueden relajarse mediante conversión a un estado triplete el cual se relaja por fosforescencia.

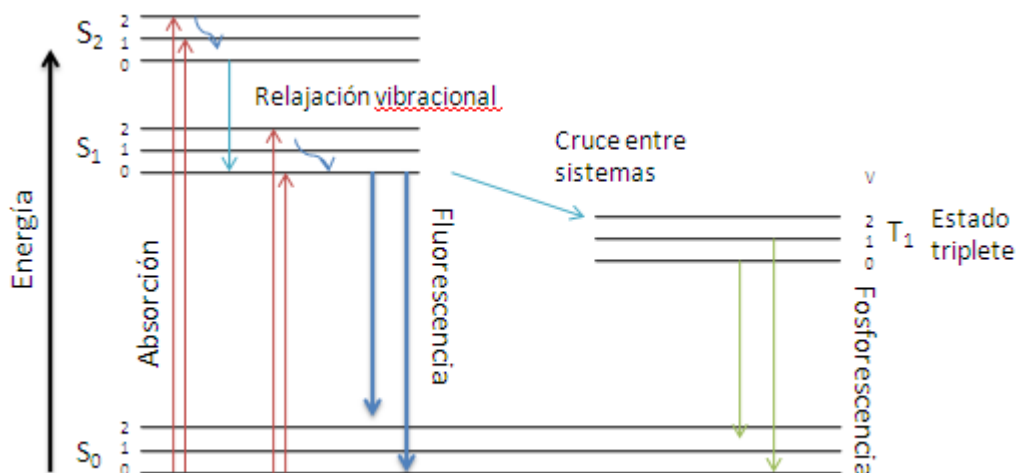


Figura 1. Esquema de Jablonski. Es la representación de los mecanismos moleculares para producir fluorescencia. Un electrón se excita pasando del nivel de energía S₀ al nivel energético S₁, en caso de pasar al S₂ sufre una relajación vibracional bajando al nivel energético S₁. Cuando el electrón baja de nivel energético del S₁ a su nivel basal, se libera un fotón produciendo fluorescencia.

Un espectrofluorómetro consta de una fuente de luz, un espacio para colocar la muestra, dos filtros o monocromadores y un detector (Whery 1976)(Fig. 2). La fuente de luz puede ser de láser, fotodiodos o lámparas de xenón o de vapor de mercurio. La sensibilidad del aparato es directamente proporcional a la potencia de la fuente. Ésta produce un haz de luz que pasa a través de un monocromador o filtro que selecciona la longitud de onda que transmite e incide sobre la muestra. Una parte de esta luz es absorbida y emitida es decir, se produce fluorescencia. La luz fluorescente pasa por un segundo filtro o monocromador que se encuentra a 90° con respecto a la luz incidente para minimizar el riesgo de que la luz incidente reflejada sea transmitida y llegue al detector. Se necesitan factores de amplificación altos para estas medidas ya que las señales típicas de fluorescencia son bajas. Los “slits” son ventanas que sirven para ajustar el rango de longitud de onda y la cantidad de luz emitida y captada, a mayor apertura del slit, mayor sensibilidad y menor selectividad.

Una matriz de emisión-excitación (MEE) es un perfil del espectro total de fluorescencia de un compuesto sobre un rango preestablecido de longitudes de

onda. Es proporcional a la concentración de la sustancia y funciona como huella digital. Para una mezcla de HPA, el MEE obtenido debe ser igual al obtenido por la suma de los espectros (Beltrán y col. 1998).

La espectrofluorimetría de fluorescencia presenta como ventajas que posee una alta sensibilidad ya que puede leer muestras en el orden de ppm y ppb (Booksh y col. 1999). No es necesario un tratamiento de la muestra ni hace falta concentrarla. Es una técnica no destructiva, no requiere uso de solventes, lo que disminuye los costos y la generación de residuos. Sin embargo, esta técnica posee poca selectividad ya que las señales de una mezcla de HPAs se pueden sobreponer en una MEE obteniendo la suma de los espectros. Las MEE son útiles para medir e identificar material orgánico disuelto en muestras como pesticidas y HPA's (Booksh y col. 1999).

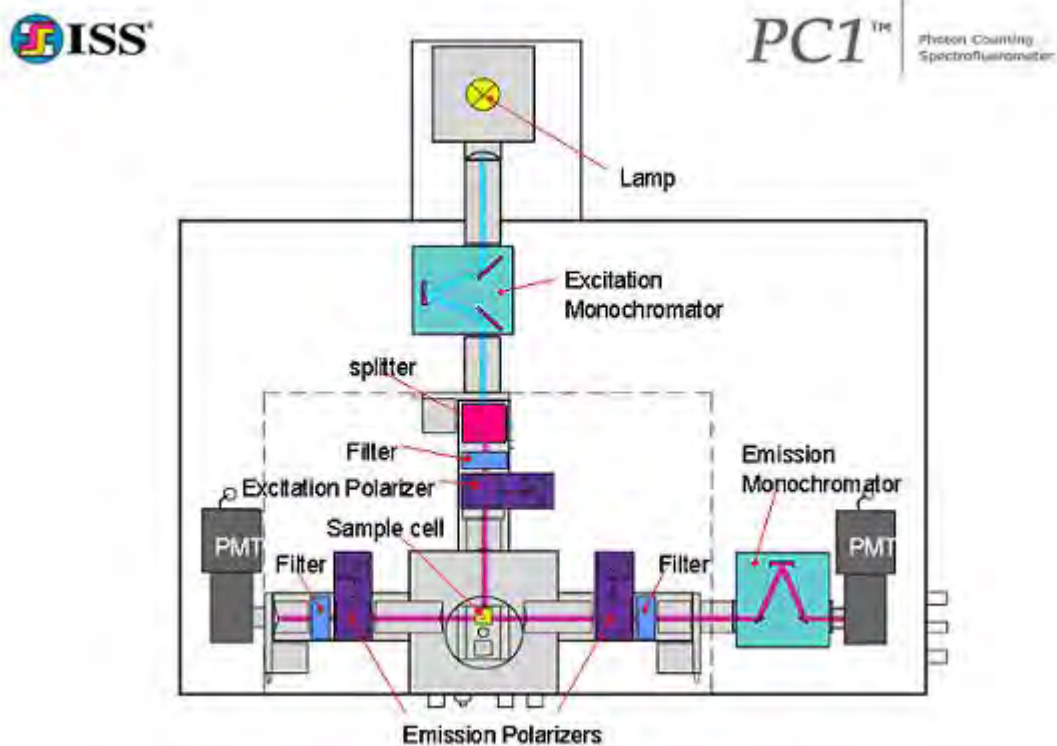


Figura 2. Esquema del funcionamiento de un espectrofluorómetro. La radiación de la fuente de luz pasa a través de un sistema óptico y de los filtros para concentrar el haz y seleccionar la longitud de onda de excitación. El haz de luz atraviesa la cubeta donde está la muestra, esta emite fluorescencia en todas direcciones en una longitud de onda mayor a la usada para la excitación. El sistema óptico de emisión filtra la luz a la longitud de onda deseada que es proyectada hacia el detector que, por medio de un fotomultiplicador, nos da el resultado en unidades de fluorescencia. Fig. tomada de: http://iss.com/resources/research/technical_notes/PC1_MeasquantumYldVinci.html

Los factores que influyen en la fluorescencia son: la temperatura, ya que a mayor temperatura menor fluorescencia porque hay más colisiones entre las moléculas aumentando la probabilidad de desactivación por relajamiento no radiante. La viscosidad ya que una disminución en la viscosidad del solvente también aumenta la posibilidad de relajamiento no radiante. El pH, que afecta la medición en caso de que el analito tenga o no sustituyentes ácidos o básicos. Finalmente, la concentración del fluoróforo es importante ya que cuando éste aumenta, se incrementa el número de colisiones entre moléculas, que es lo que provoca el fenómeno de absorción/fluorescencia provocando un apagamiento que disminuye la fluorescencia por la competencia de desactivación del fluoróforo con otras moléculas del mismo analito o con otra sustancia como puede ser el oxígeno; este fenómeno es conocido como apagamiento o “quenching” (Harris, 2001).

Existen múltiples distorsiones derivadas del instrumento. El haz de luz y su longitud de onda pueden variar a través del tiempo durante cada experimento y ninguna lámpara tiene intensidad constante en todas las frecuencias. La lámpara de arco de xenón tiene una intensidad casi constante en el rango de 300-800 nm. El rendimiento de los filtros y monocromadores varía con el tiempo. La fluorescencia a longitudes de onda de emisión debajo de las longitudes de onda de excitación es físicamente imposible. Puede haber la luz emitida a la misma longitud de onda que la luz incidente a lo que se llama dispersión de Raleigh.

3. Establecimiento de una metodología analítica.

Un procedimiento analítico se refiere a la forma en que realizamos el análisis de las muestras para determinar de manera cualitativa o cuantitativa el contenido de un analito o de las impurezas presentes en una muestra. Las características a evaluar para poder validar un procedimiento analítico son:

Especificidad: Poder identificar al analito en presencia de otras sustancias que se esperaría estén presentes en la muestra.

Linealidad: Se refiere a poder obtener, dentro de un rango, resultados o respuestas que sean directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito. Para

establecer la linealidad se recomienda emplear 5 o más concentraciones diferentes. Hay que establecer un intervalo entre los niveles de dilución más altos y bajos para los cuales el procedimiento analítico es válido. La R^2 recomendada para que un método analítico se considere válido debe ser mayor al 0.97.

Exactitud: Expresa el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente con el valor real o nominal (OAA, 2003).

Precisión: La medida en que los valores de réplicas de una serie de ensayos analíticos que se realizan en una muestra homogénea son semejantes entre sí, el grado de reproducibilidad del método bajo las mismas condiciones. El coeficiente de variación aceptado para la precisión de un método es de 3% (OAA, 2003).

Selectividad: La capacidad del método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, excipientes, etc. presentes en la muestra. (Beltrán y col. 1998).

ANTECEDENTES.

Se hizo una revisión bibliográfica en búsqueda de reportes de metodologías para determinar HPAs en aceites comestibles. A continuación se describen estas técnicas, la mayoría utiliza extracciones o tratamientos previos de la muestra, uno o varios pasos de separación y equipos complejos o acoplados a otros-

El protocolo publicado por DIONEX (2008) para la cuantificación de HPAs por medio de cromatografía en columna de afinidad como fase estacionaria, indica que las muestras se agregaron a la columna sin ser tratadas ni extraídas de la matriz oleosa. La columna retuvo los HPAs separándolos de la matriz; para extraerlos, lavaron la columna con solventes y los inyectaron en el HPLC. Requirieron de aproximadamente 80 min., mientras que otras técnicas tardan entre 8 y 10 horas y el porcentaje de recuperación varió del 70 al 131%.

Manoj y col. (2004) realizaron una extracción de HPAs a partir de 10 g de muestra disuelta en n-heptano y realizaron extracciones líquido-líquido varias veces con dimetoxisulfóxido (DMSO). Posteriormente agregaron agua a la fracción de DMSO y extrajeron con ciclohexano. La muestra se concentró, se pasó por una columna de sílica con sulfato de sodio anhidro y se eluyó con ciclohexano y diclorometano. La muestra se evaporó a sequedad y resuspendió en acetonitrilo para poder inyectar al HPLC. Los resultados obtenidos muestran que el 88.5% de las muestras de aceite estaban contaminados. Su método tiene un límite de detección de 0.1 ng a 4 ng dependiendo del compuesto evaluado.

Wegryzn y col. (2006) realizaron dos experimentos, por un lado tomaron muestras de comida que molieron y extrajeron los HPAs con diclorometano y cloroformo. Llevaron las muestras a sequedad y resuspendieron en acetonitrilo. Por otro lado contaminaron muestras de aceite para usarlas como controles del método, las cuales diluían 1:5 con diclorometano. Todas las muestras fueron sometidas a cromatografía de exclusión molecular, eluyendo con acetonitrilo y diclorometano. Concentraron las muestras, las resuspendieron en acetonitrilo y las inyectaron en el HPLC. Los métodos desarrollados por Manoj y Wegryzn utilizaron una gran cantidad de solventes y tardaron mucho tiempo al hacer las extracciones.

Arrebola y col. (2001) realizaron un análisis de la muestra por medio de una cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (CG-MS). Desarrollaron una técnica sencilla porque no hay preparación ni purificación de la muestra. Sin embargo los HPAs deben ser estables y resistentes a la degradación a altas temperaturas por tiempos prolongados. Esta técnica es efectiva para HPAs semivolátiles de más de 4 anillos. El límite de detección fue de 0.04 µg/kg con un 95% de reproducibilidad.

Finalmente, Şekeroglu y col. (2007) buscaron determinar la cantidad de benzo(a)pireno en aceites vegetales. Diluyeron las muestras con hexano y las separaron en una columna de sílica gel eluyendo con diclorometano y n-hexano. Después secaron las muestras y las inyectaron en un HPLC. Reportan pérdidas de HPAs volátiles durante la preparación de las muestras por lo que su método no es muy exacto.

En esta tesis se presenta el desarrollo de una metodología sencilla, efectiva, precisa y lineal para cuantificar la presencia de HPAs con límites de detección del orden de ng/ml. Esto es útil, ya que las técnicas descritas son complejas, requieren de tratamiento previo de las muestras utilizando una gran cantidad de diversos solventes y por tanto generando muchos residuos, aumentando los costos del análisis y contaminando. Muchas de las técnicas mencionadas son lentas o no son sensibles a cantidades pequeñas de analitos. Para desarrollar un método sensible para la cuantificación de los HPAs aprovechamos que los espectros de fluorescencia emitidos son altamente específicos, no requieren que la muestra sea tratada con anterioridad y no generan desechos disminuyendo los costos de análisis y no destruyen la muestra.

HIPÓTESIS

Por medio de una matriz de fluorescencia de excitación-emisión (MEE) será posible determinar la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de aceite comestible. Este método será simple, no será necesario realizar un proceso de extracción y podrá ser utilizado para evaluar la concentración de estos compuestos tóxicos en los aceites usados en los puestos ambulantes de comida en zonas con alta contaminación vehicular e industrial.

OBJETIVOS.

- Desarrollar una metodología sencilla basada en matrices de fluorescencia de excitación-emisión (MEE) para detectar la contaminación por HPAs presentes en muestras de aceites comestibles.
- Analizar muestras de aceite utilizado en puestos callejeros para determinar la cantidad de HPAs acumulados y compararla con los límites establecidos como peligrosos.

I. Objetivos Particulares

- Estudiar la proporcionalidad del contenido de un hidrocarburo aromático policíclico puro y la respuesta de matrices de fluorescencia de excitación-emisión (MEE).
- Determinar las características que deben evaluarse para poder validar el procedimiento analítico y probarlo con aceite enriquecido con diferentes HPAs.
- Recolectar muestras de aceites comestibles en puntos con alta contaminación vehicular y en las estaciones de monitoreo atmosférico del SMA, obtener sus MEE y reportar la concentración de HPAs presentes en las muestras.
- Analizar la información obtenida y relacionarla con los niveles de contaminación en las diferentes zonas del área metropolitana de la Ciudad de México.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Reactivos y equipo

Los HPAs utilizados para hacer los experimentos fueron los siguientes: fenantreno (98%), benzo(a)pireno (98%), criseno (98%), antraceno (99%), pireno (97%), perileno (97%), 2,3-benzoantraceno (98%), benzo(ghi)perileno (98%), 7-metilbenzo(a)pireno (98%), dibenzo(ai)pireno (97%), 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (98%), 1,2-benzodifenilsulfuro(99%), 1,2:5,6 dibenzoantraceno (97%) y 9,10-dimetilantraceno (99%). Todos los compuestos fueron comprados a Sigma-Aldrich. El acetonitrilo empleado para hacer todas las diluciones pertinentes fue de Fischer Scientific grado HPLC.

Se compraron aceites comerciales de diferentes marcas; 1.2.3, Nutrioli y Mazola para verificar que presentaran el mismo patrón de MEE entre ellas. Se dejaron muestras de aceite en cajas Petri de plástico en las estaciones de monitoreo ambiental para el experimento de captación de contaminantes atmosféricos.

El equipo utilizado para realizar las mediciones fluorométricas fue el "Espectrofluorómetro Olis DM4", con una lámpara de 75 watts. Se utilizaron 4 slits manuales de 3.16 mm. Se utilizó el software Olis Global Works. Los datos obtenidos del espectrofluorómetro se procesaron en el software Matlab 8.0 y en Excel, Microsoft Office 2007. Se utilizaron celdas de cuarzo para fluorómetro Sigma-Aldrich.

2. Procedimiento Analítico

2.1 Obtención de matrices de emisión-excitación.

Se realizaron soluciones stock de cada HPA, pesando 10 mg del compuesto en una balanza analítica y a partir de éstos se hicieron las diluciones pertinentes hasta llegar a concentraciones de 10 ng/ml y se hicieron las MEE. Se obtuvo la MEE del acetonitrilo ocupado como disolvente para asegurar que no presentara fluorescencia que pudiera interferir con las lecturas. Las soluciones se conservaron en frascos perfectamente limpios y cerrados con tapa de teflón y en la obscuridad para evitar la volatilización y la fotodegradación.

Los datos de la matriz de emisión-excitación de un compuesto se obtuvieron realizando mediciones fluorométricas, estableciendo un rango de longitudes de onda de emisión desde 350 hasta 700nm (leyendo cada 2 nm) y simultáneamente se varió la longitud de onda de excitación cada 10 nm desde 200 hasta 400 nm. Considerando que la fluorescencia a longitud de onda de emisión menor a la de excitación no existe, se eliminó el pico correspondiente a la dispersión Raleigh que aparece a longitud de onda de excitación igual a longitud de onda de emisión, para asegurarnos de que no hubiera señal de esta dispersión en nuestros espectros se eliminaron los datos 10 nm antes de llegar al mismo valor de longitud de onda de excitación que de emisión.

Para evaluar la especificidad del método y la repetibilidad de los picos máximos de las MEE se realizaron mediciones de 5 HPAs (fenantreno, antraceno, pireno, criseno y benzo(a)pireno) a diferentes concentraciones y se observó la posición de los picos máximos de cada compuesto en las matrices. Si el método es específico, estos deben de estar posicionados siempre en las mismas longitudes de onda de excitación y emisión. Después se obtuvieron las MEE de cada compuesto. Las soluciones de los 14 HPAs se midieron directamente en el espectro como se indicó anteriormente y se obtuvo el volumen de fluorescencia (VF) bajo la curva de cada espectro. Este procedimiento se repitió para cada uno de los HPAs y para las muestras de aceite comercial sin usar. Para medir la precisión del método, medimos 5 veces muestras de antraceno en acetonitrilo a 10 ng/ml y a partir de la variación de estos datos, evaluamos que tanto varían las unidades de fluorescencia detectadas por el equipo.

Como al obtener una matriz de excitación-emisión para una mezcla de compuestos, los espectros de estos se sobreponen, se midió el volumen de fluorescencia obtenido de cada compuesto para después intentar discernir entre una mezcla de compuestos de HPAs. Los HPAs ocupados para esto fueron antraceno, criseno y 2,3-benzoantraceno a concentraciones de 10 ng/ml.

Se realizaron también las MEE de los aceites comerciales comprados para asegurar que no presentaran fluorescencia en la zona que se van a medir los HPAs.

2.2 Obtención de muestras de las estaciones de monitoreo ambiental del SIMAT.

Se colocaron 20 ml de aceite marca 1.2.3 en cajas Petri de vidrio y se colocaron en las estaciones de monitoreo atmosférico de SIMAT. Se escogieron aquellas estaciones en donde se monitorearan regularmente las partículas de 10 y de 25 micras, PM_{10} y $PM_{2.5}$ respectivamente. Las muestras de aceite se dejaron expuestas al medio ambiente por un periodo de un mes y se analizaron por fluorescencia para la obtención de sus MEE. Las muestras no requirieron tratamiento previo.

La ubicación de las muestras de aceite colocadas en la Ciudad de México y zonas conurbadas del Estado de México se indican en la tabla 2. También se indica cuáles son los parámetros que miden y en que tipo de zona están. La figura 3 es un mapa que muestra la distribución geográfica de estas estaciones.

En el norte se encuentran 4 estaciones de monitoreo donde se colocaron muestras de aceite: dos en el noreste y dos en el noroeste. En el noroeste están las estaciones de Tlanepantla, que se localiza en un área habitacional con comercios y servicios. Se ubica sobre Avenida Toluca que presenta flujo vehicular moderado, aunque en el tiempo en que se colocó la muestra se encontraban realizando construcciones viales lo que aumentaba el tráfico y la cantidad de polvo. Aproximadamente a un kilómetro de la estación se encuentra una zona industrial y de bodegas. La estación de la ENEP-Acatlán se encuentra en un área urbana, está dentro del campus universitario en la esquina de dos avenidas de flujo vehicular moderado.

En la zona Noreste están las estaciones de monitoreo de Xalostoc y de San Agustín; la primera está ubicada en La Distribuidora Volkswagen "Santa Clara" que es un área principalmente industrial y habitacional. Se ubica sobre la Antigua Carretera México-Pachuca, con flujo vehicular alto. La segunda está ubicada en El Centro de Salud Comunitario "San Agustín" se encuentra en un área urbana, principalmente habitacional con flujo vehicular bajo, está rodeada de parques y está localizada cerca de la Avenida Hank González que presenta circulación en ambos sentidos (con 7 carriles cada uno) y flujo vehicular alto.

En la zona centro se colocó una muestra en la Merced, localizada en la estación de la Merced que se encuentra rodeada de unidades habitacionales, comerciales, escuelas y parques. La estación de monitoreo se encuentra en la clínica ubicada sobre Avenida Congreso de la Unión que tiene circulación en ambos sentidos y flujo vehicular alto.

En el sur se colocaron muestras en 4 estaciones de monitoreo, tres en el sureste y una en el suroeste. La del suroeste se colocó en la estación del Pedregal ubicada en una primaria en un área urbana, habitacional con escaso flujo vehicular de autos particulares. Las estaciones de monitoreo en donde se colocaron las muestras en el sureste fueron en el Cerro de la Estrella ubicado en un área urbana, habitacional, sobre la Calzada San Lorenzo que presenta circulación en ambos sentidos y flujo vehicular alto; en la estación de monitoreo de la UAM-Iztapalapa, que se encuentra ubicada en el techo de un edificio dentro del campus de la UAM-I muy cerca de la Central de abastos; y finalmente, en la estación de monitoreo en Tláhuac ubicada en la primaria en una zona rural habitacional, calles de terracería y cerca de campos de cultivo, se ubica sobre la calle Escudo Nacional que muestra un flujo vehicular bajo.

Transcurrido un mes de exposición las muestras se recolectaron de las estaciones de monitoreo para determinar sus respectivas MEE. Para obtener los valores de fluorescencia en el espectrofluorómetro, se colocaron 2 ml de cada una de las muestras en celdas de cuarzo. Los resultados de VF se transformaron a unidades equivalentes en ng/kg y se compararon con las cantidades máximas permitidas de HPAs en alimentos en reglamentaciones de otros países así como los datos obtenidos con las otras metodologías.

Tabla 2. Ubicación de las muestras de aceite colocadas en las estaciones de monitoreo atmosférico del SIMAT.

