

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRIA EN QUIMICA DEL MEDIO AMBIENTE



**“Monitoreo de benzo[a]pireno por HPLC en productos cárnicos
ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016.”**

Tesis presentado por el bachiller:

Luis Miguel Lipa Mamani

Para optar el grado académico de:

Magister en Química del Medio Ambiente

Asesor:

Dr. Julio Cesar Bernabe Ortiz

Arequipa-Perú

2016

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vii
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
CAPITULO I	9
MARCO TEORICO	9
1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACION	9
1.1.1. ENUNCIADO DE PROBLEMA	9
1.1.2. DESCRIPCION DEL PROBLEMA	9
1.1.3. JUSTIFICACION DEL PROBLEMA	11
1.2. BENZO[a]PIRENO	11
1.2.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	11
1.2.2. FUENTES DE BENZO[a] PIRENO EN ALIMENTOS	12
1.2.3. ABSORCION, DISTRIBUCION, METABOLISMO Y EXCRECION DE LOS HAP	13
1.2.4. NORMATIVA DE BENZO[a]PIRENO	16
1.3. EL AHUMADO	17

1.3.1.	EL HUMO.....	17
1.3.2.	COMPUESTOS DEL HUMO	17
1.3.3.	REACCION DE LOS COMPONENTES DEL HUMO – PRODUCTO AHUMADO	19
1.3.4.	METODOS DE AHUMADO	20
1.3.4.1.	METODOS DE AHUMADO DIRECTO	20
1.3.4.2.	METODOS DE AHUMADO INDIRECTO	21
1.3.5.	PRODUCTOS CARNICOS AHUMADOS.....	23
1.4.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	24
1.4.1.	SISTEMA HPLC	24
1.4.2.	TIPOS DE HPLC	26
1.4.3.	FASES MOVILES	27
1.4.4.	PARAMETROS DEL HPLC.....	28
1.5.	LA EXTRACCION ASISTIDA POR ULTRASONIDOS (EAU) EN LA PREPARACION DE MUESTRAS	31
1.5.1.	PRINCIPIOS DE LA EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO	33
1.5.2.	EFFECTOS DEL ULTRASONIDO	34
1.5.3.	EXTRACCION ASISTIDA POR SONICACION EN PEQUEÑAS COLUMNAS.....	36
1.6.	ANALISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	37
CAPITULO II.....		39
MATERIALES Y METODOS.....		39
2.1.	CAMPO DE VERIFICACION.....	39
2.1.1.	UBICACIÓN ESPACIAL.....	39
2.1.2.	UBICACION TEMPORAL	39
2.1.3.	UNIDADES DE ESTUDIO	39
2.2.	TECNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACION ...	40
2.2.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	40

2.2.2.	ANALISIS Y METODOLOGIA	41
2.2.2.1.	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	41
2.2.2.2.	DETERMINACION DE BENZO[a]PIRENO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	41
2.2.2.3.	DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS AHUMADOS	42
2.3.	ESTRATEGIA DE RECOLECCION DE DATOS	43
2.3.1.	ANALISIS ESTADISTICO.....	43
2.3.2.	ORGANIZACION	45
2.3.3.	RECURSOS	45
2.3.4.	VALIDACION ANALITICA DEL METODO	46
CAPITULO III	52
RESULTADOS Y DISCUSION	52
I.	VALIDACION DEL METODO ANALITICO	52
1.1.	PREPARACION DE LA SOLUCION ESTANDAR	52
1.2.	CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PARA LA DETERMINACION DE BENZO[a]PIRENO	53
1.3.	VALIDACION DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE BENZO[a]PIRENO POR HPLC	54
1.3.1.	LINEALIDAD	54
1.3.2.	PRECISION	55
1.3.3.	EXACTITUD	56
1.3.4.	LIMITES DE CUANTIFICACION (LDQ) Y DETECCION (LDD)	57
1.4.	MUESTREO DE LOS PRODUCTOS CARNICOS AHUMADOS	59
1.5.	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	60
II.	MONITOREO DE BENZO[a]PIRENO EN PROPUCTOS CÁRNICOS AHUMADOS	64

2.1. NIVELES DE BENZO[a]PIRENO EN EL MONITOREO DE PRODUCTOS CARNICOS AHUMADOS DE LA CIUDAD DE AREQUIPA	64
2.2. RELACION ENTRE EL CONTENIDO DE HUMEDAD Y BENZO[a]PIRENO EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS AHUMADOS	72
CAPITULO IV	77
CONCLUSIONES	77
RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFIA	79
ANEXO 1	93



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del benzo[a]pireno [22].....	12
Figura 2. Metabolismo del benzo[a]pireno a nivel hepático. [39].....	15
Figura 3. Esquema del sistema de HPLC. [88]	26
Figura 4. Parámetro de retención del analito. [61]	30
Figura 5. Representación esquemática del colapso de la burbuja en una superficie sólida [65].	32
Figura 6. Desarrollo y colapso de las burbujas por cavitación [65] [73].....	34
Figura 7. Fenómeno de cavitación. (A) Desarrollo y colapso de las burbujas por cavitación. (B) Colapso cavitacional en la interface solido-liquido. [75].	35
Figura 8. Esquema de la SAESC (sonication assisted extraction in small columns) [62].	36
Figura 9. Estándar de benzo[a]pireno grado HPLC	52
Figura 10. Tiempo de retención para el estándar de benzo[a]pireno.....	53
Figura 11. Grafica para la linealidad del método por HPLC.....	55
Figura 12. Grafica de la concentración versus área.....	57
Figura 13. Grafica de la concentración versus desviación estándar.	58
Figura 14. Cooler Klimber y gel refrigerante para el monitoreo de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados.....	59
Figura 15. Acondicionamiento de la extracción por solvente asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas modificada. [62].	61
Figura 16. Cromatograma de un producto cárnico ahumado (Muestra D); donde: (a) es la muestra sin estándar y (b) muestra con estándar benzo[a]pireno.	62
Figura 17. Esquema del tratamiento de las muestras para la determinación de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados.....	63
Figura 18. Monitoreo de benzo[a]pireno por lotes ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa.	65
Figura 19. Niveles de benzo[a]pireno en diferentes lotes de productos cárnicos ahumados. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre lotes dentro de la misma muestra.	67

Figura 20. Cámara de ahumado: Representación de CAC/RCP 68/2009 [12] [47], variables para el control de la contaminación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en los procesos de ahumado. 71

Figura 21. Concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y el contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados (Lote 1) que se comercializan en la ciudad de Arequipa. 73

Figura 22. Concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y el contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados (Lote 2) que se comercializan en la ciudad de Arequipa. 73

Figura 23. Concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y el contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados (Lote 3) que se comercializan en la ciudad de Arequipa. 74



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables.	10
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del benzo[a]pireno	12
Tabla 3. Contenido máximo de benzo[a]pireno permitido en alimentos.	16
Tabla 4. Principales compuestos detectados en el humo.....	18
Tabla 5. Compuestos implicados del humo de los Productos ahumados.	19
Tabla 6. Propiedades de la fase móvil de HPLC	28
Tabla 7. Unidades de estudio.....	39
Tabla 8. Fórmulas para un ANOVA con un Diseño de Bloques Completos al Azar....	44
Tabla 9. Fórmulas para un ANOVA de una vía	44
Tabla 10. Valores aceptables del coeficiente de variabilidad según AOAC	49
Tabla 11. Límites de porcentaje de recuperación según la AOAC.	50
Tabla 12. Condiciones cromatográficas para la determinación de benzo[a]pireno.....	53
Tabla 13. Datos para la linealidad del método	54
Tabla 14. Datos para la repetibilidad del método.....	55
Tabla 15. Recuperación del método	56
Tabla 16. Muestras para el monitoreo de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados.....	60
Tabla 17. Comparación de los porcentajes de recuperación usando una concentración con corriente de nitrógeno y aire.	62
Tabla 18. Contenido de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en el monitoreo de productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa.	66
Tabla 19. Prueba LDS (Least significant difference) para el monitoreo de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa.....	68
Tabla 20. Comparación de los niveles de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados encontrados en Arequipa con otros lugares.....	69
Tabla 21. Contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016	75
Tabla 22. Prueba LDS (Least significant difference) del contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa.....	75
Tabla 23. Prueba F para varianzas de la concentración de las muestras (concentración con nitrógeno y concentración con aire).....	93

