

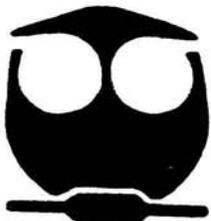


**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**EVALUACION DE LA PRESENCIA DE HIDROCARBUROS  
AROMATICOS POLICICLICOS (HAP) EN ALIMENTOS  
AHUMADOS Y ENLATADOS  
CASO TIPO: POLLO Y MEJILLONES**

**TESIS MANCOMUNADA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
PRESENTAN:  
RUIZ MONTERRUBIO FABIOLA GRACIELA  
VALENCIA PEREZ-REA LAURA RENATA**



MEXICO, D.F.



2004

**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**



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            Prof. Pedro Villanueva González

Vocal                Prof. Ma. del Carmen Durán Domínguez

Secretario          Prof. Rolando Salvador García Gómez

Primer suplente    Prof. Lucía Cornejo Barrera

Segundo suplente   Prof. Hilda Elizabeth Calderón Villagomez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio E - 301, del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA), Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema



M. en C. Rolando Salvador García Gómez

Supervisor Técnico



Q. A. Pável Castillo Urueta

Sustentante



Pas de Q. A. Fabiola G. Ruiz Monterrubio

Sustentante



Pas de Q. A. Laura R. Valencia Pérez -Rea

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por habernos brindando tantos años un lugar donde poder realizar nuestros estudios.

A la **Facultad de Química** por habernos formado como profesionista.

Al personal y a los maestros del laboratorio de **Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental** por abrirnos las puertas para realizar nuestro trabajo de investigación, en especial a la Dra-Ing. Carme Durán de Bazúa, M. en C. Rolando Salvador García Gómez, Q. A. Pável Castillo Urueta, Sra. Irene, Sra. Julia

Al personal del laboratorio "4A y 4B" del **Departamento de Alimentos y de Biotecnología** de la Facultad de Química de la UNAM, en especial a M. en C. Lucia Cornejo, QFB. Agustín Rey Herrera.

Deseamos expresar un agradecimiento muy especial a las siguientes personas:

Al **M. en C. Rolando Salvador García Gómez**, por la confianza que tuvo en nosotras para poder llevar a cabo este proyecto.

Al **Q. A. Pável Castillo Urueta**, por toda la ayuda, brindada en esta investigación y especialmente por su amistad.

A la **Dra-Ing. Carmen Durán de Bazúa**, por sus comentarios, el apoyo brindado y el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Al **Q. Pedro Villanueva González**, por sus consejos, el apoyo brindado y sobre todo por su amistad.

A la **Dra. Patricia, Dra. Yolanda C.**, por la ayuda prestada para la realización de este proyecto.

## DEDICATORIAS

### *Fabiola*

Gracias a *Dios* por permitirme llegar a este momento tan importante para mi vida personal como profesional, por haberme escuchado en los momentos difíciles en mi vida, por consolarme con una oración.

A mi mami, "*Martha*", por haber estado en los momentos más angustiantes durante toda la carrera hasta este final, así como sus consejos, apoyo incondicional, y principalmente sus sacrificios, para darme lo mejor en toda mi vida, y su entera comprensión.  
Gracias por ser mi mamita

A mi papá "*Domingo*", por su confianza entera, comprensión, por su apoyo incondicional, y sacrificios que hizo para darme lo mejor en mi vida.  
Gracias por ser mi papito

A mi hermano "*Fabián*", que ante todo siempre supo comprenderme a pesar de todo lo que sucedía, su apoyo económico, y principalmente por consolarme cuando las cosas en mi vida solían estar mal.

A mi Tía "*Lety*", por apoyarme siempre en mi vida, por comprenderme y así como sus consejos.

A mi Tía "*Norma*", por darme sus consejos y siempre apoyarme en mi vida personal como profesional

A mis demás tíos por haberme ayudado con su apoyo y cariño en especial a mi tío *Oscar* y *Sergio*<sup>†</sup>, por haberme dado la mejor ayuda en toda mi carrera como son sus libros.

A mis amigos por su confianza y por haber estado cuando más los necesitaba, gracias por ser una parte importante en mi vida. En especial a *Antonio, Belén, Gaby B, Gaby G, Laura, Liztli, Lupita, Víctor.*

En especial a mi compañera de carrera, tesis y amiga, por haberme ayudado cuando más lo necesitaba, así como su compañía en este episodio de nuestras vidas, en los momentos divertidos y difíciles en la realización de esta Tesis. De todo esto me llevo en el corazón su amistad como en lo personal como lo Profesional.

Que más puedo decir: Gracias por todo y sigue adelante tienes mucho por conocer.

## DEDICATORIAS

### **Renata**

Antes que a nadie a **Dios** por haberme brindado la oportunidad de vivir y estar conmigo en cada segundo de mi vida, por escucharme, consolarme, darme la familia tan maravillosa que tengo y darme la oportunidad de conocer a personas tan especiales que le dieron un giro a mi vida.

A mi **mami "Laura"**, por ser mi mejor amiga, por brindarme todo su amor, su apoyo, consejos, regaños, alientos y cuidados en todos estos años y que sin ella no estaría donde estoy, a ella le dedico este pequeño logro por que es ella quien se lo merece.  
Gracias por ser mi madre.

A mi **papito "Rene"**, por amarme y cuidarme durante todos estos años, por darme siempre un buen consejo y una palabra de apoyo cuando más la necesitaba, por confiar en mí y ser el padre tan maravilloso que eres.

A mi **hermano "Enrique"**, por que a pesar de las discusiones siempre puedo contar contigo y por darme un sobrino "**Iván**" tan maravilloso.

A mi **Dany**, que es mi luz, gracias hermanita por estar a mi lado y amarme tanto, Iván y tú son mi razón de vivir

A mi **cuñada "Lety"**, gracias por cuidar de mi hermano y brindarme tu apoyo  
A mis tíos, primos y sobrinos, por sus alientos, los llevo siempre en mí corazón

A mis amigos por que se que puedo contar con ustedes en cualquier momento, por escucharme y soportarme durante tantos años. Cada uno de ustedes marco mi vida:  
*Alejandra, Brenda, Cecilia, Dalia, Edgar, Evelyn, Fabiola, Felipe, Flor, Gaby A., Gaby B., Gaby G., Héctor, Jay, Katia, Kharla, Lila, Liztli, Manuel, Mariana, Miguel A. Paola, Sandra, Silvia, Víctor S., Víctor M.*

A quien le dio algo muy especial a mi vida, la llenaste de alegría, cada momento fue especial, inolvidable y maravilloso, gracias a ti descubrí muchas cosas acerca de mí  
Gracias por existir y gracias a la vida por dejarme conocerte.

Gracias **Fabiola** por todo este tiempo que pasamos en la realización de este proyecto, por tu apoyo, consejos y sobre todo por ser tan buena amiga, compañera y persona sabes que siempre podrás contar conmigo.

Como en alguna ocasión me comentaste "nos falta mucho por vivir"

## ÍNDICE

Abreviaturas empleadas y glosario de términos	1
RESUMEN	3
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	4
1.1 Breve historia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	4
1.2 Características generales de los hidrocarburos aromáticos	5
1.3 Origen y formación de los HAP	6
1.4 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas	6
1.5 Características del ahumado	9
1.6 Métodos y equipos para la producción de humo	10
1.7 Efectos deseables e indeseables de los componentes del humo	11
1.8 Formación de los HAP durante el proceso de ahumado	12
1.9 Efecto de los HAP en el organismo	12
1.10 Características de las muestras bajo estudio	13
1.10.1 Características de los mejillones	13
1.10.2 Características del pollo	15
1.11 Objetivos	15
1.11.1 Objetivo general	15
1.11.2 Objetivos particulares	15
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS ANALÍTICOS	17
2.1 Cromatografía de gases, CG	17
2.1.1 Gas portador	18
2.1.2 Sistema de inyección	18
2.1.3 Columnas cromatográficas	19
2.1.4 Fase estacionaria	19
2.1.5 Temperatura del horno	19
2.2 Espectrometría de masas	20
2.2.1 Sistema de generación de vacío	20
2.2.2 Fuente de ionización	20
2.2.3 Filtro de masas	23
2.2.4 Detector	24

<b>2.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)</b>	<b>24</b>
2.3.1 Gas portador en CG/EM	25
2.3.2 Consideraciones prácticas sobre el acoplamiento CG/EM	25
<b>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Obtención y acondicionamiento de las muestras</b>	<b>26</b>
3.1.1 Obtención de las muestras	26
3.1.2 Drenado y molienda	27
<b>3.2 Caracterización química de las muestras (análisis químico)</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Almacenamiento</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Extracción de los HAP en las muestras empleando el método UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA, 1993)</b>	<b>28</b>
<b>3.5 Limpieza y fraccionamiento de los HAP con los métodos EPA 3630a (EPA, 1990) y UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA, 1993)</b>	<b>28</b>
<b>3.6 Determinación de HAP empleando CG/EM</b>	<b>29</b>
<b>3.7 Determinación de los porcentajes de recobro</b>	<b>33</b>
3.7.1 Porcentajes de recobro en los adsorbentes	33
3.7.2 Porcentajes de recobro en las diferentes matrices	33
<b>3.8 Análisis de varianza</b>	<b>33</b>
<b>3.9 Tratamiento de residuos</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Análisis químico</b>	<b>35</b>
4.1.1 Caracterización química de los pollos ahumados	35
4.1.2 Caracterización química de los mejillones ahumados	36
<b>4.2 Curvas de calibración de los estándares de HAP empleando CG/EM</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Cromatogramas y espectros de masas de los estándares y de las diferentes muestras</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Evaluación de la recuperación de los HAP en la columna cromatográfica y en las muestras (pollo y mejillones ahumados)</b>	<b>40</b>
<b>4.5 Identificación y cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos empleando CG/EM en las diferentes muestras</b>	<b>43</b>
<b>4.6 Cuantificación en las muestras de pollos</b>	<b>46</b>

<b>4.7 Cuantificación en las muestras de mejillones</b>	<b>47</b>
<b>4.8 Análisis de varianza</b>	<b>48</b>
4.8.1. Análisis de varianza para las muestras de pollo	48
4.8.2. Análisis de varianza para las muestras de mejillones	50
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>54</b>
<b>5.1 Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>5.2 Recomendaciones</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>58</b>
<b>Fundamentos de los métodos empleados</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>62</b>
<b>Fórmulas para realizar el análisis de varianza</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO C</b>	<b>64</b>
<b>Datos para obtener las curvas de calibración de los tres hidrocarburos aromáticos policíclicos</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO D</b>	<b>68</b>
<b>Cromatogramas y espectros de masas determinados en los estándares y en las muestras</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO E</b>	<b>78</b>
<b>Tratamiento de residuos (CCPHSDCL, 1995; Sax, 1989)</b>	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Características físicas (Hawley, 1992, Merck Index, 1994) .....	7
Tabla 1.2 Peso molecular y dosis letal media ( $DL_{50}$ o $LD_{50}$ , por sus siglas en inglés) de algunos compuestos (Astrup et al, 1983; HARZARD, 1999; ANESFAR, 2002) .....	8
Tabla 1.3 Tecnología de producción de humo (Sikorski, 1990).....	11
Tabla 3.1 Reactivos que se emplearon para el desarrollo experimental de la investigación .....	26
Tabla 3.2 Equipos empleados durante el desarrollo experimental de la investigación .....	26
Tabla 3.3 Rampa de temperatura .....	30
Tabla 3.4 Condiciones de operación en el detector de masas .....	30
Tabla 4.1 Comparación del análisis químico del pollo .....	35
Tabla 4.2 Comparación del análisis químico en mejillones .....	36
Tabla 4.3 Estudio de retención de los compuestos por los adsorbentes en la columna .....	41
Tabla 4.4 Retención de los HAP en el pollo "vía pública" .....	42
Tabla 4.5 Retención de los HAP en pollo "establecimiento" .....	42
Tabla 4.6 Retención de los HAP en los mejillones "Geisha <sup>®</sup> " .....	42
Tabla 4.7 Retención de los HAP en los mejillones "May Lyly <sup>®</sup> " .....	43
Tabla 4.8 Cuantificación de HAP en la muestra de pollo de la "vía pública".....	46
Tabla 4.9 Cuantificación de HAP en la muestra de pollo del "establecimiento" .....	47
Tabla 4.10 Cuantificación de HAP en la muestra de mejillones "Geisha <sup>®</sup> " .....	48
Tabla 4.11 Cuantificación de HAP en la muestra de mejillones "May Lyly <sup>®</sup> " .....	48
Tabla 4.12 Resultados del análisis de varianza del fluoranteno en las muestras de pollo .....	49
Tabla 4.13 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el fluoranteno.....	49
Tabla 4.14 Resultados del análisis de varianza del pireno en las muestras de pollo .....	49
Tabla 4.15 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el pireno .....	49
Tabla 4.16 Resultados del análisis de varianza del benzo(a)pireno en las muestras de pollo .....	50
Tabla 4.17 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el benzo(a)pireno .....	50
Tabla 4.18 Resultados del análisis de varianza del fluoranteno en las muestras de mejillones .....	51
Tabla 4.19 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el fluoranteno.....	51
Tabla 4.20 Resultados del análisis de varianza del pireno en las muestras de mejillones.....	51
Tabla 4.21 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el pireno.....	51
Tabla 4.22 Resultados del análisis de varianza del benzo(a)pireno en las muestras de mejillones .....	52
Tabla 4.23 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el benzo(a)pireno .....	52
Tabla 4.24 Concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) .....	52
Tabla C.1 Condiciones óptimas del cromatógrafo de gases .....	64
Tabla C.2 Condiciones de operación para el detector de masas.....	64
Tabla C.3 Iones moleculares y tiempos de retención de los 3 HAP bajo estudio .....	65
Tabla E.1. Tratamiento de residuos .....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Fisiología del mejillón (Fechter, 1993).....	14
Figura 2.1 Esquema fundamental de las partes de un cromatógrafo de gases .....	17
Figura 2.2 Inyector dividido y sin dividir ("split- splitless") (Harris, 1992).....	18
Figura 2.3 Impacto electrónico (IE) (Esteban, 1993).....	21
Figura 2.4 Ionización química (IQ) (Esteban, 1993).....	22
Figura 2.5 Diagrama esquemático de un analizador de cuadrupolo.....	23
Figura 2.6 Detector dinodo de alta energía acoplado a un espectrómetro de masas, DAE/EM (Harris, 1992).....	24
Figura 3.1 Metodología general seguida durante el desarrollo experimental.....	31
Figura 3.2 Metodología de extracción de HAP (UNEP/IOC/IAEA, 1993).....	32
Figura 4.1 Curvas estándar [0.1-1ppm].....	37
Figura 4.2 Cromatograma de una mezcla de 3 estándares .....	38
Figura 4.3 Cromatograma de una muestra de pollo "vía pública" contaminada con tres estándares .....	38
Figura 4.4 Cromatograma de una muestra de mejillones "Geisha®" contaminada con tres estándares.....	38
Figura 4.5 Cromatograma de una muestra de mejillones "May Lyly®" .....	38
Figura 4.6 Cromatograma de una muestra de pollo "establecimiento" .....	39
Figura 4.7 Espectro de masas del fluoranteno identificado en la mezcla de estándares .....	39
Figura 4.8 Espectro de masas del pireno identificado en la mezcla de estándares.....	39
Figura 4.9 Espectro de masas del benzo(a)pireno identificado en la mezcla de estándares .....	40
Figura 4.10 Espectro de masas del fluoranteno en una muestra de mejillones "Geisha®".....	40
Figura 4.11 Espectro de masas del pireno en una muestra de mejillones "Geisha®" .....	40
Figura 4.12 Espectro de masas del benzo(a)pireno en una muestra de mejillones "Geisha®".....	40
Figura 4.13 Cromatograma y espectros de masas de la muestra de pollo de la "vía pública" .....	44
Figura 4.14 Cromatograma y espectros de masas de la muestra de pollo del "establecimiento" ..	44
Figura 4.15 Cromatograma y espectros de masas de la muestra de mejillones "Geisha®".....	45
Figura 4.16 Cromatograma y espectros de masas de la muestra de mejillones "May Lyly®" .....	45
Figura C.1 Estructuras de los 3 HAP en estudio .....	64
Figura C.2 Curva de calibración del fluoranteno [0.1 -1.0 ppm] .....	65
Figura C.3 Curva de calibración del fluoranteno [1.0 -10 ppm] .....	65
Figura C.4 Curva de calibración del fluoranteno [10 -100 ppm].....	65
Figura C.5 Curva de calibración del pireno [0.1 -1.0 ppm] .....	66
Figura C.6 Curva de calibración del pireno [1.0 -10 ppm] .....	66
Figura C.7 Curva de calibración del pireno [10 -100 ppm] .....	66
Figura C.8 Curva de calibración del benzo(a)pireno [0.1 -1.0 ppm] .....	67

Figura C.9 Curva de calibración del benzo(a)pireno [1.0 -10 ppm] .....	67
Figura C.10 Curva de calibración del benzo(a)pireno [10 -100 ppm] .....	67
Figura D.1 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [0.1 ppm] .....	68
Figura D.2 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [0.5 ppm] .....	68
Figura D.3 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [1 ppm] .....	68
Figura D.4 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [5 ppm] .....	69
Figura D.5 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [10 ppm] .....	69
Figura D.6 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [50 ppm] .....	69
Figura D.7 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [100 ppm] .....	69
Figura D.8 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de pollo "establecimiento" contaminada con una mezcla de tres estándares .....	70
Figura D.9 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de pollo "establecimiento" contaminada con una mezcla de tres estándares .....	70
Figura D.10 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de pollo "vía pública" contaminada con una mezcla de tres estándares .....	70
Figura D.11 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de pollo "vía pública" contaminada con una mezcla de tres estándares .....	70
Figura D.12 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de mejillones "May Lyly®" contaminada con una mezcla de tres estándares .....	71
Figura D.13 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de mejillones "May Lyly®" contaminada con una mezcla de tres estándares .....	71
Figura D.14 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de mejillones "Geisha®" contaminada con una mezcla de tres estándares .....	71
Figura D.15 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de mejillones "Geisha®" contaminada con una mezcla de tres estándares .....	71
Figura D.16 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de pollo "establecimiento" .....	72
Figura D.17 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de pollo "establecimiento" .....	72
Figura D.18 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de pollo "vía pública" .....	72
Figura D.19 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de pollo "vía pública" .....	73
Figura D.20 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de mejillones "Geisha®" .....	73
Figura D.21 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de mejillones "Geisha®" .....	73
Figura D.22 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de mejillones "May Lyly®" .....	74
Figura D.23 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de mejillones "May Lyly®" .....	74
Figura D.24 Espectro de masas del estándar del fluoranteno [10 ppm] .....	74
Figura D.25 Espectro de masas del estándar del pireno [10 ppm] .....	74
Figura D.26 Espectro de masas del estándar del benzo(a)pireno .....	75
[10 ppm] .....	75

Figura D.27 Espectro de masas del fluoranteno de la fracción uno del pollo “establecimiento” contaminado con una mezcla de tres estándares.....	75
Figura D.28 Espectro de masas del pireno de la fracción uno del pollo obtenido del “establecimiento” contaminado con una mezcla de tres estándares.....	75
Figura D.29 Espectro de masas del benzo(a)pireno de la fracción uno del pollo “establecimiento” contaminado con una mezcla de tres estándares.....	75
Figura D.30 Espectro de masas del fluoranteno de la fracción dos del pollo “establecimiento” contaminado con una mezcla de tres estándares.....	76
Figura D.31 Espectro de masas del pireno de la fracción dos del pollo “establecimiento” contaminado con una mezcla de tres estándares.....	76
Figura D.32 Espectro de masas del benzo(a)pireno de la fracción dos del pollo “establecimiento” contaminado con una mezcla de tres estándares.....	76
Figura D.33 Espectro de masas del fluoranteno de la fracción uno de los mejillones “May Lyly®”.....	76
Figura D.34 Espectro de masas del pireno de la fracción uno de los mejillones “May Lyly®”.....	76
Figura D.35 Espectro de masas del benzo(a)pireno de la fracción uno de los mejillones “May Lyly®”.....	77
Figura D.36 Espectro de masas del fluoranteno de la fracción dos de los mejillones “May Lyly®”.....	77
Figura D.37 Espectro de masas del pireno de la fracción dos de los mejillones “May Lyly®”.....	77
Figura D.38 Espectro de masas del benzo(a)pireno de la fracción dos de los mejillones “May Lyly®”.....	77
Figura E. 1 Residuos generados en el análisis químico.....	79
Figura E.2 Residuos generados en la extracción de HAP.....	80

## Abreviaturas empleadas y glosario de términos

A, A'	Concentración del compuesto generado por tratamiento de la vía pública o de los mejillones Geisha®
A	Número de muestras totales
AA	Aductos de ácido desoxirribunucleico
AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribunucleico
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos de EEUA (Association of Official Analytical Chemists, en inglés)
APM	Alto peso molecular
B, B'	Concentración del compuesto generado por el proceso del establecimiento o de los mejillones May Lyly®
b	Ordenada al origen, ecuación 3-1
BaP	Benzo(a)pireno (Benz(a)pyrene, en inglés)
BPM	Bajo peso molecular
Bu	Butano
CCA	Comité Científico de Alimentos de la Unión Europea
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CM	Cuadros medios
COP	Compuestos orgánicos persistentes
DAE	Dinodo de alta energía
DC	Corriente continua, por sus siglas en inglés
DL <sub>50</sub> , LD <sub>50</sub>	Dosis letal media (LD <sub>50</sub> , por sus siglas en inglés)
DMCS	Dimetilclorosilano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSA	Desincroización de la síntesis del ADN
EM	Espectrometría de masas
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (Environmental Protection Agency, en inglés)
ERST	Ensayo revertante en <i>Salmonella typhimurium</i>
eV	Electrón- Volt
F <sub>0</sub>	Relación de variación por muestras
FC	Factor de corrección
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América (Food and Drug Administration, en inglés)
FLT	Fluoranteno (Fluoranthene, en inglés)
FM	Fórmula molecular
gl	Grados de libertad
gle	Grados de libertad del error
glT	Grados de libertad para tratamientos
glT	Grados de libertad total
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
H <sub>1</sub>	Hipótesis alterna
IE, EI	Impacto electrónico (Electron Impact, en inglés)
IAEA	Asociación Internacional para la Evaluación Educativa (International Association for Educational Assessment, en inglés)
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IOC	Comisión Oceanográfica Intergubernamental (Intergovernmental Oceanographic Commission, en inglés)

IQ, CI	Ionización química (Chemical ionization, en inglés)
INEGI	Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática
INNSZ	Instituto Nacional de Ciencias de la Nutrición "Salvador Zubirán"
LD <sub>50</sub>	Half Lethal Doses, en inglés
"Librerías"	Paquetería computarizada, "NIST, versión 1.4" por "library" en inglés (biblioteca o acervo bibliográfico)
m	Valor de la pendiente de la curva, ecuación 3-1
MB	Modo de barrido
MC	Media de cuadrados
MG	Mejillones Geisha®
MML	Mejillones May Lyly®
mm Hg	Milímetros de mercurio
m/z	Relación masa/ carga
n	Número total de observaciones
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PB	Punto de ebullición
PE	Pollo de establecimiento
PF	Punto de fusión
PM	Peso molecular
PVP	Pollo vía pública
PYR	Pireno (Pyrene, en inglés)
R <sub>1</sub> ,R <sub>2</sub> ,R <sub>3</sub>	Residuos
RF	Radiofrecuencia
rpm	Revoluciones por minuto
SC	Suma de cuadrados
SCAN	Modo de barrido en el equipo de espectrometría de masas, por la palabra en inglés
SCe	Suma de cuadrados del error
SCF	Comité Científico de Alimentos de la Unión Europea (Scientific Committee on Food, en inglés)
SCt	Suma de cuadrados para tratamientos
SCT	Suma de cuadrados total
Septo	Sello de teflón
SIM	Selected ion monitoring, en inglés
SSI	Seguimiento selectivo de iones (SIM), por sus siglas en inglés (SSI, SIM)
torr	Unidad de presión equivalente a 6.894 kPa y a 1 atm
t <sub>r</sub>	Tiempo de retención
UMA	Unidad de Masa Atómica
UNEP	Programa de la Organización de las Naciones Unidas para el Ambiente, PNUMA (United Nations Environment Program, en inglés)
V	Volt
x	Concentración de la muestra en mg/mL muestra, ecuación 3-1
$\bar{x}$	Media de los valores
y	Área bajo la curva