Nombre	Parámetro	Zona	Tipo	Dirección
Tlalnepantla (TLA)	PM ₁₀ PM _{2.5}	NO	Industrial-Urbano	Av. Toluca s/n, Glorieta de Atlacomulco, Col. Tlalmex, Tlalnepantla, Edo. de México
ENEP-Acatlan (EAC)	PM ₁₀	NO	Urbano	Av. Alcanfores s/n esq. Con San Juan Totoltepec, Col. Santa Cruz Acatlán, Naucalpan, Edo. de México
Xalostoc (XAL)	PM ₁₀	NE	Industrial-Urbano	Km 13.5 de la antigua carretera a Pachuca y calle del Hierro, Col. Xalostoc, Municipio Ecatepec de Morelos, Edo. de México.
San Agustín (SAG)	PM ₁₀ PM _{2.5}	NE	Urbano	Centro de Salud Comunitario "San Agustín", calle sur 88 esq. con calle sur 90, Col. Nuevo paseo de San Agustín, Municipio Ecatepec de Morelos, Edo. de México
Merced (MER)	PM ₁₀ PM _{2.5}	CE	Urbano	Avenida Congreso de la Unión No. 148, Colonia Merced Balbuena, Delegación Venustiano Carranza, México D.F. CP 15860.
Tláhuac (TAH)	PM ₁₀	SE	Rural	Escuela primaria Federal Acatonalli. Calle Escudo Nacional s/n, Col. Nativitas, Pueblo de Tulteyalco, Del Xochimilco, México D.F.
Cerro de la Estrella (CES)	PM ₁₀	SE	Urbano	Planta de tratamiento de aguas negras "Cerro de la estrella" Calzada San Lorenzo s/n, Colonia Paraje San Juan, Del. Iztapalapa, México D.F.
UAM Iztapalapa (UIZ)	PM ₁₀ PM _{2.5}	SE	Urbano	UAM-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina De. Iztapalapa, México D.F. CP 09340
Pedregal (PED)	PM ₁₀	SO	Urbano	Escuela primaria "John F. Kennedy" Calle Cañada No. 370 esq. con Av. Cráter, Col. Pedregal de San Ángel, Del. Álvaro Obregón, México D.F.

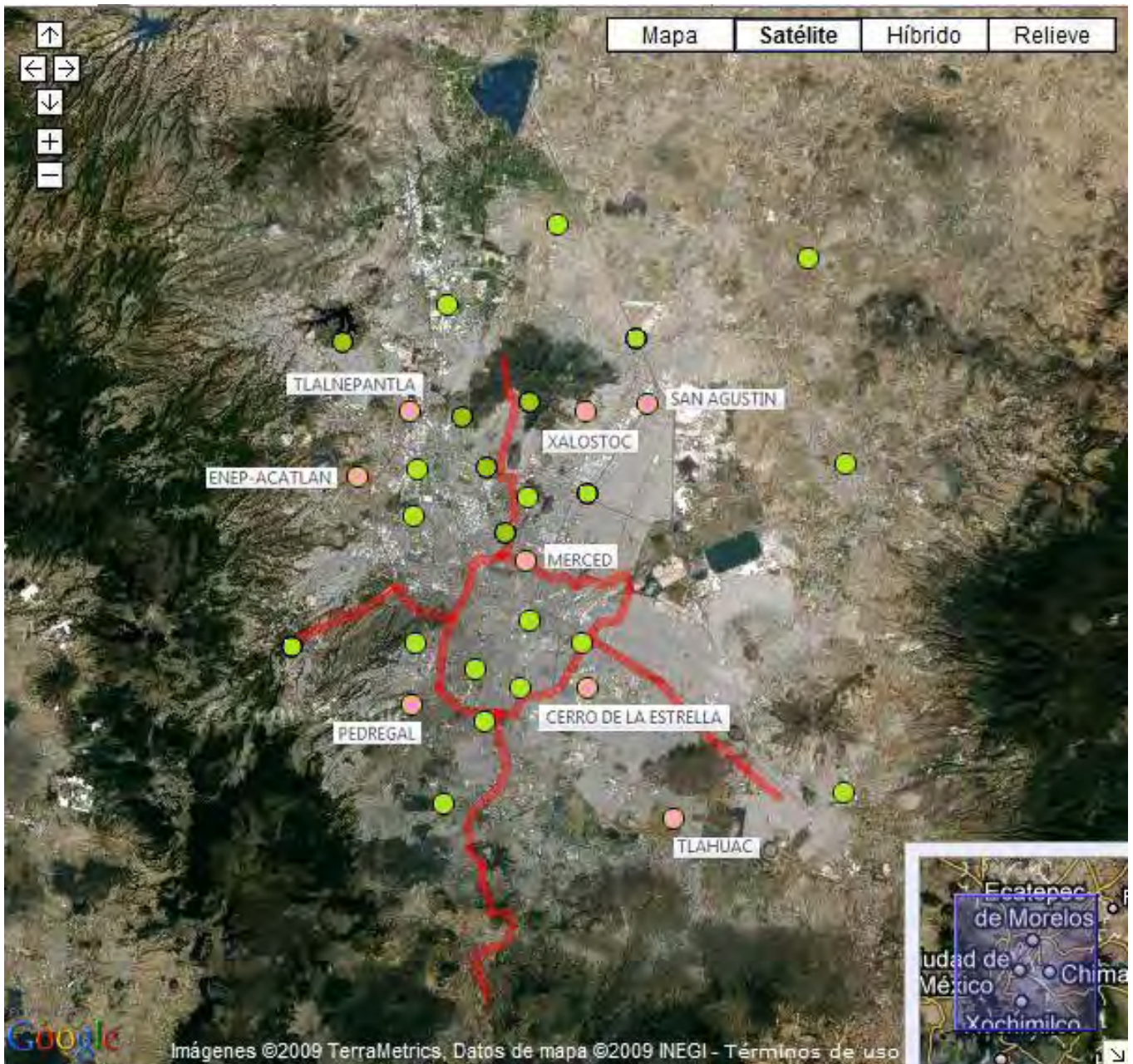


Figura 3. Mapa del INEGI 2009 dónde se muestra el relieve de la zona metropolitana de la ciudad de México y de sus alrededores que se caracteriza por ser un valle rodeado de cordilleras lo que provoca el estancamiento de los contaminantes en la zona. Los puntos verdes se refieren a las estaciones del SIMAT; las estaciones en las que se tomó muestra se encuentran marcadas con un punto rosa.

3 Obtención de muestras de aceite en puestos de comida ambulantes.

Además de las estaciones de monitoreo atmosférico, se obtuvieron muestras de aceite en algunos puestos ambulantes de comida frita en diferentes puntos de la ciudad de Cuernavaca. Inicialmente, se tomaron muestras en la estación de camiones de Cuernavaca, ya que es un lugar cercano a donde se realizó este trabajo y es una zona con constante movimiento de vehículos viejos. También se obtuvieron muestras de Tres Marías, ubicada en la carretera federal de México-Cuernavaca donde diariamente circulan muchos carros y camiones. Se tomaron de 3 a 4 ml. de muestra directamente de los puestos de comida y se guardaron en tubos de ensaye tapados y cubiertos con aluminio para su posterior análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Cuantificación de HPAs en las muestras

Realizamos las mediciones pertinentes para obtener la MEE de cada compuesto puro como se señala en la metodología y poder comparar los volúmenes de fluorescencia. Hicimos un promedio de los VF y escogimos al HPA que tuviera un volumen de fluorescencia individual más cercano al promedio como compuesto representativo para realizar una curva patrón y así poder hacer una relación directa entre el VF que presenta una muestra con la concentración de HPAs totales presentes en dicha muestra.

Algunas de las MEE obtenidas de los compuestos se presentan a continuación, el resto se encuentran en el anexo I.

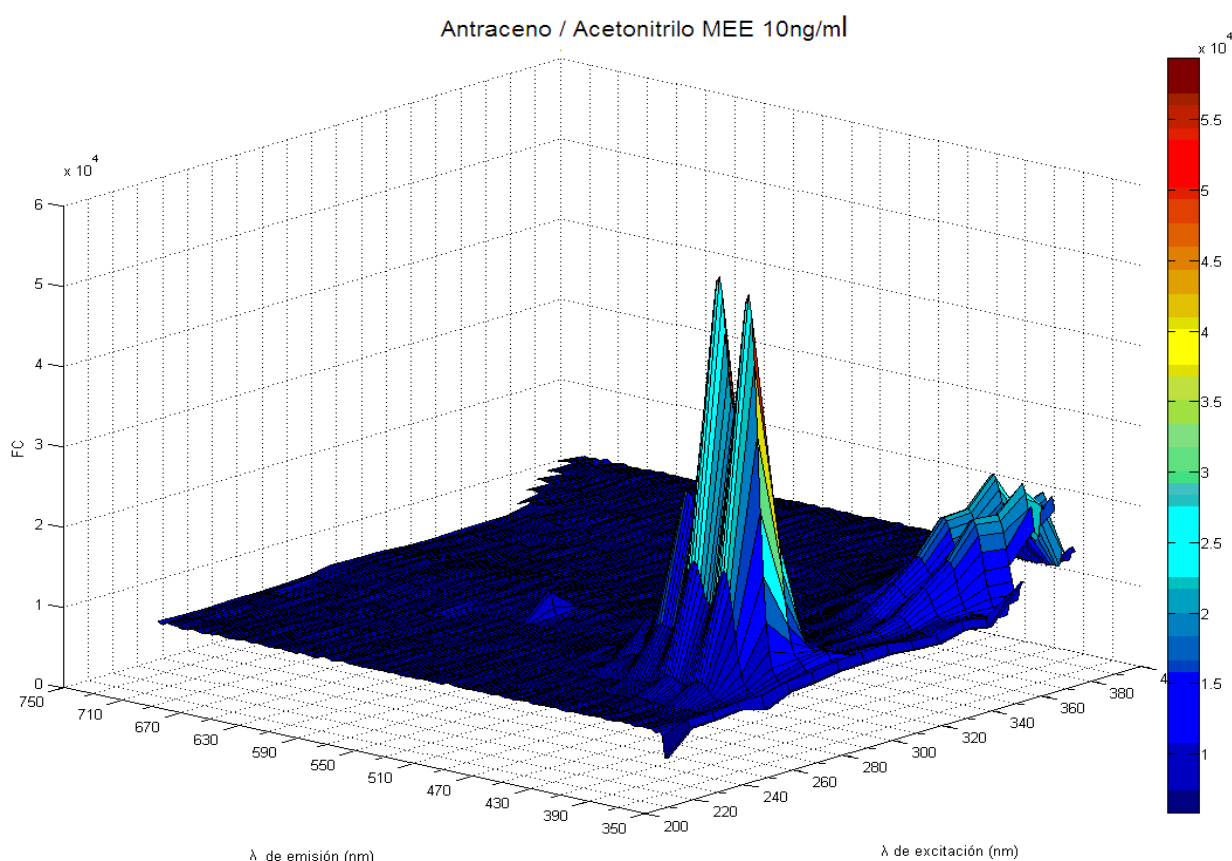


Figura 4. Matriz de excitación-emisión de antraceno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos característicos a 250 nm de λ de excitación y a 380 y 400 nm de λ emisión.

En la figura 4 se muestra la matriz de excitación-emisión obtenida de una muestra de 10 ng/ml de antraceno disuelto en acetonitrilo. Esta figura presenta dos picos característicos ubicados a 250 nm de longitud de onda de excitación y a 380 y 400 nm de longitud de onda de emisión. Por otra parte, se ve una señal de fluorescencia localizada a partir de 340 nm de longitud de onda de excitación y 400 nm de longitud de onda de emisión.

En la figura 5 se muestra la matriz de excitación-emisión del benzo(a)pireno que presenta un pico de fluorescencia a 290 nm de λ de excitación y 406 nm de λ emisión y otro de mayor fluorescencia a 380 nm de λ de excitación y 366 nm de λ de emisión.

Cabe mencionar que antes de realizar la medición de los compuestos puros se hizo la MEE del acetonitrilo y ésta no mostró fluorescencia alguna, como era de esperarse.

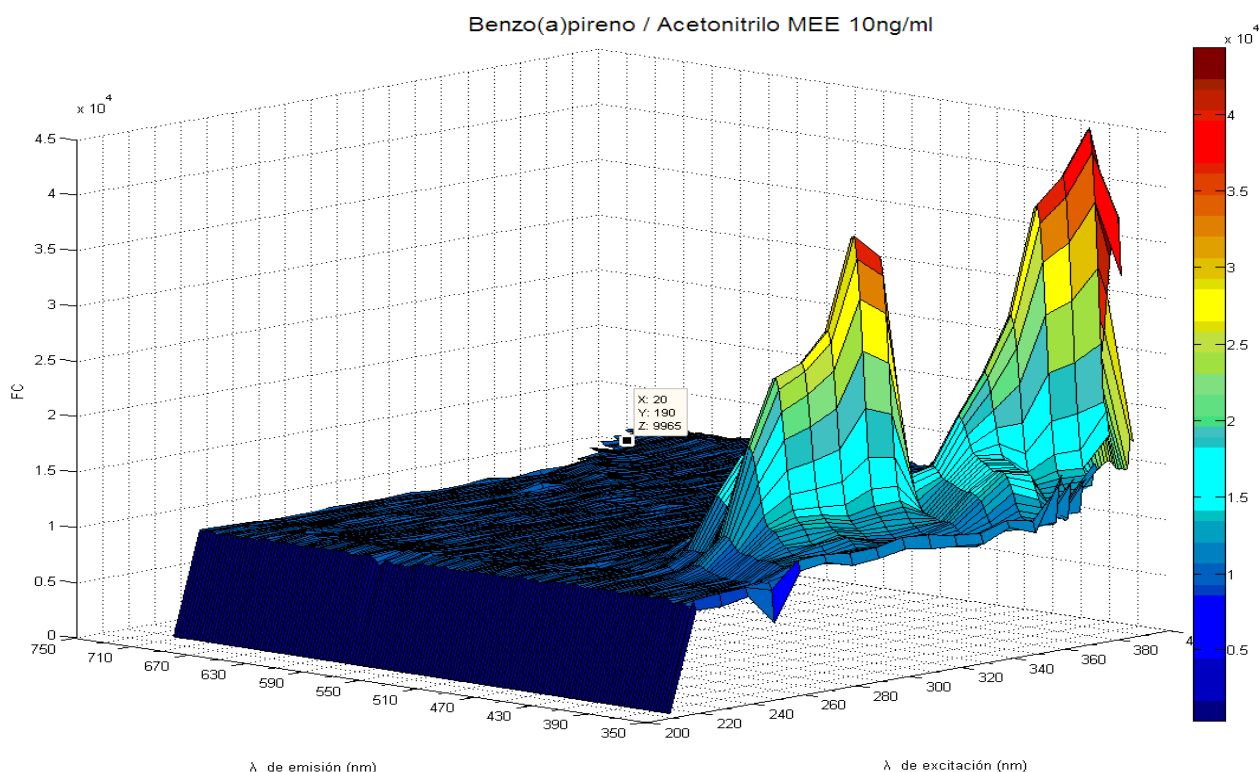


Figura 5. Matriz de excitación-emisión de benzo(a)pireno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta un pico de fluorescencia a 290 nm de λ de excitación y 406 nm de λ emisión y otro a 380 nm de λ de excitación y a 366 nm de λ de emisión.

A continuación se muestra la figura 6 correspondiente a la MEE del 2,3-dibenzoantraceno, podemos observar la presencia de un pico de fluorescencia

máxima en 270 nm de λ de excitación y 364 nm de λ de emisión. Presenta una serie de señales de menor fluorescencia en 250 nm de λ de excitación y a 380, 400 y 422 nm de λ . Presenta pequeños picos de fluorescencia a 270 nm de λ de excitación y 476 y 508 nm de λ de emisión.

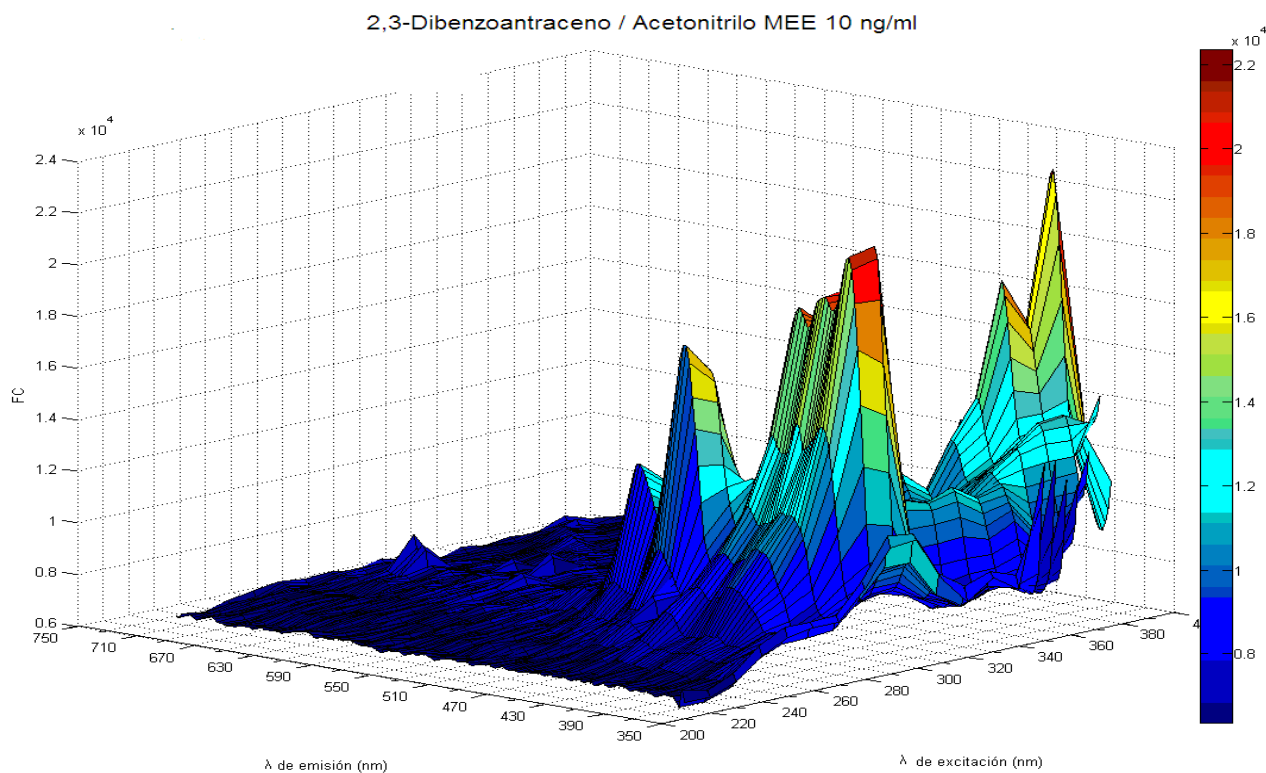


Figura 6. Matriz de excitación-emisión de 2,3-dibenzoantraceno muestra un pico de fluorescencia en 270 nm de λ de excitación y 364 nm de λ de emisión. Presenta otros picos de fluorescencia en 250 nm de λ de excitación y a 380, 400 y 422 nm de λ . Presenta pequeños picos de fluorescencia a 270 nm de λ de excitación y 476 y 508 nm de λ de emisión.

Las siguientes tres figuras (fig. 7-9) son MEE de tres compuestos que al igual que el antraceno y el benzo(a)pireno están consideradas dentro de los 16 contaminantes prioritarios de la EPA. La primera, que corresponde a la figura 7 es la matriz del criseno en acetonitrilo, ésta presenta dos picos de fluorescencia a 270 nm de λ de excitación, uno a 364 nm y otro a 382 nm de λ de emisión. La segunda, correspondiente a la MEE del pireno presenta dos picos de fluorescencia a 330 nm de λ de excitación en 376 y 392 nm de λ de emisión; también se observa una pequeña señal de fluorescencia en la zona de 270 nm de λ de excitación y 390 nm de λ de emisión. Finalmente, la MEE de la figura 9 corresponde al fenantreno, este

espectro presenta dos picos de fluorescencia a 250 nm de λ de excitación en 392 y 412 nm de λ de emisión.

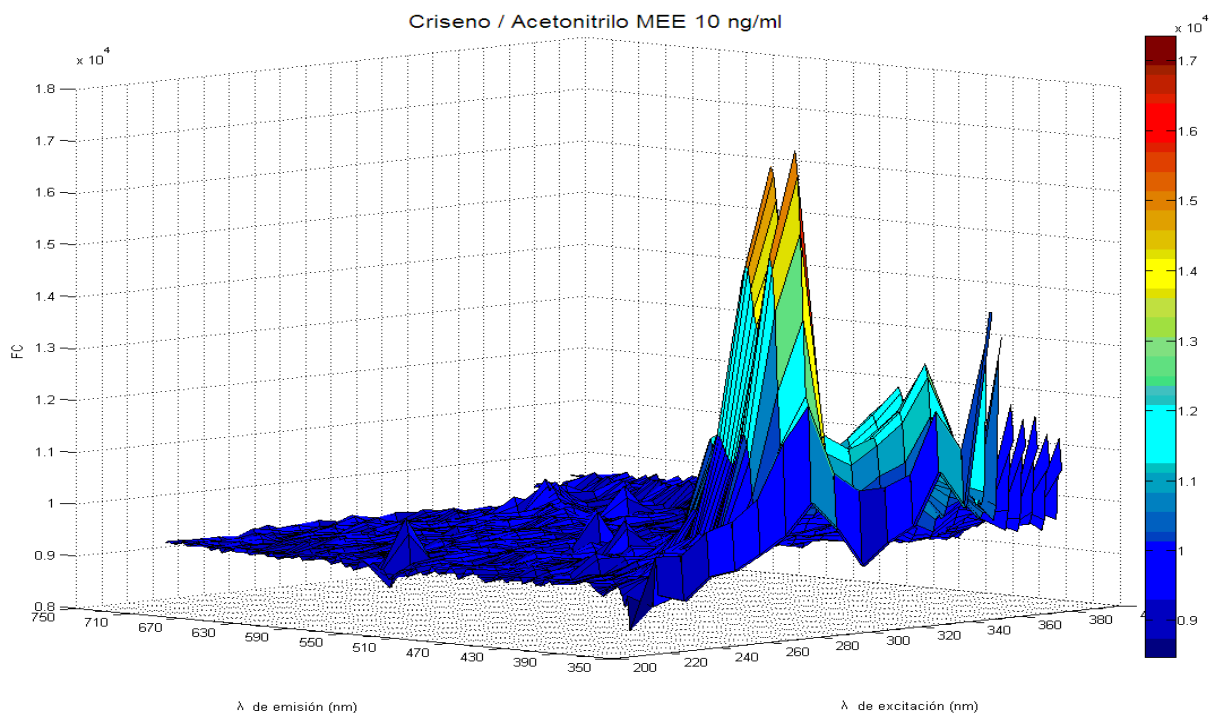


Figura 7. Matriz de excitación-emisión de criseno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos de fluorescencia a 270 nm de λ de excitación en 364 y 382 nm de λ de emisión.