Tabla 24. Prueba t para la concentración de las muestras (concentración con nitrógeno y concentración con aire).....	93
Tabla 25. Análisis de varianza para el monitoreo de benzo[a]pireno por HPLC en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016.....	94
Tabla 26. Análisis de varianza del contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016.....	94
Tabla 27. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra A). Arequipa, 2016.....	94
Tabla 28. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra B). Arequipa, 2016.....	95
Tabla 29. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra C). Arequipa, 2016.....	95
Tabla 30. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra D). Arequipa, 2016.....	95
Tabla 31. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra E). Arequipa, 2016.....	96
Tabla 32. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra F). Arequipa, 2016.....	96
Tabla 33. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra G). Arequipa, 2016.....	96

DEDICATORIA

Dedicado a mi madre Tomasa por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, a mi padre Luis (QEPD) por su confianza depositada, a mis hermanos Diego y Lucero por su compañía en todo momento, a mis sobrinos Santiago y Noemi, por llenar nuestras vidas con su alegría y esperanza; quienes fueron los pilares fundamentales para conseguir mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por brindarme la oportunidad de estudiar la maestría así como el financiamiento de la misma y de la presente investigación, quienes contribuyeron de esta manera a mi formación académica, profesional en esta etapa tan importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgencita de Chapi, por guiarme por el buen camino, dándome las fuerzas para seguir adelante y ofrecerme los medios oportunos para continuar con mi formación profesional.

A los docentes de la escuela de Postgrado de la Universidad Católica de Santa María por sus valiosas enseñanzas, quienes me orientaron para poder culminar el presente trabajo de investigación.

A mis compañeros de clase especialmente a Elvis, Harry, Gabriela y Aida, quienes me apoyaron incondicionalmente durante la maestría.

Un agradecimiento especial para todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para la culminación de la presente tesis.

RESUMEN

El ahumado es una de las técnicas más antiguas utilizadas para prolongar la vida útil de los alimentos, además de conferirle buenas propiedades organolépticas, bactericidas, antioxidantes, también puede ser acompañado de efectos no deseables como la contaminación del producto ahumado por los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), particularmente el benzo[a]pireno durante su procesamiento. Dentro de los HAP, sólo se han comprobado propiedades carcinogénicas en algunos de ellos; como el benzo[a]pireno que ha sido clasificado dentro de la categoría 1 por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), con evidencia carcinogénica comprobada en seres humanos; por ende, la importancia para la identificación y cuantificación de este contaminante. El presente trabajo tuvo como objetivo monitorear los niveles de benzo[a]pireno en productos cárnicos que se comercializan en la ciudad de Arequipa previa validación del método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las condiciones cromatográficas óptimas fueron: temperatura de trabajo de 25 °C, longitud de onda de 254 nm, flujo de 2 mL min⁻¹ constituido por una fase móvil de acetonitrilo (80%) y agua ultrapura (20 %), volumen de inyección de 20 µL, tiempo de retención de 4.37 min. Para las determinaciones de benzo[a]pireno se procedió a realizar la validación del método cromatográfico por HPLC en un rango de 5 a 60 µg L⁻¹ obteniéndose una linealidad con un r² igual a 0.9989, con un coeficiente de variación menor al 8.5 % y un porcentaje de recuperación de 91.07 %, estando dentro de los límites establecidos por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) siendo el método lineal, preciso y exacto respectivamente, con límites de detección 0.85 µg L⁻¹ y de cuantificación de 1.77 µg L⁻¹.

Se recolectaron muestras de productos cárnicos ahumados (7 por cada lote) procedentes de distintas empresas o productores que se expenden en la ciudad de Arequipa, teniendo en cuenta que sean de lotes diferentes para la realización del monitoreo (3 lotes de cada muestra que correspondían a los meses de diciembre 2015, enero, febrero y marzo 2016), las muestras fueron almacenadas en un cooler acondicionada con gel refrigerante hasta el traslado de dichas muestras para su respectivo análisis, previo tratamiento de la muestras con extracción por solvente asistida por ultrasonido (EAU).

El monitoreo de benzo[a]pireno en 7 muestras de productos cárnicos ahumados de 3 lotes diferentes cada una, mostraron concentraciones promedio a nivel de muestras; para la muestra A de $27.62 \mu\text{g kg}^{-1}$, muestra E de $15.72 \mu\text{g kg}^{-1}$, muestra B de $10.42 \mu\text{g kg}^{-1}$, muestra D de $7.29 \mu\text{g kg}^{-1}$, muestra G con $4.34 \mu\text{g kg}^{-1}$, muestra F con $4.21 \mu\text{g kg}^{-1}$, muestra C con $3.87 \mu\text{g kg}^{-1}$; las muestras A, E y B mostraron diferencias estadísticas significativas respecto a las demás muestras. De las 7 muestras analizadas solo 3, que corresponden a las muestras G, F y C están dentro del límite permitido de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ establecido por la comisión europea N° 835, 2011 tomado como normativa de referencia para este estudio. Respecto al contenido de humedad (%) y su relación con el contenido de benzo[a]pireno presentaron una relación variada; dado que las muestras A y E con mayores contenidos de benzo[a]pireno presentaron menores contenidos de humedad, pero a su vez la muestra B con un alto contenido de benzo[a]pireno presentó un alto contenido de humedad indicando que los productos cárnicos ahumados con contenidos de elevados de benzo[a]pireno pueden tener diferentes contenidos de humedad.

Palabras claves: benzo[a]pireno, HAP, HPLC, productos cárnicos ahumados, EAU, monitoreo, lotes.

ABSTRACT

Smoking is one of the oldest techniques used to prolong the shelf life of foods, in addition to impart good organoleptic, bactericides, antioxidant properties, it may also be accompanied by undesirable effects such as pollution of the smoked product by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), particularly benzo[a]pyrene during processing. Within PAHs, they have only been proven carcinogenic properties in some of them; such as benzo [a] pyrene has been classified in category 1 by the International Agency for Research on Cancer (IARC), with proven evidence carcinogenic in humans; hence, the importance for the identification and quantification of this pollutant. This study aimed to monitor the levels of benzo[a]pyrene in meat products sold in the city of Arequipa prior validation of the method by high performance liquid chromatography (HPLC).

The optimal chromatographic conditions were: temperature of 25 °C, wavelength 254 nm, flow rate of 2 mL min⁻¹ consists of a mobile phase of acetonitrile (80%) and ultrapure water (20%), injection volume 20 µL, retention time 4.37 min. For determinations of benzo[a]pyrene proceeded to perform validation of the chromatographic HPLC method in a range of 5 to 60 µg L⁻¹ to obtain a linearity with a r² equal to 0.9989, with a coefficient of variation of less than 8.5% and a percentage of recovery of 91.07%, being within the limits established by the AOAC (Association of Official Analytical Chemists) being linear, accurate and precise method respectively, with detection limits of 0.85 µg L⁻¹ and quantitation of 1.77 µg L⁻¹.

Samples of smoked meat products (7 per batch) from different companies or producers that are sold in the city of Arequipa were collected, considering they are from different batches for carrying out the monitoring (3 batches of each sample corresponding to the months of December 2015, January, February and March 2016), the samples were stored in a cooler equipped with cooling gel to the transfer of such samples for examination, pretreatment of the samples with solvent extraction assisted by ultrasound (UAE).

Monitoring benzo[a]pyrene in 7 samples of smoked meat products 3 different batches, showed average level concentrations of samples; for sample A of 27.62 µg kg⁻¹, sample

E of $15.72 \mu\text{g kg}^{-1}$, sample B of $10.42 \mu\text{g kg}^{-1}$, sample D of $7.29 \mu\text{g kg}^{-1}$, sample G with $4.34 \mu\text{g kg}^{-1}$, sample F with $4.21 \mu\text{g kg}^{-1}$, sample C with $3.87 \mu\text{g kg}^{-1}$; samples A, E and B showed statistically significant differences compared to the other samples. Of the 7 samples tested only 3, which correspond to samples G, F and C are within the allowed limit of $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ established by the European Commission No. 835, 2011 taken as reference standards for this study. Regarding the moisture content (%) and its relation to the content of benzo[a]pyrene had a varied relationship; since the samples A and E with higher content of benzo[a]pyrene showed lower moisture contents, but in turn the sample B with a high content of benzo[a]pyrene present a high moisture content indicating that the meat products smoked with high content of benzo[a]pyrene may have different moisture contents.

Keywords: benzo[a]pyrene, PAHs, HPLC, smoked meat products, EAU, monitoring, batches.