## RESUMEN

El gusto y el consumo hacia los productos ahumados se ha incrementado en nuestros días. No obstante, cada día se conoce más sobre la gran variedad de compuestos tóxicos originados por el proceso de ahumado y los problemas ocasionados en el ser humano. Entre los compuestos tóxicos originados durante este proceso, se encuentran a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Su peligrosidad se ha reportado desde los años 50 donde se detectó por primera vez la presencia de benzo(a)pireno (BaP) en este tipo de productos. En la actualidad, no se cuenta con alguna reglamentación sobre la presencia de HAP en este tipo de alimentos y, por ello, el objetivo central de este trabajo se enfocó en identificar y cuantificar a tres de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de mayor peligrosidad y persistencia en el organismo y que representan un riesgo potencial para la salud de los consumidores. Las determinaciones de estos compuestos fueron realizadas sobre muestras comerciales de mejillones ahumados y enlatados (Geisha® y May Lyly®), así como también en dos muestras de pollos ahumados adquiridos en un establecimiento y en un puesto comercial ubicado sobre la vía pública. Las muestras de pollo fueron transportadas al laboratorio en bolsas de plástico con hielo para su acondicionamiento y posterior análisis. Durante la primera parte de esta investigación se realizó el análisis químico, encontrando para los mejillones de la marca Geisha® y May Lyly® los siguientes valores de humedad (36.16<sup>±0.08</sup> y 39.62<sup>±0.06</sup>), cenizas (1.71<sup>±0.03</sup> y 1.79<sup>±0.01</sup>), grasa cruda (6.43<sup>±0.04</sup> y 8.04<sup>±0.01</sup>) y proteína (15.77<sup>±0.02</sup> y 19.16<sup>±0.03</sup>), respectivamente. Para el caso del pollo ahumado obtenido en un establecimiento y en la vía pública, los valores fueron los siguientes: humedad (34.19<sup>±0.01</sup> y 41.32<sup>±0.04</sup>), cenizas (1.02<sup>±0.07</sup> y 2.35<sup>±0.03</sup>), grasa cruda (16.86<sup>±0.10</sup> y 17.58<sup>±0.02</sup>) y proteína (15.81<sup>±0.04</sup> y 17.12<sup>±0.03</sup>), respectivamente. La extracción de los tres HAP se realizó de acuerdo a lo descrito en el método UNEP-7 (1993), propuesto por el Programa de la Organización de las Naciones Unidas para el Ambiente (UNEP, en inglés). La identificación y cuantificación se realizó empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Con base en ella se lograron identificar para el caso de ambos pollos al fluoranteno (FLT), pireno (PYR) y benzo(a)pireno (BaP) en un intervalo de concentraciones que oscilan de 1.52<sup>±0.20</sup> - 4.78<sup>±0.41</sup> mg/kg, 1.82<sup>±0.32</sup> - 5.53<sup>±0.62</sup> mg/kg y de 0.62<sup>±0.05</sup> - 0.97<sup>±0.04</sup> mg/kg, respectivamente. Para las muestras de mejillones comerciales se encontraron las siguientes concentraciones: fluoranteno de 2.69<sup>±0.79</sup> - 4.09<sup>±0.16</sup> mg/kg, pireno de 4.10<sup>±0.34</sup> - 4.85<sup>±0.09</sup> mg/kg y, para el caso del benzo(a)pireno, de 0.32<sup>±0.05</sup> - 0.41<sup>±0.02</sup> mg/kg. Por otra parte, se observó una variación sobre los porcentajes de recuperación para cada uno de los HAP analizados, encontrándose que, para la matriz de mejillones, para el FLT, el PYR y el BaP se alcanzaron valores de recuperación de 78-94%, de 87-90% y de 94-95% respectivamente; mientras que, para la matriz de pollo, los porcentajes de recuperación fueron de 80-84%, 77-79% y 80-85%, respectivamente. Debido a los resultados generados en este estudio, se sugiere proponer una norma mexicana en la que se establezcan los límites máximos permisibles de estos compuestos en los alimentos ahumados, con la finalidad de evitar un posible daño a los consumidores de este tipo de productos alimenticios.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Breve historia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

Desde hace aproximadamente 200 años, se le han atribuido a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) efectos carcinogénicos y mutagénicos. Los primeros indicios de estos compuestos se remontan hacia 1775 en donde Percival Patt, un físico inglés, asoció la alta incidencia de cáncer escrotal en personas que se dedicaban a limpiar chimeneas (deshollinadores), por su continuo contacto con el tizne de la chimenea (Multon, 1981).

Posteriormente, en 1932, se aisló al benzo(a)pireno del alquitrán del carbón determinándose su alto potencial carcinógeno mediante experimentos realizados en animales. En 1950, se clasificó a los HAP como agentes carcinógenos en alimentos, debido a los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos, los que mostraron la relación existente entre la incidencia de cáncer de estómago y el elevado consumo de productos ahumados tales como carnes y pescado. Dobes, en 1954, detectó por primera vez la presencia de benzo(a)pireno en productos ahumados. La concentración de HAP se reporta en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o  $\text{mg}/\text{kg}$  de benzo(a)pireno, debido a que es el hidrocarburo aromático policíclico más estudiado, abundante y representativo de los efectos de los compuestos de este grupo, siendo el primero en poder ser cuantificado en las partículas del aire (Greenberg, 1995).

A partir de los trabajos realizados por Dobes sobre el benzo(a)pireno, las líneas de investigación se han enfocado a estudiar la formación, liberación en el ambiente y los mecanismos bioquímicos que determinan la transformación celular irreversible. Gracias a los avances registrados en las décadas pasadas y a los avances tecnológicos de los últimos años, se han podido detectar e identificar en alimentos debido al desarrollo de técnicas y equipos analíticos de mayor sensibilidad (Galceran, 2002).

Por otra parte, a partir de 1975, se han podido realizar pruebas rápidas de mutagénesis, especialmente empleando la prueba de Ames (*Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*), que fue desarrollada a partir de 1971 por Bruce N. Ames; quien descubrió una alta correlación entre el cáncer y los resultados positivos arrojados por esta prueba, la cual se ha practicado a los diferentes HAP. Entre las ventajas que presenta esta prueba son la

simplicidad en el manejo, el bajo costo al no necesitar equipos sofisticados y una alta confiabilidad sobre los resultados obtenidos. Esta prueba se basa en el uso de cepas bacterianas específicas como son las de *Salmonella typhimurium* para detectar *in vitro* mutaciones en el ADN de la célula receptora de las bacterias (Derache, 1990; Voet, 1992; Lehninger, 2001).

## 1.2 Características generales de los hidrocarburos aromáticos

Esta clase de compuestos contiene por lo menos un benceno en su estructura, existiendo diferentes clases de hidrocarburos aromáticos. Una de las clasificaciones consta de los derivados alifáticos y alicíclicos del benceno, una segunda clasificación es la llamada polifenilica, la cual comprende a los compuestos en los cuales dos o más anillos bencénicos se encuentran fusionados. Finalmente, la tercera clasificación comprende a más de 100 diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos conocidos como HAP (Albert, 1990; Morrison, 1996). Estos compuestos difieren en el número de posiciones del anillo aromático y en el número y posición de sustituyentes químicos en el sistema básico; confiriéndoles características físico-químicas y toxicológicas especiales, como son su alta hidrofobicidad, su carácter lipofílico y su semivolatilidad, lo cual los hace sumamente peligrosos para los seres vivos. Al ser considerados compuestos orgánicos persistentes (COP), pueden permanecer en el ambiente durante largos períodos de tiempo sin ser alterados ni modificadas sus propiedades tóxicas. Los HAP se han clasificado en dos grandes grupos de acuerdo a los efectos que producen en el ambiente y en los sistemas biológicos. El primer grupo se encuentra constituido por los HAP de bajo peso molecular (BPM), formados por dos o tres anillos aromáticos, entre los que se destacan el naftaleno y el fluoreno. En el segundo grupo destacan aquellos compuestos formados por cuatro a siete anillos aromáticos a los cuales se les denomina HAP de alto peso molecular (APM), destacando por su nivel de toxicidad el benzo(a)pireno y el dibenzo(a,h)antraceno (Almaraz, 2001; Castillo-Urueta, 2002). Con base en ello, se ha observado una relación estrecha entre el tamaño del compuesto y su solubilidad, ya que a mayor peso molecular y/o tamaño de la molécula, disminuye su solubilidad en agua; sin embargo, aumentan la toxicidad, el carácter lipofílico y la persistencia en el medio (Ruiz-Carbajal, 2001).

### **1.3 Origen y formación de los HAP**

El mecanismo exacto de formación de los HAP no ha sido establecido con certeza; sin embargo, se ha postulado su formación a partir de una reacción de radicales libres y de la adición intermolecular o polimerización de pequeñas moléculas (Castells, 1998). Por otra parte, se ha comprobado su formación cuando se expone la materia orgánica a temperaturas elevadas de combustión, mediante un proceso de pirólisis y de condensación de los reactivos. De esta manera, la formación de los HAP puede ser atribuida a la combustión incompleta de madera, materiales orgánicos y combustibles fósiles (Almaraz, 2001). A nivel mundial hay estudios que revelan su presencia en aire, agua, suelos, alimentos y cosméticos (Díaz-Morales *et al*, 2001).

De hecho, la mezcla de HAP se genera durante la combustión de proteínas y grasas que contiene la carne o el aceite comestible. En la degradación de las grasas se forman radicales libres, favoreciéndose debido a las altas temperaturas de combustión. Estos radicales son potencialmente reactivos, por lo que reaccionan con el oxígeno o con otras cadenas de ácidos grasos generando una cadena de reacciones que tienen como producto a nuevos compuestos (Howard, 1986; Fennema, 1996).

Los HAP son sustancias ampliamente distribuidas en el ambiente, siendo su origen muy diverso, ya que es posible encontrarlos en el agua, en el aire, en el humo de cigarrillos, formando parte de los componentes de gasolinas, en los gases de escape de los automotores, en la superficie del suelo y en el ahumado de los alimentos (Grimmer, 1984; Hayakawa, 2002).

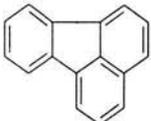
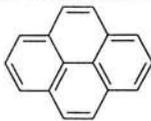
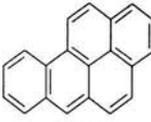
Existen dos formas en que los alimentos pueden ser contaminados con HAP; la primera de ellas, es a través del transporte del aire de los sitios industriales a las zonas agrícolas y la segunda involucra la cocción directa del alimento, tal y como sucede con los procesos de asado al carbón, el rostizado y el ahumado (Greenberg, 1995; Linder, 1995).

### **1.4 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas**

Los HAP se encuentran como contaminantes ambientales y de alto riesgo para la salud humana en las listas de la Agencia de Protección Ambiental de los EEUUA (Environmental Protection Agency, EPA, en inglés), de la Administración de Medicamentos y Alimentos de EEUUA (Food

Drug Administration, FDA, en inglés) y del Comité Científico de Alimentos de la Unión Europea (Scientific Committee on Food, SCF, en inglés); debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas, aunque estas características varían de un compuesto a otro (Lubawy, 1983; Gernot, 1998). En las Tablas 1.1 y 1.2, se mencionan las propiedades físicas, químicas y toxicológicas más representativas de estos compuestos.

Tabla 1.1 Características físicas (Hawley, 1992, Merck Index, 1994)

Compuestos	PM (g/mol)	FM	Presión de vapor a 25°C (mmHg)	PF/PB (°C)	Solubilidad en H <sub>2</sub> O a 25°C (µg/L)	Características
 Fluoranteno (FLT)	202	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	9.2x10 <sup>-6</sup>	120/367	260	Sólido; soluble en éter, benceno y hexano. Con ácido sulfúrico da coloración azul
 Pireno (PYR)	202.26	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	4.5x10 <sup>-6</sup>	156/404	135	Sólido incoloro, ligeramente soluble en disolventes orgánicos, se obtiene a partir del alquitrán de carbón
 Benzo(a)pireno (BaP)	252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5.6x10 <sup>-9</sup>	179/495	310-312	Cristales amarillentos ligeramente soluble en alcohol, benceno, tolueno, xileno; soluble en hexano y DMSO

DMSO = Dimetilsulfóxido

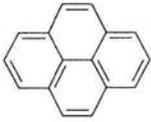
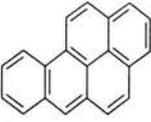
FM = Fórmula molecular

PB = Punto de ebullición

PF = Punto de fusión

PM = Peso molecular

**Tabla 1.2** Peso molecular y dosis letal media (DL<sub>50</sub> o LD<sub>50</sub>, por sus siglas en inglés) de algunos compuestos (Autrup *et al*, 1983; HARZARD, 1999; ANESFAR, 2002)

Compuesto	Abreviatura	PM	DL <sub>50</sub> <sup>*</sup> mg/ kg	Datos de toxicidad	Actividad carcinogénica	Genotoxicidad
 Fluoranteno	FLT	202	2000	Venoso por ruta intravenosa. Moderadamente tóxico por ingestión y vía cutánea	+	ERST DSA
 Pireno	PYR	202.26	2700	Venoso por inhalación. Tóxico moderado por ingestión y por rutas intraperitoneales. Irrita la piel	0	ERST DSA ICH
 Benzo(a)pireno	BaP	252	4095	Carcinogénico confirmado. Venoso por vía subcutánea, intraperitoneal e intrarrenal. Irrita la piel	++	ERST AC DSA AA

**Notas:**

\*: Exposición oral en ratas

++: Suficiente evidencia como causa de cáncer en el hombre

+: Evidencia limitada, hay una interrelación de causa de cáncer pero no ha sido probada

AA: Aduetos de ADN

AC: Aberraciones cromosómicas

DSA: Desincroización de la síntesis de ADN

ERST: Ensayo revertante en *Salmonella typhimurium*

ICH: Intercambio de cromátidas hermanas

PM: Peso molecular

### 1.5 Características del ahumado

El ahumado consiste en someter un producto alimenticio a la acción de los compuestos gaseosos que se desprenden durante la combustión incompleta de cualquier hidrocarburo. En sus orígenes, al ahumar un producto alimentario, el objetivo era aumentar la vida media del mismo, al impedir descomposición microbiana; sin embargo, con el tiempo, se observó que los productos ahumados conferían ciertas características organolépticas agradables sobre el producto. La generación de humo, es el resultado de las diferentes reacciones incompletas que ocurren entre los constituyentes de la madera (celulosa, hemicelulosa y lignina) y el aire. La composición del humo depende de la naturaleza de la madera y de las condiciones de combustión tales como el tipo de ahumador y la temperatura de calentamiento. Las maderas más ampliamente utilizadas para ahumar productos alimenticios de manera artesanal, son las de tipo no resinoso, como las maderas de nogal o caoba, ya que al emplearse maderas de tipo resinoso se incrementa la producción de compuestos carcinogénicos. Adicionalmente, durante el proceso de ahumado se ponen de manifiesto las siguientes características:

- Una descomposición, bajo la acción de calor (pirólisis), de los polímeros constituyentes de la madera en moléculas orgánicas de bajo peso molecular.
- Se ven favorecidas las reacciones de oxidación, polimerización y de condensación.
- De acuerdo al incremento de la temperatura se tienen las siguientes fases:
  - a) Deshidratación hasta aproximadamente los 170°C
  - b) Pirólisis endotérmica de hemicelulosa, hasta los 270°C
  - c) Pirólisis exotérmica de la celulosa y de la lignina, hasta los 400°C, con formación de carbón de madera
  - d) Combustión del carbón de madera, formado en la fase (c), pudiendo alcanzar la temperatura de los 1200°C
  - e) Condensación y formación de nuevas sustancias a partir de los compuestos resultantes de la pirólisis [fases (b), (c), (d)]
  - f) Oxidación de los productos de condensación y de los formados en la pirólisis en presencia de oxígeno
  - g) Nueva pirólisis a partir de los compuestos formados y repetición de las fases (e) y (f) (Girard, 1991; Simko, 2002).

## **1.6 Métodos y equipos para la producción de humo**

Existen diferentes métodos para la generación del humo, los cuales serán descritos brevemente a continuación:

- a) **Combustión sin llama.**- Es el método más antiguo para la producción de humo, consiste en quemar sin llama leños y serrín. Debido al carácter espontáneo y exotérmico del proceso de combustión, este procedimiento es a la vez más sencillo y menos costoso. La temperatura de la zona de combustión es lo suficientemente elevada como para ocasionar la completa degradación de todo los constituyentes de la madera. Como consecuencia, la aplicación del humo así obtenido proporciona alimentos con aromas muy marcados. La única desventaja del método, es la imposibilidad de controlar la temperatura de la zona de combustión. Como consecuencia, el humo se genera a temperaturas que favorecen la síntesis pirolítica de HAP y con frecuencia exhibe variaciones en la composición cuantitativa de sus componentes.
  
- b) **Generador de humo por fricción.**- Esta técnica consiste en someter la madera a una degradación térmica, generando la combustión mediante fricción de los trozos de madera contra un disco o tambor en rotación. La temperatura en la superficie de fricción puede controlarse variando la presión ejercida sobre el trozo de madera o modificando la velocidad de giro del rotor. Sin embargo, no suele exceder los 380°C.
  
- c) **Proceso hidropirolítico.**- Este método se caracteriza por degradar térmicamente la madera mediante vapor sobrecalentado que alcanza temperaturas entre los 250 a 390°C. Es insuflado a través de paredes perforadas hasta alcanzar el serrín, haciendo que la temperatura del lecho ascienda hasta 200°C. Como consecuencia de la baja temperatura de degradación de la madera, los cuerpos volátiles resultantes son ricos en ácidos carboxílicos y compuestos carbonílicos.
  
- d) **Producción de humo en lecho fluidificado.**- Este método permite controlar condiciones uniformes de temperatura y concentración de masa. Por esta razón su empleo es más ventajoso que los otros sistemas mencionados anteriormente (Sikorski, 1990).

Las características del humo obtenido y de la temperatura que alcanza en los diferentes procesos se pueden observar en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3 Tecnología de producción de humo (Sikorski, 1990)**

Tecnología de producción	Temperatura de combustión (°C)	Modo de combustión	Temperatura del humo (°C)	Características de los humos obtenidos
Combustión sin llama	Altas temperaturas	Sin llama	-----	Seco, denso y rico en oxígeno
Generador de humo por fricción	300 – 500	Sin llama	20	Seco, denso y muy rico en oxígeno
Proceso hidropirólítico	300 – 400	Sin llama	80	Humo denso y pobre en oxígeno
Humo en lecho fluidificado	300 – 400	Sin llama	20	Seco, denso y rico en oxígeno

### 1.7 Efectos deseables e indeseables de los componentes del humo

Con el ahumado de los productos alimenticios, se obtienen los efectos deseables e indeseables mencionados a continuación:

1. Efectos en el sabor; en los que los compuestos involucrados son fenoles y carbonilos.
2. Efectos en el color; son debido principalmente a la sedimentación de sustancias colorantes. Se trata principalmente de productos volátiles del grupo de los fenoles, los cuales experimentan además oscurecimientos por polimerización u oxidación. La superficie absorbe también sustancias en forma de partículas procedentes de los carbohidratos; sin embargo, la causa principal de la coloración reside en las reacciones químicas de la superficie de los alimentos con sustancias pertenecientes al grupo de los carbonilos.
3. Efectos en la textura, el producto se vuelve más suave debido a la desnaturalización de proteínas por el calor.

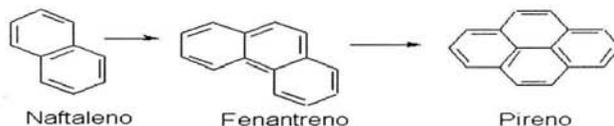
4. Efecto de conservación, los compuestos involucrados en la conservación son los difenoles, los fenoles, el formol y los ácidos fórmico y acético.

Entre los efectos indeseables se tienen los siguientes:

1. Contaminación del producto por ciertos compuestos tóxicos del humo, como los HAP, formaldehído, dimetilnitrosamina, catecoles y otros contaminantes.
2. Degradación de los aminoácidos esenciales de las proteínas y vitaminas (Girard, 1991; Mohler, 1991).

### 1.8 Formación de los HAP durante el proceso de ahumado

Se originan cuando la temperatura de combustión de la madera asciende hasta los 400°C, a partir del naftaleno, que es un componente del humo que consta de dos anillos aromáticos, al que se le puede adicionar fácilmente otro anillo benzólico (Mohler, 1991).



En el caso de los alimentos que se encuentran en contacto directo con la parrilla, se forman a partir de las grasas debido a un exceso de calor y de la proximidad de la fuente calórica debido a la formación de radicales libres (Fennema, 1996; Simko, 2002). Se debe considerar que la concentración de HAP en alimentos ahumados es poco constante y la razón principal para esa variación está asociada a los diversos procedimientos usados para ahumar como son: el tipo y composición de la madera, tipo de generador de humo, accesibilidad de oxígeno, temperatura de generación de humo, tiempo de exposición y uso de antioxidantes (Sullivan *et al*, 1983; SCF, 2002).

### 1.9 Efecto de los HAP en el organismo

Los HAP son compuestos que entran al organismo distribuyéndose en diferentes órganos por inhalación, ingestión o absorción cutánea. Una vez metabolizados son oxidados por el citocromo P-450 a fenoles, dihidrodioles y quinonas. (Elskus y Stegenan, 1989). Por

consiguiente, los HAP son considerados como agentes genotóxicos indirectos, es decir, que requieren ser metabolizados para que la molécula de HAP se active y dañe el ADN. El mecanismo de acción de los HAP que se ha encontrado consiste en el ataque electrofílico de las bases del ADN, específicamente el par Guanina - Citosina, por los metabolitos carcinogénicos. Por ejemplo, el benzo(a)pireno forma el ión triol carbonio, que se fija al sitio de unión de las bases durante la replicación del ADN (Castells, 1998).

Debido a lo anterior, en diferentes países como Alemania, Italia, República Checa y Suiza, se ha establecido una concentración máxima de 1 µg/kg de benzo(a)pireno en alimentos ahumados, mientras que en Estados Unidos de América, el límite para este compuesto es de 0.03 µg/kg (Simko, 2002).

Por otra parte, México no cuenta con ninguna reglamentación que establezca los límites máximos permisibles de HAP en productos ahumados, siendo un país en el cual el consumo de productos ahumados no resulta tan limitado. Entre los productos de mayor consumo se encuentran las carnes a la leña, carbón o brasas, las carnes asadas y a la parrilla, el tocino y otros embutidos ahumados. Debido a ello, se debe tener una vigilancia permanente de las concentraciones de HAP en este tipo de productos con la finalidad de evitar efectos adversos o colaterales hacia la salud del consumidor (Luthe, 2002).

## **1.10 Características de las muestras bajo estudio**

### **1.10.1 Características de los mejillones**

Los mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) son moluscos bivalvos que viven formando comunidades más o menos numerosas, fijados a la superficie de las rocas a las que se adhieren mediante un pie rudimentario formado en una de las etapas larvarias y que sirve de órgano de fijación. Se encuentran en la zona de mareas o por debajo de ésta, soportando una profundidad máxima de 10 metros.

Estos organismos presentan una enorme capacidad de filtración, pudiendo llegar a bombear hasta 8 litros de agua por hora. A dichos moluscos se les ha denominado filibranquios; es decir, presentan una serie de filamentos o ramificaciones en sus branquias a manera de cilios o pelos, cuya alimentación es a través de filtración, lo cual les permite la acumulación de los

hidrocarburos pero no su eliminación. Los mejillones a diferencia de otros moluscos bivalvos, son unisexuales por lo que cada hembra puede llegar a depositar más de un millón de óvulos y la incubación suele durar entre una o dos semanas, según la temperatura del agua. El mejillón es propio del Atlántico, por lo que se encuentra distribuido a lo largo de las costas de Europa y América. Actualmente, los mejillones son cultivados en criaderos naturales y artificiales, debido a su rápido crecimiento, facilidad para adherirse a soportes y a su apreciada carne. Los países productores más importantes son: España (sobre todo en las Rías Gallegas), los Países Bajos, Corea, Japón y Estados Unidos. Del año 2000 – 2002 según los reportes presentados por el INEGI, México ha importado de estos países aproximadamente catorce millones de moluscos preparados o conservados (INEGI, 2000, 2002), por lo que es de suma importancia conocer la concentración de HAP que puedan tener estos alimentos. En la Figura 1.1 se aprecia una fotografía de los mejillones.