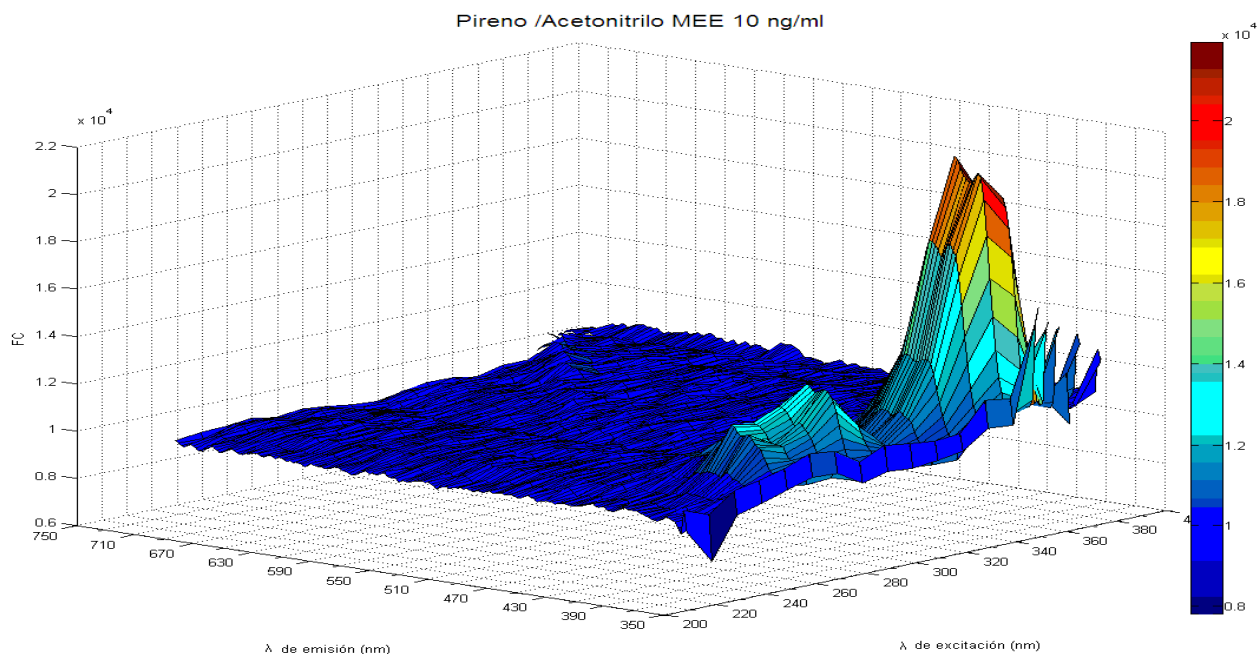


Figura 8. Matriz de excitación-emisión de pireno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos de fluorescencia a 330 nm de λ de excitación en 376 y 392 nm de λ de emisión. Presenta un poco de fluorescencia en la zona de 270 nm de λ de excitación y 390 nm de λ de emisión

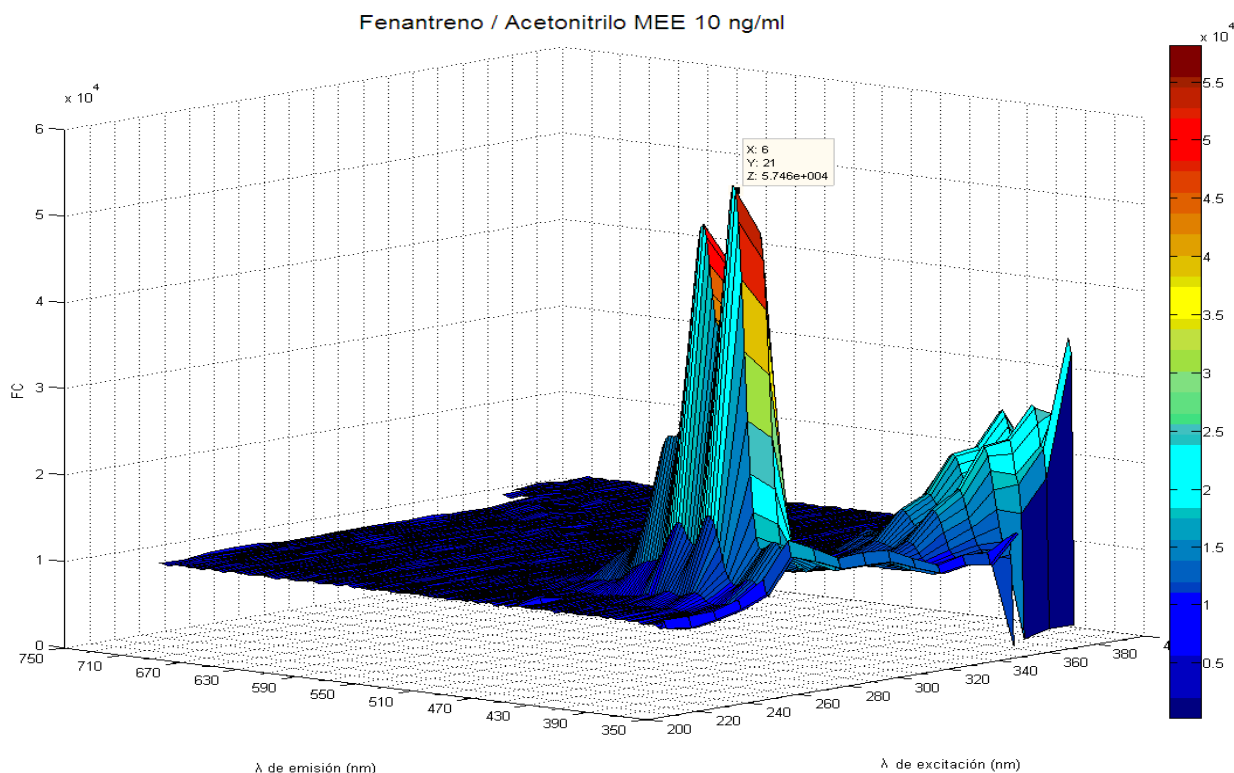


Figura 9. Matriz de excitación-emisión de fenantreno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos de fluorescencia a 250 nm de λ de excitación en 392 y 412 nm de λ de emisión.

A partir de las MEE de los 14 diferentes HPAs, se pudo observar que la matriz completa fue característica para cada compuesto. Sin embargo, hay zonas que son muy parecidas entre sí e inclusive, se presentaron algunos compuestos que tuvieron señales de fluorescencia significativas en las mismas coordenadas de longitudes de onda de emisión-excitación lo que hace más difícil la identificación de un compuesto; es decir, la sobreposición de los picos específicos que presenta cada compuesto disminuye la selectividad del método. En general podemos observar que ninguno de los compuestos presentó fluorescencia en la zona que abarca de 550 a 700 nm de λ de excitación por lo que en un futuro podemos dejar de escanear estas zonas.

Además de las MEE de los 14 HPAs a evaluar obtuvimos las MEE del aceite de maíz para verificar que la fluorescencia del aceite no interfiriera con la fluorescencia de los HPAs y para verificar la similitud entre diferentes marcas. El patrón de las MEE obtenidas para los aceites fue el mismo sin embargo el VF fue diferente según

la marca debido a que unas mostraban más fluorescencia que otras. El patrón obtenido se muestra a continuación (Fig. 10):

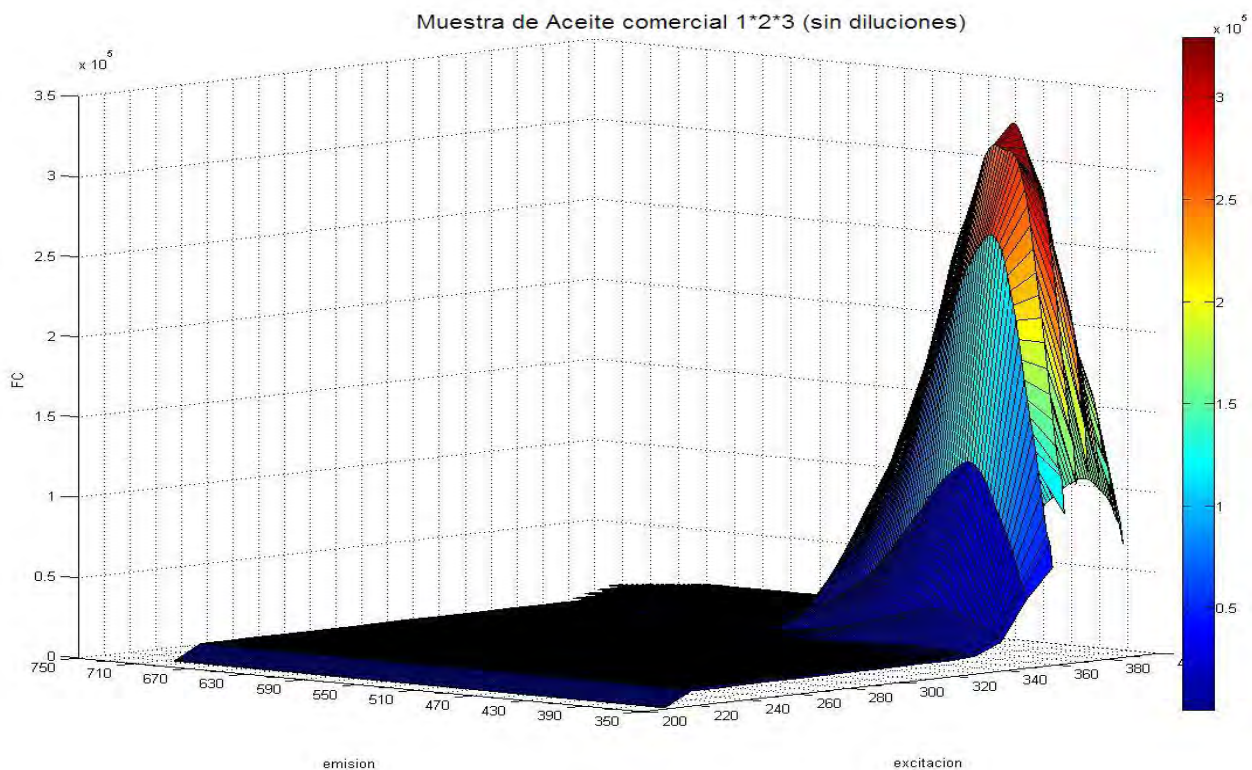


Figura 10. Matriz de excitación-emisión de aceite de maíz comercial. Muestra un pico grueso de fluorescencia en el área de 330 nm de λ de excitación hasta la aparición de la dispersión de Raleigh, y de 350 a 600 nm de λ de emisión,

En general las muestras de aceite de diferentes marcas mostraron un pico muy amplio en una zona específica del espectro. Los aceites vegetales están compuestos principalmente de triacilglicerol los cuales no deberían presentar fluorescencia. Sin embargo, es sabido que todos los aceites comerciales contienen antioxidantes. Además de los antioxidantes naturales como el tocoferol, se utilizan antioxidantes sintéticos que son compuestos aromáticos y que presentan fluorescencia (European Parliament and Council, 1995; Burdock, 1997). Algunos de estos compuestos antioxidantes son: galato de propilo (PG), galato de octilo (OG), galato de dodecilo (DG), 2,4,5-trihidroxibutirofenona (THBP), ácido nordihidroguayarático (NDGA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroximetilfenol (Iox-100), palmitato de ascobilo (AP) tert-butil-4-hidroxianisol (BHA), 3,5-di-tert-butil-4-

hidroxitolueno (BHT) y tert-butil-hidroquinona (TBHQ), siendo estos últimos tres los más usados en México (Fig. 11). Por lo anterior, sería necesario restar la fluorescencia de esta área a todos los espectros para garantizar que la fluorescencia fuese únicamente por la presencia de HPAs. Además, a partir de las matrices nos dimos cuenta de que las unidades de fluorescencia registradas y por lo tanto el VF varían según la marca del aceite utilizado y al tiempo de exposición al medio ambiente. Esto puede deberse a la oxidación de los antioxidantes y vitaminas agregadas al aceite como excipientes. Al no poder estandarizar esta zona decidimos excluirla de los espectros. Dicha zona abarca de 330 nm a 400 nm de longitud de onda de excitación y de 350 nm a 600 nm de emisión.

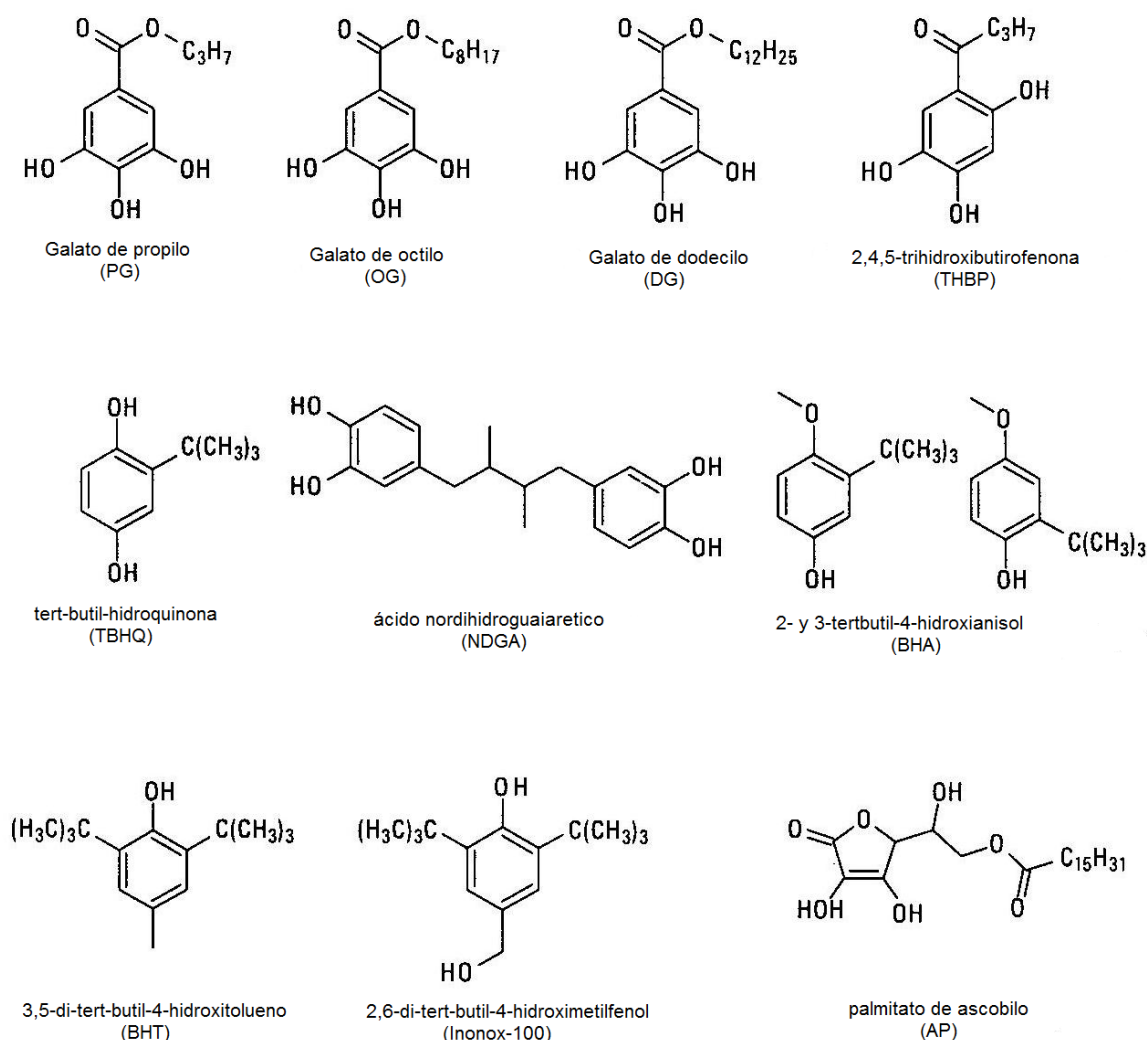


Figura 11. Compuestos utilizados como antioxidantes en el aceite maíz comercial.

Si observamos esta área en los espectros de los compuestos puros podemos ver que algunos compuestos presentaron fluorescencia, e inclusive compuestos como el benzo(ghi)pireno, el 7-metilbenzo(a)pireno y el 1,2:5,6-dibenzoantraceno presentan un pico máximo de fluorescencia a 470 nm de longitud de onda de excitación y 408 nm de longitud de onda de emisión. El pireno por otro lado presenta dos picos máximos de fluorescencia a 330 nm de λ de excitación en 376 y 392 nm de λ de emisión los cuales serán excluidos de las mediciones y únicamente se considerarán los picos presentes en la zona de 270 nm de λ de excitación y 390 nm de λ de emisión.

Después de obtener las MEE verificamos si los picos máximos de fluorescencia obtenidos de los compuestos eran siempre iguales, por lo que realizamos experimentos con diferentes concentraciones de diferentes HPA y medimos la ubicación y la intensidad del pico de fluorescencia. A partir de estos datos construimos curvas patrón para verificar si el aumento en este pico es proporcional a la concentración del HPA. Las curvas patrón se realizaron para el antraceno, el criseno, el benzo(a)pireno y el fenantreno. Todos los picos máximos de las diferentes concentraciones de un mismo analito aparecieron en la misma posición para cada espectro, estas posiciones son las mismas que se reportan en el pie de figura de las matrices de excitación-emisión.

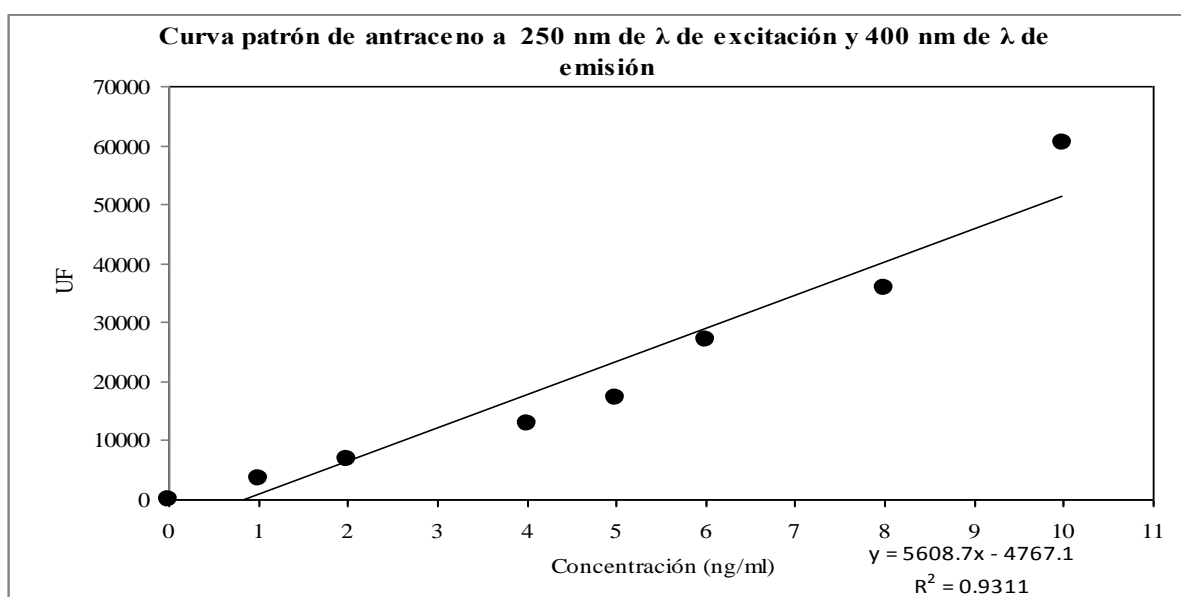


Figura 12. Curva patrón de antraceno en acetónitrilo con una R^2 de 0.9311, lo que indica linealidad aceptable, realizada a 250 nm de λ de excitación y a 400 nm de λ emisión.

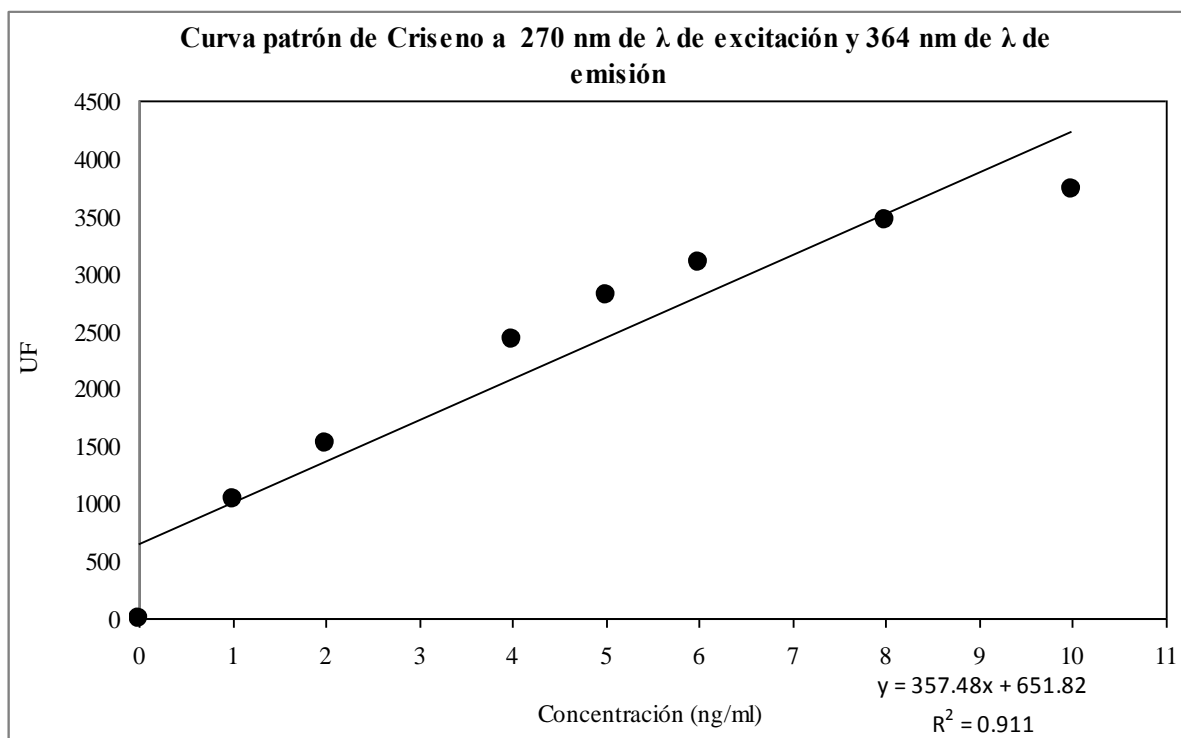


Figura 13. Curva patrón de criseno en acetónirilo con una R^2 de 0.911, lo que indica linealidad aceptable, realizada a 270 nm de λ de excitación y a 364 nm de λ emisión.

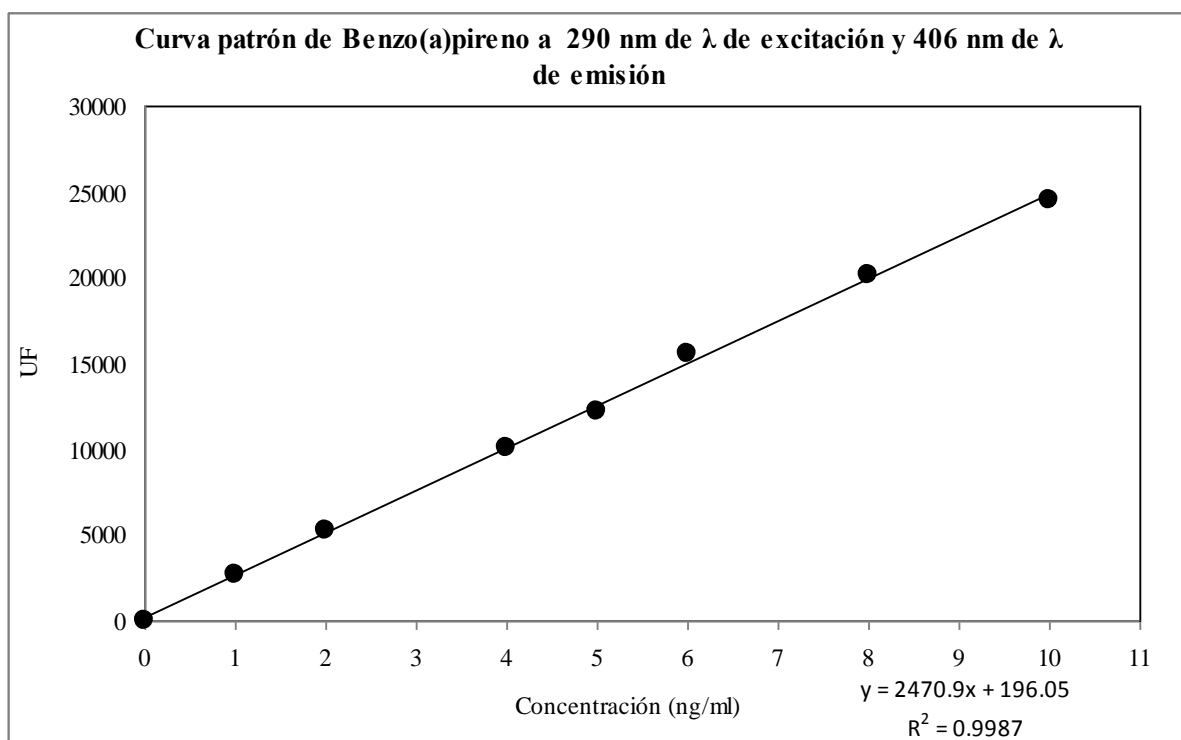


Figura 14. Curva patrón de benzo(a)pireno en acetónirilo con una R^2 de 0.9987, lo que indica muy buena linealidad, realizada a 290 nm de λ de excitación y a 460 nm de λ emisión.