INTRODUCCION

El ahumado es una de las tecnologías más antiguas para la conservación de la carne y los productos cárnicos. Durante el ahumado se generan sustancias fenólicas, difenolicas, carbonilos, entre otros, las cuales tienen un efecto importante en las propiedades organolépticas de los productos cárnicos ahumados; además de ello, muestran propiedades antimicrobianas y antioxidantes [1] [2]; asimismo se generan componentes no deseables como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) producto de la combustión incompleta de la materia orgánica (leña, aserrín, madera, etc.) que se usan como combustible para la generación de humo en el ahumado; estos HAP, comprenden un gran grupo de compuestos orgánicos con dos o más anillos aromáticos fusionados, y representan una clase de contaminantes que son cancerígenos, teratogénicos y mutagénicos [3] [4].

El riesgo a la exposición de los HAP depende del tipo de dieta, los hábitos alimenticios; que a menudo están vinculados con las costumbres propias de cada lugar [5]. La presencia de HAP como contaminante de los productos cárnicos ahumados depende de varios factores: tipo de combustible, contenido de humedad, temperatura alcanzada durante la generación de humo, método de ahumado, entre otras variables [6] [7]. El comité científico sobre la alimentación humana (SCF) [8] ha identificado a 15 HAP como cancerígenos [9], entre ellos el benzo[a]pireno que ha sido considerado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) como carcinogénico del grupo 1; con evidencia comprobada en seres humanos [10]; debido a estas propiedades carcinogénicas de los HAP, su contenido en los alimentos debe ser tan bajo como sea razonablemente posible. La comisión europea (CE) mediante la regulación N° 835 de 2011 especifica la concentración máxima permitida de benzo[a]pireno de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ en peso fresco [11] para carnes y productos cárnicos ahumados.

El codex alimentarius en su capítulo "Código de prácticas para reducir la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en los alimentos producidos por procedimientos de ahumado y secado directo" [12], establece que la contaminación por HAP a través de su elaboración debe ser controlado, teniendo en cuenta la tecnología

del procesamiento. La empresa o productor debe ser consciente de las condiciones en las que se generan mayores niveles de HAP y siempre que sea posible, deberá controlar dichas condiciones para reducir su formación.

Existen varias técnicas para el tratamiento muestras en la extracción de HAP de productos alimenticios. Algunas de las desventajas son el consumo de grandes cantidades de disolvente, largos tiempos de extracción y muy laboriosas en algunos casos. La extracción asistida por ultrasonido es ampliamente usada, en numerosas áreas; como en la industria alimentaria, farmacéutica e ingeniería ambiental. El uso de la extracción por sonicación disminuye los tiempos de extracción debido al proceso de cavitación producida por el baño de ultrasonidos [13] [14]. Varios métodos de análisis se pueden utilizar para cuantificar los HAP en productos alimenticios, de los cuales los más utilizados son la cromatografía de gases con espectrometría de masas, y cromatografía líquida con alta resolución con un detector de fluorescencia, UV [15] [16] [17].

El monitoreo en el presente estudio tuvo como objetivo hacer un seguimiento de los niveles de contaminación de benzo[a]pireno a través de diferentes lotes en productos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa, con el fin de generar información que permita orientar la adopción de medidas que aseguren la inocuidad de los productos cárnicos ahumados.

HIPOTESIS

Dado que el ahumado es un técnica de conservación de alimentos que consiste en someterlos a la acción de los productos gaseosos que se desprenden de la combustión de ciertos vegetales (leña, aserrín, madera) y el benzo[a]pireno es producto a su vez de la descomposición térmica de la materia orgánica, es probable que este contaminante pueda acumularse en los productos cárnicos ahumados que se producen y comercializan en la ciudad de Arequipa.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Monitorear los niveles de benzo[a]pireno por HPLC en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Validar un método para la determinación de benzo[a]pireno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en productos cárnicos ahumados
2. Identificar y cuantificar la presencia de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados por HPLC.
3. Evaluar si los niveles de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa se encuentran dentro de los límites permitidos.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1.1. ENUNCIADO DE PROBLEMA

“Monitoreo de benzo[a]pireno por HPLC en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016.”

1.1.2. DESCRIPCION DEL PROBLEMA

La presencia de benzo[a]pireno en los productos cárnicos ahumados, se ha constatado a través de importantes revisiones [18] [19] [20], donde se han evidenciado su formación debido a las condiciones de procesamiento al cual son sometidos, tales como; el ahumado, el tostado, el secado, el horneado, la parrilla, la fritura; de igual manera, se asocian con su formación los métodos, tipos y tiempos de cocción, la fuente de energía utilizada, la distancia de la misma con el alimento, las altas temperaturas, el tipo de combustible usado, entre otros [12]. Debido a que la formación del benzo[a]pireno se da en alimentos ahumados, la ingestión de estos se convierte en una de las principales vías de exposición [21]. Por ello la importancia de identificar y cuantificar dicho contaminante en productos cárnicos ahumados.

1.1.2.1. AREA DE INVESTIGACION

El presente trabajo de investigación se encuadra en el área de calidad alimentaria y medio ambiente.

1.1.2.2. ANALISIS DE VARIABLES

Tabla 1. Operacionalización de las variables.

Tipo	Variable	Indicador
Independiente	Ahumado de los productos cárnicos de la ciudad de Arequipa	• Contenido de humedad del producto cárnico ahumado (%)
Dependiente	Presencia de benzo[a]pireno en productos cárnicos	• Concentración de benzo(a)pireno ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Fuente: Elaboración propia, 2016.

1.1.2.3. TIPO DE INVESTIGACION

Se trata de un estudio experimental, cuantitativo, prospectivo y longitudinal.

1.1.2.4. NIVEL DE INVESTIGACION

El nivel de la investigación es exploratorio, relacional y explicativo.

1.1.2.5. INTERROGANTES

- ¿Será posible determinar benzo[a]pireno por HPLC?
- ¿Será posible determinar benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados en la ciudad de Arequipa?
- ¿Tendrá alguna relación el contenido de humedad (%) en los niveles de benzo[a]pireno de los productos cárnicos ahumados analizados?
- ¿Los niveles de benzo[a]pireno en productos ahumados estarán por debajo del límite permitido?

1.1.3. JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

En nuestra ciudad los productos cárnicos son componentes importantes de la dieta diaria, destacando su elevado contenido proteico. El ahumado es una de las técnicas más antiguas utilizadas para prolongar la vida útil de los alimentos, además conferirle buenas propiedades organolépticas, bactericidas, antioxidantes, también puede ser acompañado de efectos no deseables como la contaminación del producto por los hidrocarburos aromáticos policíclicos, particularmente el benzo[a]pireno durante su procesado. En este contexto, es importante identificar y cuantificar dicho contaminante para que se puedan formular estudios base para la generación de políticas que permitan controlar, estandarizar el ahumado de los productos cárnicos y los insumos que se emplean en el mismo dado que a nivel nacional se adolece de una normativa que regule la presencia de dicho contaminante.

1.2. BENZO[a]PIRENO

El benzo[a]pireno está catalogado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), ente de la OMS, en la categoría 1 (carcinógeno humano) que agrupa a las sustancias que poseen probada acción cancerígena en humanos y animales [10]. La Agencia de Protección Ambiental y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos lo catalogan dentro de las 10 sustancias más importantes con riesgo para la salud pública [22].

Las principales fuentes naturales de formación de HAP entre ellos el benzo[a]pireno son los incendios forestales y erupciones volcánicas; como fuentes antropogénicas tenemos diversos procesos industriales (producción de carbón, fundiciones de aluminio, fabricación de electrodos de grafito y material refractario), el parque automotor, la emisión de gases vehiculares y el procesamiento de los alimentos (ahumado y secado). El humo del tabaco es otra fuente importante de exposición a benzo[a]pireno [23] [24].

1.2.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

El benzo[a]pireno es hidrocarburo aromático policíclicos (HAP) formado por cinco anillos de benceno fundidos, en la Figura 1 se presenta su estructura.