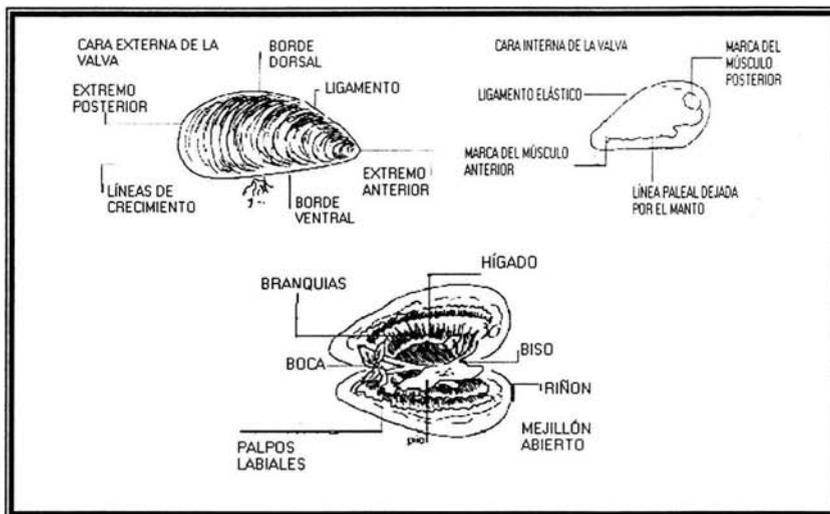


Figura 1.1 Fisiología del mejillón (Fechter,1993)

### **1.10.2 Características del pollo**

Las aves de corral son animales de gran interés en la industria ya que son apreciadas por su carne y huevos (Castello, 1960). Durante el año de 2000, México importó 6,667.941 de gallos, gallinas o pollos con un valor de 144,504 miles de pesos, a los países de Australia, Canadá, Chile, China, España, EUUA, Francia, India, Italia y Tailandia (INEGI, 2000). La carne es muy apreciada por los consumidores debido a que es económica y a que, a excepción de la cabeza, patas y vísceras, todas las otras parte del pollo son comestibles; además, es nutritiva debido a que contiene aminoácidos y lípidos esenciales; sin embargo, mucho de los consumidores prefieren comer la carne más cocinada que otros, como es el caso del rostizado y ahumado. Esto se debe a que la carne adquiere características organolépticas especiales que son del agrado del consumidor, la piel del pollo es una de las partes que contiene más grasa; por eso al ahumarse es el primer sitio donde se alojan los HAP.

Con base en la problemática planteada, a continuación se presenta el objetivo general de esta investigación así como los objetivos particulares.

### **1.11 Objetivos**

#### **1.11.1 Objetivo general**

Determinar la presencia y cantidad en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de tres de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que representan un mayor riesgo toxicológico en alimentos ahumados, considerando los límites internacionales para ellos, como los del benzo(a)pireno, de 0.03 a 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$

#### **1.11.2 Objetivos particulares**

- Realizar un análisis químico con la finalidad de caracterizar a las muestras.
- Acoplar la metodología descrita en el método UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA, 1993) para la extracción, identificación y cuantificación de HAP en los alimentos propuestos.

- Separar, cuantificar e identificar a tres de los HAP (Pireno, Fluoranteno y Benzo(a)pireno) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, en muestras de pollos que han sido sometidos a un proceso de ahumado a la intemperie y ahumado en un establecimiento, así como muestras de mejillones ahumados y enlatados.
- Correlacionar los resultados obtenidos en esta investigación con los reportados en la literatura.

## CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS ANALÍTICOS

A continuación se describirán brevemente los fundamentos analíticos de las técnicas empleadas durante la parte experimental de este trabajo.

### 2.1 Cromatografía de gases, CG

Esta técnica permite separar mezclas de compuestos volatilizándolos al inicio de la columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de un gas inerte, de gran pureza, que circula de manera continua a lo largo de la columna durante la corrida (fase móvil). En la fase estacionaria de la columna se lleva a cabo la retención selectiva de los componentes de la mezcla a separar debido a fenómenos de adsorción y desorción, por lo cual, los componentes viajan a través de la columna con diferentes velocidades, dependiendo éstas del peso y de la afinidad que presenten hacia el adsorbente. Los componentes separados se detectan en la salida del sistema por medio de un detector. La señal se integra y envía a un sistema de captura y análisis de datos (García-Gómez, 2000; Harris, 1992; Skoog y Leary, 1992).

Las principales ventajas de la cromatografía de gases son las siguientes: Alta resolución, velocidad, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos. Su principal desventaja es que únicamente se pueden manipular muestras volátiles; de lo contrario, no pasa a través de la columna. Con la CG es difícil identificar y medir compuestos iónicos, compuestos de elevada polaridad y compuestos de peso molecular superior a 600 g/mol (McNair, 1981; Santos, 2002). En la Figura 2.1 se presentan esquemáticamente las partes de un cromatógrafo de gases.

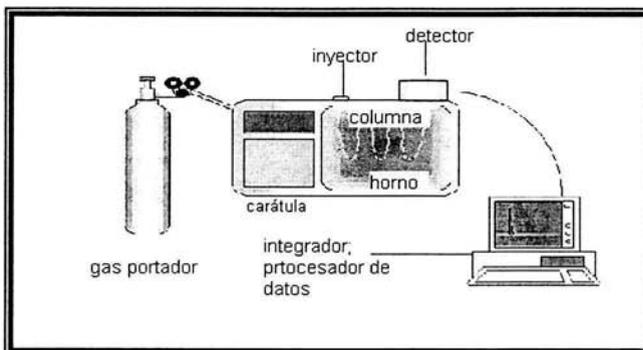


Figura 2.1 Esquema fundamental de las partes de un cromatógrafo de gases

### 2.1.1 Gas portador

La elección de la fase móvil en cromatografía de gases influye en el funcionamiento de la columna y el detector. El helio, hidrógeno y nitrógeno son los gases más utilizados (Harris, 1992). Los flujos de los gases se controlan normalmente mediante un regulador de presión de dos niveles colocados en el cilindro de gas como primera etapa y por reguladores de flujo instalados en el cromatógrafo como etapa final. El intervalo de presiones de entrada oscila entre 4.68 y 23.44 kPa (10 y 50 psi), lo que produce flujos de 0.5 a 2 mL/min en columnas capilares (Skoog y Leary, 1992).

### 2.1.2 Sistema de inyección

La muestra se inyecta por medio de una jeringa hipodérmica a través de un septo de silicón, dentro del sistema de inyección (Figura 2.2), donde se evapora en un tubo de vidrio "silanizado" denominado alineador ("liner", en inglés). El gas portador transporta la muestra en forma de gas a lo largo de la columna. El tipo de inyección puede tener dos variantes: Dividida (split) y sin dividir (splitless). En la variante dividida (split), la muestra es separada pasando a la columna solamente del 0.1 al 10% del volumen inyectado, eliminándose el resto por medio de una válvula de escape. Este tipo de inyección es recomendable para el análisis de analitos que se encuentren en concentraciones altas. La segunda variante, sin dividir (splitless), se recomienda para análisis cuantitativos y para muestras que contienen al analito en concentraciones de trazas (ppm) o (ppb). En este procedimiento de inyección, el total del volumen de la muestra pasa a la columna (Harris, 1992).

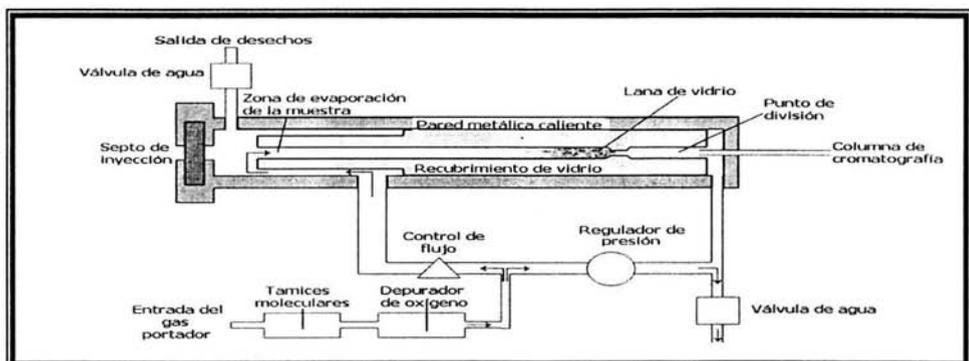


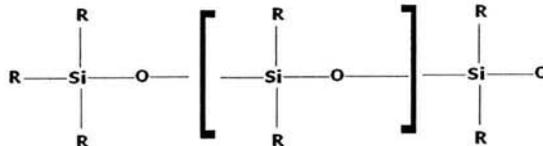
Figura 2.2 Inyector dividido y sin dividir ("split-splitless") (Harris, 1992)

### 2.1.3 Columnas cromatográficas

El propósito de la columna cromatográfica es efectuar la separación de los analitos bajo estudio. Para ello se emplean diferentes tipos de columnas, destacando entre ellas las columnas empacadas y las columnas capilares. Las primeras pueden ser de acero inoxidable o vidrio con un diámetro de 3- 6 mm y una longitud de 1- 5 m. Las segundas generalmente presentan una longitud de 15 y 30 m. Estas columnas tienen mayor resistencia física, una reactividad menor frente a los componentes de la muestra y una alta flexibilidad. Presentan como característica que mientras menor sea el diámetro de la columna, mayor es la eficiencia de ésta; la cual se mide por el número de platos teóricos (McNair, 1981; Harris, 1992).

### 2.1.4 Fase estacionaria

El tiempo de retención de un soluto en una columna depende de la naturaleza química de la fase estacionaria. Las fases estacionarias del tipo hidrocarburo y dialquil-siloxanos son no polares, mientras que las fases poliéster son altamente polares. Generalmente, la polaridad de la fase estacionaria debe ser similar a la de los componentes de la muestra. La estructura general de los polidimetil siloxanos se muestra a continuación:



Se pueden encontrar comercialmente fases estacionarias polimerizadas y/o entre-cruzadas, proporcionándole a la fase estacionaria una larga duración debido a que se evita el "sangrado" de la columna, el cual consiste en arrastrar una pequeña cantidad de líquido inmovilizado fuera de la columna durante el proceso de elución (Harris, 1992; Skoog y Leary, 1992).

### 2.1.5 Temperatura del horno

La temperatura óptima de la columna es una variable importante para la separación de los componentes de la muestra, así como la fase y las dimensiones de la columna. Para muestras con amplios intervalos de puntos de ebullición o diferentes polaridades, resulta de gran utilidad poder modificar la temperatura de la columna durante la separación, lo cual se conoce como temperatura programada. En general, al incrementarse la temperatura de una columna, se reduce el tiempo de retención y el de resolución (Harris, 1992; Skoog y Leary, 1992).

## 2.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas consiste en bombardear un haz de electrones sobre las moléculas del compuesto bajo estudio en un sistema a alto vacío. Esto provoca la ruptura de las moléculas en varios fragmentos iónicos. Cada ión positivo formado durante la fragmentación presentará una relación masa a carga ( $m/z$ ), generalmente de una UMA. Una vez formados dichos iones, son acelerados y separados de tal modo que se registre una señal para cada valor de la relación masa/carga, donde la intensidad de la señal, reflejará la abundancia del ión que provoca la señal (Dabrio, 1971).

### 2.2.1 Sistema de generación de vacío

En los espectrómetros de masas la fuente de iones, el filtro de masas y el detector deben de estar contenidos en un sistema de vacío ( $10^{-5}$ – $10^{-8}$  torr), con la finalidad de que no se lleven a cabo colisiones entre las moléculas analizadas y otras como serían el agua y el aire, con lo cual se garantiza que los iones seleccionados y detectados eficientemente, serán solamente de la muestra a analizar. Otra de las razones por las cuales se usa el alto vacío es, además de proveer trayectorias libres de colisiones de iones, el incrementar el tiempo de vida del filamento, incrementando la sensibilidad del equipo (Seibl, 1973).

### 2.2.2 Fuente de ionización

Existen varios tipos de fuentes de ionización, siendo los más comunes los que a continuación se mencionan:

- a) Impacto electrónico (IE)
- b) Ionización química (IQ)

a) Impacto electrónico (IE).- Este sistema consiste en emitir electrones por un filamento caliente de tungsteno o renio, los cuales son acelerados por un potencial aproximadamente de 70 eV, que se aplica al filamento y al ánodo. Las trayectorias de los electrones y de las moléculas se encuentran en ángulo recto y se cruzan en el centro de la fuente donde colisionan y tiene lugar la ionización (Figura 2.3). Los productos primarios resultantes son iones de una única carga positiva, formados cuando los electrones de elevada energía se acercan suficientemente a las moléculas como para causarles la pérdida de electrones debido a las

repulsiones electrostáticas. La ionización por IE no es muy eficiente ya que sólo alrededor de una molécula entre un millón experimenta la reacción primaria (Skoog y Leary, 1992). En la reacción de  $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$ , M representa la molécula de analito y  $M^+$  es su ion molecular. Se dice que el ión molecular se considera como un ión radical, ya que posee el mismo peso molecular que la molécula inicial. Los iones positivos producidos en una ionización electrónica son atraídos a través de la rendija hacia la primera placa de aceleración mediante una diferencia de potencial (normalmente de 5V para el caso de analizadores de cuadrupolo), la cual se aplica entre esta placa y los repulsores. Con el objetivo de formar un número significativo de iones gaseosos en una proporción reproducible, es necesario que los electrones generados por el filamento de la fuente sean acelerados por un potencial de 50eV. La pequeña masa y la alta energía cinética de los electrones producen aumentos muy pequeños en la energía traslacional de las moléculas con las que chocan. Sin embargo, estas moléculas adquieren estados vibracionales y rotacionales excitados. La subsecuente relajación tiene lugar mediante una elevada fragmentación, que da lugar a un número de iones positivos de varias masas que son menores que a la del ión molecular (Skoog y Leary, 1992). En la Figura 2.3 se puede apreciar el proceso por el cual sucede la fragmentación por medio de impacto electrónico.

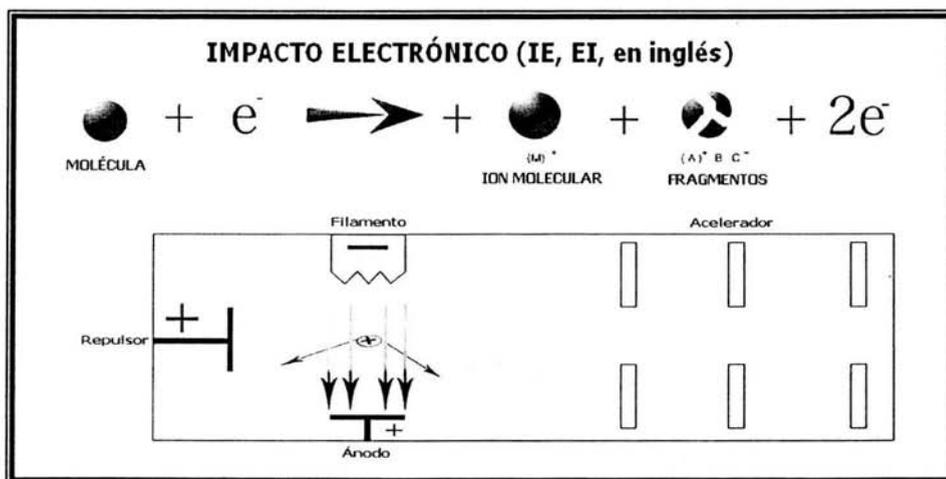


Figura 2.3 Impacto electrónico (IE) (Esteban, 1993)

b) Ionización química.- En la Figura 2.4 se muestra un diagrama de cómo se lleva a cabo la ionización química (IQ). La ionización química es el resultado de las interacciones químicas iónico-moleculares entre una gran cantidad de iones, formados a partir de un gas reactivo y las moléculas neutras procedentes de una pequeña cantidad de muestra. Hay dos tipos de ionización química: i) Ionización química positiva. Este proceso de ionización se realiza en dos pasos. Durante el primero de ellos, se introduce a la cámara una gran cantidad (concentración medida como presión parcial de aproximadamente 1 torr) de un gas reactivo (metano), el cual se ioniza por impacto electrónico. La energía electrónica que se requiere para asegurar una buena penetración del haz electrónico ionizante en el volumen activo de gas debe ser de 200-500 V. A la ionización primaria le sigue un proceso de segundo orden, mediante el cual los iones primarios reaccionan con otras moléculas neutras de gas reactivo para producir un plasma de iones reactivos estabilizados. El segundo paso se lleva a cabo cuando un ión reactivo se encuentra con una molécula neutra procedente de la evaporación de la muestra; ii) Ionización química negativa. Este tipo de ionización produce reacciones ion-molécula cuando se generan un exceso de iones negativos en la cámara, los cuales interaccionan con las moléculas neutras de una muestra. Dicha interacción puede consistir en la transferencia de carga, transferencia de hidruros (Willard, 1991).

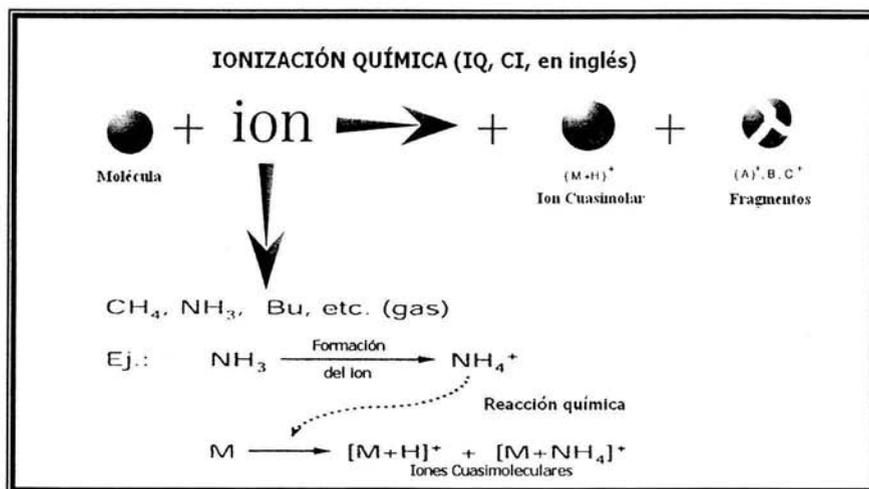


Figura 2.4 Ionización química (IQ) (Esteban, 1993)

### 2.2.3 Filtro de masas

La parte más importante del analizador del filtro másico es el conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal paralelas que sirven como electrodos del filtro de masas (Skoog y Leary, 1992).

Los iones que se producen en la fuente de ionización se aceleran por un potencial de 5 a 15V y se introducen en el espacio existente entre las barras (Figura 2.5) (Chapman, 1993).

Mediante la aplicación de voltajes variables de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) a cada pareja de barras, se consigue que ciertos iones de masas determinadas pasen por el "túnel" formado por las cuatro barras polares, siguiendo trayectorias oscilantes estables que le conducen al detector, mientras que los iones con otras masas, al ser inestables sus trayectorias, no alcanzan el detector, siendo desviadas fuera del conjunto de barras. Variando convenientemente estos voltajes pueden irse enfocando de modo subsecuente los iones de diferentes masas presentes para obtener el espectro correspondiente (Esteban, 1993).

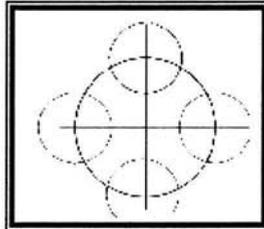


Figura 2.5 Diagrama esquemático de un analizador de cuadrupolo

El funcionamiento del cuadrupolo puede ser operado en dos modos: Modo de barrido, MB (SCAN, por su siglas en inglés) y por el de seguimiento ("monitoreo") selectivo de iones (SSI).

En el modo SSI, el filtro de las masas establece el paso de ciertos iones al detector de acuerdo a una prioridad (selectividad). Esto provee una gran sensibilidad y se usa para aplicaciones cuantitativas. En el modo SCAN, el filtro de masas se establece para operar secuencialmente en todo un intervalo de masas. Este modo posee una sensibilidad menor debido a que muchos de los iones golpean las barras durante el trayecto y quedan registrados. Esta variante se emplea para generar espectros interpretativos o para realizar una búsqueda en "librerías"

(Skoog y Leary 1992), nombre que se le da a los archivos computarizados de identificación de compuestos.

### 2.2.4 Detector

En la Figura 2.6 se aprecia un detector donde el dinodo de alta energía (DAE) atrapa los iones cargados positivamente que se encuentran en el cuadrupolo. Cuando los iones alineados chocan con el DAE, se emiten electrones, los cuales son atrapados por el multiplicador de electrones; en el cual, éstos golpean su superficie interna y liberan más electrones de su superficie ocasionando que la señal se amplifique (Skoog y Leary, 1992).

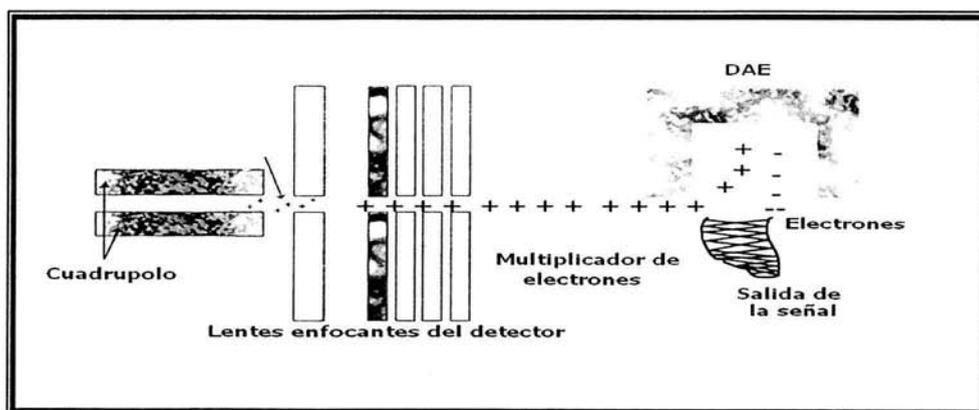


Figura 2.6 Detector dinodo de alta energía acoplado a un espectrómetro de masas, DAE/EM (Harris, 1992)

### 2.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM) es una herramienta analítica de gran sensibilidad, la cual se basa en la separación cromatográfica de los compuestos en estado gaseoso, que son transportados por medio del gas acarreador al detector de masas para su identificación. Al tener este sistema acoplado se obtiene, por un lado, la separación cromatográfica de cada compuesto y, por el otro, el espectro de masas generado para cada compuesto. De esta manera, es posible la obtención de información cuantitativa y cualitativa. La técnica acoplada representa una de las herramientas más valiosas en análisis, ya que combina las ventajas de separar e identificar los compuestos en estudio al mismo tiempo.

### 2.3.1 Gas portador en CG/EM

Teniendo en cuenta que el gas acarreador, total o parcialmente, entrará en la fuente iónica, se debe elegir un gas fácilmente eliminable, que no reaccione con la muestra y que no interfiera con su espectro. El gas acarreador más utilizado en CG/EM es el helio debido a que es químicamente inerte, no interfiere con el espectro de la muestra, no interfiere con el cromatograma, tiene un alto potencial de ionización (24.6eV) que ayuda a medir la corriente iónica total y mejora la eficiencia de la fuente de ionización de impacto electrónico (Esteban, 1993).

### 2.3.2 Consideraciones prácticas sobre el acoplamiento CG/EM

La mayor dificultad en el acoplamiento entre un CG y un detector de masas se debe a la gran diferencia de presiones entre los sistemas. El CG opera típicamente a presión atmosférica, mientras que el espectrómetro de masas requiere un vacío de unos  $10^{-8}$  -  $10^{-10}$  atmósferas con objeto de evitar procesos de colisión entre los iones con otras moléculas. Por el contrario, ambos sistemas tienen dos importantes características en común por el hecho de que los dos sistemas trabajan con muestras en fase vapor y con cantidades del orden de  $\mu\text{g}$  o inferiores. En la CG se precisan de  $10^{-3}$  -  $10^{-13}$  g y en espectrometría de masas de  $10^{-2}$  -  $10^{-11}$  g, representando estos límites inferiores los límites prácticos de detección entre ambas técnicas (Dabrio, 1971).

## CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

En las Tablas 3.1 y 3.2 se presenta un listado sobre los materiales y los reactivos empleados durante el desarrollo experimental.

**Tabla 3.1 Reactivos que se emplearon para el desarrollo experimental de la investigación**

Reactivos	Proveedor/Especificaciones
Disolventes: Hexano, diclorometano y metanol	Sigma-Aldrich/Grado cromatográfico
Estándares: benzo(a)pireno, pireno, fluoranteno 99%	Sigma-Aldrich/99.9% de pureza

**Tabla 3.2 Equipos empleados durante el desarrollo experimental de la investigación**

Equipos	Especificaciones
Liofilizadora	Marca: Labconco; Modelo: N890925-4
Horno	Marca: Precision Scientific; Modelo: 100
Mufla	Marca: Furnace; Modelo: 4800
Estufa de calentamiento	Marca: Thermolyne; Modelo: Ce 1110
Cromatógrafo de gases con detector de masas	Marca: Carlo Erba; Modelo:8000. Serie II, MD-800
Sonicador	Marca: Brasonic S.A.; Modelo: Branson-3210
Roto-evaporador	Marca: Buche; Modelo: 461

### 3.1 Obtención y acondicionamiento de las muestras

#### 3.1.1 Obtención de las muestras

Las muestras de pollo y de mejillones bajo estudio fueron adquiridas como se indica a continuación: La primera muestra de pollo a la leña, tomada al azar, fue adquirida en un establecimiento localizado entre Río Churubusco y Tezontle en la Delegación Iztapalapa, en la Ciudad de México. La segunda muestra de pollo a la leña se adquirió en un establecimiento ambulante ubicado entre el Eje 6 sur y la Av. Plutarco Elías Calles en la Delegación Benito Juárez, también en la Ciudad de México. Dichas muestras fueron transportadas en bolsas de plástico oscuro, dentro de hieleras con suficiente hielo, a los laboratorios del Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (PIQAYQA) de la Facultad de Química de

la UNAM, donde fueron conservadas a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  para su posterior caracterización. Por otra parte, las muestras de mejillones enlatados se adquirieron en dos centros comerciales ubicados en el Distrito Federal. Con finalidades comparativas se seleccionaron dos marcas de mejillones enlatados, la marca "Geisha<sup>®</sup>" y la marca "May Lyly<sup>®</sup>", las cuales se cuidó que presentaran características similares en cuanto a su composición, procedencia y que en ambas muestras la etiqueta estableciera la leyenda "mejillones ahumados enlatados inmersos en aceite de semilla de algodón".

### **3.1.2 Drenado y molienda**

Para el caso del pollo, fue seccionado en varios trozos de carne, homogeneizándose la piel, los muslos, las piernas y la pechuga, con la ayuda de una licuadora estéril a una velocidad de 300 rpm obteniendo una pasta homogénea amarilla. La pasta se liofilizó y caracterizó realizándole un análisis químico. Para el caso de los mejillones, el aceite en el cual vienen inmersos, fue drenado y eliminado; posteriormente, se procedió a la homogeneización de los mejillones usando una licuadora a 300 rpm, obteniendo una pasta homogénea de color verde oscuro.

### **3.2 Caracterización química de las muestras (análisis químico)**

Las pastas, tanto de las muestras de pollo, como de las de mejillones, fueron caracterizadas realizándoles un análisis químico (determinación del contenido de humedad y de los porcentajes de grasa, de cenizas y de proteína cruda), de acuerdo con las metodologías presentadas en el Anexo A (AOAC, 1990).

### **3.3 Almacenamiento**

Una vez conocida la composición porcentual de las muestras, se sometieron al proceso de liofilización para que, finalmente, una vez ya secas las muestras, fueran molidas en un mortero con la finalidad de homogeneizar la muestra. El producto obtenido de ambas muestras fue guardado en frascos de vidrio de color ámbar a  $-10^{\circ}\text{C}$  para el análisis y cuantificación de los compuestos en estudio.

### **3.4 Extracción de los HAP en las muestras empleando el método UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA, 1993)**

Para la realización de esta parte se montó el método analítico propuesto por el Programa de la Organización de las Naciones Unidas para el Ambiente UNEP-7, realizando algunas modificaciones en la técnica, las cuales se describen a continuación:

Cada una de las muestras por separado, se colocan en cartuchos de celulosa para ser introducidas en un equipo de extracción Soxhlet. Posteriormente, se les adicionan 200mL de hexano grado cromatográfico y se mantienen bajo reflujo durante 16 horas. Al término de este tiempo, se añaden 40mL de KOH en solución metanólica (0.7M) y 60mL de H<sub>2</sub>O a un matraz bola de 500mL, con la finalidad de saponificar los lípidos presentes en la muestra. El extracto obtenido se mantiene durante tres horas bajo la acción de reflujo para que, finalmente, se transfiera a un embudo de separación de 500mL. Los compuestos de interés se extraen con hexano grado cromatográfico en tres etapas, usando 50mL de hexano en cada una, para contar al final con un volumen de 150mL; el cual, mediante presión reducida, se concentra hasta obtener 5mL. Los extractos se almacenan en viales color ámbar bajo refrigeración a -10 °C, para su posterior análisis.

### **3.5 Limpieza y fraccionamiento de los HAP con los métodos EPA 3630a (EPA, 1990) y UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA, 1993)**

La limpieza y fraccionamiento de los extractos para la obtención de los hidrocarburos aromáticos se realizó combinando dos metodologías, que fueron los métodos UNEP-7 y EPA-3630a. Consistió en emplear columnas cromatográficas de 2cm de diámetro interno por 30cm longitud, a las cuales se les colocó en el fondo un gramo de lana de fibra de vidrio, con la finalidad de poder empacar los adsorbentes. Posteriormente, se colocaron 8g de sílice y 8g de alúmina (el método UNEP-7 sólo establece 4g de cada adsorbente, activadas a 200°C durante 8 horas y desactivadas parcialmente con agua al 5% p/p), en la columna de separación cromatográfica a través de un vaso de precipitado de 250mL, empleando como eluyente hexano grado cromatográfico. A continuación, se adiciona 1g de sulfato de sodio anhidro, para eliminar el agua que pudieran contener las muestras. La elución de la fracción alifática (fracción 1) se lleva a cabo empleando 20mL de hexano. La fracción 2 en donde se obtienen a los hidrocarburos aromáticos se obtiene empleando diferentes mezclas de disolventes a diferentes concentraciones (30mL de hexano:diclorometano 9:1 + 20mL de hexano:diclorometano 1:1 +

20mL de diclorometano), los métodos no establecen los últimos 20mL de diclorometano que fueron utilizados para aumentar la polaridad. Finalmente ambas fracciones se concentraron bajo presión reducida hasta tener un volumen de 5mL por evaporación rotatoria al vacío. Las fracciones obtenidas se almacenaron en viales color ámbar bajo refrigeración a -10°C, para su posterior análisis por CG/EM.

### **3.6 Determinación de HAP empleando CG/EM**

Para la identificación y cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos se empleó un equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas, de la marca Marca: Carlo Erba; Modelo:8000. Serie II, MD-800 el cual cuenta con inyectores del tipo "dividir- sin dividir" ("split- splitless"). Las fracciones de interés fueron analizadas en el modo sin dividir (splitless), empleando una columna capilar (DB-5) de 30 m de longitud con un diámetro interno de 0.25 mm y de 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de capa de fase estacionaria compuesta de una relación del 5% fenil - 95% metil polisiloxano. Las condiciones de temperatura utilizadas en el equipo se llevaron a cabo mediante una programación, la cual se puede apreciar en la Tabla 3.3, siendo la temperatura del inyector de 220°C. Las condiciones de operación del detector de masas (MD800) se muestran en la Tabla 3.4. El método de obtención de los espectros se realizó en la variante de "Seguimiento selectivo de iones" (SSI), con 4 ciclos/min. La separación e identificación de los compuestos en estudio se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de los tres estándares a analizar (fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno) y mediante la identificación de los iones moleculares correspondientes a cada estándar. Para la cuantificación de los HAP se utilizó la técnica de estándar externo, que consistió en preparar una mezcla de los tres analitos en estudio con 13 diferentes concentraciones (de 100 a 0.1ppm). Por otra parte, se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones patrón y se analizaron en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas con el fin de determinar los tiempos de retención para cada compuesto y obtener las áreas bajo la curva para cada una de las concentraciones, donde se obtuvo por un lado el valor de la pendiente y por el otro el valor de la ordenada al origen. La concentración de cada uno de los HAP identificados en las muestras se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

(Ecuación 3-1)

donde:

y = área bajo la curva

m = valor de la pendiente de la curva

x = La concentración de la muestra ( $\mu\text{g/mL}$  de muestra)

b = La ordenada al origen

**Tabla 3.3 Rampa de temperatura**

Temperatura del horno ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min)	Velocidad ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
90	1.0	8
180	0.0	5
245	0.0	4
300	7.0	---

**Tabla 3.4 Condiciones de operación en el detector de masas**

Emisión	500
Temperatura de la fuente	200 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura de la interfase	250 $^{\circ}\text{C}$
Presión de análisis	73.73 kPa (-4 psi)
Velocidad de lectura	4 ciclos/s
Modo de operación	SIM
Tiempo de análisis	40 min

En la Figura 3.1 se muestra la metodología general seguida durante el desarrollo experimental y en la Figura 3.2 se aprecia el método de extracción de HAP (UNEP/IOC/IAEA, 1993).

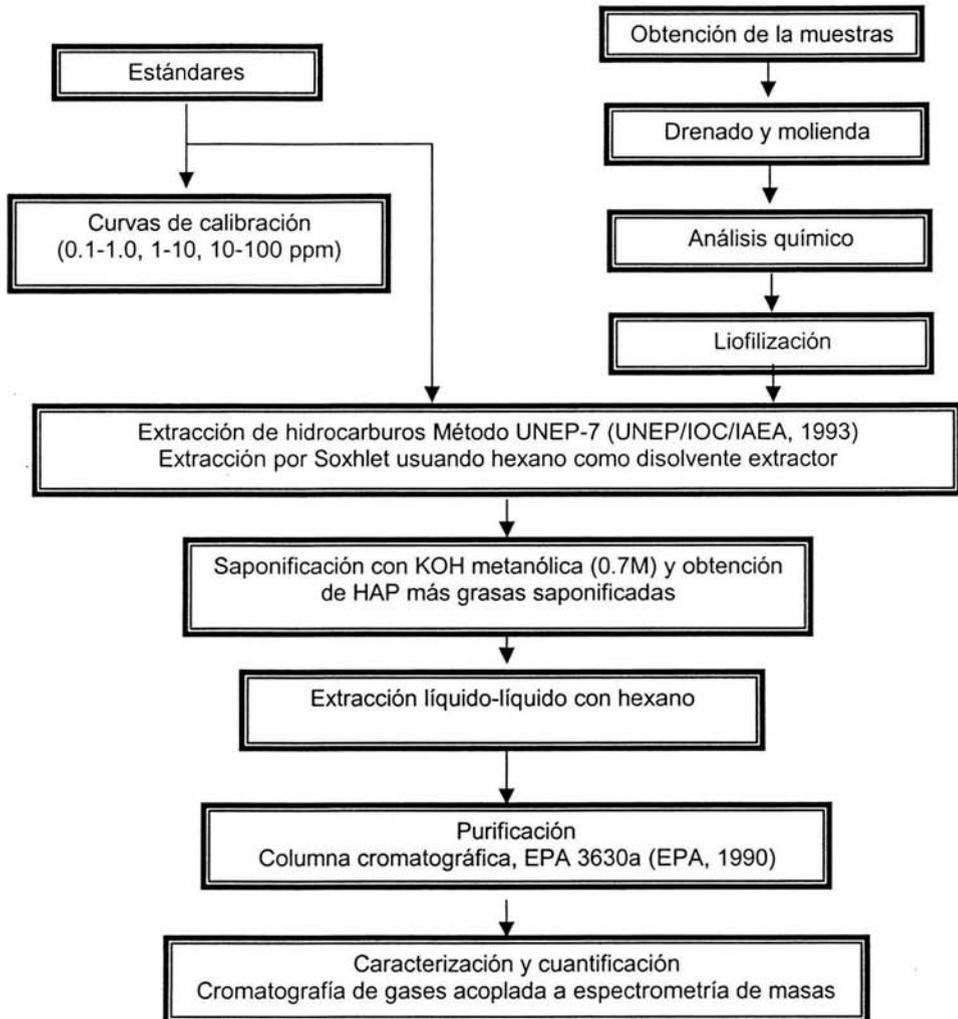


Figura 3.1 Metodología general seguida durante el desarrollo experimental

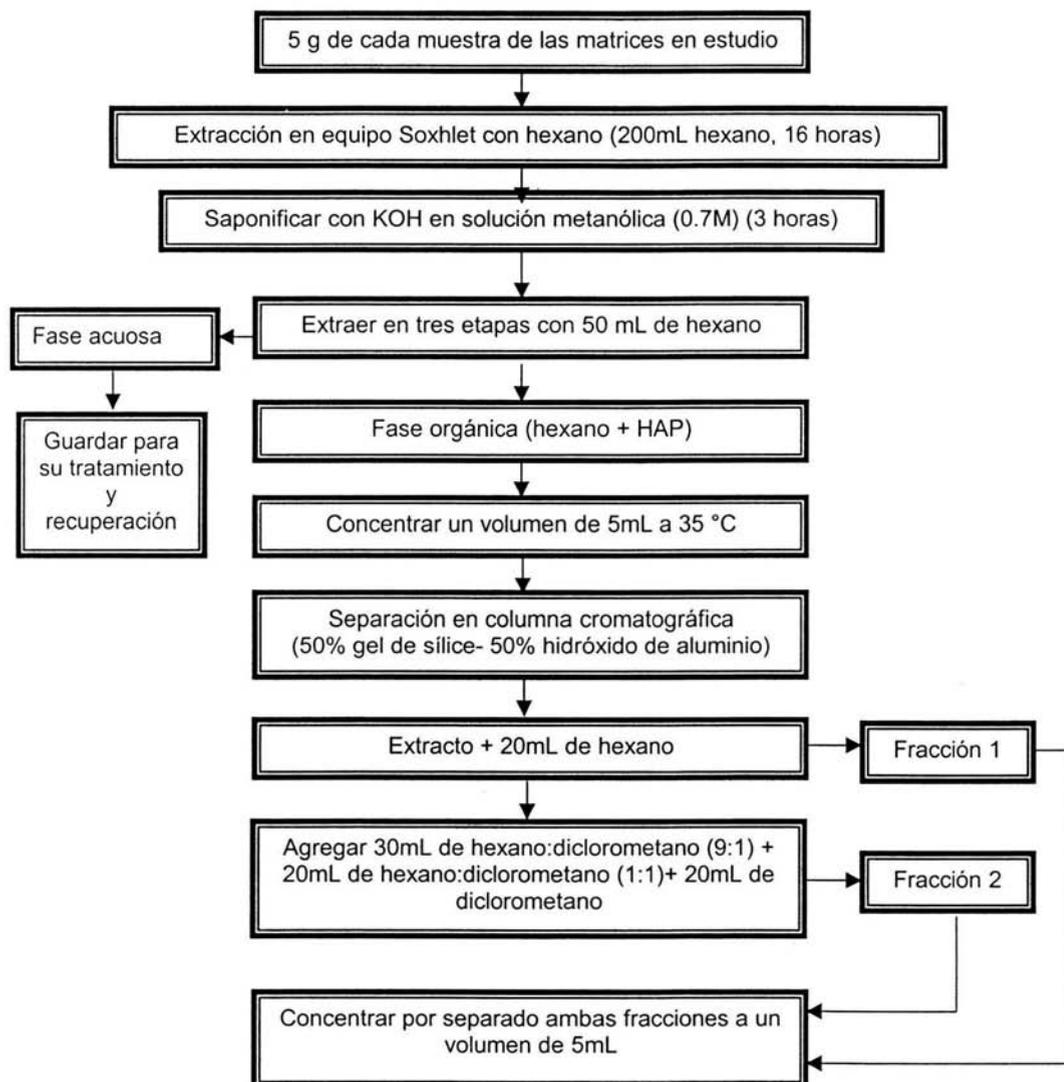


Figura 3.2 Metodología de extracción de HAP (UNEP/IOC/IAEA, 1993)

### 3.7 Determinación de los porcentajes de recobro

#### 3.7.1 Porcentajes de recobro en los adsorbentes

Para determinar el porcentaje de recobro de los compuestos en los adsorbentes, se utilizó una mezcla de tres estándares de concentración conocida (30ppm) la cual se roció sobre el cartucho de celulosa y se siguió el mismo procedimiento de extracción y limpieza; finalmente, se inyectaron 2µL en el CG/EM, para determinar el porcentaje de recobro de cada compuesto.

#### 3.7.2 Porcentajes de recobro en las diferentes matrices

El porcentaje de recobro en las diferentes matrices se realizó contaminando cada una de las diferentes matrices por triplicado con una concentración conocida de una mezcla de los tres estándares, correspondientes a las muestras en estudio; posteriormente, se extrajeron y cuantificaron los HAP mediante la metodología antes citada.

### 3.8 Análisis de varianza

Es una técnica estadística que realiza un análisis simple de varianza para comprobar la hipótesis según la cual dos o más muestras (extraídas de poblaciones con la misma media) son iguales. Esta técnica profundiza en las pruebas para dos medias como, por ejemplo, la Prueba t. Las fórmulas se muestran en el Anexo B (Mendenhall y Sincich, 1997).

Varianza: Medida de la dispersión de los valores alrededor de la media. Se calcula como la suma de cuadrados, SC, de las desviaciones respecto a la media dividida por el número total de observaciones válidas menos 1 (Mendenhall y Sincich, 1997).

Utiliza la fórmula siguiente:

$$\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)} \quad \text{(Ecuación 3-2)}$$

donde:

$n$  = número total de observaciones

$x$  = media de los valores

Para determinar si existía relación entre la concentración de cada compuesto y el proceso de ahumado al que fueron sometidas las muestras se realizó un análisis de varianza para cada compuesto. Comparando por separado los dos tipos de pollos (pollo de la vía pública y pollo del establecimiento) y las dos marcas de mejillones (Geisha® y May Lyly®) y estableciéndose las siguientes hipótesis

$$H_0=[A]=[B]$$

$$H_i=[A] \neq [B]$$

donde:

A = Concentración del compuesto generada por tratamiento de la vía pública

B = Concentración del compuesto generada por el proceso del establecimiento

$$H_0= [A'] = [B']$$

$$H_i= [A'] \neq [B']$$

donde:

A = Concentración del compuesto (mejillones Geisha®)

B = Concentración del compuesto (mejillones May LyLy®)

$$\text{Si } F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}} \Rightarrow \text{Existe diferencia significativa}$$

### 3.9 Tratamiento de residuos

Los residuos generados durante esta investigación como son aceites y grasas se saponificaron y se desecharon en la tarja que lleva el agua residual a la planta de tratamiento de agua residual de la Ciudad Universitaria. Los disolventes se destilaron para rehúso con propósitos que no sean de investigación; finalmente los HAP, adsorbentes de la columna y muestras (pollo y mejillones) se incineran (Anexo E).

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis químico

El análisis químico se realizó con la finalidad de conocer y de caracterizar las muestras de pollo y de mejillones dependiendo de su porcentaje de humedad, proteína cruda y grasa cruda. En cuanto el porcentaje de humedad, fue decisivo para darles un adecuado tratamiento de secado a las muestras (proceso de liofilización), ya que este método sólo es eficiente con un máximo de 5% de humedad. Por otro lado, era necesario conocer el porcentaje de grasa que contenían las muestras para realizar una saponificación adecuada de las muestras y una limpieza posterior a los extractos.

#### 4.1.1 Caracterización química de los pollos ahumados

Los valores obtenidos de estas determinaciones se pueden apreciar en la Tabla 4.1. Estos valores fueron comparados con los reportados en la literatura por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ, 2000). Los resultados muestran que en los dos tipos de pollo, la humedad se redujo hasta en un 50% con respecto a lo reportado en las tablas del INNSZ. Estos resultados se deben al tratamiento térmico (ahumado) que sufrieron las muestras de estudio, ya que el análisis realizado en el Instituto es para muestras crudas. Como consecuencia de este proceso, los sólidos totales se ven aumentados con respecto a los reportados en la literatura como sería el caso de las cenizas, la grasa y la proteína.

**Tabla 4.1 Comparación del análisis químico del pollo**

%	Vía pública		Establecimiento		INNSZ*	
<b>Humedad</b>	34.19 <sup>±0.01</sup>		41.32 <sup>±0.04</sup>		65.90	
<b>Materia seca</b>	65.81 <sup>±0.01</sup>		58.68 <sup>±0.04</sup>		34.41	
	<b>Base húmeda</b>	<b>Base seca</b>	<b>Base húmeda</b>	<b>Base seca</b>	<b>Base húmeda</b>	<b>Base seca</b>
<b>Cenizas</b>	1.02 <sup>±0.07</sup>	1.55 <sup>±0.10</sup>	2.35 <sup>±0.03</sup>	4.01 <sup>±0.05</sup>	0.40	0.62
<b>Grasa</b>	16.86 <sup>±0.10</sup>	20.15 <sup>±0.08</sup>	17.58 <sup>±0.02</sup>	22.65 <sup>±0.03</sup>	15.10	22.91
<b>Proteína</b>	15.81 <sup>±0.04</sup>	26.01 <sup>±0.04</sup>	17.12 <sup>±0.03</sup>	26.95 <sup>±0.08</sup>	15.60	23.67

\*Tablas del valor nutritivo de los alimentos (Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"). Valores reportados en base húmeda y seca

#### 4.1.2 Caracterización química de los mejillones ahumados

Los resultados derivados de las determinaciones realizadas a los mejillones ahumados se aprecian en la Tabla 4.2. Al igual que en las muestras de pollos se realizó una comparación con los valores reportados en la literatura por el INNSZ (2000). En este caso, como en el de las muestras de pollos, se debe tener en consideración que los mejillones ahumados son cotejados con ostiones crudos fuera de su concha donde, de manera similar, se observa que la humedad se redujo en un 46% con respecto al valor reportado por el INNSZ. En cuanto al porcentaje de cenizas, se encontró una similitud a lo reportado en la literatura; sin embargo el porcentaje de proteína y grasa se incrementaron en un 46% y 60% respectivamente, esto se debe, como ya fue comentado con anterioridad a la fuente de comparación.

Tabla 4.2 Comparación del análisis químico en mejillones

%	Geisha®		May Lyly®		INNSZ*	
	Base húmeda	Base seca	Base húmeda	Base seca	Base húmeda	Base seca
<b>Humedad</b>	39.62 <sup>±0.06</sup>		36.16 <sup>±0.08</sup>		81.80	
<b>Materia seca</b>	60.38 <sup>±0.06</sup>		63.84 <sup>±0.08</sup>		18.20	
<b>Cenizas</b>	1.71 <sup>±0.03</sup>	2.84 <sup>±0.06</sup>	1.79 <sup>±0.01</sup>	2.80 <sup>±0.02</sup>	1.60	1.96
<b>Grasa</b>	6.43 <sup>±0.04</sup>	10.68 <sup>±0.07</sup>	8.04 <sup>±0.01</sup>	12.59 <sup>±0.03</sup>	2.30	2.81
<b>Proteína</b>	15.77 <sup>±0.02</sup>	26.12 <sup>±0.32</sup>	19.16 <sup>±0.03</sup>	30.01 <sup>±0.08</sup>	9.40	11.41

\*Tablas del valor nutritivo de los alimentos (Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"). Valores en base húmeda y seca

#### 4.2 Curvas de calibración de los estándares de HAP empleando CG/EM

Debido a que se desconocía el nivel de contaminación de los pollos por este tipo de compuestos, se realizaron tres curvas de calibración de 0.1-1 ppm, 1-10 ppm y 10-100 ppm, con cinco concentraciones diferentes del estándar. Un ejemplo de estas curvas se muestra en la Figura 4.1. La realización de dichas curvas se aprecia en el Anexo C. Dichas curvas se realizaron interpolando el área determinada para cada compuesto contra su concentración en ppm, se observa que las curvas no comienzan en cero, debido a la señal de fondo (ruido) del equipo. También puede verse que todos los estándares presentaron diferentes áreas bajo la curva, observándose buena linealidad entre ellas y un aceptable coeficiente de correlación.