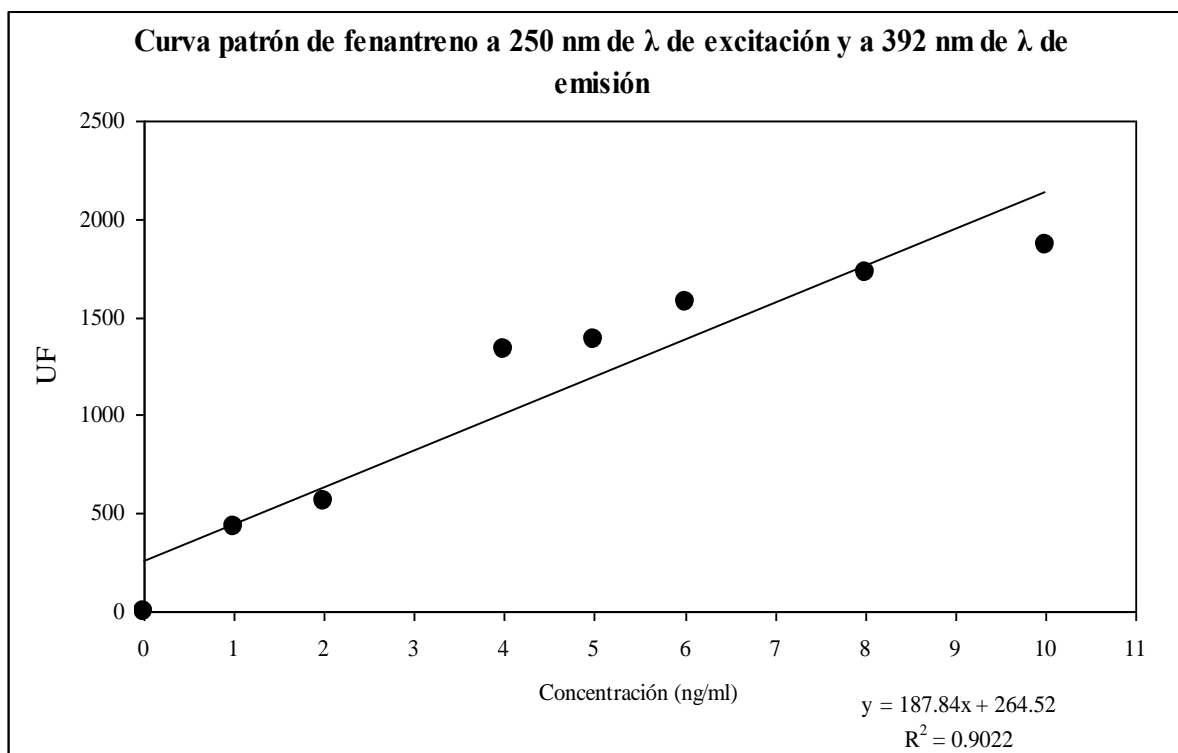


Figura 15. Curva patrón de fenantreno en acetónitrilo con una R^2 de 0.9022, lo que indica una linealidad aceptable, realizada a 250 nm de λ de excitación y a 392 nm de λ emisión.

La fluorescencia máxima fue siempre la misma para cada compuesto, inclusive a diferentes concentraciones y se observó una amplia correlación entre concentración del HPA y la fluorescencia emitida. El HPA que presentó mejor coeficiente de correlación fue el benzo(a)pireno con una R^2 de 0.9987. Sin embargo, decidimos no trabajar más con éste debido a sus propiedades cancerígenas a las que se hace mención en la introducción. Los otros HPAs presentan una linealidad aceptable, siendo el fenantreno el que presenta un coeficiente de correlación más bajo con una R^2 de 0.9022.

Una vez establecido que los picos máximos son específicos para cada compuesto y que la fluorescencia emitida es proporcional a la concentración, verificamos que el VF obtenido a partir de una mezcla de dos HPAs sea equivalente a la suma de los VF de cada compuesto por separado.

Como está indicado en la literatura (Beltrán y col. 1998), cuando se obtiene una matriz de excitación-emisión para una mezcla de compuestos, los espectros de éstos se sobreponen, por lo que se decidió medir el volumen de fluorescencia

ocupado por cada compuesto e intentar discernir entre dos diferentes HPAs en una mezcla de compuestos. Para lograr esto realizamos la MEE de tres compuestos diferentes (antraceno, criseno y 2,3-dibenzoantraceno); después de hizo una mezcla de éstos 1:1 y se midió el VF para comparar los valores obtenidos.

Las MEE de los tres compuestos mencionados se obtuvo de la forma indicada en la metodología. A partir de los resultados pudimos observar el mismo patrón (fig. 16) que en los compuestos realizados con los compuestos puros a concentración conocida (10 ng/ml) que se muestran en las figs. 6, 7 y 8. para antraceno, criseno y 2,3 dibenzoantraceno respectivamente .

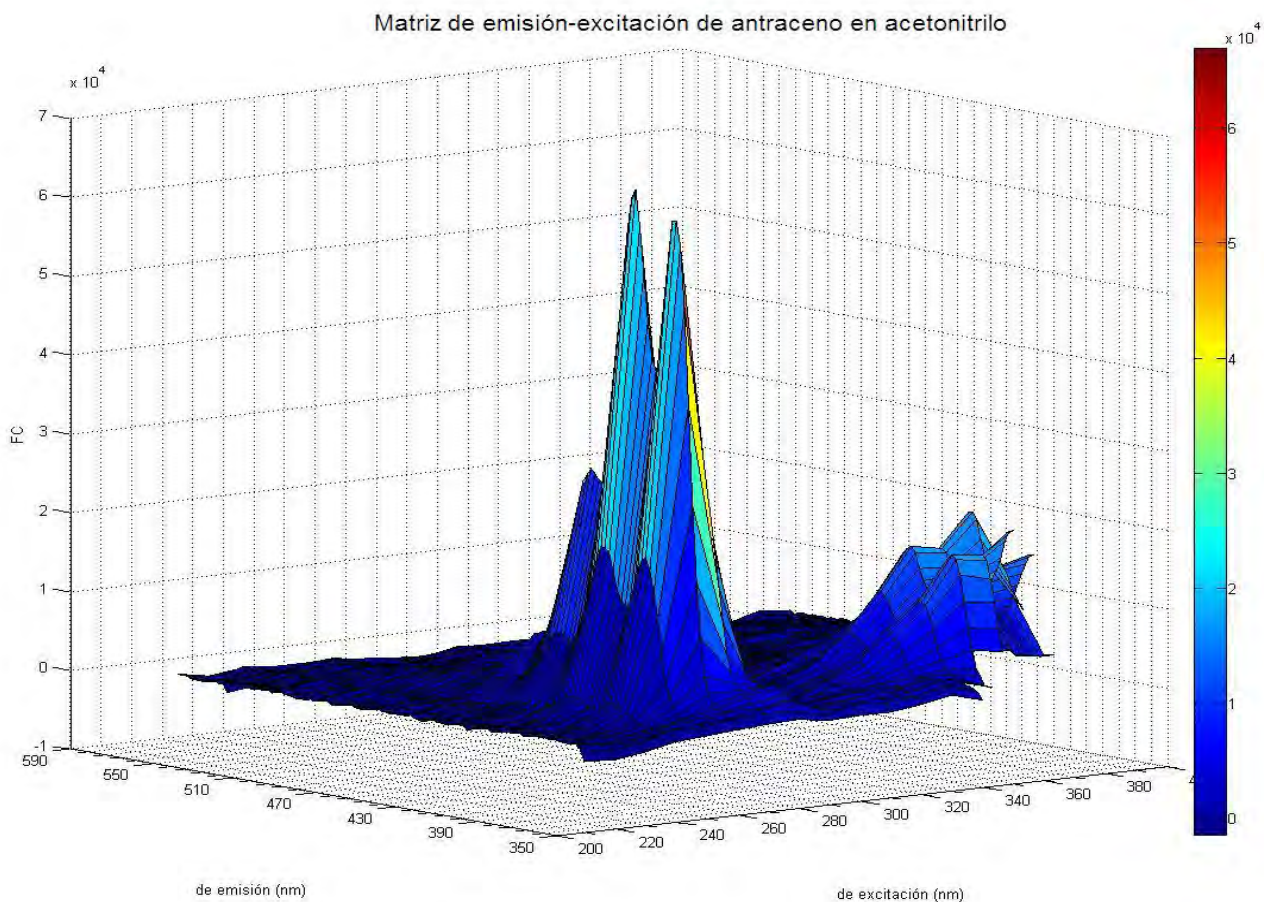


Figura 16. Matriz de excitación-emisión de antraceno en acetonitrilo. Presenta el mismo patrón que el que se muestra en la fig. 4. con dos picos característicos a 250 nm de λ de excitación y a 380 y 400 nm de λ de emisión.

El VF obtenido para cada uno de los compuestos se presenta en siguiente tabla.

Tabla 3. VF de los compuestos en acetonitrilo a una concentración de 10ng/ml

Compuesto	VF
Antraceno	19,941,228
Criseno	2,742,036
2,3 dibenzoantraceno (2,3 DBA)	6,763,920

A partir de las mezclas de estas soluciones se obtuvieron las MEE mostradas en las figuras 17,18 y 19 que se muestran a continuación.

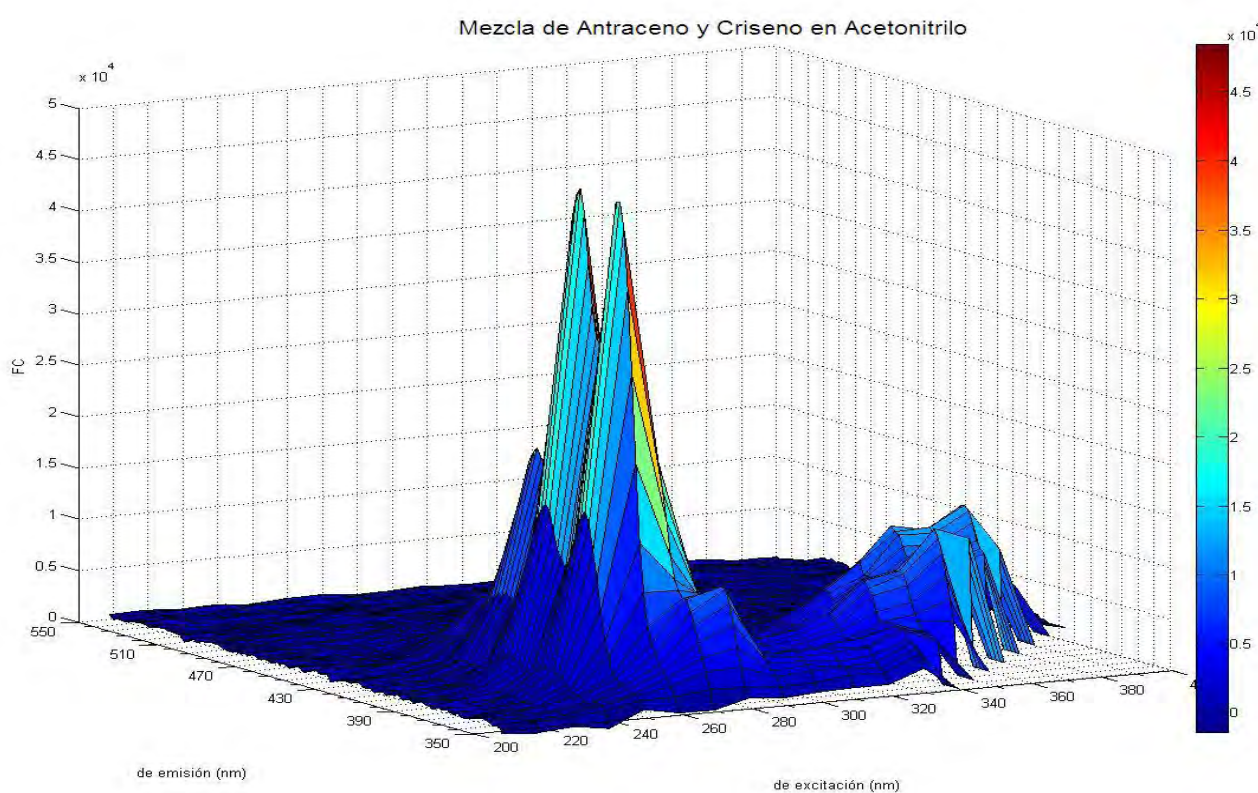


Figura 17. Matriz de excitación-emisión de una mezcla de criseno y antraceno en acetonitrilo a 10 ng/ml. Se observan picos máximos característicos del antraceno con un pequeño pico localizado a a 270 nm de λ de excitación y a 364 nm de λ emisión característico del criseno.

En el espectro de la figura 17 que contiene fenantreno y criseno en una proporción 1:1, resalta la forma de la matriz del antraceno a excepción de los picos pequeños localizados en la parte frontal del espectro; al revisar los datos en Excel se pudo observar la presencia de dos picos de fluorescencia característicos a 270 nm de λ

de excitación y a 364 y 382 nm de λ de emisión. Estos no se logran ver mucho ya que los picos del antraceno muestran una fluorescencia de 48,000 unidades mientras que los picos del criseno muestran 11,000 unidades de fluorescencia. Cuando revisamos las MEE obtenidas de los compuestos puros a una concentración igual (10 ng/ml) observamos que en efecto el antraceno produce una fluorescencia aproximadamente 5 veces mayor.

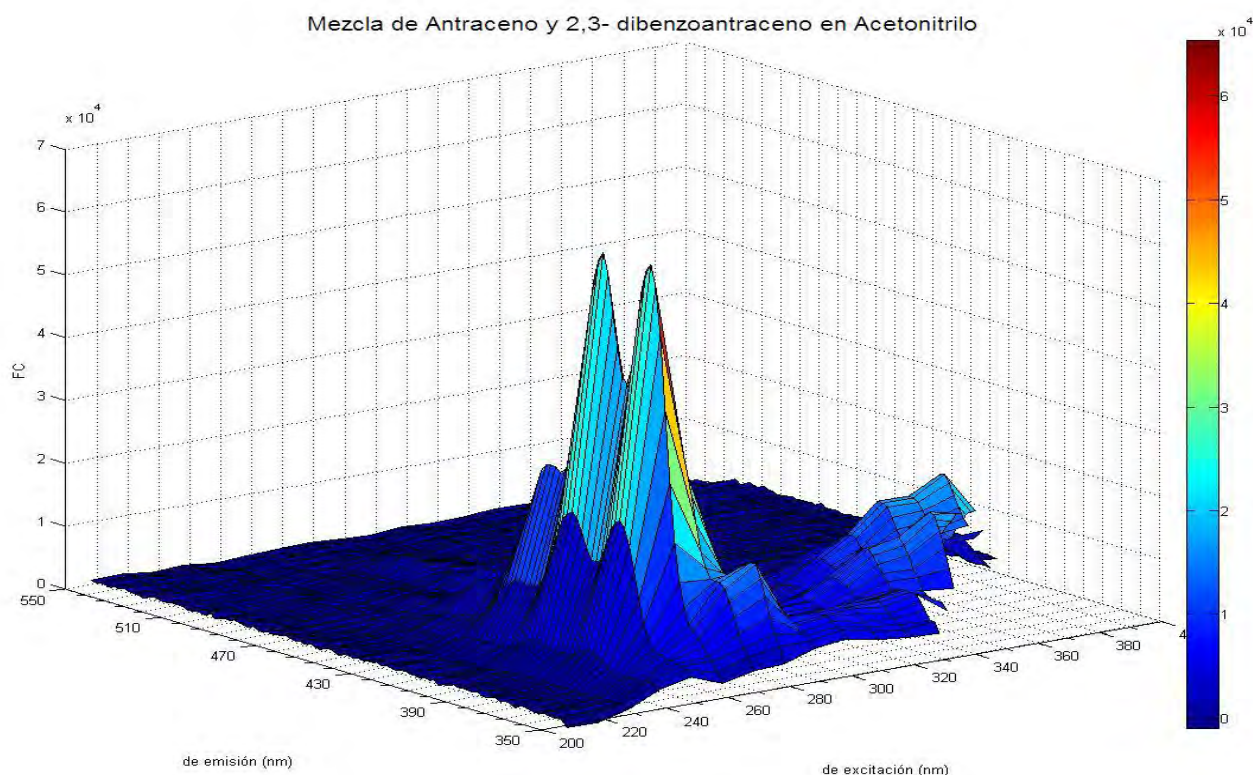


Figura18. Matriz de excitación-emisión de antraceno y 2,3 benzoantraceno en acetonitrilo. Se observan picos máximos característicos del antraceno a 250 nm de λ de excitación y a 380 y 400 nm de λ emisión con un pequeño pico localizado en 270 nm de λ de excitación y a 364 nm de λ emisión.

En el espectro de la figura 18 también resalta la forma de la matriz del antraceno con un pico pequeño localizado en la parte frontal del espectro, se revisaron los datos en Excel y se pueden observar la presencia de dos picos de fluorescencia a 270 nm de λ de excitación y a 364 nm de λ de emisión. Los picos del 2,3 benzoantraceno tampoco se logran ver mucho ya que el antraceno también muestra una fluorescencia mayor a la del 2,3 benzoantraceno. Finalmente se realizó un espectro incluyendo el criseno y el 2,3 benzoantraceno con el fin de observar la

presencia de los picos ya que ambos compuestos presentan valores de fluorescencia similar obteniendo la MEE mostrada en la figura 19.

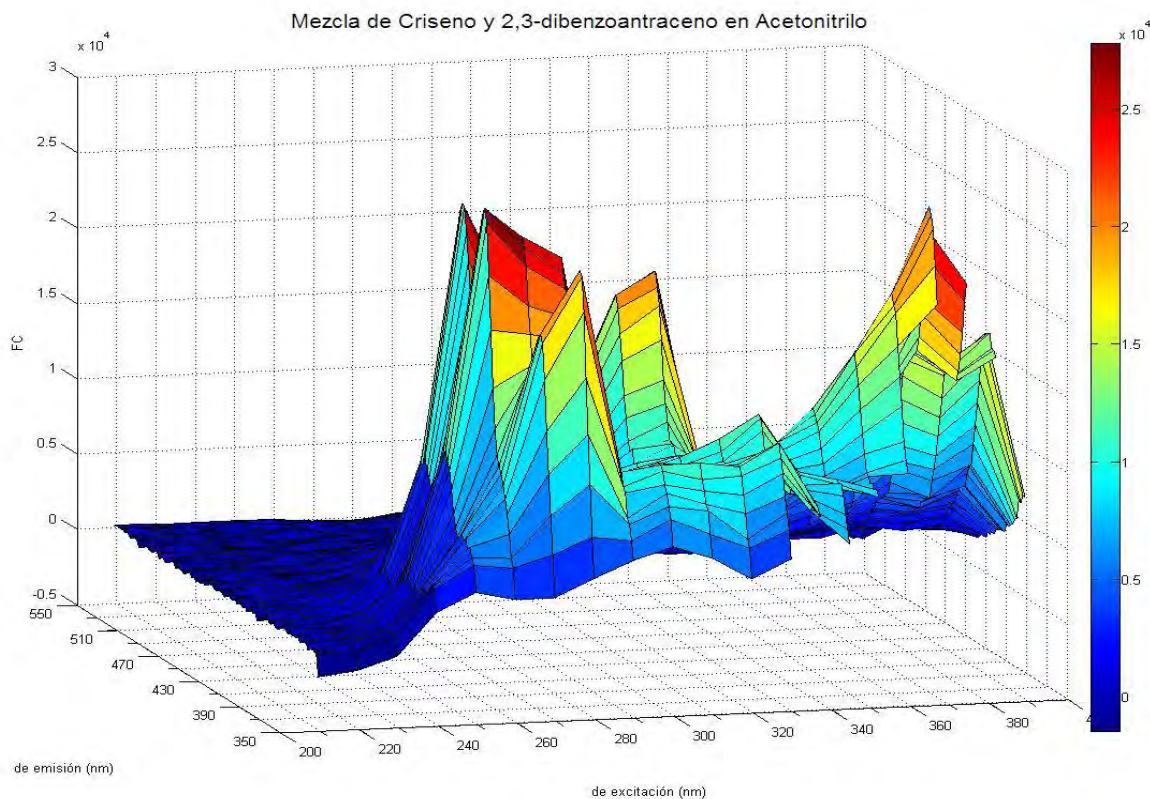


Figura 19. Matriz de excitación-emisión de criseno y 2,3 benzoantraceno en acetonitrilo. Muestra picos de fluorescencia del criseno a 270 nm de λ de excitación y a 364 y 382 nm de λ emisión. También muestra picos de emisión que corresponden a los del espectro del 2,3 dibenzoantraceno, el primero se superpone con el pico de fluorescencia de 270 nm de λ de excitación y a 364 nm de λ emisión del criseno y se presentan los picos en 250 nm de λ de excitación y a 380, 400 y 422 nm de λ de emisión, finalmente los pequeños picos de fluorescencia a 270 nm de λ de excitación y 476 y 508 nm de λ de emisión característicos del espectro del 2,3 benzoantraceno.

En este espectro (fig. 19) se observó la presencia de varios picos: analizando los datos obtenidos en Excel se pudo ver la ubicación de los puntos máximos de fluorescencia. Este espectro muestra los picos característicos de las dos especies presentes en la mezcla. La MEE muestra picos de fluorescencia del criseno a 270 nm de λ de excitación y a 364 y 382 nm de λ emisión; también muestra los picos que encontramos en el espectro del 2,3 dibenzoantraceno, el primero se superpone con el pico de fluorescencia de 270 nm de λ de excitación y a 364 nm de λ emisión del criseno y se presentan los picos en 250 nm de λ de excitación y a 380, 400 y

422 nm de λ de excitación, finalmente los pequeños picos de fluorescencia a 270 nm de λ de excitación y 476 y 508 nm de λ de emisión característicos del espectro del 2,3 benzoantraceno.

El máximo de fluorescencia localizado a 270 nm de λ de excitación y a 364 nm de λ de emisión está presente en los dos espectros individuales por lo que en este espectro se sobrepone impidiendo que utilicemos los puntos de fluorescencia máximos como forma de medir cuantitativamente los HPAs. Obtuvimos el VF de las matrices de los compuestos puros (tabla 3) y de las mezclas e hicimos una comparación del volumen que esperaríamos de la mezcla obtenido a partir de la suma de los volúmenes de cada espectro (tabla 4) contra el VF que obtuvimos a partir de la matriz de la mezcla.

Tabla 4. VBC obtenidos y esperados a partir de las MEE de las mezclas de HPAs a una concentración de 10 ng/ml

Mezcla	VF esperado	VF obtenido	% de lectura
Antraceno/Criseno	22,682,264	22,829,208	100.65%
Antraceno/2,3 DBA	26,705,148	27,020,268	101.18%
2,3 DBA/Criseno	9,204,956	8,766,156	95.23%

Con base en estos resultados sabemos que la suma del VF de dos espectros es equivalente al VF de la mezcla de dichos compuestos a las mismas concentraciones y sabemos que podemos discernir la concentración de un analito si conocemos la concentración y composición del resto de los analitos presentes en la muestra.