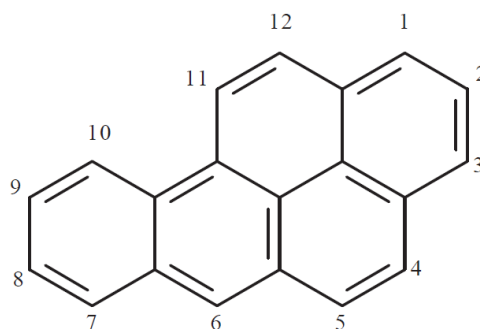


Figura 1. Estructura del benzo[a]pireno [22]

El benzo[a]pireno es un polvo amarillo inodoro, tiene baja solubilidad en agua, un alto coeficiente de partición octanol:agua, lo que le confiere una alta solubilidad en fases no acuosas, soluble en los compuestos orgánicos lipofílicos y solventes apolares como tolueno, benceno, hexano, xileno, acetona, ciclohexano, éter, dimetilformamida, dimetilsulfóxido [25]. En la Tabla 2 se observan las propiedades fisicoquímicas del benzo[a]pireno.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del benzo[a]pireno

Propiedad	Valor
Masa molécula relativa	252.31
Punto de ebullición (°C)	310 – 312 °C a 10mm Hg
Punto de fusión (°C)	178.1
Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	0.0038 a 25°C
Log K _{ow}	6.35

Fuente: Tabla adaptada de [26] [22].

1.2.2. FUENTES DE BENZO[a] PIRENO EN ALIMENTOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) como el benzo[a]pireno (BaP) son contaminantes ambientales ubicuos, formados durante la combustión incompleta de la materia orgánica (incendios forestales, petróleo, carbón) [58]. Los alimentos pueden contaminarse por HAP que están presentes en el aire, agua y suelo, así como aquellos que se forman durante el procesamiento de los alimentos (ahumado, secado) o determinadas prácticas culinarias domésticas, incluyendo la parrilla, asado, entre otros. En alimentos se pueden formar como resultado de la degradación térmica de algunos de

los componentes de alimentos tales como triglicéridos, ácidos grasos, aminoácidos y esteroides tales como colesterol [28] [29].

Los alimentos crudos (no procesados, perecibles) usualmente no deberían contener niveles altos de HAP. En zonas alejadas de zonas urbanas, los niveles de HAP encontrados en alimentos no procesados reflejan el entorno de la contaminación, que se origina por el transporte del aire contaminado de emisiones naturales como los volcanes, incendios forestales y la propia quema de los bordos o rastrojos agrícolas. En zonas industriales la contaminación de la vegetación puede ser diez veces mayor que en zonas rurales [30].

Entre los procesos a los cuales son sometidos los alimentos, donde se ha demostrado formación de este contaminante tenemos: el secado, el ahumado, el tostado, la fritura, la parrilla, principalmente cuando se usa carbón como combustible y son expuestos a fuego directo [31], en la extracción de aceites (cuando son sometidas a altas temperaturas y secados a fuego de manera directa) [32]. De igual manera, se asocian con su formación; los métodos de cocción y los tiempos involucrados en los mismos, el tipo de combustible utilizado (carbón, aserrín, maderas resinosas, diésel), la distancia entre el alimento y el fuego directo [12].

1.2.3. ABSORCION, DISTRIBUCION, METABOLISMO Y EXCRECION DE LOS HAP

ABSORCION

Los HAP se absorben a través de la ingestión, inhalación y contacto dérmico, de acuerdo a los datos de estudio en animales. El porcentaje absorbido varía en estos estudios por varias razones, incluyendo el medio de transporte en el cual los HAP se encuentran. En general, los HAP no se limitan al material particulado, pueden ser absorbidos en los pulmones mejor que la misma dosis que se encuentra en la superficie de las partículas en el aire [33].

DISTRIBUCION

Una vez absorbidos, los HAP

- Ingresan al sistema linfático,
- al sistema circulatorio sanguíneo, y
- se metabolizan principalmente en el hígado y el riñón.

Los patrones de distribución de los HAP varían respecto a las diferencias en las propiedades lipofílicas. Debido a su naturaleza lipofílica, los HAP pueden acumularse en la leche materna y el tejido adiposo. Sin embargo, la excreción biliar y urinaria de los HAP es relativamente eficiente debido a la amplia distribución de enzimas que transforman los HAP en metabolitos polares [34].

METABOLISMO Y EXCRECIÓN

Los HAP son metabolizados predominantemente por las enzimas CYP (enzimas P-450 del sistema oxidasa de función mixta) en el hígado. Además del hígado y los riñones, el metabolismo de los HAP se produce en las glándulas suprarrenales, testículos, tiroides, pulmones, piel, glándulas sebáceas y pequeños intestinos [35].

El objetivo del metabolismo es aumentar su polaridad para obtener sustancias hidrófilas con el fin de acelerar su excreción. Aunque este mecanismo produce la desintoxicación, algunos HAP se metabolizan a mutágeno o carcinógeno sustancias activas, que son capaces de atacar el ácido desoxirribonucleico celular (ADN) [36]. Por otra parte, en algunos ensayos con animales han demostrado que algunos metabolitos de HAP son sospechosos de ser disruptores endocrinos que actúan como hormonas. Sus efectos se producen principalmente en los recién nacidos de madres expuestas durante el embarazo y la lactancia [37].

En el metabolismo del benzo[a]pireno el receptor aril de los hidrocarburos (AhR) es el principal factor de transcripción que regula la activación de las enzimas de la fase I y fase II. Después que el benzo[a]pireno (BaP) se une al AhR, el complejo de BaP-AhR se transloca al núcleo de la célula, donde se dimeriza con la proteína de translocadora nuclear de AhR y se une a los promotores de genes que contienen elementos de respuesta a AhR, activando de este modo la producción de enzimas [69]. Como tal, el

BaP induce su propio metabolismo al actuar como un inductor y un sustrato de las enzimas metabólicas.

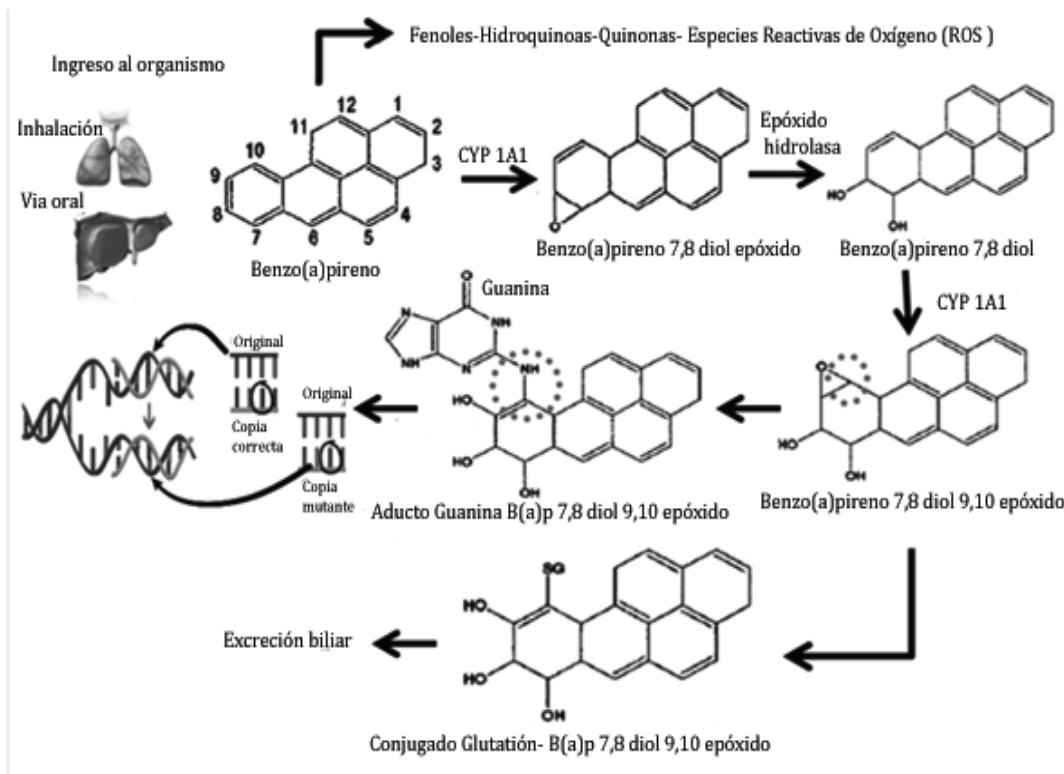


Figura 2. Metabolismo del benzo[a]pireno a nivel hepático. [39].

En el metabolismo de la fase I, el BaP se convierte en un epóxido, principalmente por el citocromo P450 (CYP) enzimas (CYP1A1 y CYP1B1), pero también por otras enzimas, incluyendo la prostaglandina sintasa. Los epóxidos BaP se someten a la hidratación por epóxido hidrolasa para formar dioles. Aldo-ceto reductasas convierten los dioles de BaP a catecoles [40].