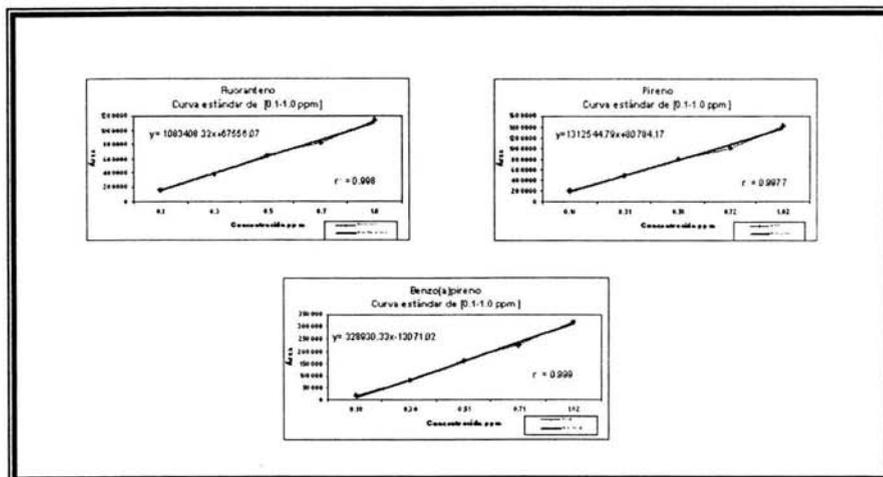


Figura 4.1 Curvas estándar [0.1-1ppm]

#### 4.3 Cromatogramas y espectros de masas de los estándares y de las diferentes muestras

Para este análisis se preparó una mezcla conteniendo a los tres estándares, con el objetivo de evaluar su retención tanto en los adsorbentes de la columna, como en las muestras bajo estudio (pollo y mejillones). En la Figura 4.2 se aprecia el cromatograma correspondiente de los tres estándares en estudio a una concentración de 10ppm, donde se pueden observar tres picos: El primero de ellos presentó un tiempo de retención de 24.17min y corresponde al fluoranteno; el segundo de ellos, pireno, apareció a los 25.21min y, finalmente, el tercer pico corresponde al benzo(a)pireno con un tiempo de retención de 36.44min. Por otra parte, al comparar los cromatogramas obtenidos en las muestras contaminadas, así como en las muestras sin contaminar, se observa que los tiempos de retención de cada compuesto coinciden con el tiempo de retención que se obtuvo en el estándar (Figuras 4.3-4.6). Al comparar sus tiempos de retención se observa que el tiempo que los separa es tan sólo de un minuto; en cambio, el benzo(a)pireno permanece mayor tiempo en la columna debido a su conformación estructural y a un incremento en su "ion molecular" (252 UMA). Los cromatogramas correspondientes para cada uno de los estándares como para cada una de las muestras se aprecian en el Anexo D.

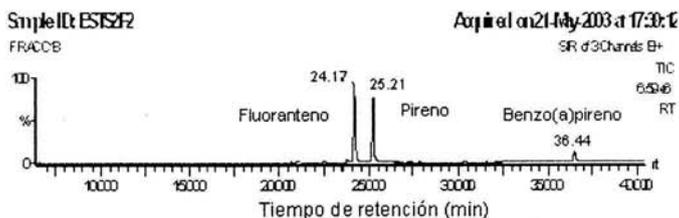


Figura 4.2 Cromatograma de una mezcla de 3 estándares

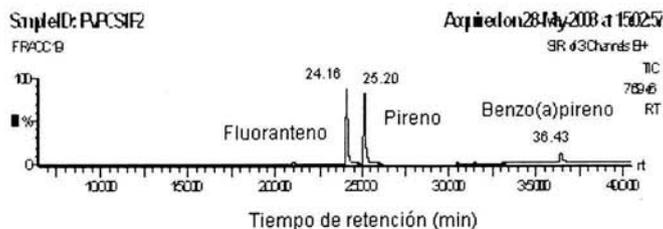


Figura 4.3 Cromatograma de una muestra de pollo "vía pública" contaminada con tres estándares

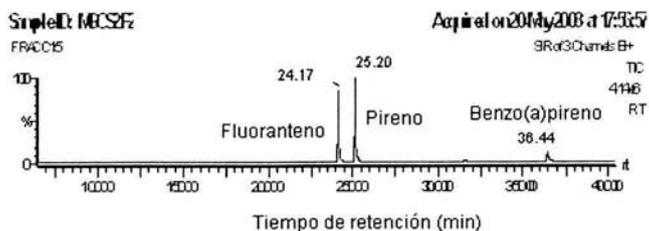


Figura 4.4 Cromatograma de una muestra de mejillones "Geisha" contaminada con tres estándares

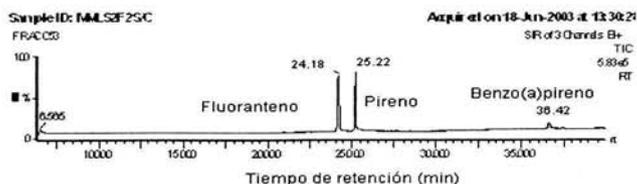


Figura 4.5 Cromatograma de una muestra de mejillones "May Lyly"

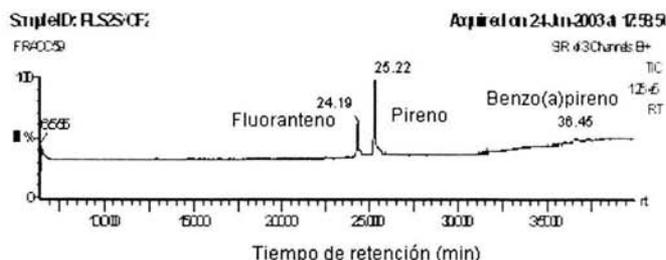


Figura 4.6 Cromatograma de una muestra de pollo "establecimiento"

La comprobación de la presencia de estos compuestos se realizó mediante el detector de masas en el modo selectivo de iones (SSI, SIM, por sus siglas en inglés). Las Figuras 4.7 a la 4.12 muestran los espectros de masas de los compuestos tanto en estándares como en las diferentes muestras. En ellos se puede observar que el fluoranteno y el pireno poseen el mismo ión molecular de 202 UMA y, el benzo(a)pireno, de 252 UMA. Debido al modo de detección que se eligió (SSI) y a que dos compuestos tienen el mismo ion molecular es por lo que los picos se observan a los extremos del espectro; sin embargo, la abundancia relativa comprueba la existencia de cada ion. Los espectros de masas correspondientes para cada uno de los estándares como para cada una de las muestras se aprecian en el Anexo D.

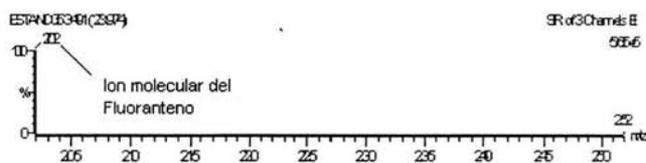


Figura 4.7 Espectro de masas del fluoranteno identificado en la mezcla de estándares

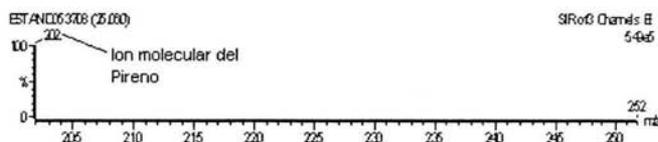


Figura 4.8 Espectro de masas del pireno identificado en la mezcla de estándares

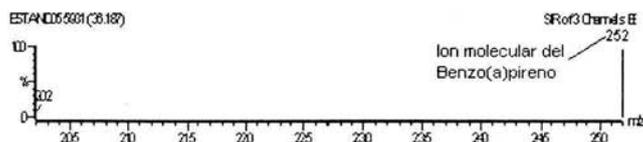


Figura 4.9 Espectro de masas del benzo(a)pireno identificado en la mezcla de estándares

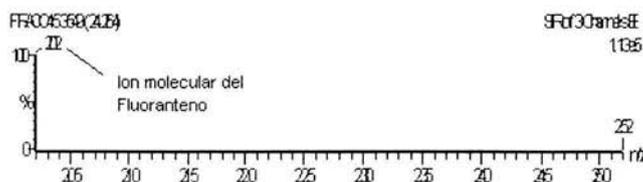


Figura 4.10 Espectro de masas del fluoranteno en una muestra de mejillones "Geisha"

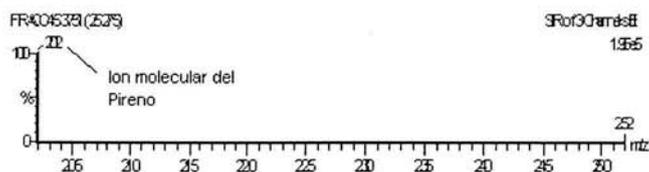


Figura 4.11 Espectro de masas del pireno en una muestra de mejillones "Geisha"

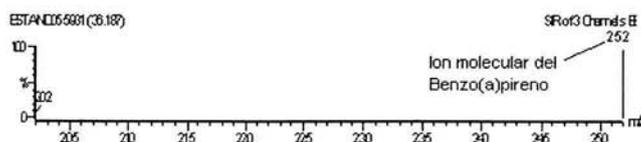


Figura 4.12 Espectro de masas del benzo(a)pireno en una muestra de mejillones "Geisha"

#### 4.4 Evaluación de la recuperación de los HAP en la columna cromatográfica y en las muestras (pollo y mejillones ahumados)

Los porcentajes de recuperación de los tres estándares se aprecian en la Tabla 4.3. La finalidad que persiguió este estudio fue la de evaluar la retención de los compuestos por los adsorbentes empleados en las columnas cromatográficas (gel de sílice e hidróxido de aluminio), así como en

las matrices bajo estudio (pollo "establecimiento y vía pública"; mejillones "Geisha® y May Lyly®"). Para ello, se realizaron por triplicado dos experimento: El primero de ellos consistió en pasar por una columna, un volumen de la mezcla de estándares de concentración conocida eluyéndola conforme a lo descrito en el método 7 del UNEP/IOC/IAEA (1993). De este experimento se obtuvieron los porcentajes de retención de cada estándar en los adsorbentes. El segundo experimento, consistió en contaminar cada una de las diferentes muestras con una concentración conocida de estándares y tratándola conforme a lo descrito en el método 7 del UNEP/IOC/IAEA (1993). Con ello se obtuvieron, tanto los porcentajes de retención en los adsorbentes, como los de recuperación de los HAP en las diferentes muestras (Tablas 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7). Cabe mencionar que la caracterización y cuantificación de los compuestos, se realizó empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En ellas se observa la diferente retención presentada por cada compuesto, ya sea en los adsorbentes como en las diferentes matrices bajo estudio. Esto se debió, en parte, al número de anillos aromáticos que presentan los HAP y a la polaridad de cada uno de ellos, traduciéndose en una mayor o menor retención hacia los adsorbentes. En cuanto al porcentaje de recuperación en los adsorbentes, se tuvo una tendencia a incrementarse conforme se aumentó el número de anillos que conforman a los HAP, lográndose un porcentaje de recuperación para el pireno de 75.94%, del fluoranteno del 80.67%, y del 82.06% del benzo(a)pireno. En el caso del porcentaje de recuperación en las diferentes matrices varió para cada compuesto; observándose que el compuesto cuyo peso molecular fue mayor (benzo(a)pireno) se recuperó en un porcentaje más elevado, a diferencia de los otros dos compuestos (pireno y fluoranteno) bajo estudio; esto se debe al disolvente utilizado para extraer los HAP, ya que cada compuesto, presenta diferente solubilidad. También depende de la afinidad que tenga el analito con la matriz (Grimmer, 1984).

**Tabla 4.3 Estudio de retención de los compuestos por los adsorbentes en la columna**

Compuesto	mg/kg añadidos	mg/kg recuperados	mg/kg retenidos en la columna	% Recuperación	% Retención en la columna
Fluoranteno	30.00	24.20 <sup>±0.01</sup>	5.80 <sup>±0.01</sup>	80.67	19.33
Pireno	30.72	23.33 <sup>±0.24</sup>	7.39 <sup>±0.24</sup>	75.94	24.06
Benzo(a)pireno	30.48	24.62 <sup>±0.20</sup>	5.38 <sup>±0.20</sup>	82.06	17.93

Tabla 4.4 Retención de los HAP en el pollo “vía pública”

Compuesto	mg/kg añadidos	mg/kg recuperados	mg/kg retenidos en el PVP*	% Recuperación	% Retención en el PVP*
Fluoranteno	30.00	25.06 <sup>±0.13</sup>	4.75 <sup>±0.13</sup>	84.18	15.82
Pireno	30.72	24.33 <sup>±0.05</sup>	6.39 <sup>±0.05</sup>	79.20	20.80
Benzo(a)pireno	30.48	26.06 <sup>±0.59</sup>	4.42 <sup>±0.59</sup>	85.50	14.50

\*PVP = pollo vía pública

Tabla 4.5 Retención de los HAP en pollo “establecimiento”

Compuesto	mg/kg añadidos	mg/kg recuperados	mg/kg retenidos en el PE*	% Recuperación	% Retención en el PE*
Fluoranteno	30.00	24.20 <sup>±0.26</sup>	6.28 <sup>±0.26</sup>	79.40	28.08
Pireno	30.72	23.75 <sup>±0.11</sup>	6.97 <sup>±0.11</sup>	77.31	22.69
Benzo(a)pireno	30.48	24.64 <sup>±0.16</sup>	5.85 <sup>±0.16</sup>	80.82	19.18

\*PE = pollo del establecimiento

Tabla 4.6 Retención de los HAP en los mejillones “Geisha<sup>®</sup>”

Compuesto	mg/kg añadidos	mg/kg recuperados	mg/kg retenidos en MG*	% Recuperación	% Retención en MG*
Fluoranteno	30.00	23.77 <sup>±0.01</sup>	6.71 <sup>±0.01</sup>	78.00	22.00
Pireno	30.72	26.86 <sup>±0.72</sup>	3.87 <sup>±0.72</sup>	87.42	12.48
Benzo(a)pireno	30.48	28.97 <sup>±0.03</sup>	1.52 <sup>±0.03</sup>	95.03	4.97

\*MG = Mejillones Geisha<sup>®</sup>

Tabla 4.7 Retención de los HAP en los mejillones "May Lyly<sup>®</sup>"

Compuesto	mg/kg añadidos	mg/kg recuperados	mg/kg retenidos en MML*	% Recuperación	% Retención en MML*
Fluoranteno	30.00	28.66 <sup>±0.03</sup>	1.82 <sup>±0.03</sup>	94.03	5.97
Pireno	30.72	27.88 <sup>±0.02</sup>	2.85 <sup>±0.02</sup>	90.74	9.26
Benzo(a)pireno	30.48	28.72 <sup>±0.33</sup>	1.77 <sup>±0.33</sup>	94.21	5.79

\*MML = Mejillones May Lyly<sup>®</sup>

#### 4.5 Identificación y cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos empleando CG/EM en las diferentes muestras

Cada una de las muestras extraídas por el método UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA,1993) se identificaron mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas en el modo SSI. En la fracción uno, obtenida mediante la elución con 100% de hexano, se logró identificar sólo a dos de los compuestos, fluoranteno y pireno; sin embargo, conforme se incrementó la polaridad de la mezcla de elución (9:1, 1:1 hexano:diclorometano y 100% diclorometano), las concentraciones de los HAP también lo hicieron, de tal forma, que la mayor concentración se obtuvo en la segunda fracción, consiguiéndose obtener los espectros de masas con los iones moleculares característicos de cada compuesto, siendo para el fluoranteno de 202 UMA, para el pireno de 202 UMA y, para el benzo(a)pireno, de 252 UMA. Esto se puede apreciar en las Figuras 4.13 a la 4.16.

La Figura 4.13 corresponde a una muestra de pollo de la vía pública, en la que se presentan tanto el cromatograma como los espectros de masas de cada analito en estudio. Primer espectro corresponde al fluoranteno en donde su ion molecular (202 UMA) tiene una abundancia relativa del 100%, lo mismo sucede para el pireno; en cambio, para el benzo(a)pireno se observa una abundancia relativa del 100% en un valor de m/z de 252 y del 0% de 202.

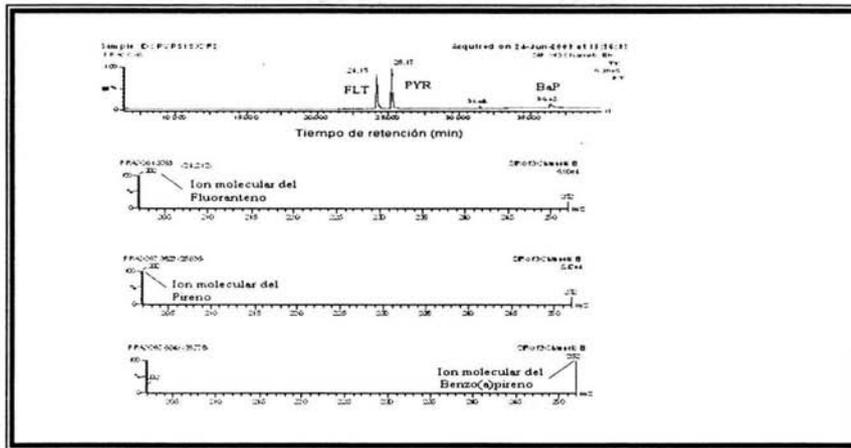


Figura 4.13 Cromatograma y espectros de masas de la muestra de pollo de la "vía pública"

La Figura 4.14 permite apreciar claramente la presencia de fluoranteno y pireno; sin embargo, el benzo(a)pireno no se observa de igual forma, pero se identifica con el espectro de masas que muestra una abundancia del 100% en el pico de 252 correspondiente al ion molecular de este compuesto.

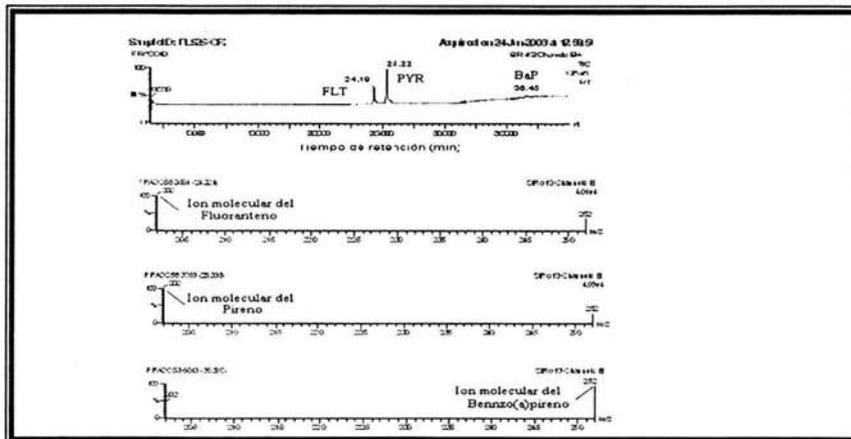


Figura 4.14 Cromatograma y espectros de masas de la muestra de pollo del "establecimiento"

El cromatograma de la Figura 4.15 presentan tres picos definidos que corresponden a los analitos en estudio; esto se comprueba por los tiempos de retención y los espectros de masas obtenidos.

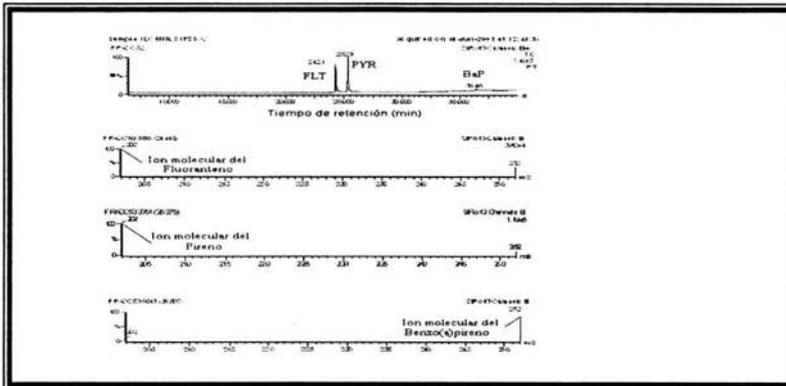


Figura 4.15 Cromatograma y espectros de masas de la muestra de mejillones "Geisha"<sup>®</sup>

En la Figura 4.16, correspondientes a los mejillones May Lyly<sup>®</sup>, se logró identificar al igual que en los mejillones Geisha<sup>®</sup> la presencia de fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno, con ayuda de los tiempos de retención y espectros de masas de cada compuesto.

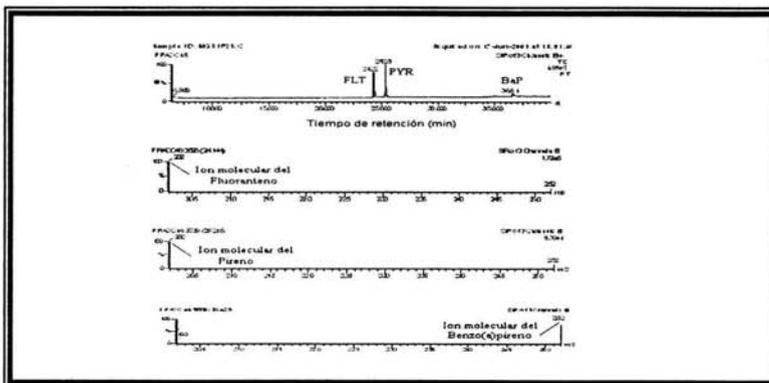


Figura 4.16 Cromatograma y espectros de masas de la muestra de mejillones "May Lyly"<sup>®</sup>

#### 4.6 Cuantificación en las muestras de pollos

En las Tablas 4.8 y 4.9, se muestran las concentraciones obtenidas de cada analito estudiado tanto en el pollo ahumado en la "vía pública" como en el ahumado del "establecimiento". Se aprecia que de los 3 HAP analizados el que presentó una mayor concentración de los tres fue el pollo obtenido de la "vía pública" en comparación al obtenido del pollo del "establecimiento" y a su vez a lo reportado en la literatura donde se ha encontrado desde 0.2 hasta 21mg/kg de benzo(a)pireno en la carne ahumada (SCF, 2002). Los valores obtenidos se deben principalmente al proceso de ahumado y al tiempo de exposición de las muestras, siendo el de combustión sin llama utilizado para el pollo obtenido de la vía pública en un tiempo de 2 horas y media. Adicionalmente, se ahuma 10 min más cuando el consumidor lo adquiere. En cambio, el pollo del establecimiento está sujeto a un proceso de ahumado con humo por fricción y el tiempo es de 2 horas. Cabe aclarar que en el primer procedimiento la muestra está en contacto directo con la fuente calórica ocasionando que los HAP se formen debido a la pirólisis de la grasa que contiene el pollo, además, por la exposición directa de los automóviles de las avenidas en donde se encuentran estos, podría aumentar la concentración de HAP en esta muestra. Por otra parte, el pollo del establecimiento se encuentra relativamente protegido contra los contaminantes del ambiente y su proximidad con la fuente calórica no es directa (Phillips, 1999). Estas concentraciones aparentemente no causarían daños a la salud, pero cabe recordar que se acumulan en la grasa corporal y que después de un periodo prolongado pueden alcanzar concentraciones que causen cáncer, principalmente el benzo(a)pireno. Es por esto que es necesario regular la concentración de dichos compuestos.

**Tabla 4.8 Cuantificación de HAP en la muestra de pollo de la "vía pública"**

Compuesto	Pollo g	Concentración mg/kg	Recobro %	Concentración mg/kg
Fluoranteno	5.0053	4.03 <sup>±0.34</sup>	84.18	4.78 <sup>±0.41</sup>
Pireno	5.0053	4.38 <sup>±0.49</sup>	79.20	5.53 <sup>±0.62</sup>
Benzo(a)pireno	5.0053	0.83 <sup>±0.03</sup>	85.50	0.97 <sup>±0.04</sup>

Tabla 4.9 Cuantificación de HAP en la muestra de pollo del “establecimiento”

Compuesto	Pollo g	Concentración mg/kg	Recobro %	Concentración mg/kg
Fluoranteno	5.0031	1.21 <sup>±0.16</sup>	79.40	1.52 <sup>±0.20</sup>
Pireno	5.0031	1.41 <sup>±0.25</sup>	77.31	1.82 <sup>±0.32</sup>
Benzo(a)pireno	5.0031	0.49 <sup>±0.04</sup>	80.82	0.62 <sup>±0.05</sup>

#### 4.7 Cuantificación en las muestras de mejillones

Los resultados obtenidos en la cuantificación de HAP en mejillones enlatados, se presentan en las Tablas 4.10 y 4.11. Ambas marcas de mejillones ahumados presentaron la misma tendencia. La mayor concentración se obtuvo en el pireno, lo cual indica que efectivamente se sometieron a un proceso de ahumado; sin embargo, al tratarse de marcas comerciales importadas es difícil conocer el proceso de ahumado que siguieron. Respecto a las altas concentraciones de fluoranteno y de benzo(a)pireno obtenidas en los mejillones podrían deberse a tres factores: El proceso de ahumado, la posibilidad de que si hubiera HAP en el ambiente, al tratarse de organismos filtradores del mar, absorberían esa contaminación por HAP reflejada en los niveles de éstos en el mar (Santodonato, 1983) y, finalmente, a que se encuentran inmersos en aceite de semilla de algodón y éste ayuda a retener los HAP por su alta naturaleza lipofílica (Linder, 1995; Moret, 2000).