El problema que se encontró en nuestro sistema es que las mezclas son muy complejas y la cantidad de HPAs y el tipo varían dependiendo de la zona de la ciudad y de las industrias a las que estén expuestos y en las muestras que colectamos no conocemos la concentración de ninguno de los componentes. Al no poder reportar las concentraciones de los HPAs de las muestras decidimos buscar el HPA que tenga un VF curva promedio y reportaremos la cantidad de HPAs en equivalentes de dicho compuesto.

A partir de cada espectro de los compuestos puros se obtuvo el VF obteniendo los valores reportados en la tabla 5. El VF se obtuvo con los datos de Excel que proporciona el espectrofluorómetro.

Tabla 5. Volumen de fluorescencia de las matrices de excitación-emisión de cada compuesto.

PAH (10 ng/mL)	VF	Figura
Fenantreno	34,091,632	9
Criseno	2,879,409	7
Antraceno	20,326,774	4
Pireno	5,173,340	8
Benzo(a)pireno	20,011,311	5
1,2,5,6 dibenzoantraceno	42,846,902	25
1,2 dibenzopireno	2,632,033	26
2,3 dibenzoantraceno	6,288,834	6
7-12 dihidrobenzo(a)antraceno	10,899,517	27
7-metilbenzo(a)pireno	53,751,837	28
9-10 dimetiantraceno	24,606,476	24
Benzo(ghi)pireno	67,127,183	30
Dibenzo(ai)pireno	8,157,249	29
Perileno	17,599,304	31
Promedio	22,599,414	--

Los VF obtenidos a partir de estas matrices variaron debido a las diferentes intensidades de fluorescencia que registró el aparato, variando de un orden de magnitud de 2×10^4 a 14×10^4 unidades de fluorescencia. El HPA cuyo VF individual se acerca más al del promedio y que está clasificado como uno de los HPAs prioritarios por la EPA es el antraceno. Por lo antes descrito se seleccionó al antraceno como patrón y los resultados se reportaron en equivalentes de antraceno.

Para poder hacer una medición cuantitativa de los HPAs y para probar la linealidad del método con las unidades que íbamos a medir, fue necesario hacer una curva patrón de los VF de antraceno en acetonitrilo a bajas concentraciones ya que la bibliografía consultada indica que las concentraciones de HPAs en las muestras de aceite son bajas (del orden de nanogramos). La curva se realizó con

concentraciones en el rango de 1 a 10 ng/ml tomando más de 8 puntos de referencia. a partir de lo cual se obtiene el siguiente gráfico:

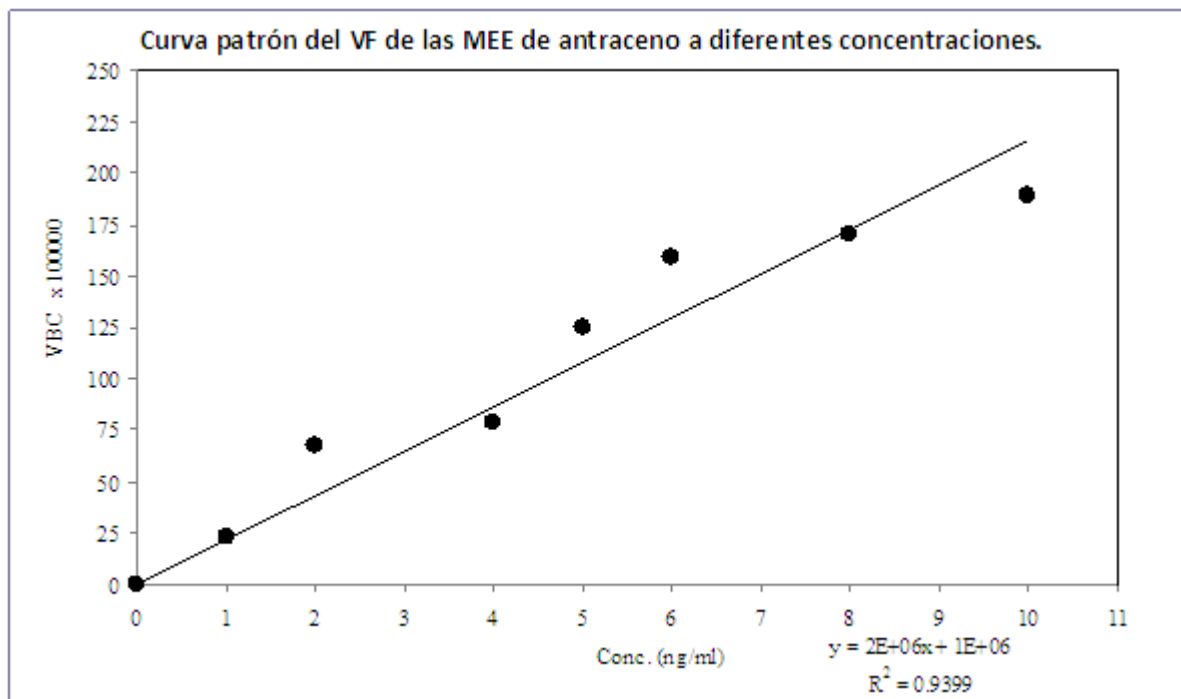


Figura 20. Curva patrón del volumen bajo la curva de las MEE de antraceno en acetonitrilo. La MEE obtenida fue de 200 a 330nm de λ de excitación y de 350 a 750 nm de λ de emisión.

A partir de la ecuación obtenida del gráfico 20 se calcularon las concentraciones en ng/ml de equivalentes de antraceno presentes en una muestra a partir del VF obtenido de su MEE. De este gráfico podemos deducir que el método no presenta linealidad apropiada para un método analítico ya que en el rango evaluado se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.94, esto puede deberse en parte a la variación del espectro por ruido del aparato. Un método debe de tener arriba del 0.97 de linealidad para ser válido.

Para evaluar la variabilidad entre diferentes mediciones de un mismo dato del espectrofluorímetro medimos el pico de fluorescencia máxima del antraceno reportado a 250 nm de λ de excitación y a 400 nm de λ emisión, el coeficiente de variación de 5 mediciones es igual a 3.1554 lo que indica que el 96.8% de las veces que midamos un determinado compuesto su punto de fluorescencia máxima sera el

mismo, sin embargo el límite máximo de variabilidad para un método analítico es del 3%.

La variabilidad de la cantidad de fluorescencia registrada por el equipo puede deberse en gran medida a la cantidad de ruido que se registra en el espectoflorímetro. Para analizar esto se evaluaron todos los puntos que se presentaron en la matriz de emisión-excitación del acetonitrilo la cual debe presentar fluorescencia en ningún punto y se obtuvo un coeficiente de variación del 12%, lo que es muy alto para un blanco.

El límite de detección del método equivale a la cantidad de analito que, genere tres veces el ruido del aparato (OAA, 2003). Tomando el punto más alto que se generó como consecuencia del ruido del aparato al medir los datos para el blanco de acetonitrilo, obtenemos que se requiere una concentración de analito que genere un ruido mayor a 1380 FC. Para 1 ng/ml de antraceno en acetonitrilo la señal del pico máximo de fluorescencia a 250 nm de longitud de onda de excitación y 400 nm de longitud de onda de emisión fue de 3484, el límite de detección calculado por intrapolación debe ser de aproximadamente 0.4 ng/ml.

Sabemos que la selectividad del método es baja debido a que los espectros de fluorescencia de cada HPAs se van a sobreponer y por lo tanto a sumarse.

Por último, se probó el método desarrollado con dos muestras de aceite contaminado con HPAs conocidos. Una con una mezcla de 5 ng/ml de HPAs y otra con 10 ng/ml. Con esto buscamos el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente con el valor real. La MEE de la mezcla de 5ng/ml de HPAs totales se observa en la figura 21, dicha mezcla de HPAs incluía antraceno, criseno, fenantreno, benzo(a)pireno y pireno.

Cualitativamente se puede observar la presencia de dos picos altos en la zona de fluorescencia del antraceno, del fenantreno y del criseno con una base un poco más ancha que la mostrada en el EEM del compuesto sólo y se observó la presencia de un pico ancho en una zona de 270 a 300 nm de λ de excitación entre 370 a 420 nm de λ emisión que debe de corresponder a la fluorescencia del benzo(a)pireno.

Ambos espectros fueron muy parecidos debido a que se utilizó la misma mezcla de HPAs para contaminarlos.

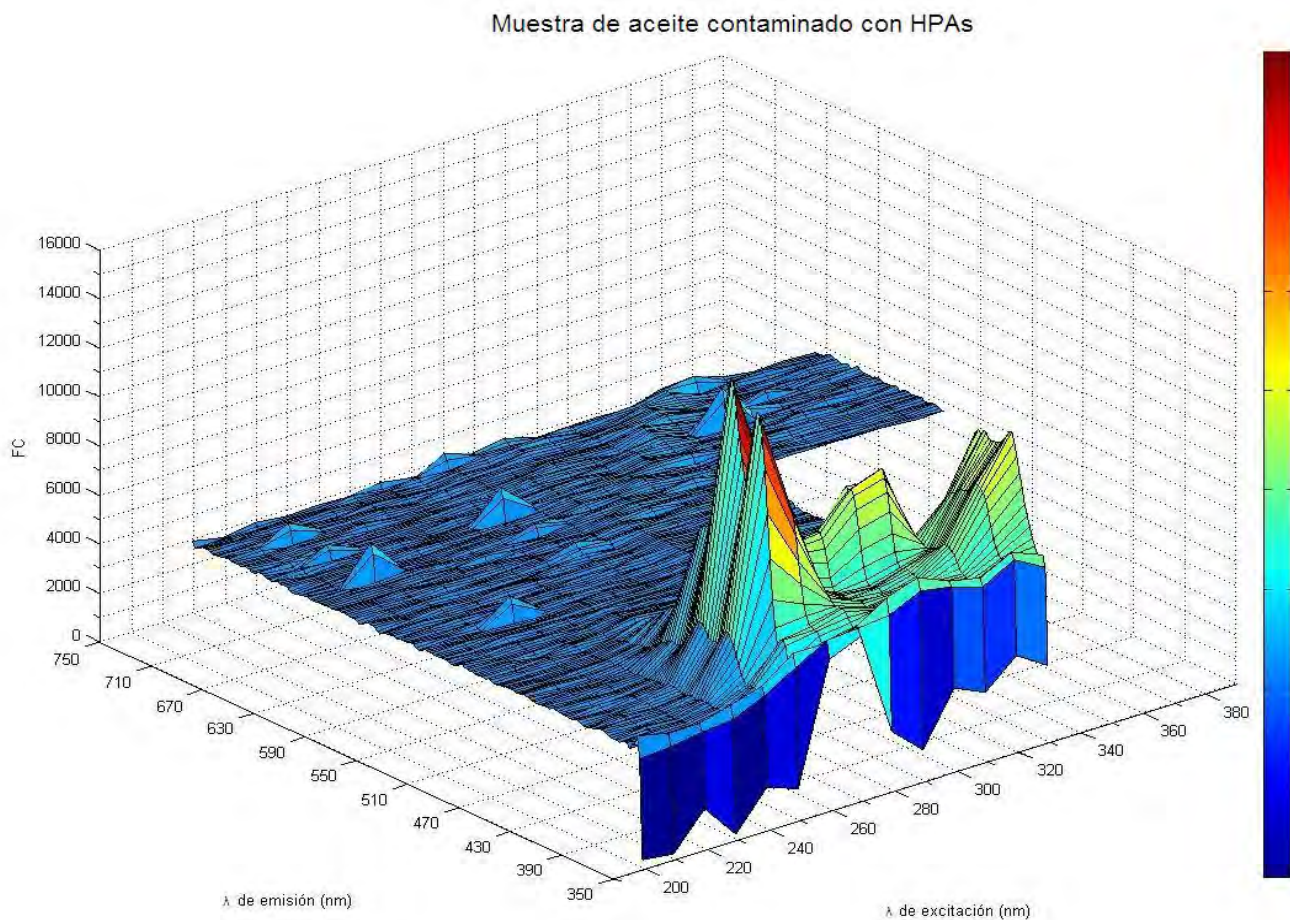


Figura 21. Matriz de excitación-emisión de una muestra de aceite contaminada con una concentración final de 5 ng/ml de una mezcla de antraceno, criseno, fenantreno, benzo(a)pireno y pireno.

Para la muestra contaminada con 5 ng/ml se obtuvo una concentración de 4.867 ng/ml y para la muestra contaminada con 10 ng/ml se obtuvo una concentración de 8.755 ng/ml; es decir, se obtuvo un porcentaje de recuperación del 97.3% y del 87.55% respectivamente. La concentración obtenida para la muestra contaminada con 10 ng/ml tiene una fluorescencia menor a la que debería presentar.

2. Muestras de estaciones de monitoreo

A partir de las muestras de aceite que dejamos en cajas Petri durante un mes en las estaciones de monitoreo atmosférico obtuvimos los VF de cada una de la MEE, las cuales mostraron patrones distintos entre sí y diferentes a las MEE obtenidas a partir de los compuestos puros (fig. 22). En la tabla 6 se presentan los VF obtenidos. A partir de las MEE y a partir de la ecuación obtenida de la curva patrón de antraceno (fig. 20) obtuvimos los datos mostrados en la quinta columna de esta tabla que es concentración total de HPAs en la muestra en ng/ml en equivalentes de antraceno.

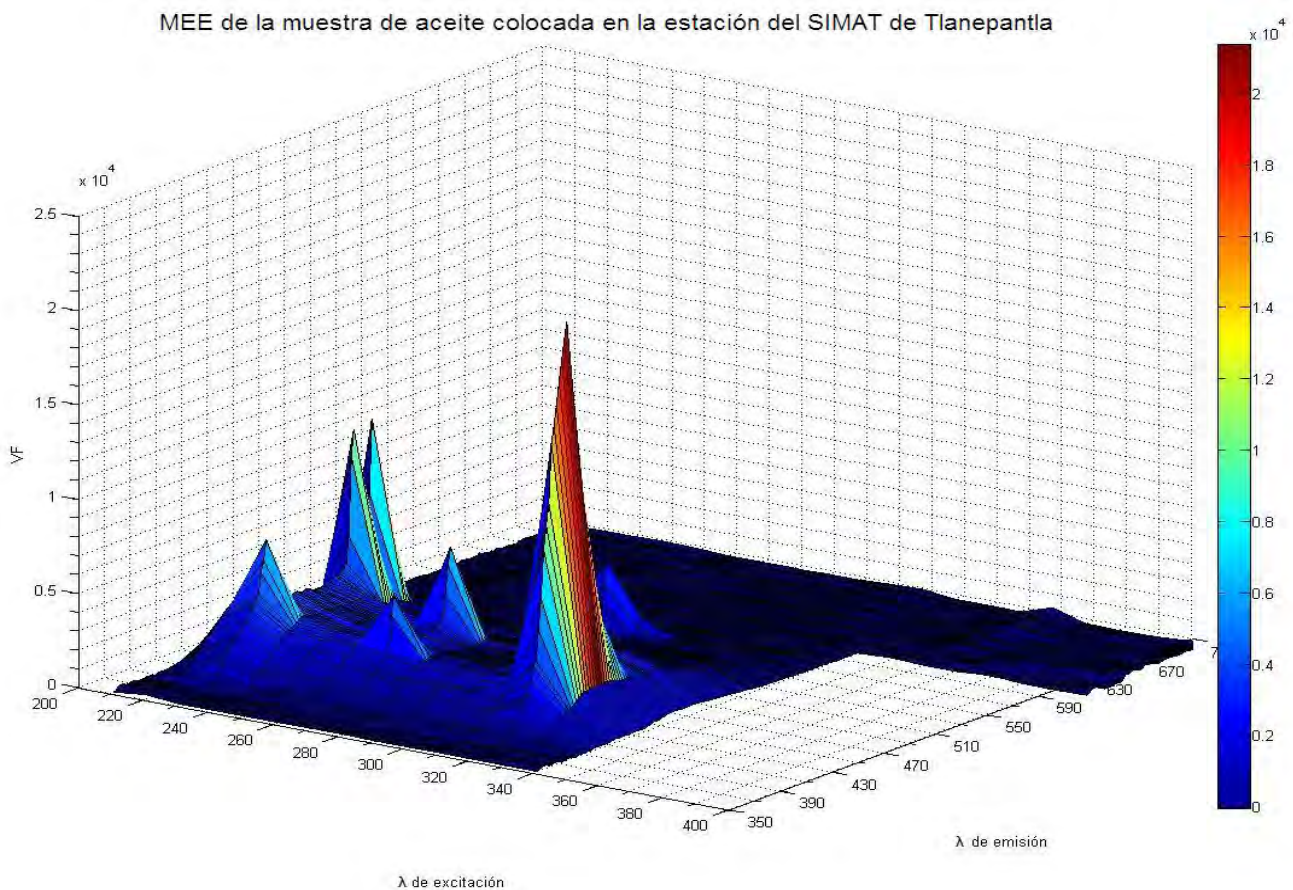


Figura 22. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de Tlanepantla y recolectada después de un mes. El gráfico muestra varios picos, los más destacables se localizan en 320nm de λ de excitación y 424 nm de λ de emisión, a 220nm de λ de excitación y a 418 y 486 nm de λ de emisión y a 270nm de λ de excitación y 460 nm de λ de emisión.

Tabla 6. Resultados de la concentración de HPAs para las diferentes zonas de muestreo de las estaciones del SIMAT.

Estación del SIMAT	Zona	Tipo	VF	HPA (ng/ml)
Tlanepantla (TLA)	NO	Industrial-Urbano	30,809,005	14.9
ENEP-Acatlán (EAC)	NO	Urbano	1,140,198	0.08
Xalostoc (XAL)	NE	Industrial-Urbano	22,263,832	10.63
San Agustín (SAG)	NE	Urbano	11,601,715	5.3
Merced (MER)	CE	Urbano	9,504,634	4.2
Tláhuac (TAH)	SE	Rural	2,920,224	0.96
Cerro de la Estrella (CES)	SE	Urbano	5,823,331	2.41
UAM-I (UIZ)	SE	Urbano	3,659,663	1.33
Pedregal (PED)	SO	Urbano	4,423,129	1.71

Según los datos obtenidos de concentración de HPA encontramos concordancia con el hecho de que en las muestras en dónde se encontró una mayor cantidad de HPAs son de las zonas de tipo industrial-urbano. En estas estaciones además de la gran cantidad de tráfico de las avenidas cercanas a estos puntos se encuentran numerosas industrias que contribuyen a la formación de HPAs. Sumado a esto, en esa época se estaban haciendo obras de construcción de vialidad a unas calles de donde se encuentra la estación de monitoreo de Tlanepantla, lo que aumentó el tráfico vehicular y por tanto las emisiones liberadas al ambiente, así como, la cantidad de polvo al que se adhieren las partículas de HPAs. La cantidad más baja se encontró en la ENEP-Acatlán a pesar de que se encuentra en una zona urbana, esto debido quizá a que era época de vacaciones y la universidad no era tan frecuentada. El dato obtenido de 0.08 ng/ml no es válido desde el punto de vista cuantitativo si consideramos que el límite de detección del método utilizado es del 0.4 ng/ml. La concentración más baja de HPAs que se encontró y que fue válida con el método empleado fue en la zona de Tláhuac, que se considera como rural, aquí las emisiones deben de ser bajas ya que no hay tanto transporte ni industrias. La zona del SO del Pedregal fue tomada en una zona residencial, sin zonas industriales alrededor, sin embargo, el periférico y el distribuidor vial se encuentran a poca distancia, además la ubicación de la zona está rodeada de montañas lo que

impide el desalojo de los contaminantes favoreciendo la deposición de éstos en la zona.

Al observar las MEE de los compuestos vemos que presentan puntos máximos en las zonas en dónde se observa la fluorescencia de los HPAs empleados para el desarrollo del método, lo cual puede ser indicativo de la presencia de éstos en las muestras. Sin embargo, se observa fluorescencia en puntos en donde ninguno de los compuestos evaluados mostró fluorescencia lo que puede indicar la presencia de otros HPAs aparte de los que nosotros evaluamos o la presencia de alguna molécula que puede incorporarse del medio ambiente.

Las muestras fueron colocadas en las fechas de enero a febrero de 2009, por lo que buscamos los datos reportados por el SIMAT en PM_{10} y $PM_{2.5}$ de esta época para ver si existía correlación con los datos observados y los obtenidos. Encontramos en la página del SIMAT el informe anual de calidad de aire en la Ciudad de México de 2008 ya que el de 2009 no ha sido publicado en la página; analizando estos datos vimos que las concentraciones más altas de partículas en general se presentan en la temporada fría-seca, aumentando en diciembre. En épocas de lluvias, las partículas son removidas por éstas, sobretodo las $PM_{2.5}$ por ser de menor tamaño. A partir del informe anual presentado en 2008 obtuvimos los promedios de las concentraciones de HPAs máximas anuales en 24 horas para PST y la concentración máxima promedio de PM_{10} y $PM_{2.5}$ por año. En ninguno de los análisis de contaminantes de las diversas partículas encontramos reportados valores para las estaciones de Tláhuac y Acatlán.

Tabla 7. Valores de los indicadores de la NOM para PST en las estaciones de monitoreo que reportaron este contaminante en 2008. (SIMAT-2008)

Entidad	Estación	Clave	Valor promedio 24H (NOM=210µg/m ³)	Cumple la NOM
Distrito Federal	Cerro de la Estrella	CES	267	No
	Merced	MER	302	No
	Pedregal	PED	233	No
	UAM-I	UIZ	344	No
Estado de México	Tlanepantla	TLA	241	No
	Xalostoc	XAL	343	No

NOM-025-SSA1-1993

En la tabla 7 se muestra el promedio anual de la concentración de PST diario. Este informe reporta que las concentraciones más altas se registraron en días con vientos intensos o en las estaciones cercanas a sitios donde se realizan actividades de construcción y mantenimiento de la infraestructura urbana. Ninguna de las estaciones de monitoreo logró el cumplimiento de la NOM al reportar valores mayores a 210 µg/m³ en 24 horas. El valor más alto se registró en la estación UAM-Iztapalapa.

Tabla 8. Valores de los indicadores de la NOM para PM₁₀ en las estaciones de monitoreo que reportaron este contaminante en 2008. (SIMAT-2008)

Entidad	Estación	Clave	Valor promedio anual (NOM=50µg/m ³)	Cumple la NOM
Distrito Federal	Cerro de la Estrella	CES	49.4	Si
	Merced	MER	56.5	No
	Pedregal	PED	37.6	Si
	UAM-I	UIZ	37.4	Si
Estado de México	Tlanepantla	TLA	53.8	No
	Xalostoc	XAL	73.3	No

NOM-025-SSA1-1993

En la tabla 8 están los valores reportados para partículas menores a 10 μm de las estaciones que midieron este parámetro y que nosotros monitoreamos. La NOM establece como límite máximo un valor de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Esta NOM se cumple en casi todas las estaciones del DF menos en la estación Merced que reporta un promedio de 56.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Las estaciones ubicadas en el Estado de México reportaron valores que exceden la norma, la concentración del promedio anual más alta se reportó en la estación Xalostoc con 73.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Tabla 9. Valores de los indicadores de la NOM para $\text{PM}_{2.5}$ en las estaciones de monitoreo que reportaron este contaminante en 2008. (SIMAT-2008)

Entidad	Estación	Clave	Valor promedio anual (NOM=15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Cumple la NOM
Distrito Federal	Merced	MER	56.5	No
	UAM-I	UIZ	----	----
	Pedregal	PED	18.1	No
Estado de México	San Agustín	SAG	20.5	No
	Tlanepantla	TLA	53.8	No
	Xalostoc	XAL	26.5	No

NOM-025-SSA1-1993

En esta tabla vemos que todas las estaciones excedieron el valor del promedio anual establecido por la NOM de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, el valor máximo se registró en la estación Xalostoc con 26.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En el informe reportan que el valor que no pudo concluirse de la UAM-I fue a causa de falta de muestras para la evaluación del cumplimiento de la norma debido a la prolongada huelga.