La epoxidación secundaria por CYPs producen epóxidos dioles, BaP-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE) es el epóxido más mutagénico y mejor estudiado de los dioles de BaP, formando aductos covalentes con el ácido desoxirribonucleico (ADN) en la posición N² de la desoxiguanosina. Alternativamente los CYPs también pueden catalizar la oxidación de un electrón de BaP para formar un catión radical BaP. Estos metabolitos son compuestos genotóxicos directos que forman aductos inestables con bases purínicas [41]. Además, CYPs pueden someterse a desacoplamiento de sus reacciones catalíticas, lo que lleva a la producción de superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y otras especies de oxígeno reactivas,

incluyendo peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo [42]. Durante el metabolismo de fase II, metabolitos de BaP se conjugan con restos hidrófilos (glutación, ácido glucurónico o sulfato) para mejorar su solubilidad en agua, lo que permite la excreción urinaria y fecal [43]. Enzimas del metabolismo de fase II incluyen al glutación S-transferasas, uridina difosfato-glucuronosil transferasa y las sulfottransferasas. Un metabolito urinario comúnmente medido es 1-hidroxi pireno [44]. El metabolismo es un requisito previo para la excreción hepatobiliar y eliminación a través de las heces, independientemente de la vía de entrada

CARCINOGENESIS

El benzo[a]pireno se clasificó previamente como un carcinógeno por IARC grupo 2B (posiblemente carcinógeno para los seres humanos), pero ahora se considera por la IARC como carcinógeno del grupo 1 (cancerígeno para los seres humanos) "Basado en evidencias suficientes en animales y pruebas sólidas de que los mecanismos de carcinogénesis en animales también operan en los seres humanos expuestos [41].

1.2.4. NORMATIVA DE BENZO[a]PIRENO

No se encontró reglamentación alguna para nuestro país, sobre las concentraciones máximas de benzo[a]pireno permitidas en productos cárnicos ahumados. La CE a través de la regulación N° 835 de 2011 especifica la concentración máxima de benzo[a]pireno en $\mu\text{g kg}^{-1}$ en peso fresco, para diferentes alimentos [11].

Tabla 3. Contenido máximo de benzo[a]pireno permitido en alimentos.

Producto alimenticio	Contenidos máximos ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso fresco)
Aceites y grasas (excluida la manteca de cacao) destinados al consumo humano.	2.0
Carnes y productos cárnicos ahumados	5.0
Carne de pescado y productos pesqueros ahumados	5.0
Carne de pescado no ahumada	2.0
Crustáceos y cefalópodos, no ahumados	5.0
Moluscos bivaldos	6.0

Fuente: Comisión Europea (CE). Regulación N° 835/2011 [11].

1.3. EL AHUMADO

El ahumado es, por definición, la operación que consiste principalmente en someter un producto alimenticio a la acción de los productos gaseosos que se desprende de la combustión de ciertos vegetales. [45].

En definitiva es un método para procesar ciertos alimentos, especialmente carne y derivados cárnicos; pescado y derivados de pescado utilizando humo que reacciona con los productos.

Durante miles de años, el hombre ha utilizado el humo para preservar y dar sabor a sus alimentos [45]. El humo originado por la quema de la madera tiene propiedades bactericidas y antioxidantes. En el pasado, estas cualidades le permitieron al hombre prolongar la vida útil de los alimentos perecederos, especialmente de la carne, contribuyendo de esa forma a asegurar su supervivencia [2]. La finalidad del ahumado es por lo tanto, una mejor calidad de conservación y dar al producto sabor y olor característico debido a la reducción del contenido de humedad y a la acción conservadora y antioxidante de algunos componentes del humo como los fenoles.

1.3.1. EL HUMO

El humo se define como una suspensión de partículas sólidas y líquidas, en un medio gaseoso [2].

El humo es un sistema complejo, constituido de una fase dispersa líquida (partículas de humo cuyo diámetro es de aproximadamente unas $0,1 \mu\text{m}$) y de una fase dispersante gaseosa (vapor de humo). Las propiedades aromatizantes y colorantes se le atribuyen a la fase dispersante gaseosa [2].

1.3.2. COMPUESTOS DEL HUMO

La combustión completa de la madera conduce a la formación, por una parte, de agua y de gas carbónico y de otra parte de un residuo mineral que son las cenizas; la producción de humo, es una reacción de combustión menos completa en la que se pone

en juego paralelamente: primero, una descomposición bajo la acción del calor (pirólisis), de los polímeros constitutivos de la madera, en moléculas orgánicas de escaso peso molecular; segundo, reacciones de oxidación, de polimerización y de condensación [2].

Tabla 4. Principales compuestos detectados en el humo.

Compuestos	# Identificados	
	Condensados de humo	Productos ahumados
Fenoles	85	20
Carbonilos, cetonas y aldehídos	45	-
Furanos	11	-
Alcoholes y los esteres	15	-
Lactonas	13	-
Hidrocarburos alifáticos	1	20
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	47	20

Fuente: Girard, 1991. [2]

- **COMPUESTOS FENÓLICOS:** Papel esencial relacionado con aroma del producto ahumado; además de poseer una acción antioxidante que permite actuar sobre la conservabilidad del producto tratado. Entre los más representativos tenemos: 3 o 4 metil guayacol, vanillina, siringol, siringaldehído.
- **COMPUESTOS CARBONILOS:** Conviene agrupar los aldehídos y las cetonas; ejercen un papel al nivel de coloración y en menor grado en el sabor del producto ahumado.
- **HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HAP):** El benzo[a]pireno, entre los primeros HAP identificados, posee una acción cancerígena y ha sido designado por ello como indicador de contaminación en los productos alimentarios. Su cantidad puede variar desde varios cientos de $\mu\text{g kg}^{-1}$, a tan solo trazas no cuantificables.

- **AROMA DISTINTIVO COMPONENTES DEL HUMO:** Aparte de los aromas típicos que son propios del benzaldehído (aroma semejante al de almendras amargas), la vanillina (aroma intenso), etc.

1.3.3. REACCION DE LOS COMPONENTES DEL HUMO – PRODUCTO AHUMADO

La acción del humo puede dividirse en su efecto antioxidante y en su efecto bacteriostático. Además existen compuestos del humo, como el formol y vapores creosotados, que modifican la textura periférica de los productos cárnicos por la coagulación de las fibras musculares de la carne o de la tripa natural.

Tabla 5. Compuestos implicados del humo de los Productos ahumados.

Efectos	Características	Compuestos implicados
Calidades de los Productos Ahumados	Sabor	Fenoles
		Carbonilos
	Color	Carbonilos
	Conservabilidad	Difenoles (antioxidantes)
		Fenoles, formol Ácidos (bacteriostáticos)
	Textura	Formol
Acciones no deseables	Deterioro de las calidades higienicas	HAP Formaldehido
	Degradación de los ácidos aminados	Carbonilos

HAP: Hidrocarburo aromáticos policíclicos.

Fuente: Girard, 1991. [2]

No obstante además de estas acciones positivas, también el ahumado es acompañado de efectos no deseables como: la contaminación del producto por ciertos compuestos tóxicos del humo, particularmente por el benzo[a]pireno; la degradación de los ácidos aminados esenciales de las proteínas. Todos estos efectos perjudiciales se traducen por

una alteración de las calidades higiénicas y del valor nutritivo de los alimentos tratados [46]. En la Tabla 5 se indican las propiedades de algunos compuestos del humo de productos ahumados.

1.3.4. METODOS DE AHUMADO

Hay un gran número de formas de la clasificación de los métodos de ahumado; en base a la temperatura del ahumado, la ubicación de la fuente del humo con respecto a la posición del producto alimenticio, y el dispositivo utilizado para la generación de humo. [47]. En este estudio, los diferentes métodos de ahumado se clasificaran en dos grupos principales: el ahumado directo e indirecto.

Métodos de ahumado directo

- Ahumado en frío tradicional
- Ahumado en caliente tradicional

Métodos de ahumado indirecto

- Ahumado por fricción
- Ahumado líquido
- Ahumado electrostático

1.3.4.1. METODOS DE AHUMADO DIRECTO

Durante el ahumado directo, el humo se produce en la misma cámara donde se procesa la carne [12]. Los métodos de ahumado directo comprenden principalmente las técnicas tradicionales. Los métodos tradicionales de ahumado consisten en la degradación térmica directa de la madera para producir humo [48]. Esta definición se puede extender, a otros tipos de combustibles que se suelen utilizar inadecuadamente, tales como residuos de alimentos (cáscaras de coco, mazorcas de maíz, huesos de frutas, etc.) e incluso los periódicos o muebles (madera tratada con pintura) [12]. Los métodos de ahumado directo se pueden clasificar de acuerdo con la temperatura del humo.