Los valores encontrados de fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno en la marca Geisha<sup>®</sup> son 4.09<sup>±0.16</sup>, 4.85<sup>±0.09</sup> y 0.41<sup>±0.02</sup>, respectivamente, más altos en comparación con la marca May Lyly<sup>®</sup>. Al no conocer el proceso que se siguió, es posible suponer que a los mejillones Geisha<sup>®</sup> se les añadió algún tipo antioxidante en bajas concentraciones, los cuales se han reportado que a niveles bajos permiten la síntesis de HAP. Por el contrario, si se añaden a elevadas concentraciones pueden actuar como inhibidores de la formación de HAP (Sullivan *et al*, 1983).

Por otra parte, los resultados que se obtuvieron de los dos tipos de marcas sobrepasan los límites permisibles en Alemania, Italia, República Checa y Suiza (1µg/kg BaP máxima) y EEUUA, 0.03µg/kg BaP máxima (Simko, 2002). Cabe recordar que en México no se cuenta con ningún tipo de legislación que regule la presencia de estos compuestos. Estos productos

estarían violando la legislación internacional, lo cual puede ser un factor importante para el desarrollo de cáncer por la exposición a los HAP contenidos en este alimento.

Algunos autores han reportado la presencia de BaP (mg/kg) en algunos alimentos ahumados. Por ejemplo en Alaska, en el año de 1996, se encontraron niveles de 5.3mg/kg para dicho contaminante; en mejillones ahumados procedentes de Noruega se determinaron concentraciones que van de 0.517 a 20.8 mg/kg; mientras que en Inglaterra, en 1976, y en EEUUA, en el 2000, todos los datos encontrados en productos ahumados se encuentran en el orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Kazerouni *et al*, 2001; SCF, 2002).

**Tabla 4.10 Cuantificación de HAP en la muestra de mejillones “Geisha®”**

Compuesto	Mejillón g	Concentración mg/kg	Recobro %	Concentración mg/kg
Fluoranteno	5.0080	3.19 <sup>±0.75</sup>	78.00	4.09 <sup>±0.16</sup>
Pireno	5.0080	4.24 <sup>±0.79</sup>	87.42	4.85 <sup>±0.09</sup>
Benzo(a)pireno	5.0080	0.39 <sup>±0.02</sup>	95.03	0.41 <sup>±0.02</sup>

**Tabla 4.11 Cuantificación de HAP en la muestra de mejillones “May Lyly®”**

Compuesto	Mejillón g	Concentración mg/kg	Recobro %	Concentración mg/kg
Fluoranteno	5.0054	2.52 <sup>±0.75</sup>	94.00	2.69 <sup>±0.79</sup>
Pireno	5.0054	3.69 <sup>±0.31</sup>	90.00	4.10 <sup>±0.34</sup>
Benzo(a)pireno	5.0054	0.30 <sup>±0.03</sup>	94.21	0.32 <sup>±0.05</sup>

## 4.8 Análisis de varianza

### 4.8.1. Análisis de varianza para las muestras de pollo

Los resultados presentados en las Tablas 4.12 a la 4.17 son indicativos del análisis de varianza realizado para las muestras de pollo. Dicho análisis se realizó para conocer si existía alguna diferencia significativa al comparar los dos procesos de ahumado (ahumado realizado en los pollos obtenidos en la vía pública y el ahumado realizado a los pollo obtenidos en el establecimiento), ya que las condiciones del proceso de ahumado variaron una de la otra. En el

caso del pollo obtenido de la vía pública, la generación de humo se realizó a fuego directo, con un tiempo de exposición de 2.5 horas, mientras que para el pollo proveniente del establecimiento, la producción de humo se realizó por fricción con 2 horas de exposición.

**Tabla 4.12 Resultados del análisis de varianza del fluoranteno en las muestras de pollo**

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calculado
Proceso	1	15.75	15.75	152.07
Error	4	0.41	0.10	
Total	5	16.16		

**Tabla 4.13 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el fluoranteno**

Nivel de significancia	F de Tablas		F calculado
0.05	18.51	<	152.07
0.01	98.5	<	152.07

**Tabla 4.14 Resultados del análisis de varianza del pireno en las muestras de pollo**

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calculado
Proceso	1	20.65	20.65	102.24
Error	4	0.81	0.20	
Total	5	21.45		

**Tabla 4.15 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el pireno**

Nivel de significancia	F de Tablas		F calculado
0.05	18.51	<	102.24
0.01	98.5	<	102.24

**Tabla 4.16 Resultados del análisis de varianza del benzo(a)pireno en las muestras de pollo**

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calculado
Proceso	1	0.19	0.19	225.68
Error	4	0.003	0.001	
Total	5	0.20		

**Tabla 4.17 Comparación entre el valor de F tablas y el valor de F calculado para el benzo(a)pireno**

Nivel de significancia	F de Tablas		F calculado
0.05	18.51	<	225.68
0.01	98.5	<	225.68

De los resultados obtenidos de las Tablas 4.12-4.17 se aprecia que  $H_0$  fue rechazada en todos los casos, aceptándose la hipótesis alterna, la cual dice que sí existe una diferencia significativa entre los dos procesos de ahumado. El proceso que siguió el pollo de la vía pública generó una mayor concentración de compuestos cancerígenos con respecto al tratamiento del pollo del establecimiento, de acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras, debido a que el alimento se encuentra en contacto directo y con un mayor tiempo de exposición con la fuente calórica. Además, se pueden considerar otros factores como son el tipo de carne, el tipo de ahumador, el tipo de madera, el tiempo de exposición, etc. Por ello de acuerdo con los datos reportados en la literatura, entre mayor sea el tiempo de exposición y la cercanía de la muestra a la fuente calórica, la generación de HAP aumentará (ECEBaP, 1997; Almaraz, 2001; SCF, 2002)

#### 4.8.2. Análisis de varianza para las muestras de mejillones

Los resultados obtenidos del análisis de varianza son presentados en las Tablas 4.18 - 4.23. Este estudio, se realizó con el objetivo de comparar el proceso de ahumado de las dos marcas de mejillones adquiridas, siendo el proceso de ahumado reservado de cada empresa. Sin embargo, los resultados arrojados por dichas tablas, demostraron que no existe una diferencia

significativa entre las dos marcas de mejillones. Esto indicaría que el proceso de ahumado en ambas industrias es similar tanto en su producción como en el proceso de conservación.

**Tabla 4.18 Resultados del análisis de varianza del fluoranteno en las muestras de mejillones**

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calculado
Proceso	1	2.97	2.97	8.92
Error	4	1.33	0.33	
Total	5	4.30		

**Tabla 4.19 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el fluoranteno**

Nivel de significancia	F tablas		F calculado
0.05	18.51	>	8.92
0.01	98.5	>	8.92

**Tabla 4.20 Resultados del análisis de varianza del pireno en las muestras de mejillones**

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calculado
Proceso	1	0.82	0.82	1.76
Error	4	1.87	0.47	
Total	5	2.69		

**Tabla 4.21 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el pireno**

Nivel de significancia	F de Tablas		F calculado
0.05	18.51	>	1.76
0.01	98.5	>	1.76

**Tabla 4.22 Resultados del análisis de varianza del benzo(a)pireno en las muestras de mejillones**

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calculado
Proceso	1	0.008	0.008	15.61
Error	4	0.002	0.001	
Total	5	0.010		

**Tabla 4.23 Comparación entre el valor de F de tablas y el valor de F calculado para el benzo(a)pireno**

Nivel de significancia	F tablas		F calculado
0.05	18.51	>	15.61
0.01	98.5	>	15.61

El resultado de este análisis demuestra que el tipo de proceso de ahumado que se lleve a cabo sobre un alimento generará una mayor o menor concentración de cada compuesto.

Para resumir, la Tabla 4.24 muestra las concentraciones de los tres HAP estudiados en los cuatro alimentos preparados y los límites aprobados en algunos países de Europa y en los EEUU.

**Tabla 4.24 Concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)**

	Fluoranteno FLT, mg/kg	Pireno PYR, mg/kg	Benzo(a)pireno BaP, mg/kg
Pollo vía pública	4.78 <sup>±0.41</sup>	5.53 <sup>±0.62</sup>	0.97 <sup>±0.04</sup>
Pollo establecimiento	1.52 <sup>±0.20</sup>	1.82 <sup>±0.32</sup>	0.62 <sup>±0.05</sup>
Mejillones Geisha®	4.09 <sup>±0.16</sup>	4.85 <sup>±0.09</sup>	0.41 <sup>±0.02</sup>
Mejillones May Lyly®	2.69 <sup>±0.79</sup>	4.10 <sup>±0.34</sup>	0.32 <sup>±0.05</sup>
Límite en EEUUA			0.00003
Límite en Europa			0.00100

Las concentraciones encontradas en estos alimentos son un reflejo del inadecuado control de calidad que siguen estos productos que se consideran un riesgo para adquirir cáncer gastrointestinal, debido a la acumulación en el tejido adiposo. Por lo que se necesita orientar al productor en cuanto a la elección del proceso de ahumado para generar un alimento satisfactorio en cuanto a características organolépticas, nutricionales, económicas y por supuesto con la menor cantidad de productos dañinos a la salud, por lo que se sugiere incluir dentro de las normas mexicanas límites máximos permisibles de sustancias cancerígenas formadas durante el proceso de ahumado, como es el caso de países como en EEUA, Alemania, Italia, República Checa y Suiza que tienen límites máximos de BaP.

Así como es necesario orientar al productor también es indispensable hacer saber al consumidor los riesgos que tienen los hidrocarburos aromáticos policíclicos en su salud, en caso de alimentos ahumados se recomienda consumir aquellos que se encuentren protegidos de contaminación de gases de escape de los automotores. En cuanto a los alimentos procesados como son salchichas, jamón y alimentos enlatados, se recomienda que no se consuman con mucha frecuencia y no se vuelvan alimentos primordiales de su dieta.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los estudios realizados pueden derivarse las siguientes conclusiones.

### 5.1 Conclusiones

- Mediante el análisis químico se lograron caracterizar las muestras de pollos ahumados provenientes tanto de la vía pública, como del establecimiento, así como las muestras de mejillones comerciales ahumados enlatados, provenientes de 2 centros comerciales del país.
- Para las muestras de pollos se obtuvo una reducción del valor de la humedad en un 50% debido al tratamiento térmico seguido (ahumado) y, por consiguiente, el incremento en los sólidos totales, como es el caso de los porcentajes de ceniza que aumentaron en un 40%, grasa en un 10% y proteína en un 4% esto al compararse en base húmeda. Los porcentajes obtenidos de ceniza, grasa y proteína en base seca son similares lo reportado por el INNSZ (2000). Para el caso de los mejillones, la humedad se redujo en un 46% sin afectarse el porcentaje de cenizas, sin embargo, el porcentaje de proteína aumentó el doble y, el porcentaje de grasa se incrementó en más de un 50% a lo reportado por el INNSZ, debido a que este instituto reporta valores sobre productos en fresco (alimentos crudos), por lo que en este caso la fuente de comparación fue el pollo entero y los ostiones fuera de su concha, debido a que no existen reportes sobre mejillones. Además, el alto porcentaje de grasa obtenido (60%) en los mejillones se debió fundamentalmente a que estos moluscos se encontraban inmersos en aceite de semilla de algodón.
- Con el porcentaje de grasa obtenido en el análisis químico fue posible realizar las modificaciones adecuadas al método UNEP-7 (1993) para extraer adecuadamente los HAP. Tales modificaciones fueron el tiempo de extracción y la saponificación.
- Con la ayuda de las curvas de calibración, se logró determinar el tiempo de retención de cada uno de los compuestos en estudio. Se observó, que los iones moleculares cuyos pesos moleculares son menores presentaron una menor retención en la fase estacionaria, como son el fluoranteno cuyo tiempo de retención ( $t_r$ ) fue de 24.04 min y el

pireno cuyo  $t_r$  fue de 25.07 min; cabe mencionar que el peso molecular para ambos analitos es de 202 g/mol. Por otro lado, el benzo(a)pireno cuyo peso molecular es de 252 g/mol y que presenta una conformación estructural distinta a los compuestos anteriores, hace que se presente una mayor permanencia en la columna y, por ende, un mayor tiempo de retención, de 36.20min.

- El método UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA,1993) fue el empleado para la extracción de los HAP, sin embargo se realizaron algunas modificaciones para hacer más eficiente la remoción, como fueron el tiempo de extracción y la saponificación en equipo Soxhlet.
- Por medio de la técnica de CG/MS, fue posible evaluar el grado de recuperación de los HAP en las diferentes muestras, obteniéndose un porcentaje de recobro diferente para cada compuesto en cada una de las matrices. Se obtuvieron los siguientes porcentajes: Pollo proveniente de la vía pública tuvo un porcentaje de recuperación para el fluoranteno del 84.18%, para el pireno de 79.20% y para el benzo(a)pireno del 85.50%. Para el caso del pollo obtenido del establecimiento, los resultados fueron de 79.40% de fluoranteno, de 77.31% de pireno y de 80.82% de benzo(a)pireno. En cuanto a la marca de mejillones Geisha<sup>®</sup> los valores fueron de 78.00% de fluoranteno, de 87.42% de pireno y de 95.03% de benzo(a)pireno. Por último, para la marca May Lyly<sup>®</sup> se obtuvieron porcentajes del 94.03% de fluoranteno, de 90.74% de pireno y de 94.21% de benzo(a)pireno. Esto indica que en las muestras que contenían aceite de algodón el recobro fue mejor que en las que tenían el producto derivado del pollo (con su propia grasa), siendo menor el del pollo del establecimiento dado que, el aceite por su alta naturaleza lipofílica ayuda a retener mejor a los HAP.
- El porcentaje de recuperación mayor obtenido de los alimentos analizados, resultó ser para el benzo(a)pireno. Esto puede ser posible gracias a que los compuestos que presentan un peso molecular menor, interactúan con los componentes de la matriz en estudio, quedando fuertemente retenidos. Por otro lado, los compuestos que presentan un peso molecular mayor, interactúan en una menor forma, lográndose un porcentaje de recuperación mayor.

- De la misma forma, empleando espectrometría de masas, fue posible identificar a los hidrocarburos aromáticos policíclicos de tres a cinco anillos (fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno), los cuales son derivados representativos del proceso de combustión de la pirólisis de la madera.
- El haber encontrado pireno en los productos analizados, es indicativo de que las muestras efectivamente fueron sometidas a un proceso de ahumado, ya que este compuesto se genera a partir de la pirólisis de la madera y la presencia, tanto de fluoranteno como de benzo(a)pireno sugieren que la temperatura se elevó alrededor de 400°C.
- Las concentraciones en que se encontraron los tres compuestos en estudio para cada una de las muestras fueron: Para el pollo obtenido de la vía pública, se obtuvo una concentración de fluoranteno de  $4.78^{\pm 0.41}$  mg/kg, para el pireno de  $5.53^{\pm 0.62}$  mg/kg y para el benzo(a)pireno de  $0.97^{\pm 0.04}$  mg/kg. Mientras que para el pollo del establecimiento, las concentraciones obtenidas fueron de  $1.52^{\pm 0.20}$  mg/kg de fluoranteno, de  $1.82^{\pm 0.32}$  mg/kg de pireno y de  $0.62^{\pm 0.05}$  mg/kg de benzo(a)pireno. Para la marca de mejillones Geisha® los resultados fueron de  $4.09^{\pm 0.16}$  mg/kg de fluoranteno, de  $4.85^{\pm 0.09}$  mg/kg de pireno y de  $0.41^{\pm 0.02}$  mg/kg de benzo(a)pireno. Finalmente, en los mejillones May-Lyly® la concentración de fluoranteno fue de  $2.69^{\pm 0.79}$  mg/kg, la de pireno de  $4.10^{\pm 0.34}$  mg/kg y para el bezo(a)pireno de  $0.32^{\pm 0.05}$  mg/kg. Dichos valores resultaron elevados, lo que podía deberse en parte, al proceso de ahumado así como a la contaminación ambiental a la que se encuentran expuestas. Debido a los resultados obtenidos, es recomendable realizar evaluaciones continuas sobre estos productos alimenticios, ya que de lo contrario, se puede presentar un problema de salud para los consumidores.
- Las concentraciones obtenidas de benzo(a)pireno, no se comparan con los datos reportados en la literatura, debido a que existe un amplio intervalo de valores que van desde 0.15ppb hasta 20.8ppm. En Noruega en 1996 se encontraron 5.3 mg/kg de BaP en pescado ahumado, mientras que en 2002, EEUUA sólo reportó 150 µg/kg en carne rostizada (ECEBaP, 1997; Vives y Grimalt, 2002). La variabilidad de estos reportes se debe, tanto a la especie a cocinar, como a los diferentes procedimientos usados para

ahumar, los cuales engloban tanto el tipo y la composición de la madera, el tipo de generador (interior o externo), la accesibilidad de oxígeno, la temperatura de generación de humo y el tiempo de ahumado, entre otros factores.

- El análisis de varianza realizado para comparar las concentraciones de los compuestos en las muestra alimenticias bajo estudio, fueron indicativos del procedimiento de ahumado a seguir, ya que en base a estos, la concentración de los compuestos puede aumentar o disminuir. En el caso de los mejillones, al tratarse de alimentos industrializados y suponiendo que siguen las mismas normas de calidad, el proceso de ahumado tuvo que ser similar ya que no existió diferencia significativa.
- El estudio realizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, resultó ser una excelente técnica para evaluar el rendimiento de la extracción. También fue una herramienta muy útil en la identificación y cuantificación selectiva de cada uno de los compuestos en estudio.

## 5.2 Recomendaciones

Las siguientes recomendaciones planteadas están cimentadas en los resultados obtenidos en esta investigación.

- Las normas NMX-F505-1993-SCF1, NMX-F-481-SCF1-2001 y NMX-FF-080-1992, no establecen límites máximos permisibles de HAP en productos ahumados, por lo que se recomienda tener un especial cuidado en el consumo elevado de alimentos sometidos a este proceso, mientras no se evalúen las repercusiones toxicológicas a corto, mediano y largo plazo por los HAP en las concentraciones presentes en los alimentos comerciales.
- Se sugiere proponer una norma que establezca los límites máximos permisibles de estos compuestos en este tipo de alimentos.

**ANEXO A****Fundamentos de los métodos empleados****Determinación del contenido de humedad (AOAC, 1990; Aragón, 1991; Pearson, 1990)**

La determinación de humedad se basa en la pérdida de peso por temperatura. Para dicho fin se colocan aproximadamente dos gramos de la muestra húmeda (por triplicado) en pesafiltros con la tapa previamente pesada, después de ponerlos a peso constante. La muestra se seca por un lapso de 1 hora en una estufa a 130°C con la tapa del pesafiltro a un lado. Posteriormente, se retira el pesafiltro de la estufa y se deja enfriar en desecador, para pesarlo una vez que se equilibra con la temperatura del ambiente.

El porcentaje de humedad se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{A - B \times 100}{M}$$

donde:

**A** = peso del pesafiltro más muestra

**B** = peso del pesafiltro más muestra después de secar a la estufa

**M** = peso de la muestra en gramos

**Determinación del contenido de cenizas (AOAC, 1990; Aragón, 1991; Pearson, 1990)**

Las cenizas son el residuo inorgánico de la incineración de la muestra. Para conseguir este residuo, se colocan aproximadamente de 3 a 4 g de muestra (por triplicado) en crisoles previamente pesados y previamente puestos a peso constante. La muestra se calcina a 550°C hasta obtener cenizas de color homogéneo.

El porcentaje de cenizas se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{A - B \times 100}{M}$$

donde:

**A** = peso del crisol con cenizas

**B** = peso del crisol

**M** = peso de la muestra en gramos

### Determinación de grasa cruda (Aragón, 1991; Pearson, 1990)

La grasa cruda es el material lipídico que se recupera mediante el empleo del disolvente adecuado. Para esto se pesan 4g de muestra (por triplicado) que se introduce en un cartucho, el cual se coloca en un sistema Soxhlet, utilizando 100 mL de éter de petróleo y se mantiene a reflujo durante 3 horas. La grasa recuperada se deposita en el matraz bola previamente pesado. La grasa cruda se calcula como sigue:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{A - B \times 100}{M}$$

donde:

A = peso del matraz con grasa

B = peso del matraz con perlas de vidrio vacío

M = peso de la muestra en gramos

### Determinación de proteína cruda

La proteína cruda se recupera mediante la digestión ácida para reducir el nitrógeno orgánico a amoníaco. Para esta finalidad, se pesan de 30 a 100mg de muestra, las cuales se digieren durante una hora y media, con 40mg de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y con 0.5g de sulfato de sodio anhidrido con 3mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (por triplicado). Posteriormente, la muestra se coloca en un destilador micro-Kjeldahl y se agrega 20mL de NaOH al 60%, recuperándose 100mL del destilado con 50 mL de ácido bórico. Finalmente, la muestra se valora con HCl 0.01N.

Los cálculos se realizan mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{[(A - B) (N) (0.014 \text{ meq}_N) (F = 6.25)] \times 100}{M}$$

donde:

A = Volumen blanco

B = Volumen muestra

N = Normalidad NaOH

M = Peso de la muestra en gramos

**TÉCNICA DE EXTRACCIÓN PARA HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO EN SEDIMENTOS MARINOS, Método UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA, 1993)**

FUENTE: UNEP/IOC/IAEA (1993). DETERMINATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN SEDIMENTS, REFERENCE METHOD No.20. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM (UNEP)

1. Secar el sedimento húmedo a temperatura de 40-50°C; macerarlo en mortero de porcelana y tamizarlo a través de una malla de 250 µm.
2. Tomar una submuestra del sedimento tamizado de 5g en base peso seco para realizar la extracción.
3. EXTRACCIÓN: Colocar la alícuota de 5g en equipo Soxhlet, utilizando un disco de papel filtro Whatman No. 2, previamente lavado. Agregar 250mL de una mezcla de hexano:diclorometano (50:50) al matraz de bola de 500mL. Extraer durante 8h con ciclos de sifón de 10min.
4. Concentrar el extracto proveniente de la etapa anterior en un rotoevaporador al vacío hasta obtener un volumen de 5-10mL. La temperatura del baño de agua no debe exceder de 40°C y la presión de la bomba de vacío debe estar en 18.75 kPa (40psi).

NOTA: Si queda mucho sedimento en el balón de 500mL entonces se centrifuga a 2500rpm durante 5min y se trasvasa a un matraz de balón de 50mL, se rotoevapora hasta 2-5mL.

5. COLUMNAS PARA SEPARACIÓN: Se utilizan columnas de vidrio de 2cm de diámetro interno x 30cm de longitud. Se empaacan en el siguiente orden: fibra de vidrio + hexano + 4g de gel de sílice (en hexano) + 4g de alúmina (en hexano) + sulfato de sodio anhidro + hexano. Nunca dejar secar la columna. La sílice y la alúmina se activan a 200°C durante 4h y se desactivan al 5% p/p con agua tridestilada. Se añade la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur, se dan varios enjuagues al matraz de balón (3-5 con hexano), se agregan 20 mL de hexano para obtener la fracción 1 (hidrocarburos alifáticos)

- colectándolos en un matraz de balón de 50 mL. La fracción 2 (hidrocarburos aromáticos policíclicos) se obtienen eluyendo con 30 mL de hexano:diclorometano (9:1).
6. Concentrar las dos fracciones en un rotoevaporador al vacío hasta un volumen de 2-5 mL. Trasvasar a viales, utilizando nitrógeno para llevar a sequedad en los viales. Se dan 9-4 enjuagues en los matraces de balón que contenían las fracciones 1 y 2 con sus respectivos disolventes.
  7. Analizar por cromatografía de gases capilar de alta resolución.