En base a estos datos podemos concluir que la NOM no se cumple a pesar de los numerosos proyectos contra la contingencia ambiental. En general podemos ver que las estaciones del Estado de México, TLA y XAL no cumplen la NOM en ninguno de los tres contaminantes, esto coincide con nuestros datos ya que estas muestras de aceite superan en cantidad de HPAs medidos a las demás por 3 veces o más. La NOM que no se cumple en ninguna de las estaciones reportadas es la

correspondiente a $PM_{2.5}$, lo cual es altamente dañino para la salud ya que como mencionamos en la introducción, este tamaño de partícula tiene acceso a la zona alveolar del tracto respiratorio causando problemas de salud.

La muestra que tuvo menor cantidad de HPAs fue la de la que colocamos en Tláhuac con 0.96 ng/ml, lo que se acerca mucho a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, cantidad que las legislaciones de algunos países europeos no está permitida (European Commission Regulation (EC) 208/2005). Cabe tomar en cuenta que la información que estamos obteniendo es de muestras que no fueron empleadas en la preparación de alimentos, no se sometían a calentamiento y se dejaron a la intemperie por un lapso de un mes, esto es relevante ya que al aumentar la temperatura del aceite esperaríamos que los HPAs fueran más solubles en el medio. Al preparar alimentos en el aceite pueden liberarse HPAs y contaminar la comida. En ocasiones el aceite puede llegar a durar más de un mes en uso.

3. Muestras de puestos de comida

Las muestras provenientes de puestos de comida fueron difíciles de obtener en la ciudad de México, sin embargo obtuvimos algunas muestras en el mercado de Cuernavaca que se encuentra al lado de la terminal de autobuses y de puestos que se encuentran en Tres Marías en la carretera federal México-Cuernavaca. Creemos que las muestras estarán menos contaminadas que en el DF debido a que sólo hay tráfico vehicular pesado de camiones viejos y no hay zonas industriales cerca. El aceite recolectado de los puestos de comida se veía muy usado, el color era más oscuro que el normal y tenía un olor rancio, sin embargo en ninguno de los puestos nos dijeron cuanto tiempo tenían usando el aceite.

Tabla 10. Resultados de la concentración de HPAs para muestras de aceite tomadas de puestos de comida

Muestra	Procedencia	HPAs (ng/ml)	HPA (mg/kg)
1	Mercado de Cuernavaca	1.00	1.086
2	Mercado de Cuernavaca	0.12	----
3	Carretera México-Cuernavaca	1.58	1.72
4	Carretera México-Cuernavaca	3.48	3.78

Muestra de aceite recolectada de un puesto de comida ambulante de la carretera federal México- Cuernavaca.

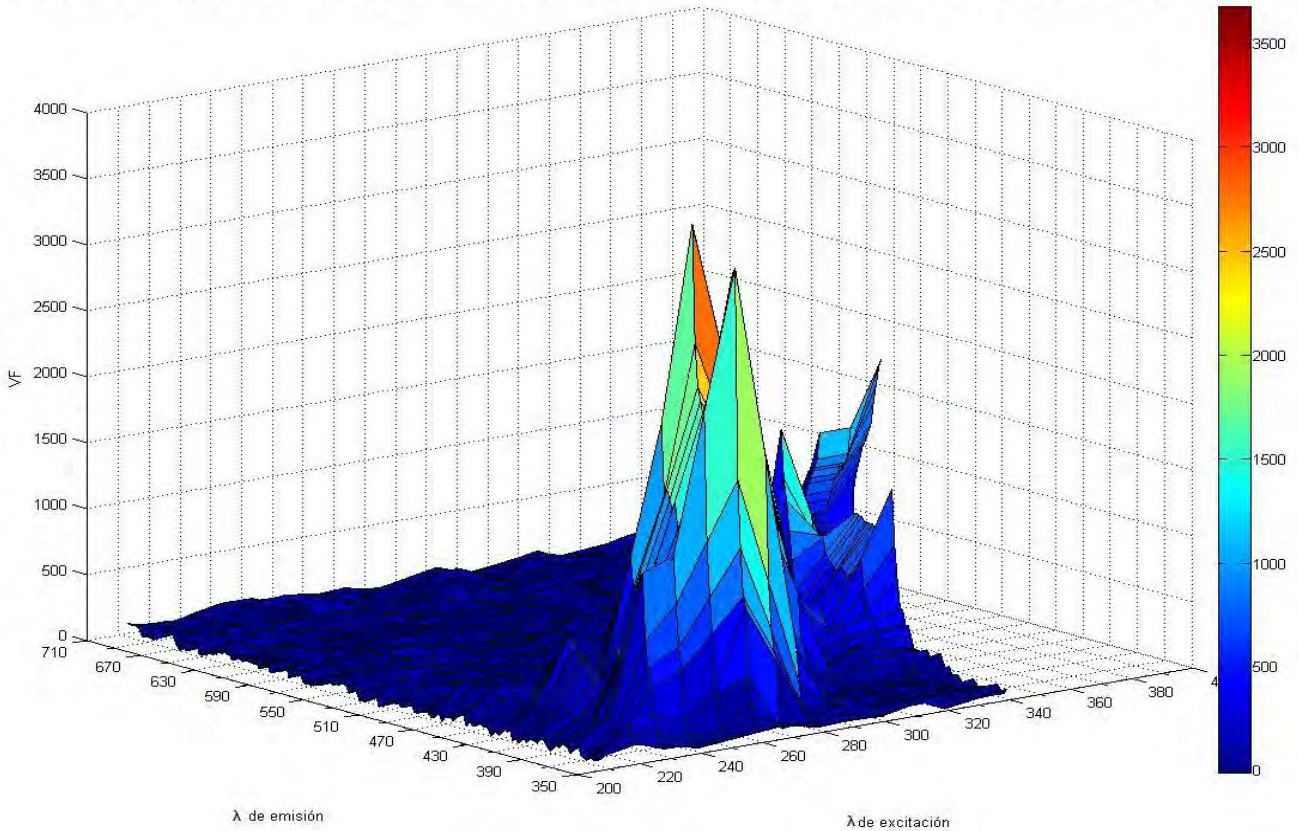


Figura 23. MEE de una muestra de aceite de maíz recolectada de un puesto de comida ubicado en la carretera federal México-Cuernavaca. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 250nm de λ de excitación y 368 nm de λ de emisión, a 260 nm de λ de excitación y a 422 nm de λ de emisión, a 280nm de λ de excitación y a 436 nm de λ de emisión, y a 330 nm de λ de excitación y 434 nm de λ de emisión.

La densidad del aceite es de 0.92 g/L para poder calcular la concentración de HPAs presentes en las muestras. La muestra 2 presenta una concentración muy baja para poder ser cuantificada adecuadamente por lo que solo se reporta la presencia de HPAs en la muestra sin especificar la concentración. La legislación establecida en varios países indica que las concentraciones máximas permitidas de HPAs en alimentos son del orden de 1 a 5 ng/kg por lo que podemos ver que la mayoría de nuestras muestras exceden esa norma. La muestra 2 del mercado registro 0.12 ng/ml de equivalentes de antraceno sin embargo esto se encuentra por debajo del valor que el método puede cuantificar, por lo que únicamente podemos asegurar de manera cualitativa que contiene HPAs. Aunque la EPA reporta como seguro el consumo de concentraciones mayores (0.3 mg de antraceno, 0.03 mg de pireno, etc) no podemos asegurar cuál es el contenido de HPAs carcinógenos que se encuentra dentro de la concentración total de HPA. Para que una muestra analizada con el método desarrollado en este trabajo esté dentro de la legislación debe de contener menos de 0.5 ng/ml de equivalentes de antraceno.

En la MEE de la figura 23 se observan claramente los puntos máximos de fluorescencia, cosa que no pasa en la muestra que se tomó del mercado de Cuernavaca que tiene la menor concentración. Los puntos máximos de fluorescencia son múltiples y no todos concuerdan con los obtenidos a partir de los compuestos puros, lo que puede ser indicativo de la presencia de otros HPAs que no tomamos en cuenta durante el desarrollo de esta técnica.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se desarrolló una metodología para la medición de HPA con una linealidad del 94%; y un coeficiente de variación entre mediciones del 3.15% atribuible al ruido del equipo. El método posee buena sensibilidad (0.4 ng/ml) con respecto a otros, pero tiene baja selectividad, motivo por el cual, se reporta la concentración de HPAs en equivalentes de antraceno y no la cantidad de cada uno.

El VF obtenido a partir de una mezcla de dos HPAs es equivalente a la suma de los VF de cada compuesto por separado.

La sensibilidad, exactitud y precisión del método pueden afinarse con un mejor equipo y con mejores condiciones.

De las muestras enriquecidas se encontró un porcentaje de recobro del 97.3% para la muestra contaminada con 5 ng/ml y de 87.55% para la muestra contaminada con 10 ng/ml. En consecuencia las muestras deben ser diluidas para evitar ruido debido al fenómeno de apagamiento.

En México no existe una legislación que regule el contenido de HPAs en ningún tipo de alimentos, sin embargo la consideramos necesaria ya que los resultados de la cantidad de HPA en equivalentes de antraceno en las muestras rebasaron las normas y las recomendaciones establecidas por otros países.

En varios estudios se ha demostrado la toxicidad de los HPAs e inclusive algunos han probado ser carcinógenos para humanos y animales, por lo tanto su detección en alimentos es de gran importancia

Sería interesante realizar un estudio evaluando el aumento en la concentración de HPAs en aceite comestible durante varios días para poder emitir una recomendación de uso máximo del aceite con el fin de evitar concentraciones de HPAs que se reportan dañinas a la salud.

BIBLIOGRAFÍA.

Arrebola F. J.; Garrido F. A.; González R. M.; Plaza B. P.; Martínez V. J. L. 2006. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil by a completely automated headspace technique coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 41(6):822-829.

ATSDR. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic hydrocarbons (PAHs) Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 1995. Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.html>.

Badiali D.; Marcheggiano A.; Pallone F.; Paoluzi P.; Bausiano G.; Iannoni C.; Materia E.; Anzini F.; Corazziari E. 1985. Melanosis of the rectum in patients with chronic constipation. *Diseases of the Colon and Rectum* 28: 241-245.

Beltrán J.L.; Ferrer R.; Guiteras J. 1998. Multivariate calibration of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures from excitation-emission fluorescence spectra. *Analytica Chimica Acta* 373: 311-319.

Booksh K.; Ji Ji R.D.; Cooper G.A. 1999. Excitation-emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta* 397: 61-72.

Böstrom C.E.; Gerde P.; Hanberg A.; Jernström B.; Johansson C.; Kyrklund T.; Rannug A.; Törnqvist M.; Victorin K.; Westerholm R.; 2002. Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air *Environmental Health Perspectives*. 110:3: 451-488.

Burdock G. 1997. *Encyclopedia of Food Color and Additives*, Vols. I, II, and III, CRC Press, Boca Raton.

Christensen Jan H.; Hansen A.B.; Mortensen J.; Andersen Ole 2005. Characterization and matching of oil samples using fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society 77: 2210-2217.

Chung-Yih K.; Hong-Shen L.; Jeang-Hung L., 2006. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and lead during Chinese mid-autumn festival, *Science of the Total Environment* 366: 233-241.

Churg A. ; Brauer M. 1997. Human lung parenchyma retains PM_{2.5}. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155:2109-2111.

Comisión Ambiental Metropolitana, Programa para mejorar la Calidad del Aire en la Zona Metropolitana del Valle de México 2002-2010. SEMARNAT, GDF, GEM, SSA. Talleres Gráficos de México, D.F. 2001.

Conte L.S.; Moret S. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *Journal of Chromatography A* 882 : 245-253.

Dionex. Analysis of PAH in edible oils by donor-acceptor complex chromatography (DACC-HPLC) Coupling with Fluorescence Detection. Application Note 196:1-8.

EPA 2008. Environmental Protection Agency, United States. Office of solid waste, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Washington, 2008. 1-3
<http://www.epa.gov/wastes/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>

“European Commission Regulation (EC) 208/2005,” European Union 2005. *Official Journal of the European Union*, vol. 3, article L34.

Gauthier T.D., Shane E.C., Guerin W.F., Seltz R., Grant C.L., 1986. Fluorescence Quenching Method for Determining Equilibrium Constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Binding to Dissolved Humic Materials, *Environmental Science Technology*, 20, 1162-1166.

Harris D.C., 2001. *Análisis Químico Cuantitativo*, 2º edición, Editorial Reverté S.A., España.

IARC. 1983. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemicals, Environmental and Experimental Data. IARC, Monograph Evaluation Carcinogenic Risks in Humans 32. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer.

IJJ, Instituto de Investigaciones Jurídicas 2008. De Homo Sapiens a Homo Automobilis: Revisando la gestión de la calidad del aire en la Ciudad de México. *Boletín Mexicano de Derecho Comparado*. México, D.F., Biblioteca Jurídica Virtual del Instituto de Investigaciones Jurídicas, UNAM. 121.

INEM, 2006. “Inventario Nacional de Emisiones de México, 1999”, Ciudad de México. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAP y GDF, 2006

Koss G., Tesseraux I. 1999. Toxicology. Hamburg University Medical School and Department of Toxicology and Environmental Medicine of the Fraunhofer Society Hamburg, Germany. Academic Press.

Manoj K. Pandey; Krishn K. Mishra; Subhash K. Khanna and Mukul Das 2004. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in commonly consumed edible oils and their likely intake in the Indian population. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 81(12)1131-1136.

Matlab Software. Version 7.6.0.324 (R2008a). The MathWorks, Inc.

Neal J.; Rigdon R.H. 1967. Gastric tumors in mice fed benzo(a)pyrene: a quantitative study. *Texan Report of Biology and Medicine* 25: 553-557.

NOM-025-SSA1-1993. Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire del ambiente, con respecto a las partículas menores de 10 micras (PM10). Valor permisible para la concentración de partículas menores de 10 micras (PM10) en el aire ambiental, como medida de protección a la salud de la población".

OOA, 2003. Organismo Argentino de Acreditación, 2003. Guía para la validación de metodos de ensayo, DC-LE-05, 1-16

Oost R.; Beyer J.; Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and Pharmacology*. 13:57-149

Orellana M.; Guajardo V. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile*. 132:85-94

Pott P. 1775. Chirurgical observations. Reproduced in: National Cancer Institute Monographs 1963:7-13.

RISK " Toxicity Profiles." 1997. The Risk Assessment Information System Toxicity Profiles

SIMAT 2008. Calidad del aire en la Ciudad de México. Informe anual del Sistema de Monitoreo Atmosférico 2008. Secretaria del Medio Ambiente. Gobierno del Distrito Federal

Stephen G. G. 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. En: Donald C. M. y Gary K. Ostrander (eds). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC Press, Boca Raton, FL, 37-85

Şekeroglu G.; Gógüs F. y Fadiloglu S. 2007. Determination of benzo(a)pyrene in vegetable oils by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Quality*. 30: 300-308.

Straif K.; Baan R.; Grosse Y.; Secretan B.; El Ghissassi F.; Cogliano V. 2006. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Lancet Oncology* 6: 931-932.

Thornhill D. C. 2007. Air quality in Mexico City: Spatial and temporal variations of particulate PAH on source apportionment of Gasoline-versus diesel Vehicle Emissions. Blacksburg, Virginia, Virginia Polytechnic Institute and State University. Masters in Science: 90.

Troche K. S.; Braga S.F.; Coluci V.R.; Galvão D.S. 2005. Carcinogenic Classification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons through Theoretical descriptions. *international Journal of Quantum Chemistry*, 103: 718-730.

Vazquez Duhalt ,1989. Environmental impact of used motor oil. *Sciences of the Total Environment*. 79: 1 23.

Vives I.; Grimalt J.; Guitart R. 2001. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología, Asociación para el Avance de la Ciencia y Tecnología*. Barcelona España 3: 45-51.

Vila F. G. 2006. Olive oil characterization using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis. *Departamento de Química Analítica i Química Orgánica. Tarragona, Universitat Rovira i Virgili*. Tesis de Doctorado.

Węgrzyn E.; Grzeńkiewicz S.; Popławska W. and Głód B.K. 2006- Modified analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbon, using sec for sample preparation and RP-HPLC with fluorescence detection. Application to different food samples. *Acta Chromatographica* 17:233-249.

Whery E.L. *Modern Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press. New York, 1976.

WHO. World Health Organization 1998. *Environmental Health Criteria 202, International Programme on Chemical Safety*. Geneva, Switzerland.

Anexo I

**Matrices de Emisión-Excitación de HPAs, muestras de estaciones de
monitoreo y puestos de comida**

Anexo I.

Matrices de Emisión-Excitación de HPAs, muestras de estaciones de monitoreo y puestos de comida

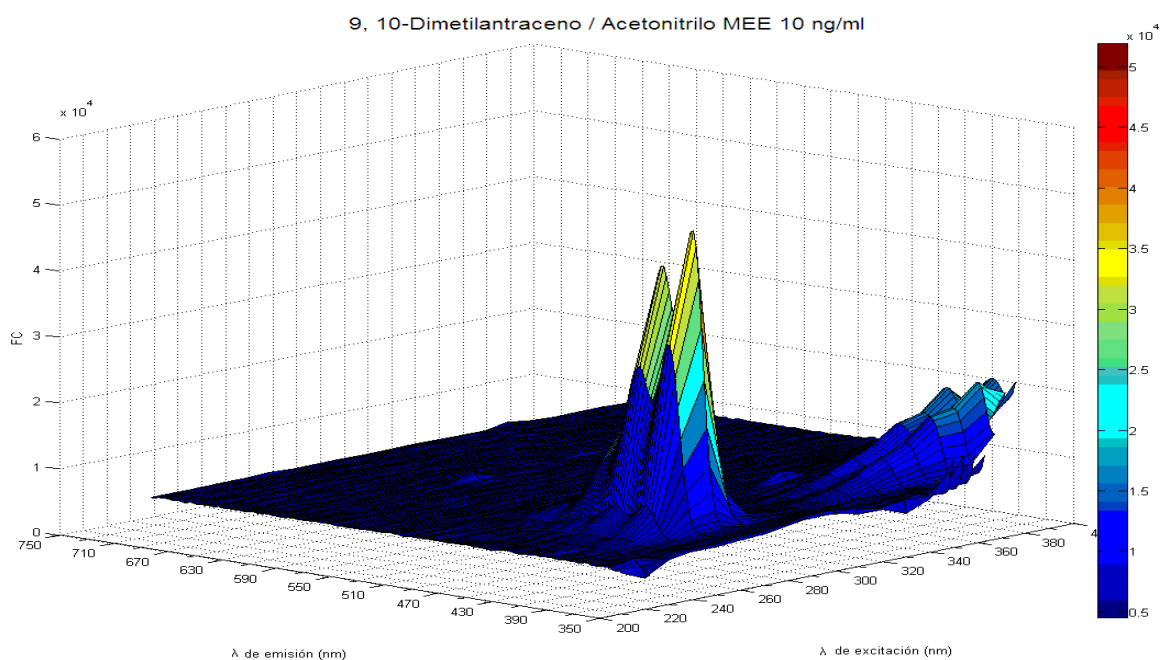


Figura 24. Matriz de excitación-emisión de 9,10-Dimetilantraceno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos característicos a 260 nm de λ de excitación y a 404 y 426 nm de λ emisión.

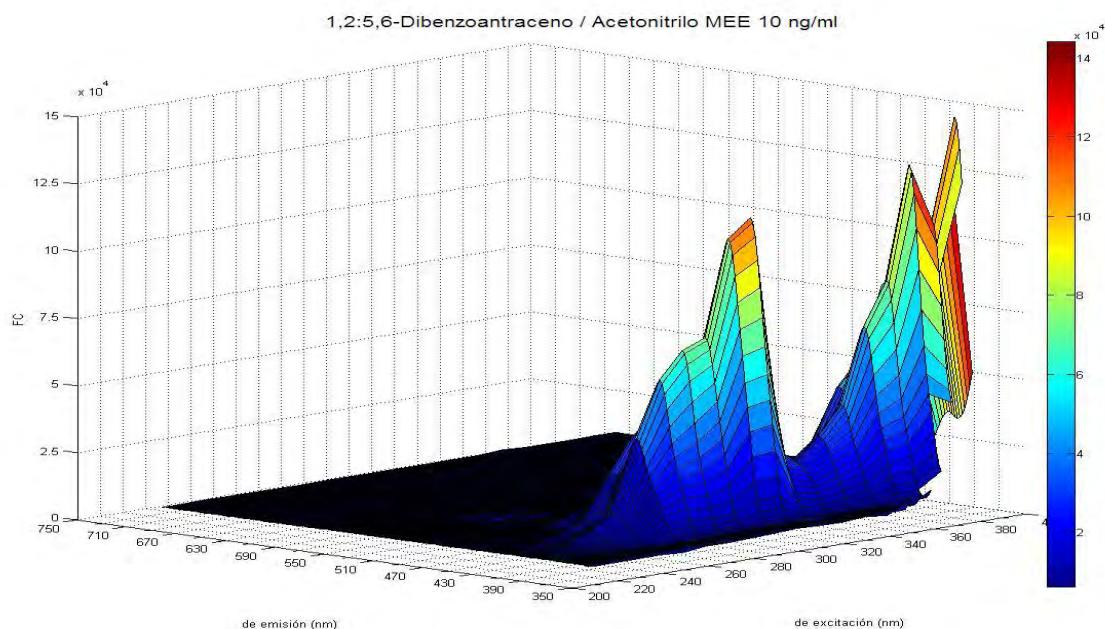


Figura 25. Matriz de excitación-emisión de 1,2:5,6-Dibenzoantraceno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta un pico de fluorescencia a 300 nm de λ de excitación y 408 nm de λ de emisión y otro a 370 nm de λ de excitación y a 408 nm de λ de emisión.

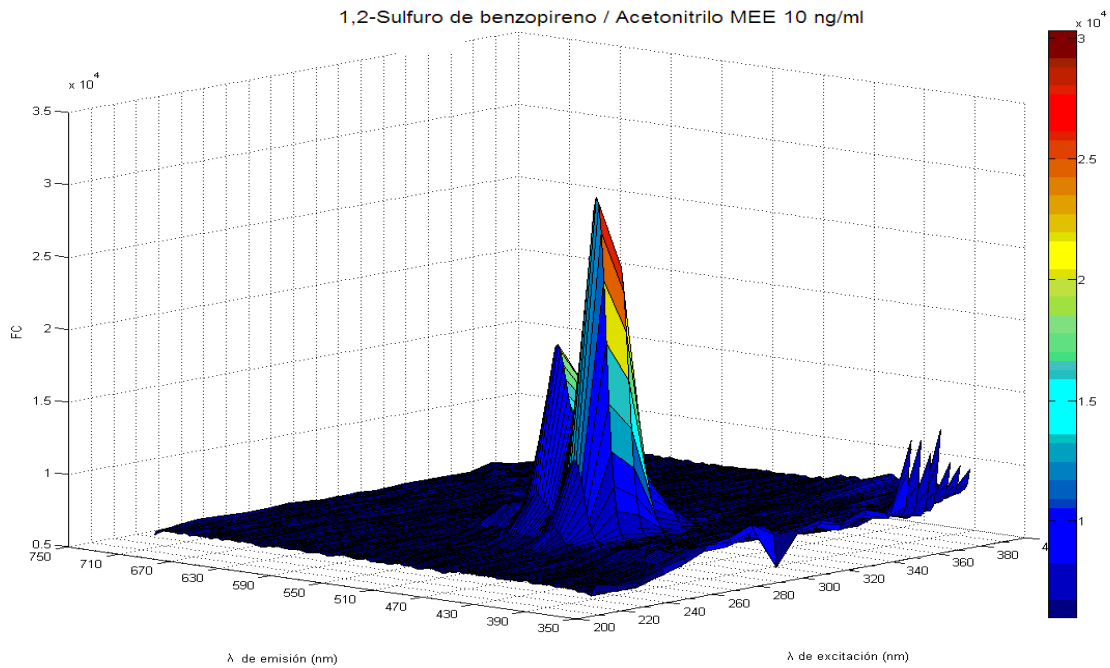


Figura 26. Matriz de excitación-emisión de 1,2- sulfuro de dibenzopireno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos de fluorescencia a 270 nm de λ de excitación en 476 y 506 nm de λ de emisión.