1.3.4.1.1. AHUMADO EN FRIO TRADICIONAL

Durante el ahumado en frío, la madera es quemada y el humo es producido. Los productos cárnicos se cuelgan en estantes colocados por encima de la fuente de calor, situados sobre un piso tipo parrilla a través del cual pasa el humo. De acuerdo a diferentes autores, la temperatura del humo requerido para lograr condiciones de ahumado en frío deben estar por debajo de 20 °C [49], entre 15 y 25 °C [50] [51], o por debajo de 30 °C [48] [52]. Esta baja temperatura es obtenida mediante la regulación del aire o por el paso del humo a través de un intercambiador de calor [51].

1.3.4.1.2. AHUMADO EN CALIENTE TRADICIONAL

Durante el ahumado en caliente, la cámara se calienta por la combustión de la madera en un proceso similar a un horno típico antiguo. Una vez colocado en el interior de la cámara, la carne es calentada y secada por las brasas de madera quemada. El aserrín es luego introducido al interior de la cámara y el fuego es avivado con el fin de producir una gran cantidad de humo [53]. Temperaturas de 130 °C en el ahumado y 80 °C en la carne son necesarias en el ahumado en caliente [48] [53], aunque algunos autores especifican temperaturas más bajas, entre 55 y 80 °C [51].

1.3.4.2. METODOS DE AHUMADO INDIRECTO

Ahumados indirectos comprenden una serie de nuevos métodos que ayudan a reducir la contaminación por HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos) de los productos cárnicos . Entre ellos tenemos:

1.3.4.2.1. AHUMADO POR FRICCION

En este tipo de ahumado el humo se produce por la fricción de una barra de madera y una pieza de metal. El ahumado típico tiene valores de fricción continua que va en intervalos de 20 segundos de la madera con un rueda dentada seguido de una pausa de que va desde 60 – 240 segundos [54], pero varía en función del producto cárnico que se desea ahumar. Durante este proceso, el rango de temperatura varía entre 180 y 380 °C

[55]. En este tipo ahumado se reduce el tiempo de operación y el consumo de madera, la producción es más controlada y optimizada. Por otra parte, la seguridad industria de la carne se ve mejorada, como consecuencia de una baja presencia de HAP en los productos ahumados [54].

1.3.4.2.2. AHUMADO LIQUIDO

El humo líquido es una moderna forma de producir productos cárnicos ahumados más rápidamente. Es más ecológicamente amigable que los procesos de ahumado tradicional Debido a que tanto las materias primas para su producción y la concentración de humo líquido aplicado a los alimentos son controlados [56]. El humo líquido es producido por condensación de humo de madera, colocándola en grandes retortas donde se aplica un intenso calor, haciendo que la madera arda, los gases liberados son rápidamente enfriados en los condensadores, por lo tanto el humo es licuado. El humo líquido es luego forzado pasar a través de unas cubetas de refinado, posteriormente, es filtrado para eliminar tóxicos y las impurezas que contienen los HAP cancerígenos [56]. Durante su producción, humo líquido se filtra y se somete a procesos de fraccionamiento y de purificación para eliminar partículas y compuestos tóxicos y carcinogénicos. Por lo tanto, en general, su uso se considera que es menos perjudicial para la salud que los procesos de ahumado tradicional.

1.3.4.2.3. AHUMADO ELECTROESTATICO

En este tipo de ahumado, el producto se colocado en un túnel continuo; entre un cableado eléctrico que son cargados entre 20 a 60 KV. El humo pasa a través de este sistema y sus componentes pueden precipitar en la superficie del alimento de acuerdo a la carga que estos posean [57] [51]. A fin de garantizar la sedimentación de los componentes del humo en la superficie del producto, la etapa de ahumado es usualmente seguida por un etapa de irradiación infrarroja [53]. Este proceso ayuda a evitar la contaminación por HAP en productos alimenticios. Es un método relativamente más caro y su manejo requiere personal calificado [2].

1.3.5. PRODUCTOS CARNICOS AHUMADOS

Son elaborados esencialmente con carnes, en piezas, troceadas o picadas de grasa, tocino, sangre, menudencias comestibles que se han sometido en su proceso de elaboración a diferentes tratamientos tales como calor, secado-maduración, oreo, marinado, adobado expuestos al humo y/o adicionado de humo a fin de obtener olor, sabor y color propios. En su elaboración pueden incorporarse opcionalmente otros ingredientes, condimentos, especias y aditivos autorizados.

La variada composición de los alimentos que pueden someterse a la acción del humo, motiva los múltiples efectos que cabe esperar como consecuencia de la precipitación de las sustancias del humo y de sus reacciones con el sustrato. Solo la carne y los productos cárnicos muestran ya grandes diferencias en sus componentes reactivos.

Si dividimos las sustancias del humo en hidrófilas y lipófilas [58], es evidente que estas materias reaccionan de forma diferente con el sustrato, los productos cárnicos. La proporción de agua de la superficie conduce ya a una capacidad muy diversa para absorber el humo. Así, la proporción de fenoles en una superficie húmeda puede ser diez veces mayor que en otra seca al actuar el humo sobre ellas. La intensificación de la acción del calor; que lleva consigo el ahumado, causa modificaciones en el sustrato, las cuales suelen ser irreversibles y ejercen una influencia considerable sobre la absorción de las sustancias del humo y sobre las reacciones consecutivas.

La escala abarca desde los productos en los que apenas ha influido la acción del humo hasta aquellos otros que ofrecen un color y un aroma destacados. El efecto del humo sobre algunos embutidos crudos se reconoce más bien por el sabor del tocino no afectado de aroma rancio; las diferencias estriban en las formas de aplicación del humo frío y del caliente. Las especialidades son consecuencia de las costumbres locales y suelen estar basadas en un ahumado intenso y muy prolongado. En el norte de Alemania [85] predominan los productos ahumados en caliente, el tratamiento es de larga duración, dando origen a productos ahumados y ennegrecidos, a causa también de la precipitación de hollín, generando un incremento en el benzo[a]pireno. Pero esto no debe ser causa de inquietud mientras dicha proporción no rebase la cantidad permitida por la Comisión Europea (CE) ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) [11].

1.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o cromatografía líquida de alto desempeño, es una técnica cromatográfica usada para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica [86]. El proceso cromatografico se puede definir como la técnica de separación de transferencia de masa entre la fase estacionaria y móvil. El HPLC utiliza una fase móvil líquida para separar los componentes de una mezcla; la fase estacionaria puede ser un líquido o una fase sólida [60].

Los componentes son primero disueltos en un disolvente y luego forzado a fluir a través de una columna cromatografica bajo una presión alta; en la columna, la mezcla se separa en sus componentes. La calidad de la resolución es importante y depende del grado de interacción entre los componentes de los solutos y la fase estacionaria. La fase estacionaria se define como el material de empaque inmóvil en la columna. La interacción del soluto con las fases móviles y estacionarias puede ser manipulada a través de diferentes opciones de disolventes y fases estacionarias; como resultado, el HPLC adquiere un alto grado de versatilidad que no se encuentra en otros sistemas cromatograficos y tiene la capacidad de separar fácilmente una gran variedad de mezclas químicas [60].

1.4.1. SISTEMA HPLC

El típico sistema de HPLC consiste en los siguientes componentes:

- **Recipientes de Solvente.** Almacenan la suficiente cantidad de solventes de HPLC para la operación continua del sistema. Puede ser equipado con un sistema de desgasificación en línea y filtros especiales para aislar los solventes de la influencia del medio ambiente [60].
- **Bomba.** Este componente permite el flujo constante y continuo de la fase móvil a través del sistema, las bombas más modernas permiten controlar la mezcla de diferentes solventes de diferentes recipientes [60].

- **Inyector.** Esto permite la introducción (inyección) de la mezcla de analitos en la corriente de la fase móvil antes de entrar en la columna, los inyectoros más modernos son inyectoros automáticos, que permiten inyecciones programadas de diferentes volúmenes de muestras que se retiran de los viales en la bandeja del muestreador automático [60]
- **Columna.** Este componente es el corazón del sistema HPLC, puesto que es en ella se produce la separación de los analitos de la mezcla. Es el lugar donde la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria, formando una interfaz con una superficie enorme [60].