## ANEXO B

### Fórmulas para realizar el análisis de varianza

#### Análisis de varianza (Montgomery, 1991)

El análisis de varianza es una técnica estadística que, con base al principio de t de Student, permite estudiar si existe diferencia significativa entre la media de las calificaciones asignadas a más de dos muestras. A continuación se desglosa los pasos requeridos para el análisis de varianza:

Factor de corrección (FC): se calcula cuadrando el gran total y dividiéndolo por el número total de respuestas.

Suma de cuadrados para tratamientos (SCT): se calcula sumando el cuadrado del total de las calificaciones de cada muestra, dividido por el número de juicios para cada muestra.

Grados de libertad para tratamientos (glt): se calculan restando uno del número de muestras.

Suma de cuadrados Total (SCT): se calcula sumando el cuadrado de cada calificación y restando el factor de corrección.

Grados de libertad total (glt): se calculan restando uno del número total de respuestas.

Suma de cuadrados del error (SCE): se calcula restando la suma de cuadrados total menos la suma de cuadrados de tratamientos.

Grados de libertad del error (gle): se calculan restando los grados de libertad totales menos los grados de libertad de los tratamientos.

Cuadrados medios (CM muestras): se calculan para cada fuente de variación y para el error, dividiendo respectivamente la suma de cuadrados por sus grados de libertad correspondientes.

Relación de variación por muestras ( $F_0$ ): se calcula dividiendo el cuadrado medio de las muestras por el cuadrado medio del error.

Después, con los valores calculados de la relación de variación (Fisher), se comparan con los valores de las tablas: Valores críticos para Fisher. Si los valores calculados son mayores que los de tablas, se establecerá que existe diferencia significativa al 5%, 1% o al 0.1%, según corresponda. Los valores de tablas adecuados se localizan por los grados de libertad.

#### Análisis de varianza para el modelo de efectos fijos unifactorial

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	Fo
Entre tratamientos	$a^*-1$	$SC_{\text{Tratamientos}}$	$MC_{\text{Tratamientos}}$	$Fo = (MC_{\text{tratamientos}}) / MC_E$
Error	$gI - gIt$	$SC_E$	$MC_E$	
Total	$GIT - 1$	$SC_T$		

\* a, es el número de muestras totales

## ANEXO C

Datos para obtener las curvas de calibración de los tres hidrocarburos aromáticos policíclicos

Curvas de calibración y parámetros empleados en CG/Masas

Tabla C.1 Condiciones óptimas del cromatógrafo de gases

Temperatura inicial del horno(°C)	Tiempo (min)	Velocidad (°C/ min)
90	1.0	8
180	0.0	5
245	0.0	4
300	7.0	----

Tabla C.2 Condiciones de operación para el detector de masas

Emisión	500
Temperatura de la fuente	200°C
Temperatura de la interfase	250°C
Presión de análisis	73.73 kPa (-4 psi)
Velocidad de lectura	4 ciclos/ s
Modo	SIM
Tiempo de análisis	46 min

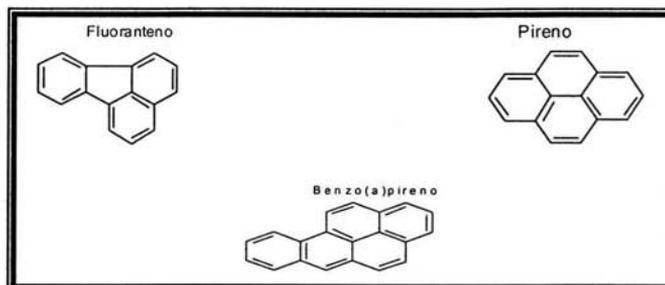


Figura C.1 Estructuras de los 3 HAP en estudio

Tabla C.3 Iones moleculares y tiempos de retención de los 3 HAP bajo estudio

Compuesto	Ion molecular (UMA)	Tiempo de retención (tr) (min)
Fluoranteno	202	24.049
Pireno	202	25.074
Benzo(a)pireno	252	36.248

Curvas de calibración para los 3 HAP estudiados

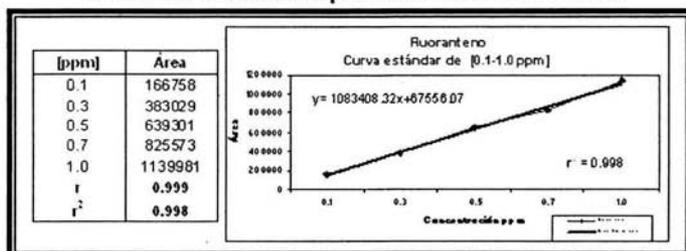


Figura C.2 Curva de calibración del fluoranteno [0.1 -1.0 ppm]

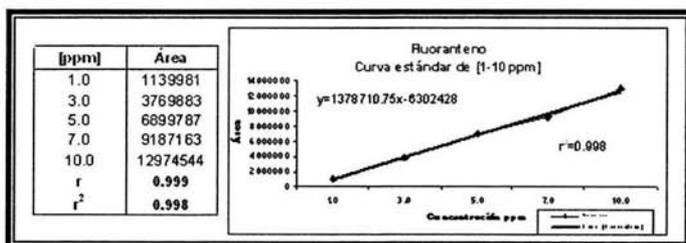


Figura C.3 Curva de calibración del fluoranteno [1.0 -10 ppm]

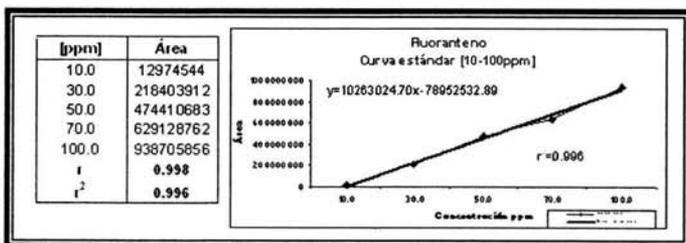


Figura C.4 Curva de calibración del fluoranteno [10 -100 ppm]

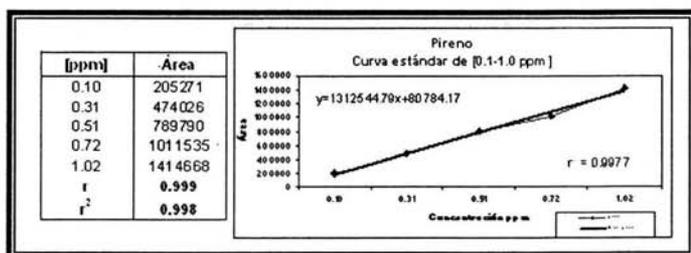


Figura C.5 Curva de calibración del pireno [0.1 -1.0 ppm]

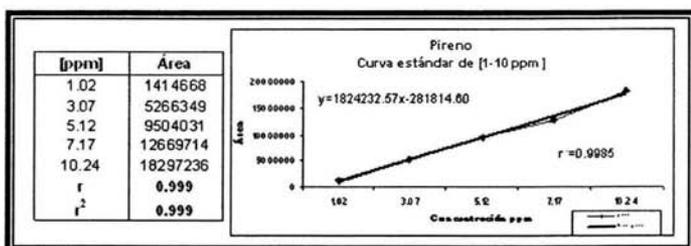


Figura C.6 Curva de calibración del pireno [1.0 -10 ppm]

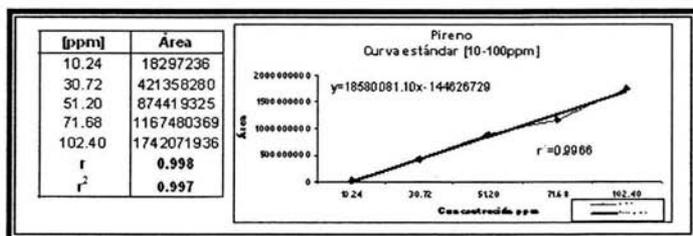


Figura C.7 Curva de calibración del pireno [10 -100 ppm]

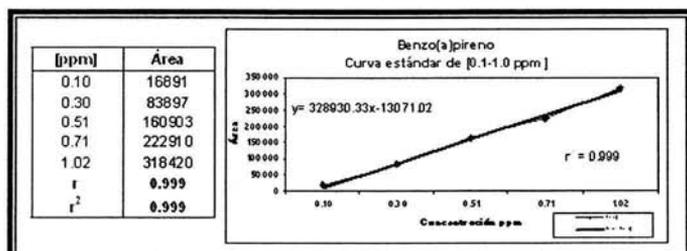


Figura C.8 Curva de calibración del benzo(a)pireno [0.1 -1.0 ppm]

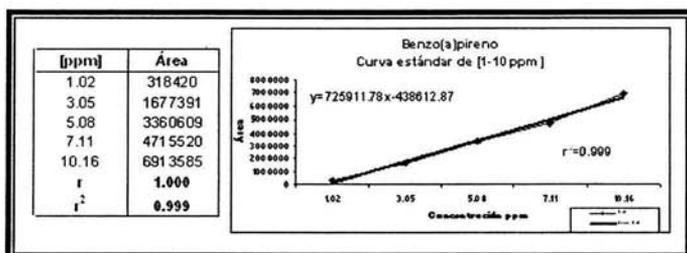


Figura C.9 Curva de calibración del benzo(a)pireno [1.0 -10 ppm]

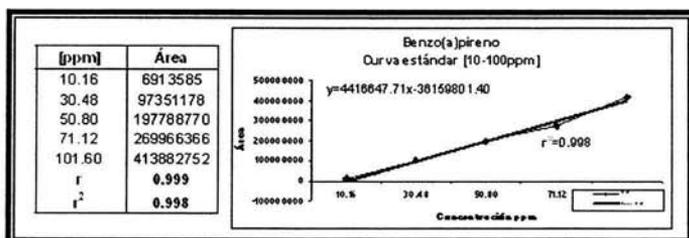


Figura C.10 Curva de calibración del benzo(a)pireno [10 -100 ppm]

Nota: Las curvas no parten de cero debido a la señal de fondo que emite el equipo

## ANEXO D

## Cromatogramas y espectros de masas determinados en los estándares y en las muestras

## Cromatogramas de los estándares obtenidos a diferentes concentraciones

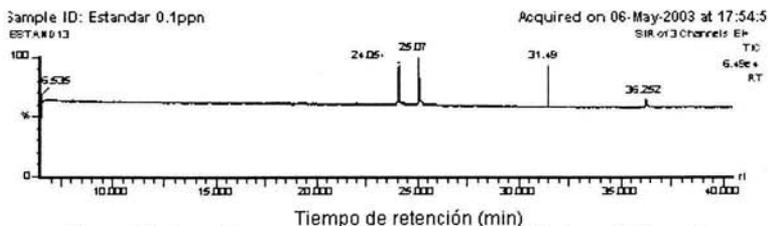


Figura D.1 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [0.1 ppm]

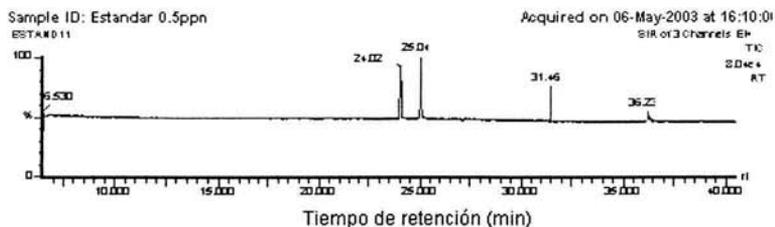


Figura D.2 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [0.5 ppm]

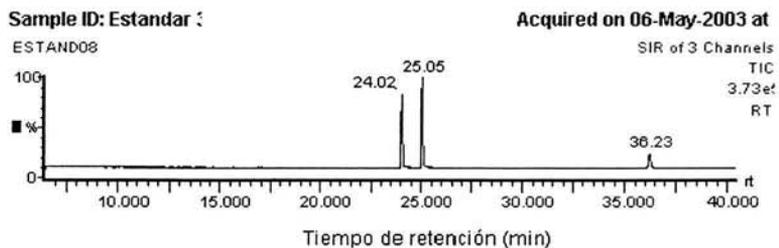


Figura D.3 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [1 ppm]

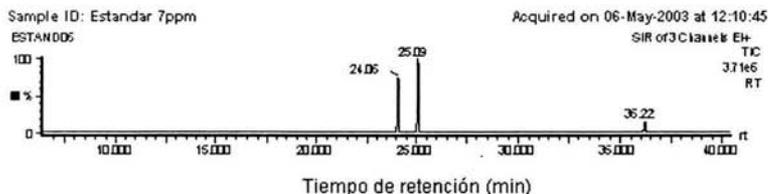


Figura D.4 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [5 ppm]

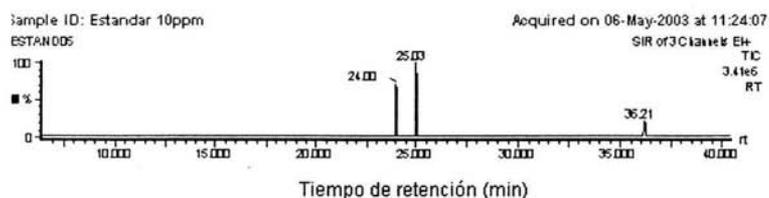


Figura D.5 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [10 ppm]

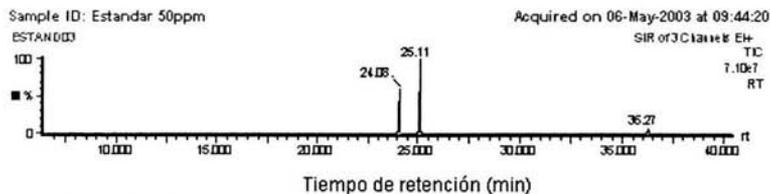


Figura D.6 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [50 ppm]

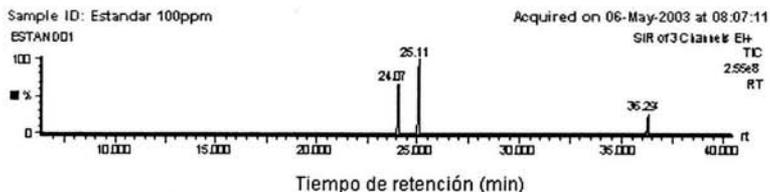


Figura D.7 Cromatograma de una mezcla de tres estándares [100 ppm]

## Cromatogramas de las muestras contaminadas fracciones uno y dos

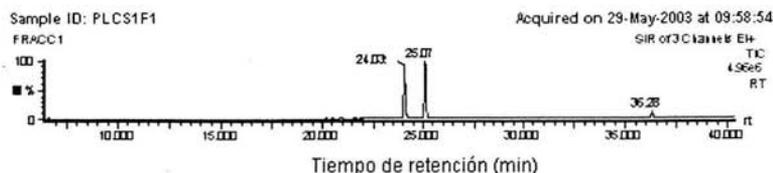


Figura D.8 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de pollo "establecimiento" contaminada con una mezcla de tres estándares



Figura D.9 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de pollo "establecimiento" contaminada con una mezcla de tres estándares

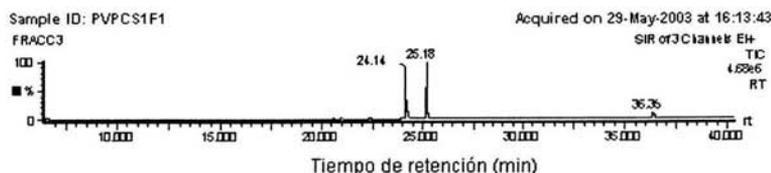


Figura D.10 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de pollo "vía pública" contaminada con una mezcla de tres estándares



Figura D.11 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de pollo "vía pública" contaminada con una mezcla de tres estándares

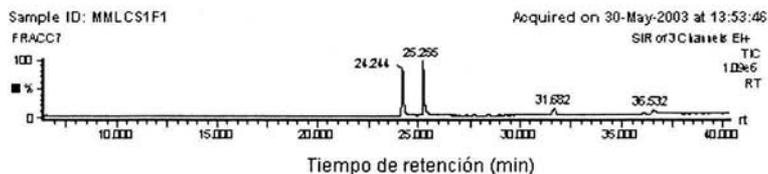


Figura D.12 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de mejillones "May Lyly" contaminada con una mezcla de tres estándares



Figura D.13 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de mejillones "May Lyly" contaminada con una mezcla de tres estándares

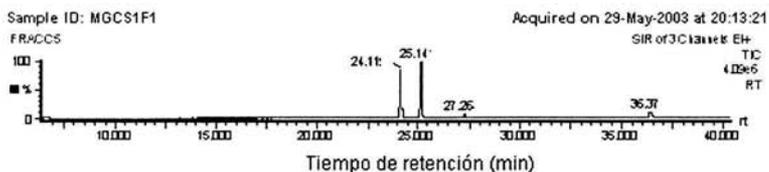


Figura D.14 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de mejillones "Geisha" contaminada con una mezcla de tres estándares



Figura D.15 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de mejillones "Geisha" contaminada con una mezcla de tres estándares

## Cromatogramas de las muestras bajo estudio

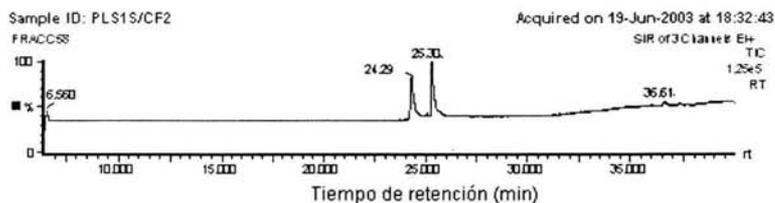


Figura D.16 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de pollo "establecimiento"

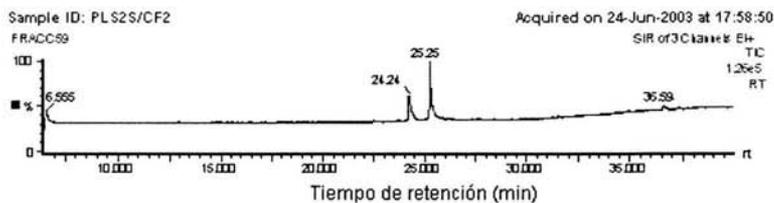


Figura D.17 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de pollo "establecimiento"

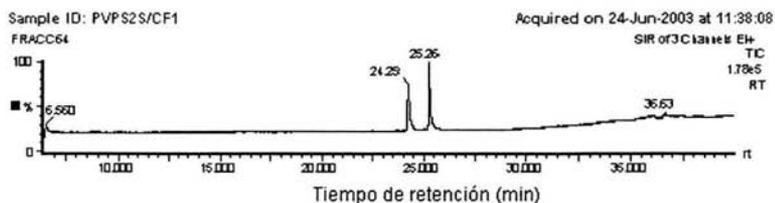


Figura D.18 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de pollo "vía pública"

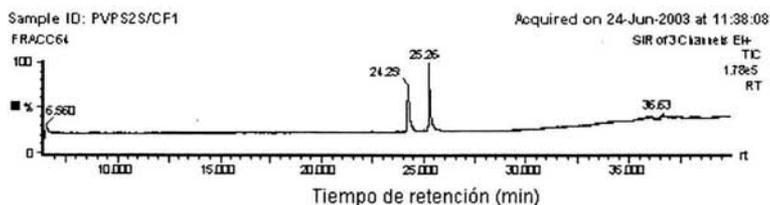


Figura D.19 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de pollo "vía pública"

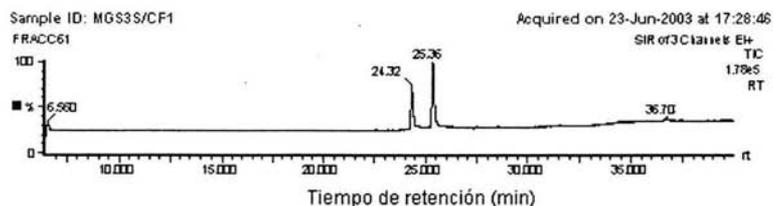


Figura D.20 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de mejillones "Geisha"

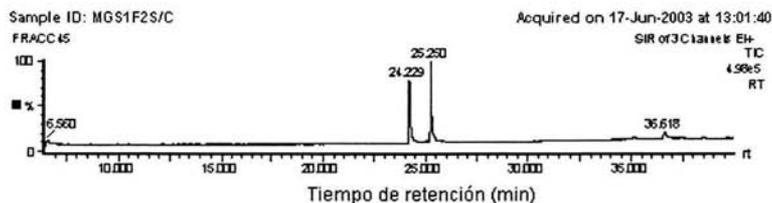


Figura D.21 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de mejillones "Geisha"

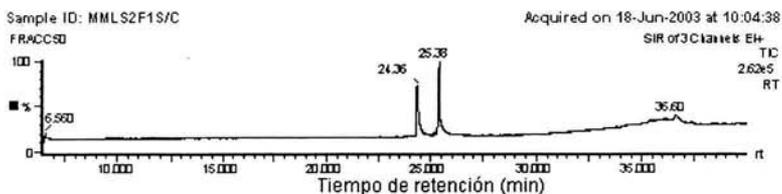


Figura D.22 Cromatograma de la fracción uno de la muestra de mejillones "May Lyly"<sup>®</sup>

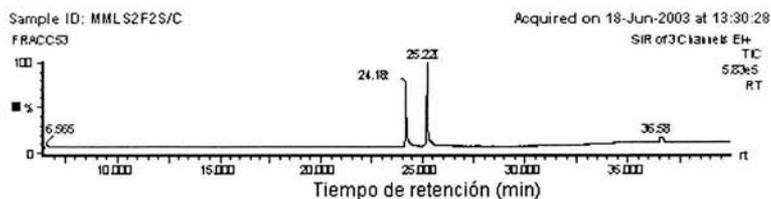


Figura D.23 Cromatograma de la fracción dos de la muestra de mejillones "May Lyly"<sup>®</sup>

### Espectros de masas obtenidos por el modo SMSI (SIM, en inglés)

#### Espectro de masas de los estándares

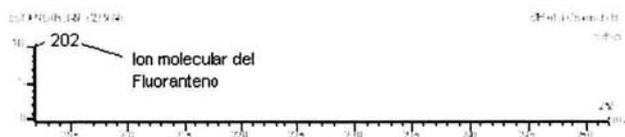


Figura D.24 Espectro de masas del estándar del fluoranteno [10 ppm]

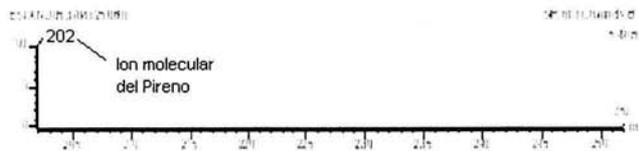


Figura D.25 Espectro de masas del estándar del pireno [10 ppm]

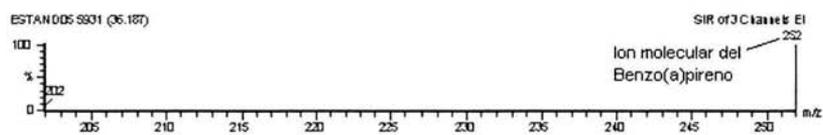


Figura D.26 Espectro de masas del estándar del benzo(a)pireno [10 ppm]

### Espectros de masas de las muestras contaminadas

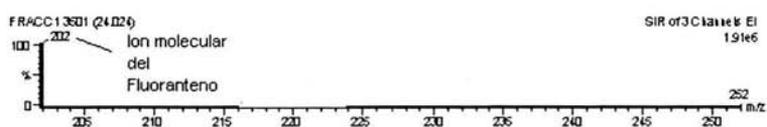


Figura D.27 Espectro de masas del fluoranteno de la fracción uno del pollo "establecimiento" contaminado con una mezcla de tres estándares

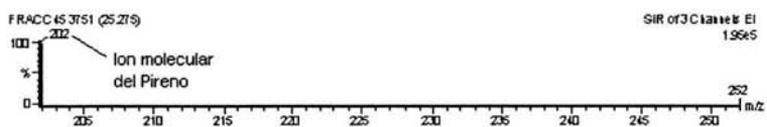


Figura D.28 Espectro de masas del pireno de la fracción uno del pollo obtenido del "establecimiento" contaminado con una mezcla de tres estándares