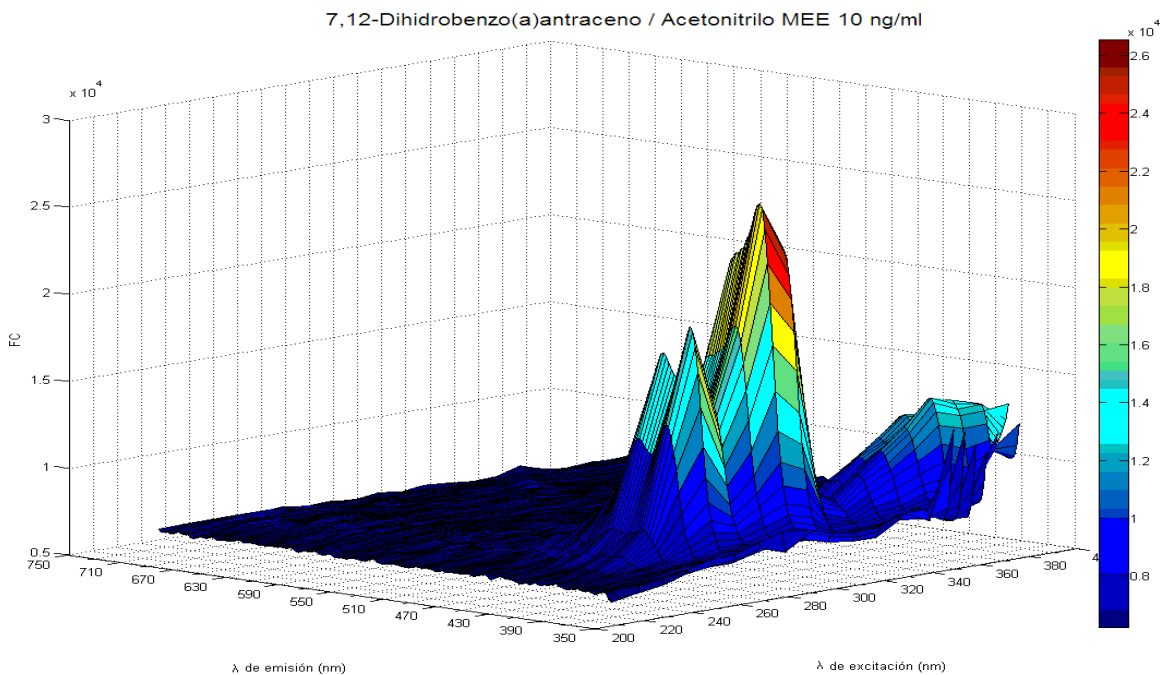


Figura 27. Matriz de excitación-emisión de 7-12 dihidrobenzo(a)antraceno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta una gran de fluorescencia con picos máximos en 260 nm de λ de excitación y 406 y 426 nm de λ de emisión y en 408 nm de λ de excitación y a 290 nm de λ de emisión.

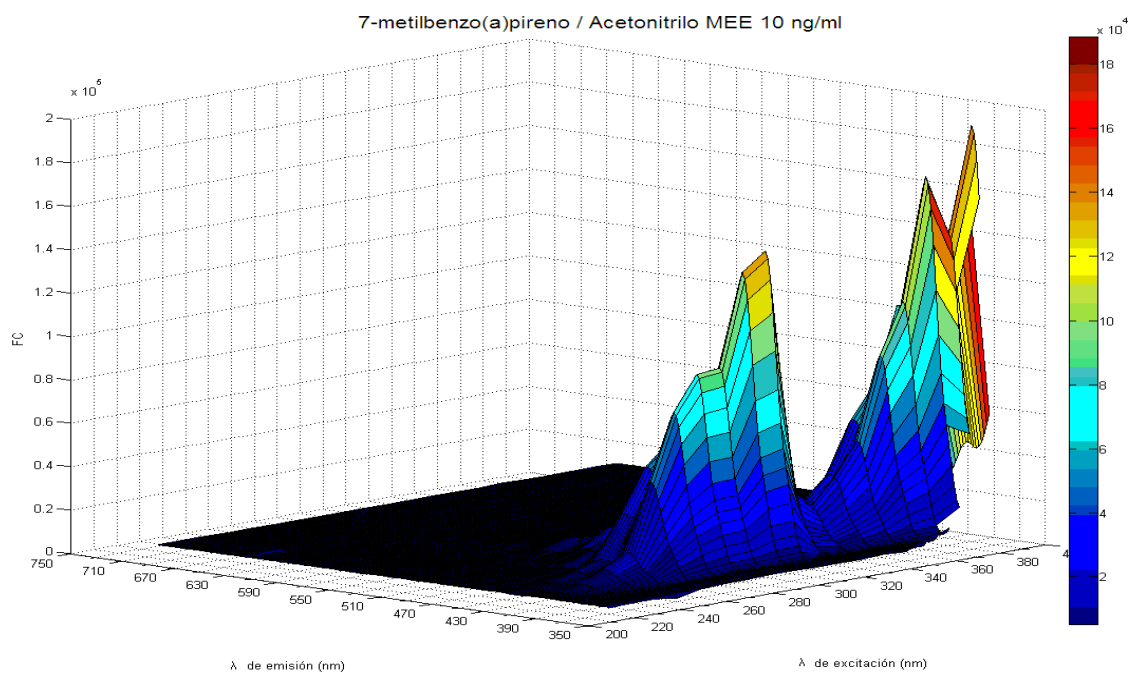


Figura 28. Matriz de excitación-emisión de 7-metilbenzo(a)pireno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos de fluorescencia a 300 nm de λ de excitación, a 408 y a 428 nm y de λ de emisión y presenta otro pico de fluorescencia a 370 nm de λ de excitación y a 408 nm de λ de emisión.

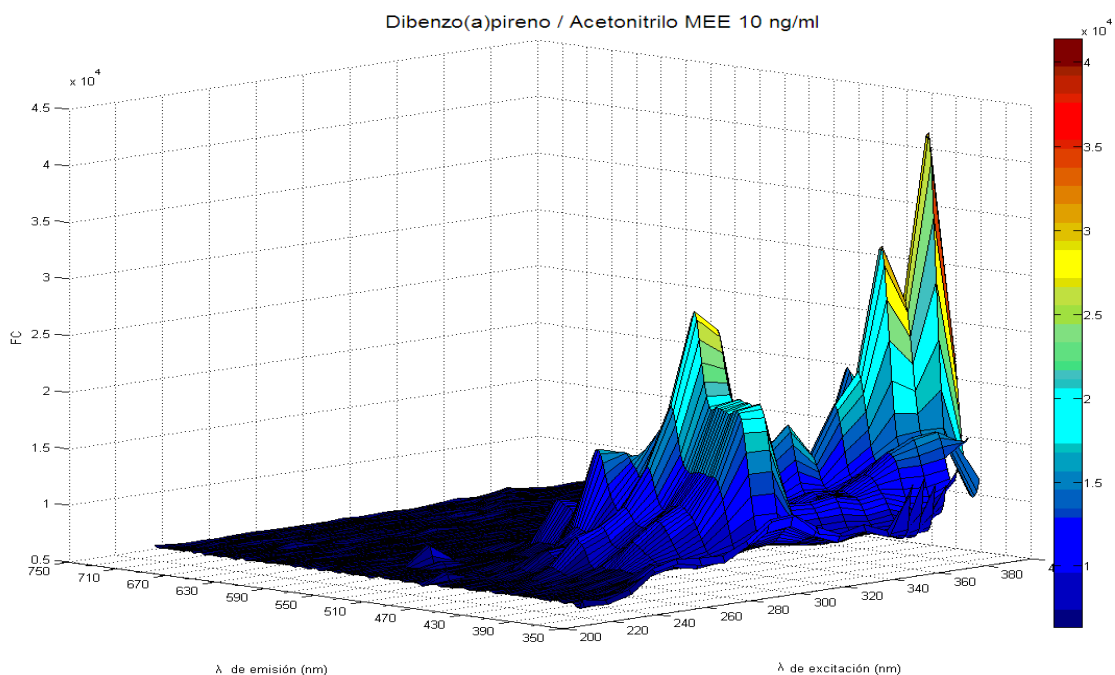


Figura 29. Matriz de excitación-emisión de dibenzo(a)pireno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos pico de fluorescencia a 300 nm de λ de excitación y 416 y 436 nm de λ de emisión y presenta otra zona de fluorescencia con pico máximo a 370 nm de λ de excitación y a 434 nm de λ emisión.

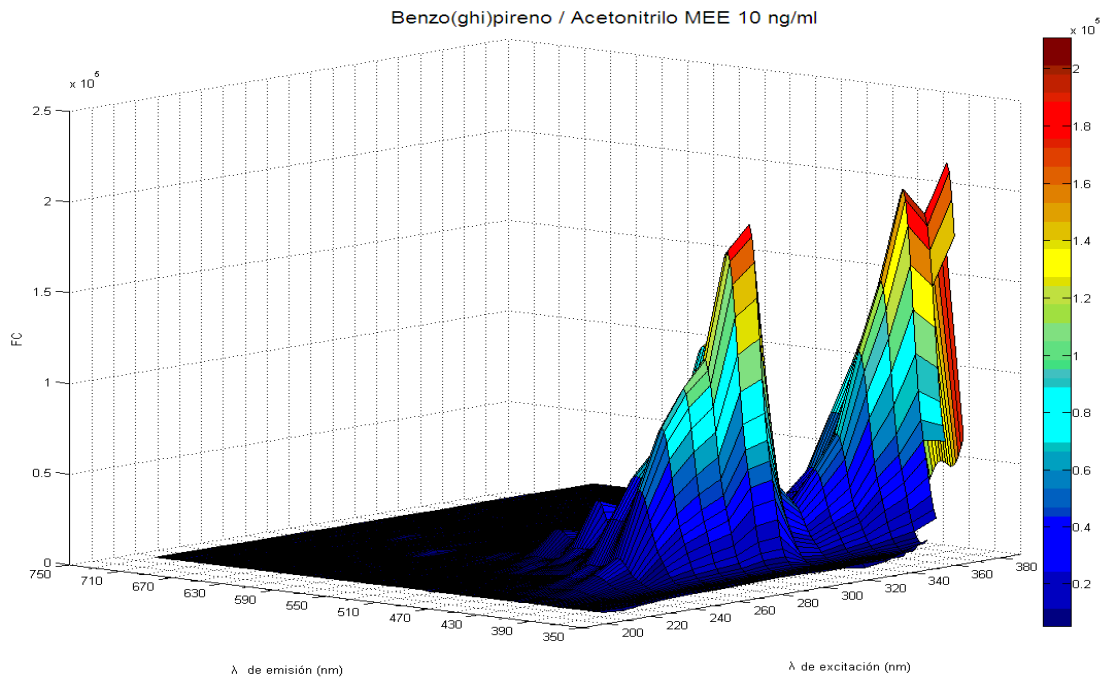


Figura 30. Matriz de excitación-emisión de benzo(ghi)pireno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos de fluorescencia a 290 nm de λ de excitación y a 408 y 426 nm de λ de emisión y presenta otra zona de fluorescencia con pico máximo a 370 nm de λ de excitación y a 404 nm de λ de emisión.

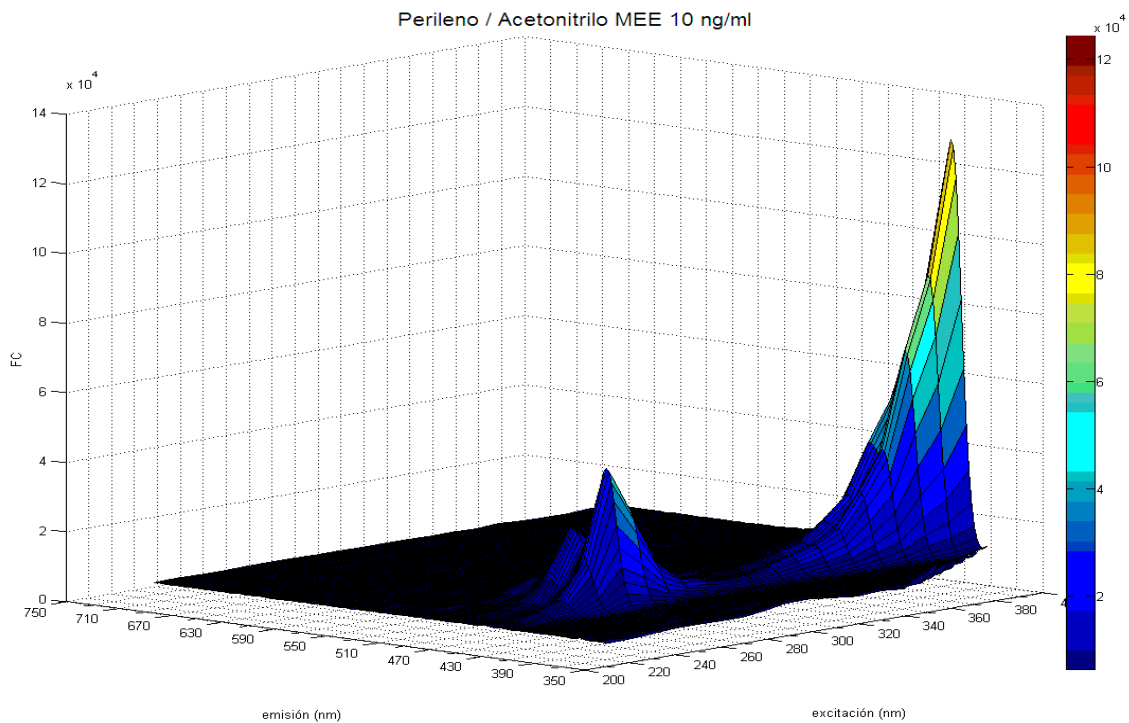


Figura 31. Matriz de excitación-emisión de perileno en acetonitrilo (10 ng/ml). Presenta dos picos de fluorescencia a 240 nm de λ de excitación y a 408 y 426 nm de λ de emisión.

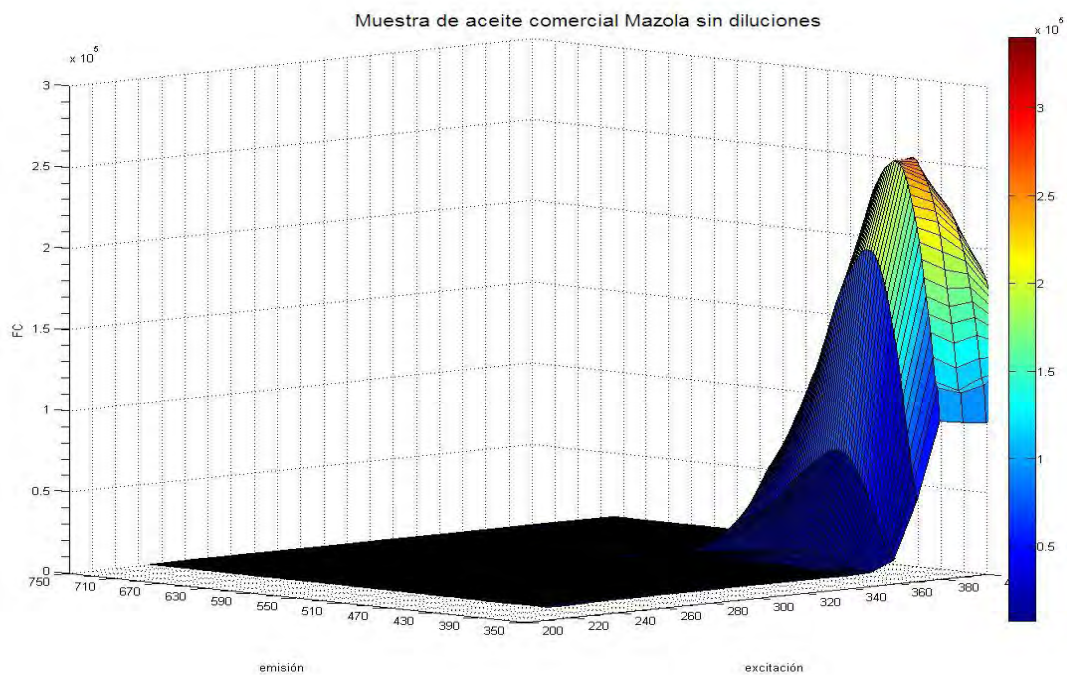


Figura 32. Matriz de excitación-emisión de aceite Mazola. Muestra un pico grueso de fluorescencia en el área de 330 nm de λ de excitación hasta la aparición de la dispersión de Raleigh, y de 350 a 600 nm de λ de emisión.

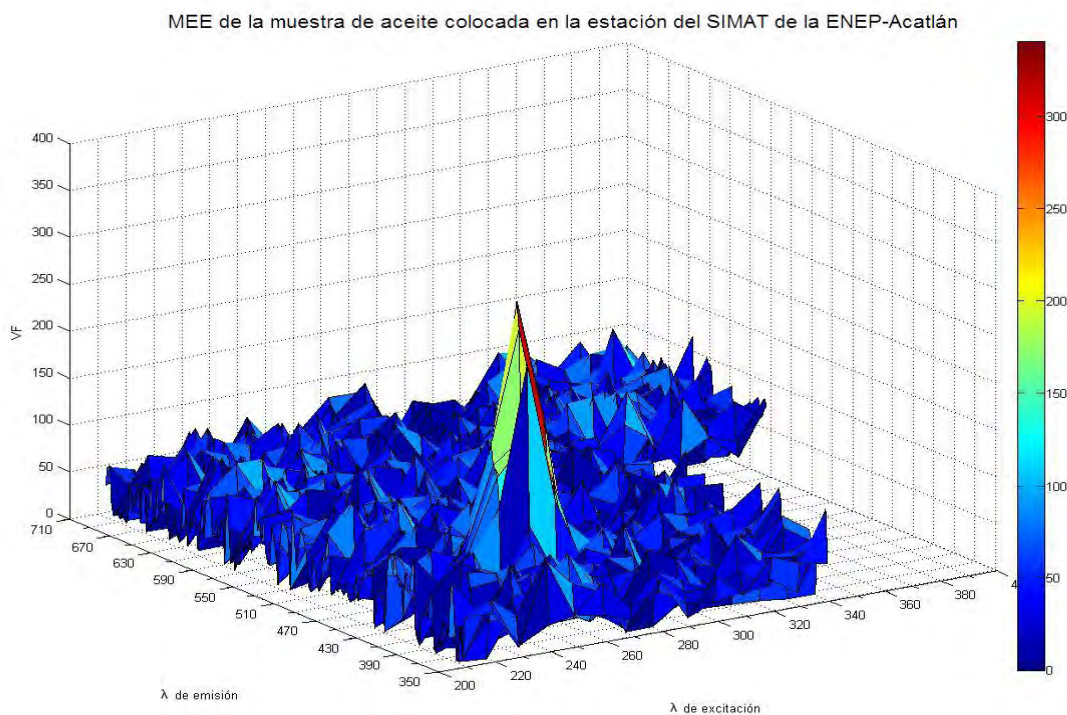


Figura 33. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de ENEP-Acatlán y recolectada después de un mes. El gráfico muestra un solo pico significativo en 240 nm de λ de excitación y 408 nm de λ de emisión.

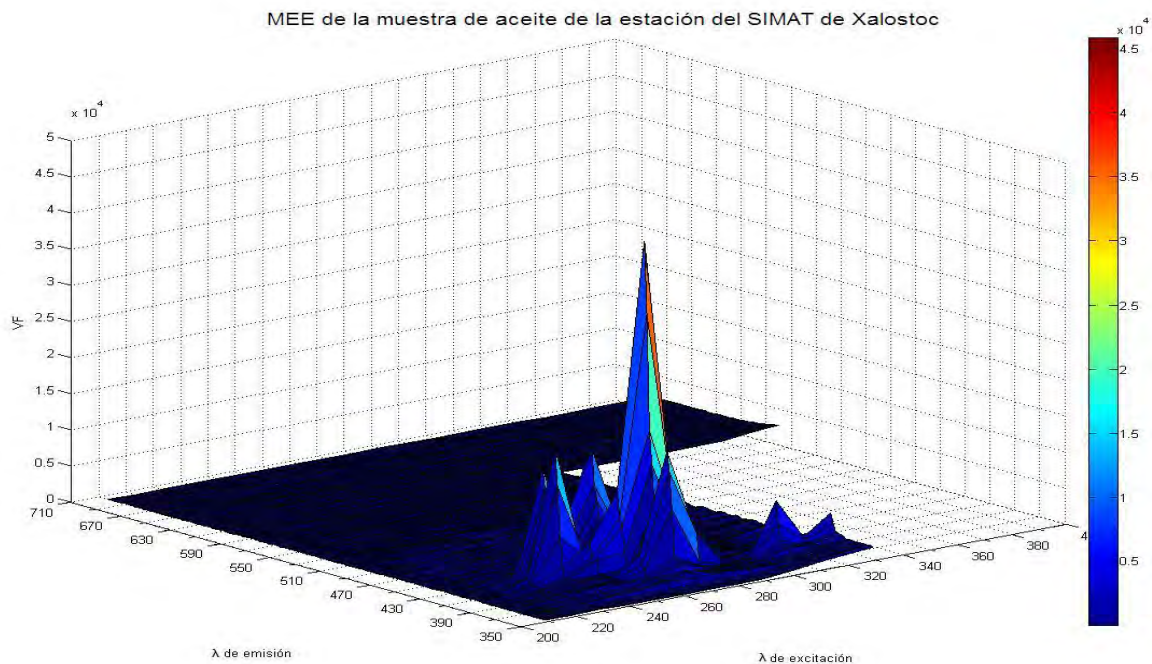


Figura 34. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de Xalostoc y recolectada después de un mes. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 250nm de λ de excitación y en 402 y 444 nm de λ de emisión y a 230 nm de λ de excitación y a 408 y 418 nm de λ de emisión.