El desarrollo de la mayor parte de la cromatografía en los últimos años se ha dirigido a para mejorar este contacto de interface. Actuales columnas de HPLC en la mayoría de los casos son un tubo de acero inoxidable lleno de pequeñas partículas de material poroso rígido (1-5.µm), el material de empaque se mantiene dentro de la columna con un especial accesorio final equipado con fritas permeables que permita las conexiones de la línea de líquido (para ofrecer fase móvil a la columna) [60].

- **Detector.** Este es un dispositivo para el registro continuo de las propiedades físicas específicas (a veces química) de la columna de efluentes. Uno de los detectores más utilizados es el UV (ultravioleta), que permite la monitorización y registro continuo de la absorbancia UV a una longitud de onda seleccionada o en un lapso de longitudes de onda (detector de diodos). Si el analito absorbe más que el fondo (fase móvil), se obtiene una señal positiva [60].
- **Sistema de control y adquisición de datos.** El Sistema informático controla todos los parámetros del instrumento HPLC (composición del eluyente, mezcla de diferentes solventes, la temperatura, las secuencias de inyección, etc.) y adquiere los datos del detector, monitorea el rendimiento del sistema (control continuo de la composición de fase móvil, la temperatura, contrapresión, etc.) [60].

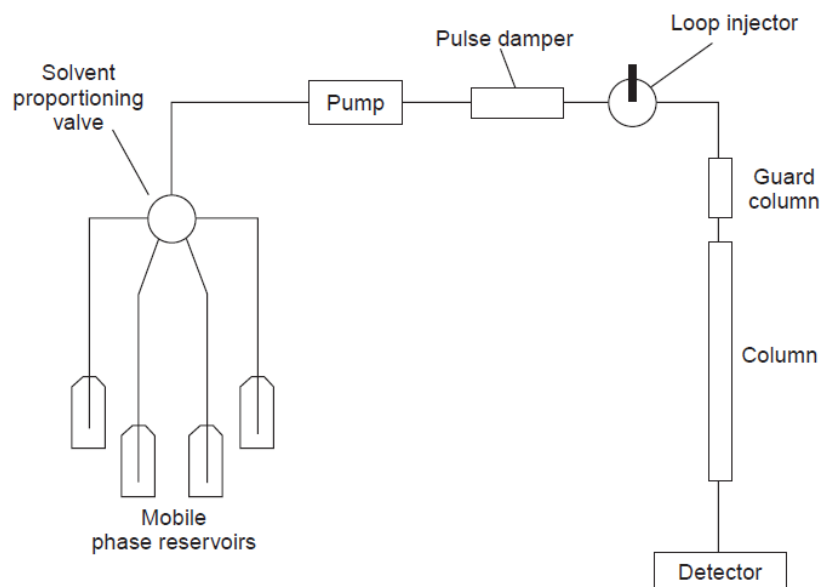


Figura 3. Esquema del sistema de HPLC. [88]

1.4.2. TIPOS DE HPLC

Dependiendo del mecanismo de separación y la naturaleza de la fase estacionaria la cromatografía líquida de alta resolución puede ser:

- a) **Cromatografía de fase normal.** La separación de los analitos se da de acuerdo a la polaridad, la fase móvil es no polar (como el n-hexano) y la fase estacionaria es de naturaleza polar (como el gel de sílice), de esta manera se retiene el analito en la fase estacionaria, aumentando su adsorción mientras más polar sea [59].
- b) **Cromatografía de fase reversa.** Esta es la más utilizada consta de una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar, como proporciones de agua y metanol o acetonitrilo, El tiempo de retención aumenta para moléculas no polares. Para aumentar la calidad de la cromatografía se suelen usar soluciones buffers de ácidos orgánicos como ácido trifluoracético [59].
- c) **Cromatografía de exclusión por tamaño.** La columna se llena con material que tiene un tamaño de poro definido, la muestra es filtrada de acuerdo a su tamaño molecular solvatado; las moléculas mas grandes son rápidamente pasadas a través de la columna; las moléculas pequeñas penetran en el interior de la porosidad de las

partículas de embalaje y eluyen después. Esta técnica también es conocida como filtración en gel o cromatografía en gel [59].

- d) **Cromatografía de intercambio iónico.** La fase estacionaria tiene una superficie de carga iónica opuesta a los iones de la muestra; esta técnica se utiliza casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables; cuanto más fuerte sea la carga de la muestra, mas fuerte será atraído a la superficie iónica y por tanto, más tiempo tendrá para eluir. La fase móvil es un tampón acuoso donde se utiliza tanto pH y fuerza iónica para controlar el tiempo de elución [59].

La polaridad del eluyente desempeña un papel principal en todos los tipos de HPLC. Hay dos tipos de elución: isocrática y gradiente. En el primer tipo, la composición del eluyente constante es bombeada a través de la columna durante todo el análisis. En el segundo tipo, la composición de eluyente está en constante cambio durante la corrida [60].

1.4.3. FASES MOVILES

El orden de elución de los solutos en HPLC se rige por la polaridad; en una separación de fase normal los solutos menos polares pasan proporcionalmente menos tiempo en la fase estacionaria polar y son los primeros en eluir de la columna. Los tiempos de retención se controlan mediante la selección de la fase móvil, una fase móvil menos polar llevan a tiempos de retención más largos; por ejemplo, una separación es pobre porque los solutos están eluyendo con demasiada rapidez, el cambio a una fase móvil menos polar lleva a tiempos de retención más largos y más oportunidades para una separación aceptable [61].

Cuando dos solutos tienen adecuada resolución en cambio a una fase móvil más polar puede proporcionar una separación aceptable con un tiempo de análisis más corto. En una separación de fase inversa el orden de elución se invierte, siendo los solutos polares los primeros en eluir. El aumento de la polaridad de la fase móvil lleva a tiempos de retención más largos, mientras que tiempos de retención más cortos requieren de una fase móvil de baja polaridad [61].

Tabla 6. Propiedades de la fase móvil de HPLC

Mobile Phase	Polarity index (P')	UV Cutoff (nm)
cyclohexane	0.04	210
<i>n</i> -hexane	0.1	210
carbon tetrachloride	1.6	265
<i>i</i> -propyl ether	2.4	220
toluene	2.4	286
diethyl ether	2.8	218
tetrahydrofuran	4.0	220
etanol	4.3	210
ethyl acetate	4.4	255
dioxane	4.8	215
metanol	5.1	210
acetonitrile	5.8	190
water	10.2	--

Fuente: Harvey, 2000. [61]

La Tabla 6 proporciona valores para el índice de polaridad, P' , de varias fases móviles de uso general, en las que mayores valores de P' corresponden a solventes más polares [61]. Fases móviles de polaridad intermedia se puede formar mediante la mezcla de dos o más de las fases móviles.

1.4.4. PARAMETROS DEL HPLC

➤ Volumen de retención

La distancia máxima del pico desde el punto de inyección se expresa en unidades de tiempo y se denomina tiempo de retención (t_R), y sirve como un identificador para el analito dado en un sistema en particular. El tiempo de retención es probablemente el descriptor más utilizado para el comportamiento del analito, y es el parámetro más fácil de medir. Sin embargo, es el menos universal [61].

El tiempo de retención del compuesto depende del flujo de la fase móvil, mientras más rápida sea la velocidad de flujo, menor será el tiempo de retención del analito. Es también dependiente de la estabilidad del tipo de flujo. El producto del tiempo de retención del analito y el flujo de la fase móvil es el volumen de retención (V_R) volumen de retención V_R del compuesto que es el descriptor más universal del comportamiento de analito en el sistema cromatografico, ya que es menos dependiente de los parámetros instrumentales [61].

➤ Volumen de vacío

Incluso si el analito no interacciona con la fase estacionaria, no aparecerá en el detector inmediatamente después de la inyección. Una columna HPLC está llena de pequeñas partículas de material poroso que tienen un volumen significativo de la fase líquida entre las partículas y el interior de su espacio poroso, por lo que el analito no interactúa todavía, y tiene que viajar a través de este volumen antes de entrar en el detector [61].

El volumen de la fase líquida de la columna se llama "volumen vacío" (V_0); también llamado en literatura "volumen muerto", "volumen de retención", entre otros. En un sistema particular de HPLC en el que el sistema ofrece un flujo (F) constante y estable, se puede convertir el volumen de retención (V_R) y el volumen vacío (V_0) en el tiempo de retención (T_R) y un tiempo vacío (t_0).