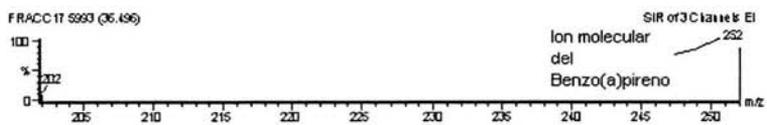


Figura D.29 Espectro de masas del benzo(a)pireno de la fracción uno del pollo "establecimiento" contaminado con una mezcla de tres estándares

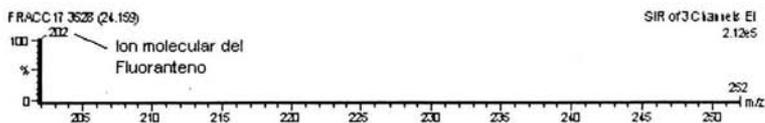


Figura D.30 Espectro de masas del fluoranteno de la fracción dos del pollo "establecimiento" contaminado con una mezcla de tres estándares

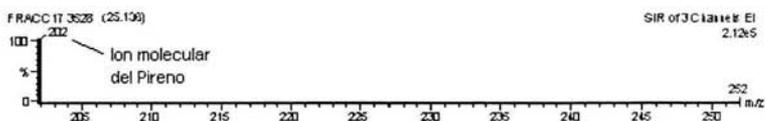


Figura D.31 Espectro de masas del pireno de la fracción dos del pollo "establecimiento" contaminado con una mezcla de tres estándares

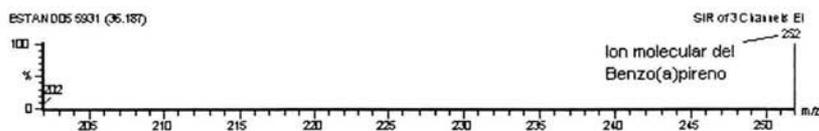


Figura D.32 Espectro de masas del benzo(a)pireno de la fracción dos del pollo "establecimiento" contaminado con una mezcla de tres estándares

### Espectros de masas de la muestra bajo estudio

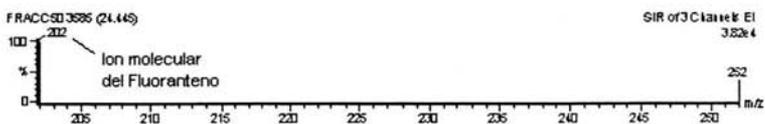


Figura D.33 Espectro de masas del fluoranteno de la fracción uno de los mejillones "May Lyly"

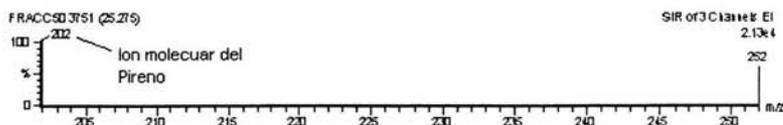


Figura D.34 Espectro de masas del pireno de la fracción uno de los mejillones "May Lyly"

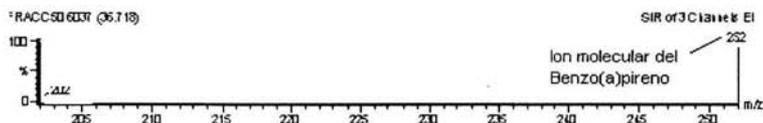


Figura D.35 Espectro de masas del benzo(a)pireno de la fracción uno de los mejillones "May Lyly<sup>®</sup>"

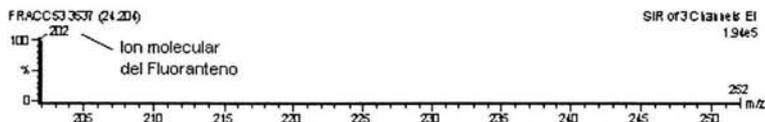


Figura D.36 Espectro de masas del fluoranteno de la fracción dos de los mejillones "May Lyly<sup>®</sup>"

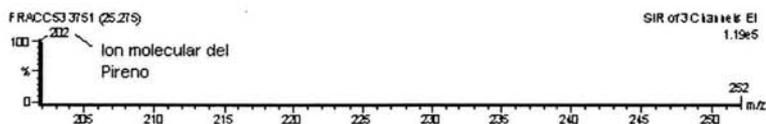


Figura D.37 Espectro de masas del pireno de la fracción dos de los mejillones "May Lyly<sup>®</sup>"

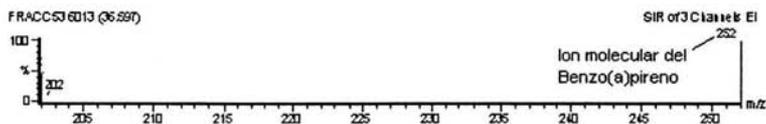


Figura D.38 Espectro de masas del benzo(a)pireno de la fracción dos de los mejillones "May Lyly<sup>®</sup>"

## ANEXO E

### Tratamiento de residuos (CCPHSDCL, 1995; Sax, 1989)

Los métodos comúnmente usados para recuperación o tratamientos de los residuos generados en los laboratorios de investigación son los siguientes:

Destilación simple, el proceso se lleva a cabo por medio de una sola etapa tomando en cuenta para separar disolventes una diferencia en sus puntos de ebullición  $\geq 80^{\circ}\text{D}$ , es decir, que se evapora el líquido de punto de ebullición más bajo (mayor presión de vapor) y se condensa por medio de un refrigerante.

La destilación fraccionada, es útil para la separación de disolventes con una diferencia en sus puntos de ebullición de  $30^{\circ}\text{D}$  a  $80^{\circ}\text{D}$ , cuyo proceso se da en multi-etapas por medio de una columna de destilación en la cual, se llevan a cabo continuamente numerosas evaporaciones y condensaciones. Al ir avanzando a lo largo de la columna, la composición del vapor es más concentrada en el componente más volátil y la concentración del líquido que condensa es más rica en el componente menos volátil. Cabe mencionar que este tipo de destilación es mucho más eficiente que una destilación simple y que mientras más etapas involucre, mejor separación se obtiene de los componentes.

La incineración son las cenizas del material orgánico después de haberse llevado a cabo una combustión completa. El mejor incinerador es el que produce únicamente  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . (CCPHSDCL, 1995).

En la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se tienen convenios con las empresas Residuos Industriales Multiquímicos Sociedad Anónima (RIMSA) y CIBA-GEIGY (Laboratorios Industriales), para confinar o incinerar los residuos generados en sus laboratorios de investigación.

Los residuos generados en cada etapa de esta investigación se muestran en las Figuras E.3 y E.4, mientras que el tratamiento que se siguió se presenta en la Tabla E.1

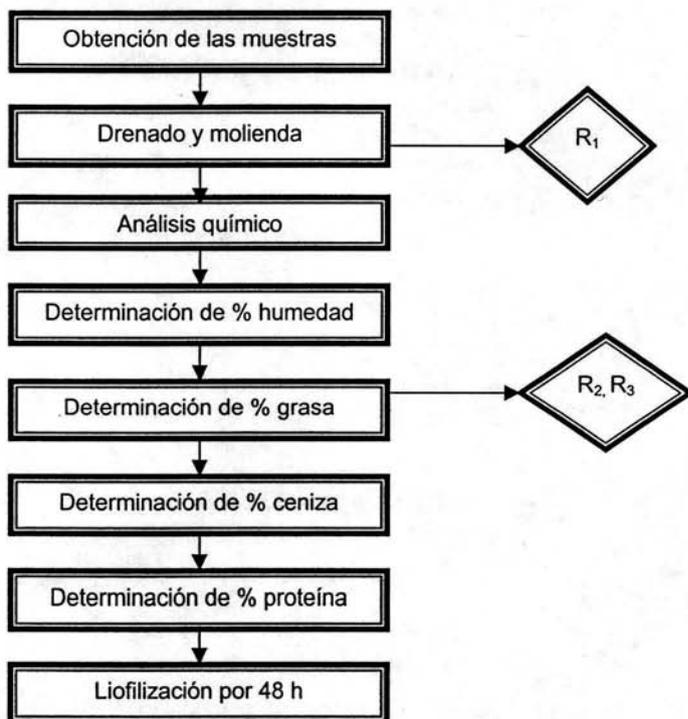


Figura E. 1 Residuos generados en el análisis químico

R<sub>1</sub> = Corresponde al aceite drenado de los mejillones ahumados enlatados

R<sub>2</sub> = Corresponde a la grasa extraída

R<sub>3</sub> = Corresponde a la muestra (pollo o mejillones) sin grasa

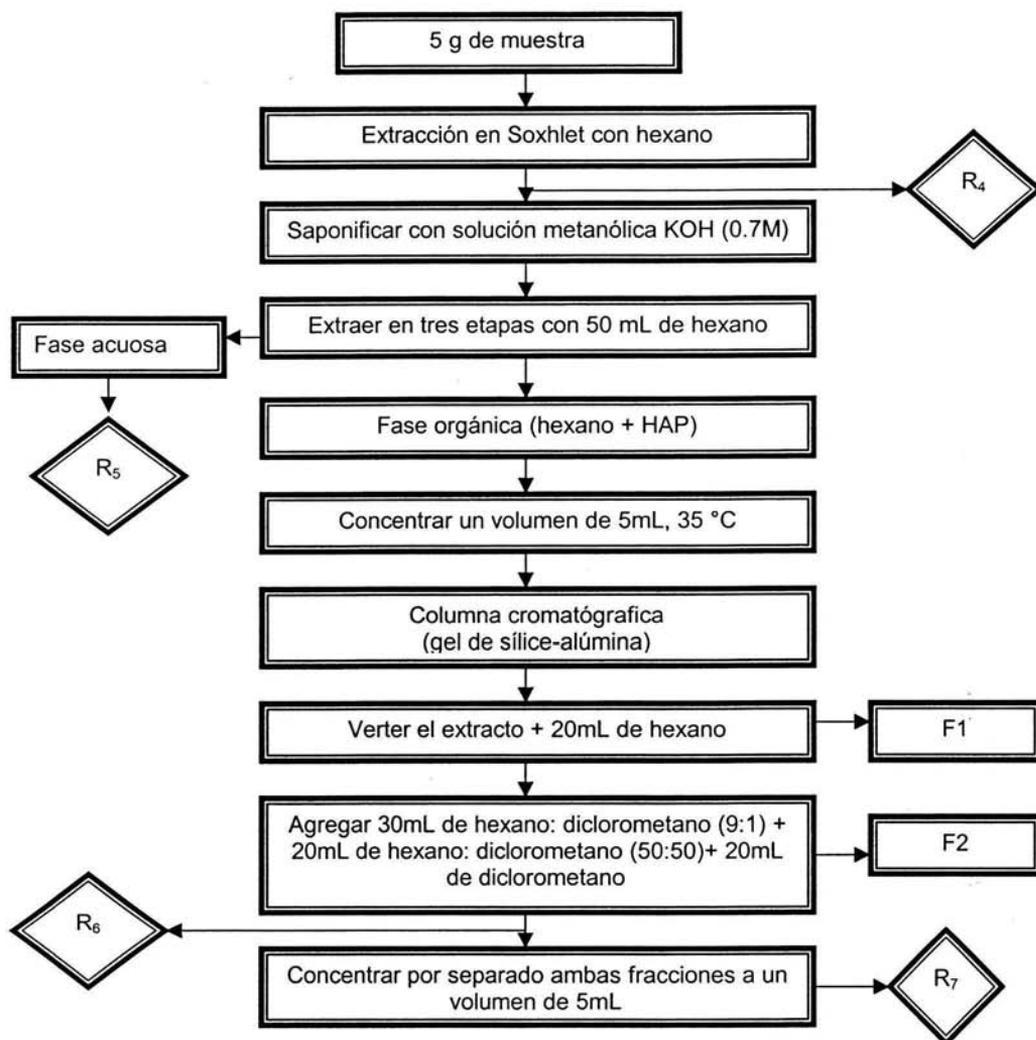


Figura E.2 Residuos generados en la extracción de HAP

R<sub>4</sub> = Correspondiente a la muestra (pollo o mejillones)

R<sub>5</sub> = Corresponde a los ácidos grasos saponificados más hexano y HAP

R<sub>6</sub> = Corresponde a los materiales adsorbentes de la columna

R<sub>7</sub> = Corresponde a todos los HAP, tanto estándares como los extraídos de las muestras que se encuentran en hexano

Tabla E.1. Tratamiento de residuos

Residuos	Origen	Tratamiento
Aceite y grasa extraída	Muestras en estudio (pollo y mejillones)	Saponificar y desechar en la tarja que lleva el agua residual a la planta de tratamiento de agua residuales de la Ciudad Universitaria
Grasas saponificadas	Grasa extraída de las muestras	Tarja que lleva el agua residual a la planta de tratamiento de agua residuales de la Ciudad Universitaria
Muestras (pollo y mejillones)	Establecimientos ambulantes y locales; y centros comerciales.	Incinerar
Hexano* + HAP	Extracción líquido-líquido donde se encuentran las grasas saponificadas y los HAP, así como las curvas patrón	Destilación simple del hexano *** y los HAP almacenarlos para su posterior incineración
Hexano* + Diclorometano** + HAP	Limpieza y fraccionamiento de los HAP	Destilación fraccionada de los disolventes y los HAP almacenarlos para su posterior incineración
Adsorbentes de la columna	Limpieza y fraccionamiento de los HAP	Se mandan a incineración
HAP	Estándares y extracción de las muestras	Se mandan a incineración
HCl	Análisis químico	Neutralización a un pH=7 y, se desecha
NaOH	Análisis químico	Tarja que lleva el agua residual a la planta de tratamiento de agua residuales de la Ciudad Universitaria

\*Hexano, su punto de ebullición es de 69°C

\*\*Diclorometano; su punto de ebullición es de 40°C

\*\*\*Hexano destilado; se puede reutilizar para otros propósitos que no sean de investigación, considerando que no se encuentra puro

## BIBLIOGRAFÍA

1. ALBERT, L. (1990). "Curso Básico de Toxicología Ambiental". Editorial. Limusa, México D.F., México. Pp. 247-277.
2. ALMARAZ, L. (2001). "Presencia y toxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos formados durante el ahumado y el tratamiento térmico de la carne y sus derivados". Tesis Profesional, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Estado de México, Cuautitlán, México. Pp. 10-11, 19-21.
3. ANESFAR. (2002). De las redes del INTERNET: [http://www.farmacia.us.es/decanato/anesfar/noname\\_1/archivos/tema](http://www.farmacia.us.es/decanato/anesfar/noname_1/archivos/tema)
4. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. 30ª Ed. AOAC, Washington, D.C, EEUUA. Pp. 152-164.
5. ARAGÓN, Ma. E. Villa, I. (1991). Prácticas de laboratorio. Análisis de alimentos. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D.F. México. Pp. 1-8.
6. AUTRUP, H. JEFFRY, M. HARRIS, D. (1983). "Metabolism of benzo(a)pyrene in cultured bronchus, trachea colon, and esophagus". Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Editorial Byalbjorseth. New York, EEUUA. Pp. 89-103.
7. CASTELLO, F. (1960). "El Nuevo Arte de Criar Gallinas". Editorial. AEDOS, 3ª edición, Barcelona, España. Pp. 25-29.
8. CASTELLS, S. (1998). "Carcinógenos en Alimentos". Revista de la Industria Alimentaria, 190: 71-85. México D.F. México.
9. CASTILLO-URUETA, P. (2002). "Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en muestra de ostiones". Tesis Profesional, UNAM, Facultad de Química, México D.F., México. Pp. 19-21.

10. CHAPMAN, J. (1993). "Practical Organic Mass Spectrometry". 2<sup>da</sup> edición, N.Y., EEUUA. P. 330.
11. CPPHSDCL. (1995). "Prudent Practices in the Laboratory", Committee on Prudent Practices for Handling, Storage, and Disposal of Chemicals in Laboratories, Editorial National Academic Press, Washington, DC, EEUUA. Pp. 47,76,147,295,324-327.
12. DABRIO, M. (1971). Cromatografía de gases II. Editorial Alhambra, Madrid, España. Pp. 122-151.
13. DERACHE, R. (1990). "Toxicología y Seguridad de los Alimentos". Editorial Omega, S.A. Barcelona, España. Pp. 295-310.
14. DÍAZ-MOROLES, N.; ALFARO, J.; GARZA, H. (2001). "Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable". Ciencia (UANL); IV (4): 420-425.
15. ECEBaP (1997). Environmental Contaminants Encyclopedia Benzo(a)pyrene (BaP). Editado por la Universidad de Colorado. Colorado, EEUUA. P. 75.
16. ELSKUS, A, STEGENAN, J. (1989). "Induced Cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus* Associated with Environmental Contamination by Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". Marine Environmental Research, 27: 31-50.
17. EPA. (1990). Agencia de Protección Ambiental de los Estado Unidos de América. Method 3630 a. Silica Gel Cleanup. Washington, DC, EEUUA. Pp. 1-7.
18. ESTEBAN, L. (1993). "La espectrometría de masas en imágenes". Editorial ACK Editores. Madrid, España. Pp. 147-160.
19. FECHTER, R. (1993). "Moluscos: Moluscos europeos marinos y del interior". Editorial Gunter Steinbach, Barcelona, España. P. 287.

20. FENNEMA, O. (1996). "Food Chemistry". 3ª Edición. Editorial Board. Nueva York, EEUUA. Pp. 255-291.
21. GALCERAN, F. (2002). "The Application of Gas Chromatography to Environmental Analysis". Trends in Analytical Chemistry, 21:672-685.
22. GARCÍA-GÓMEZ, R. (2000). "Estudios de espectroscopias de fluorescencia y masas en suelos contaminados". Tesis de maestría, UNAM, Facultad de Química, México D.F., México. Pp. 12-96.
23. GERNOT, G. (1998). "Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". Editorial CRC Press, Inc. Florida, EEUUA. Pp. 28 – 41.
24. GIRARD, J. (1991). "Tecnología de la carne y de los productos cárnicos". Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Pp. 183, 195, 196, 203.
25. GREENBERG, A. (1995). "Combustion efficiency and air quality". Editorial Istvan Hagittai and Tamas Vidoczy. New York and London. Pp. 241-245.
26. GRIMMER, G. (1984). "Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". CRC Press. Inc. Boca Ratón Florida, EEUUA. Pp. 2-59.
27. HARRIS, D. (1992). "Análisis Químico Cuantitativo". Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F., México. Pp. 637-671.
28. HARZARD, C. (1999). Tomado de las redes internacionales  
<http://www.harzard.com/msds/f/bsf/bsffx.html>
29. HAWLEY, G. (1992). "Diccionario de química y de productos químicos". Editorial Omega. Barcelona, España. P. 476.

30. HAYAKAWA, K. (2002). "Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbon in airborne particulates collected in downtown and suburban Kanazawa, Japan" *Atmospheric Environment*; 36: 5535-5541.
31. HOWARD, R. (1986). "Sanidad Alimentaria". Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España. Pp. 179-180.
32. INEGI (2000) Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática. "Estadísticas de comercio, libro de importaciones y exportaciones". México D.F. México. Pp. 83-85.
33. INEGI (2002) Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática. "Estadísticas de comercio, libro de importaciones y exportaciones". México D.F. México. Pp. 81-83.
34. INNSZ. (2000). "Tablas de Composición de Alimentos Mexicanos". Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán". México, D.F., México. Pp. 154, 155, 172, 173.
35. KAZEROUNI, N. ; SINHA, R. ; CHE-HAN HSU; GREENBERG, A.; ROTHMAN, N. (2001). "Analysis of 200 food items for benzo(a)pyrene and estimation of its intake in epidemiology study". *Food and Chemical Toxicology*; 39: 423-436.
36. LEHNINGER, A (2001). "Principios de Bioquímica". Editorial Omega. Barcelona, España. P. 1152.
37. LINDER, E. (1995). "Toxicología de los Alimentos". Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Pp. 158-160.
38. LUBAWY, D (1983). "Inhibition of Pulmonary Metabolism of Benzo(a)pyrene Produced by Acute Tobacco Smoke Exposure". *Handbook Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Editorial Byalbjorseth. Nueva York, EEUUA. Pp. 243-255.
39. LUTHE, L. (2002). "Metabolism of 1-Fluoropyrene and Pyrene in Marine Flatfish and Terrestrial Isopods". *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 12: 221-229.

40. McNAIR, H. (1981). "Cromatografía de gases". Editorial Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. EEUUA. P. 147.
41. MENDENHALL, W., SINCICH T. (1997) "Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias". Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. Nueva York, EEUUA. Pp. 39-57.
42. MERCK INDEX (1994). Ed. Merck and CO. 11va. Nueva York, EEUUA. Pp. 185, 1368.
43. MOHLER, K. (1991). "El Ahumado". Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Pp. 59, 60, 62, 67.
44. MONTGOMERY, D. (1991). "Diseño y Análisis de Experimentos". Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F., México. Pp. 45-64
45. MORET, S. (2000). "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Fats and Oils: Occurrence and Analytical Methods". *Journal of Chromatography*; 882: 245-253.
46. MORRISON, R. (1996). "Química Orgánica". Editorial Addison-Wesley. Editorial Iberoamericana. México, D.F., México. Pp. 490-553.
47. MULTON, L. (1981). "Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias". Editorial, Acribia S.A. Zaragoza, España. 3<sup>ra</sup>. Edición. Pp. 490-505.
48. Norma Mexicana NMX-F-481-SCFI-2001. "Productos de la pesca- mejillones-enlatados - especificaciones" México, D. F., México.
49. Norma Mexicana NMX-F-505-1993-SCFI. "Productos de la pesca-ostiones ahumados enlatados en aceite especificaciones". México, D. F., México.
50. Norma Mexicana NMX-FF-080-1992. "Productos avícolas- carne de pollo de engorda en canal-clasificación". México, D. F., México.

51. PEARSON, D. (1990). "The chemical analysis on foods". Editorial Chemical Publishing. N.Y., EEUUA. P. 575.
52. PHILLIPS, D. (1999). "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Diet". *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443:139-147.
53. RUIZ-CARVAJAL, A. (2001). "Campaña de Tóxicos. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos". De las redes: <http://www.greenpeace.com.mx>
54. SANTODONATO, D. (1983). "Multimedia Human Exposure and Carcinogenic Risk Assessment for Environmental PAH". *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Editorial Byalbjorseth. New York, EEUUA. Pp. 435-447.
55. SANTOS, J. (2002). "The Application of Gas Chromatography to Environmental Analysis". *Trends in Analytical Chemistry*, 21:172-685.
56. SAX, I. (1989). "Dangerous Properties of Industrial Materials". Vol. 2-3. Editorial Van Nostrand Reinhold. Nueva York, EEUUA. Pp. BC5750- FDF000.
57. SCF (2002). Scientific Committee on Food. "Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food". European Commission. Bruselas, Bélgica. P. 84.
58. SEIBL, J (1973). "Espectrometría de Masas". Editorial Alhambra. Madrid, Barcelona. P. 228.
59. SIKORSKI, E. (1990). "Tecnología de los Productos del Mar". Editorial Acribia. Zaragoza, España. Pp. 223-245.
60. SIMKO, P. (2002). "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Meat Products and Smoke Flavouring Food Additives". *Journal of Chromatography B*, 770:3-18.

61. SKOOG, D., LEARY, J (1992). "Análisis Instrumental". 4<sup>ta</sup>. Edición. Editorial. Mc Graw Hill. México, D.F., México. Pp. 491- 536, 705- 729.
62. SULLIVAN, L., CALLE, M., OCASIO, J., KITLE, Jr., ELIS, E. (1983). "The Effect of Antioxidants on the Mutagenicity of Benzo(a)pyrene and Derivatives". Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Editorial Byalbjorseth. Neva York, EEUUA. Pp. 163-173.
63. UNEP/ IOC/ IAEA. (1993). "Determination of Petroleum Hydrocarbons in Sediments". Reference Method No 20. United Nations Environment Programme (UNEP). París, Francia.
64. VIVES, I., GRIMALT, J. (2002). "Method for Integrated Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Organochlorine Compounds in Fish Liver". Journal of Chromatography B, 768:247-254.
65. VOET, D. (1992). "Bioquímica". Ediciones Omega. Barcelona, España. Pp. 1044-1045.
66. WILLARD, H. (1991). "Análisis Instrumental". Grupo Editorial Iberoamérica. Belmont, California, EEUUA. Pp. 460- 461.