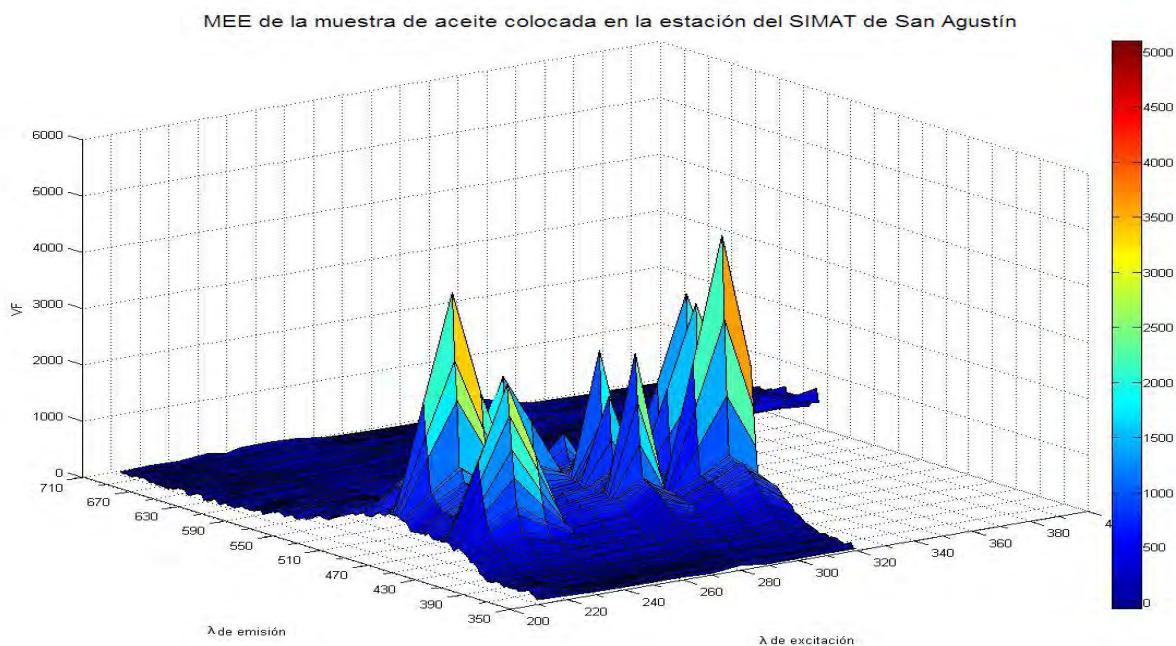


Figura 35. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de San Agustín y recolectada después de un mes. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 300 nm de λ de excitación y en 438 nm de λ de emisión, a 270 nm de λ de excitación y a 438 nm de λ de emisión, a 240 nm de λ de excitación y 470 nm de λ de emisión y a 220nm de λ de excitación y a 476 nm de λ de emisión.

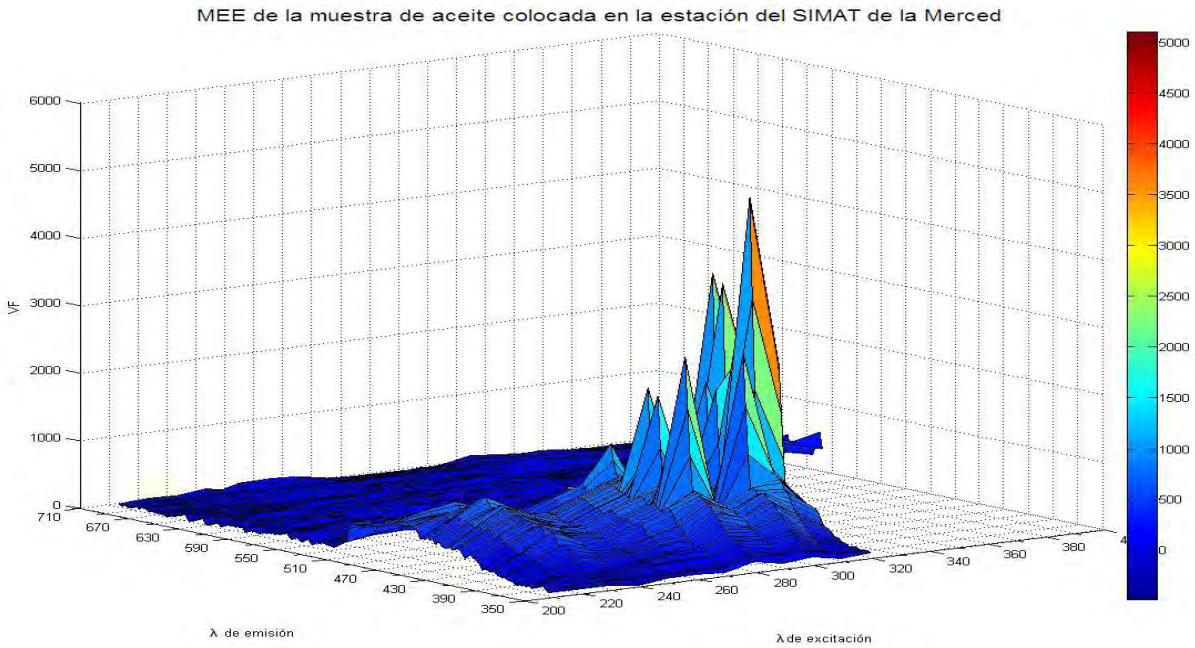


Figura 36. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de la Merced y recolectada después de un mes. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 220nm de λ de excitación y en 450 y 442 nm de λ de emisión, a 270 nm de λ de excitación y en 406 nm de λ de emisión y a 300 nm de λ de excitación y a 406 y 424 nm de λ de emisión.

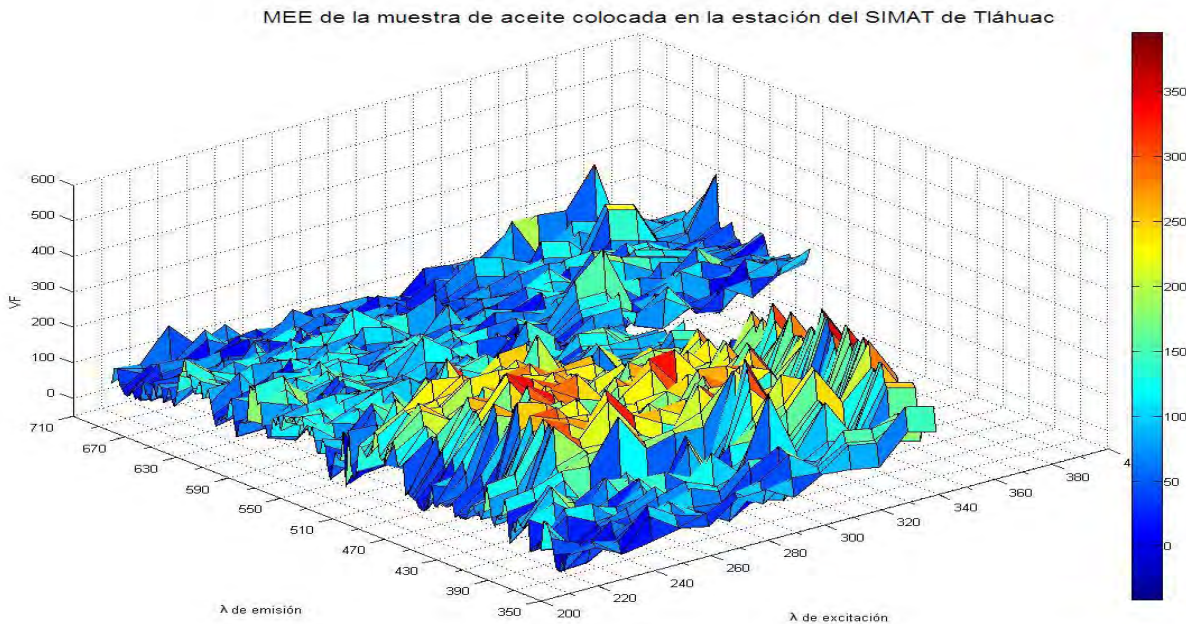


Figura 37. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de Tláhuac y recolectada después de un mes. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 280 nm de λ de excitación y en 388 nm de λ de emisión y a 320 nm de λ de excitación y 380 nm de λ de emisión.

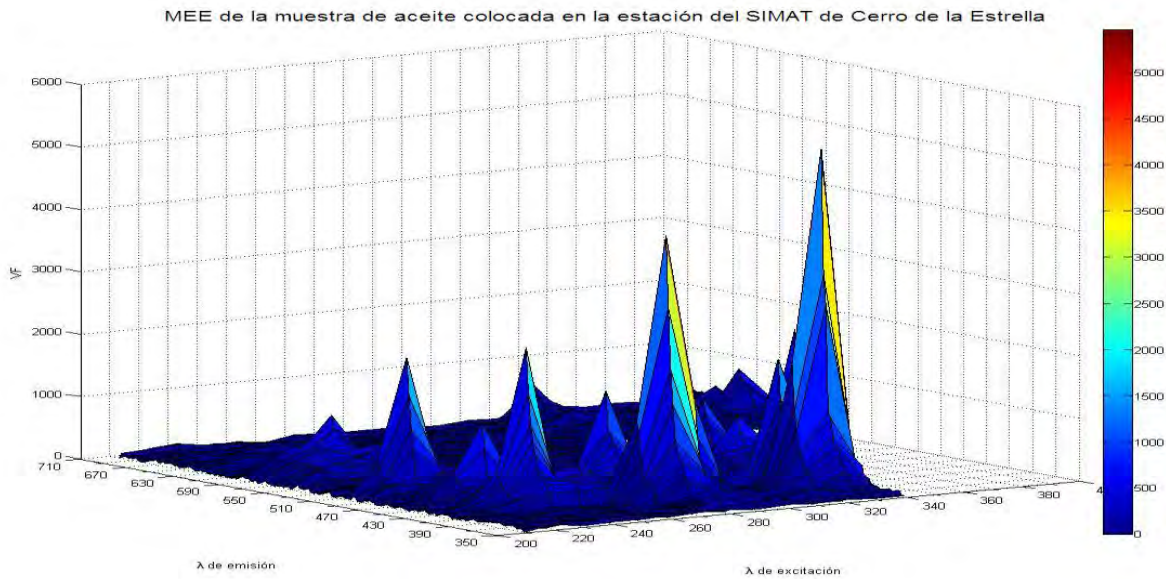


Figura 38. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de Cerro de la Estrella y recolectada después de un mes. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 230 nm de λ de excitación y en 424 nm λ de emisión, a 270 nm de λ de excitación y a 404 nm de λ de emisión, en 320 nm de λ de excitación y en 396 nm λ de emisión y a 330 nm de λ de excitación y a 444 nm de λ de emisión.

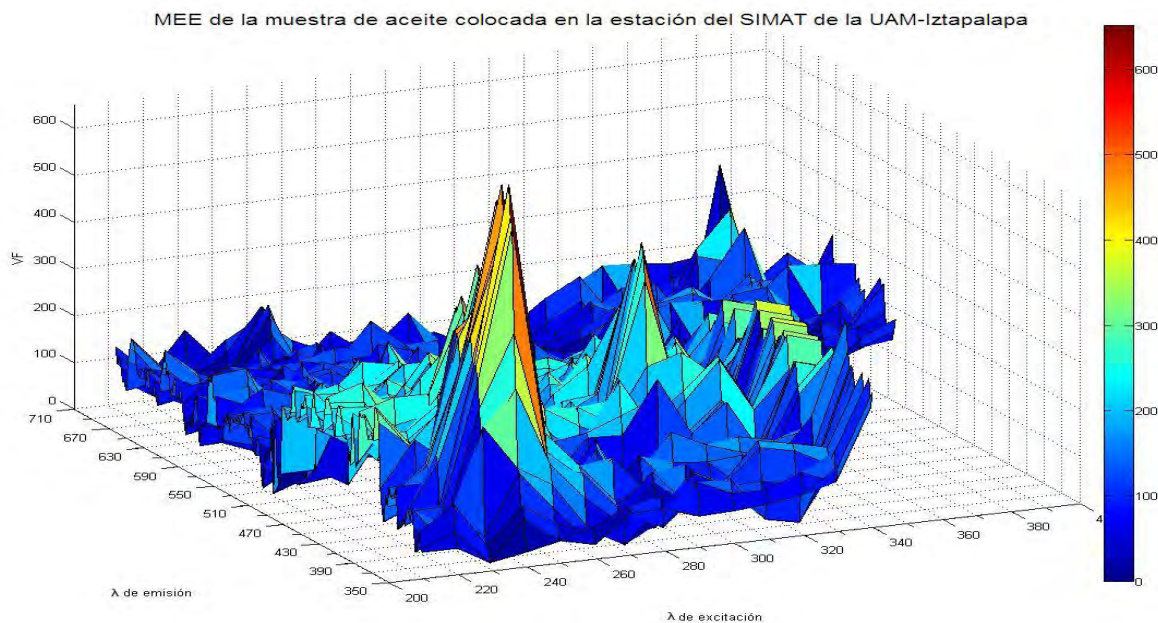


Figura 39. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de la UAM-Iztapalapa y recolectada después de un mes. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 230 nm de λ de excitación y 370 y 378 nm de λ de emisión, a 280 nm de λ de excitación y en 416 y 424 nm de λ de emisión y a 320 nm de λ de excitación y a 440 y 424 nm de λ de emisión.

MEE de la muestra de aceite colocada en la estación del SIMAT de Pedregal

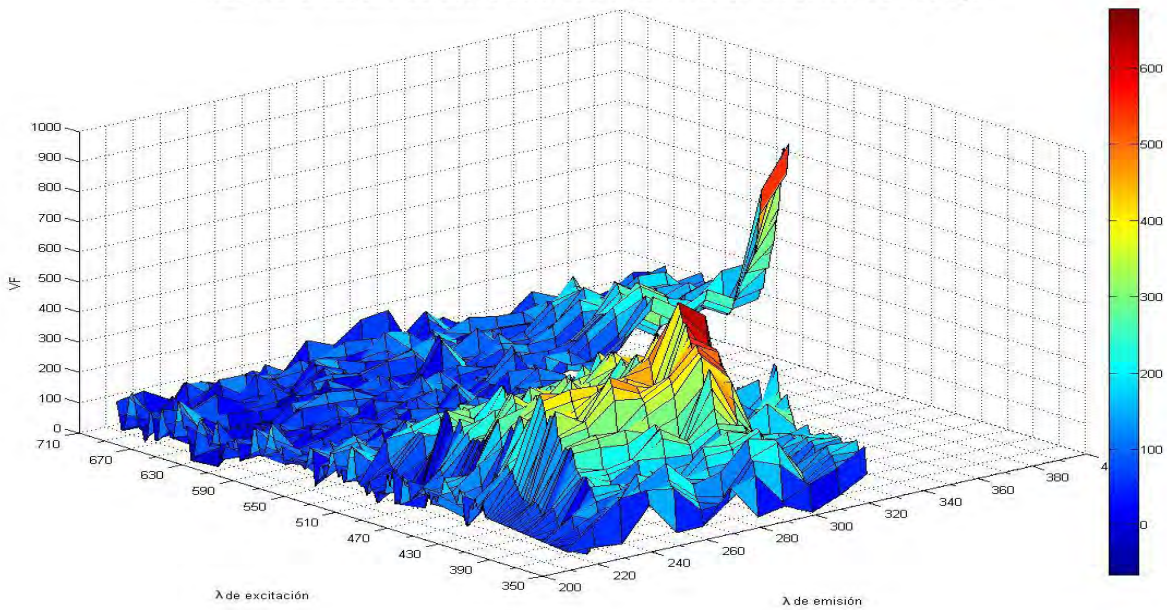


Figura 40. MEE de la muestra de aceite de maíz dejada en la estación de monitoreo del SIMAT de Pedregal y recolectada después de un mes. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 240nm de λ de excitación y en 372 nm de λ de emisión, a 260 nm de λ de excitación y en 374 y 384 nm de λ de emisión y a 270 nm de λ de excitación y a 388 nm de λ de emisión.

Muestra de aceite recolectada de un puesto de comida ambulante del Mercado de Cuernavaca (2)

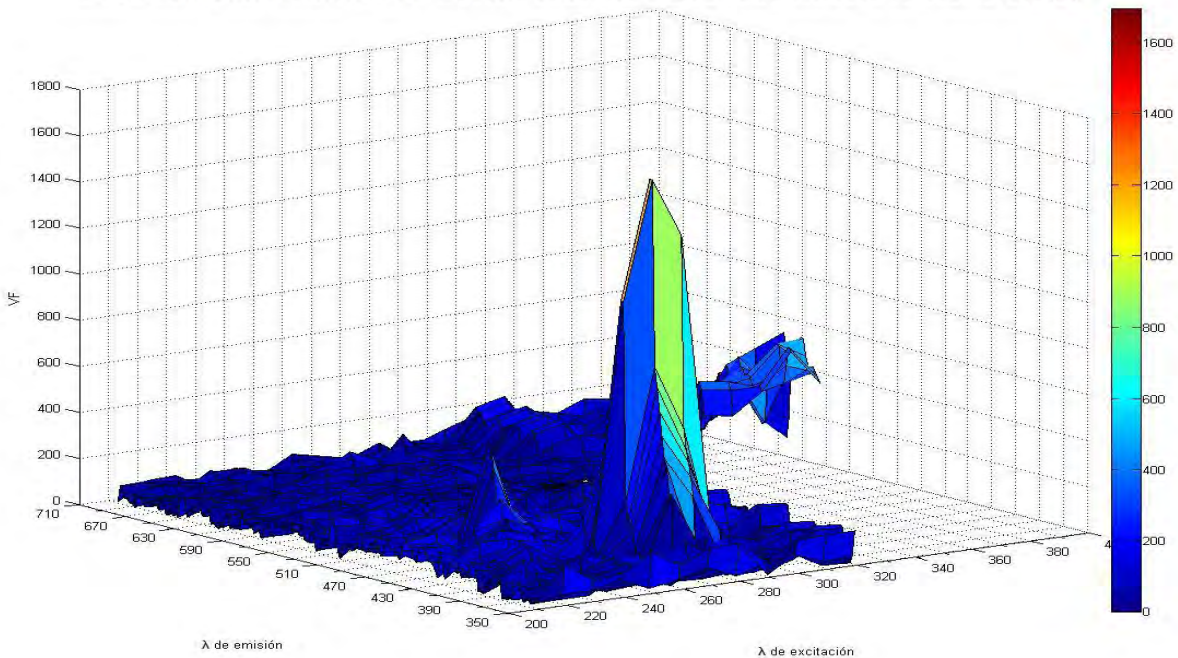


Figura 41. MEE de una muestra de aceite de maíz recolectada de un puesto de comida ubicado en el Mercado de Plan de Ayala en Cuernavaca. El gráfico muestra un solo punto máximo de fluorescencia en 260 nm de λ de excitación y 400 nm de λ de emisión.

Muestra de aceite recolectada de un puesto de comida ambulante del Mercado de Cuernavaca

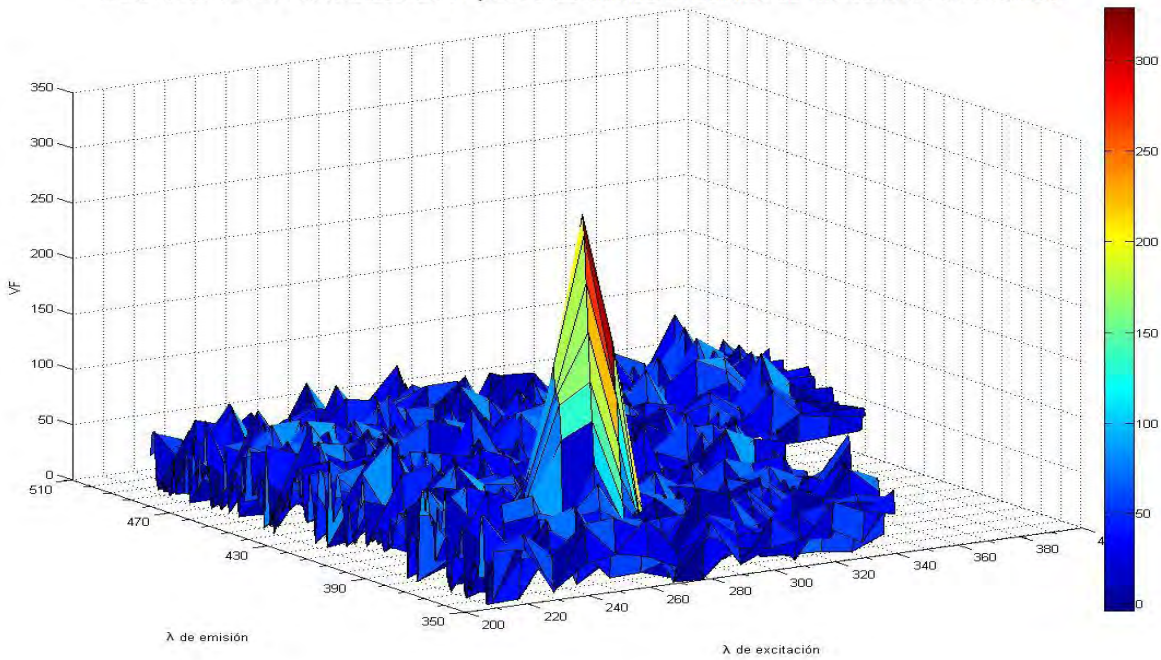


Figura 42. MEE de una muestra de aceite de maíz recolectada de un puesto de comida ubicado en el mercado de Plan de Ayala en Cuernavaca. El gráfico muestra un solo punto máximo de fluorescencia en 240 nm de λ de excitación y 386 nm de λ de emisión.

Muestra de aceite recolectada de un puesto de comida en la carretera federal México-Cuernavaca (2)

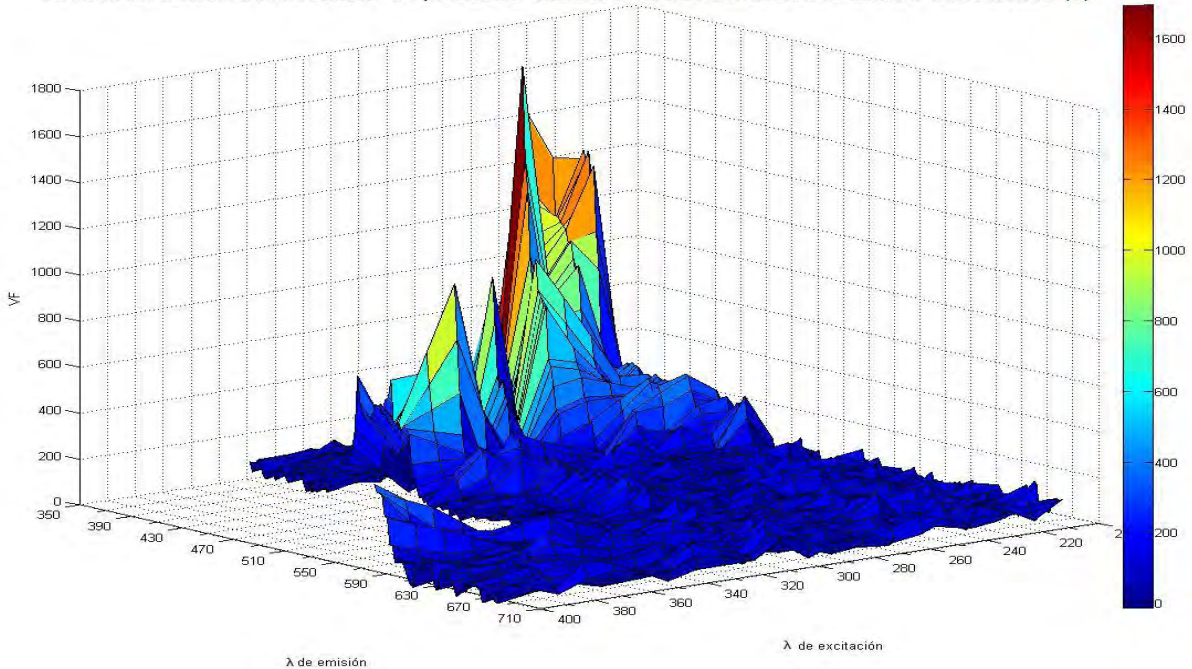


Figura 43. MEE de una muestra de aceite de maíz recolectada de un puesto de comida ubicado en la carretera federal México-Cuernavaca. El gráfico muestra varios picos los más destacables se localizan en 250nm de λ de excitación y en 368 nm de λ de emisión, a 260 nm de λ de excitación y en 420 nm de λ de emisión y a 310 nm de λ de excitación y a 466 nm de λ de emisión.