El tiempo vacío puede interpretarse como parte del tiempo de retención total del analito, tiempo que el analito en realidad pasa por la fase móvil moviéndose a través de la columna, y para el resto del tiempo de retención del analito se encuentra en la superficie de la fase estacionaria [61].

➤ Factor de retención

La retención del analito se compone de dos partes: (1) el tiempo que el componente se encuentra en la fase móvil y en realidad se mueve a través de la columna y (2) el momento en el que el analito es retenido en la fase estacionaria [61].

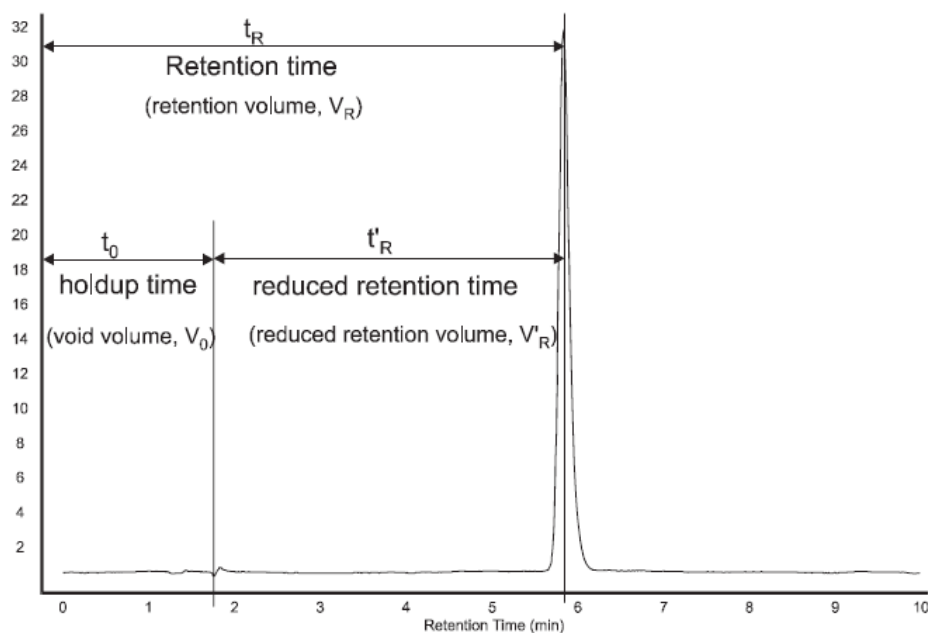


Figura 4. Parámetro de retención del analito. [61]

La diferencia entre el tiempo de retención total (T_R) y el tiempo muerto se llama tiempo de retención reducido (t'_R), el volumen de retención reducida V'_R corresponde a la diferencia entre el volumen de retención del analito y el volumen del vacío. La relación entre el volumen de retención reducido y el volumen vacío es un parámetro dimensional ampliamente usado llamado factor de retención, k . [60].

➤ Selectividad

La capacidad del sistema cromatográfico para discriminar diferentes analitos se llama selectividad (α). La selectividad se determina como la relación entre los factores de retención de dos analitos, o la relación entre los tiempos de retención reducidos.

El aumento de la selectividad en el desarrollo de la separación de una mezcla compleja es la meta principal de cualquier cromatografo, porque si la selectividad para el par: de analitos es igual a 1, entonces no importa cómo delimitar picos o la velocidad de su separación, no se podrá separar estos componentes hasta aumentar la selectividad [60].

➤ Eficiencia

Un analito se inyecta en la columna en forma de zona muy pequeña con una distribución uniforme de la sustancia analizada dentro de esta zona. Si bien esta zona se está moviendo a través de la columna, se amplía el grado de esta banda, llamándose ampliación de la eficiencia. Hay varias teorías diferentes (aproximaciones matemáticas) utilizados para la descripción de la ampliación de la banda. Martin y Synge, introdujo la teoría de platos para la evaluación de la eficiencia de la columna [60].

La teoría de los platos supone que el analito se encuentra en el equilibrio con la fase estacionaria y la columna se divide en una serie de platos hipotéticos; cada plato tiene una altura finita (altura de plato teórico eficaz, HETP), y un analito pasa un tiempo finito en este plato, este se considera que es suficiente para alcanzar el equilibrio. Cuanto menor sea la de altura de la placa o mayor es el número de placas, más eficiente será el intercambio del analito entre las dos fases, y mejor será la separación. Es por ello que la eficiencia de la columna se mide en el número de platos teóricos [60].

➤ Resolución

La distancia máxima entre los picos refleja la selectividad del sistema. Cuanto mayor sea la distancia, mayor es la selectividad, la anchura del pico cromatográfico refleja la ampliación de la banda del sistema y por lo tanto la eficiencia. La resolución, R , se define como la razón de la distancia entre dos picos a la anchura media de estos picos (en la línea base), este parámetro abarca tanto la eficiencia y la selectividad [60].

1.5. LA EXTRACCION ASISTIDA POR ULTRASONIDOS (EAU) EN LA PREPARACION DE MUESTRAS

Los procedimientos tradicionales de preparación de muestras para el análisis de contaminantes consisten en una etapa de extracción con solvente o digestión, generalmente seguida por una purificación del extracto en el caso de contaminantes orgánicos; considerándose éstas, etapas cruciales durante el proceso analítico. Los métodos tradicionales aparte de ser laboriosos, implican mucho tiempo y por lo general consumen grandes cantidades de solventes. Como consecuencia de ello, una variedad de

métodos de preparación de muestras se han desarrollado a lo largo las últimas décadas con los objetivos de mejorar las técnicas de extracción así como reducir los costos y tiempos de análisis.

Durante los últimos años, se han desarrollado varias técnicas rápidas de extracción con el fin de superar las limitaciones de los métodos convencionales. Extracción con líquidos presurizados (PLE), también llamado extracción acelerada con disolventes (ASE), y la extracción asistida por microondas (MAE) son técnicas que se puede utilizar para la extracción de compuestos orgánicos en lugar de la extracción Soxhlet, ya que son más rápidos en comparación con la cantidad de horas necesarias para la extracción Soxhlet y, a su vez, requieren mucho menos disolvente [62].

Dependiendo de la matriz existen diversas metodologías de extracción entre las cuales se tienen para matrices acuosas la extracción liquido-liquido con embudo de separación, extracción liquido-liquido continua y la extracción en fase sólida [63]. Para matrices sólidas existe el método de extracción soxleht, extracción de fluidos presurizados, extracción por microondas, extracción con fluidos supercríticos y la extracción asistida por ultrasonido [63].

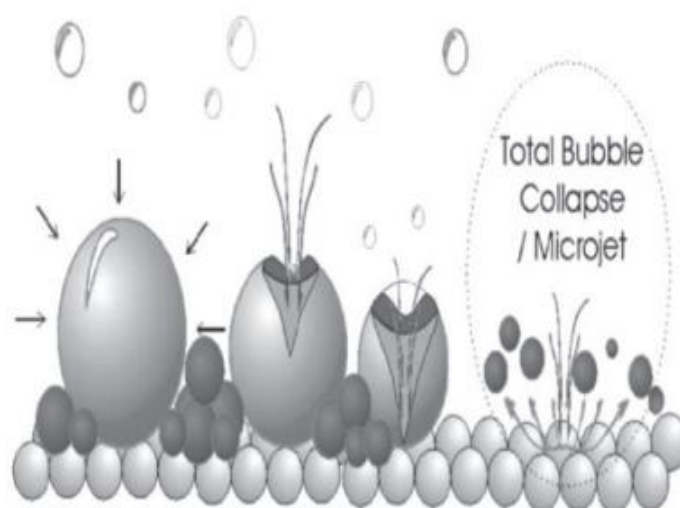


Figura 5. Representación esquemática del colapso de la burbuja en una superficie sólida [65].

La energía de ultrasonidos provoca un efecto conocido como cavitación, que genera un gran número de diminutas burbujas en medios líquidos y erosión mecánica en sólidos,

incluyendo la ruptura de las partículas (Figura 5). La sonicación ofrece un contacto eficiente entre el sólido y el agente de extracción, por lo general resultando una buena recuperación del analito [64]. La sonicación es utilizado en la preparación de muestras para ayudar al tratamiento de muestras sólidas, en la extracción, la digestión y formación de suspensiones, así como en la preparación de la muestras líquidas para ayudar a la extracción líquido-líquido (LLE), homogeneización o emulsificación.

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) se utiliza para la extracción de analitos de muestras sólidas, la aplicación de la radiación de ultrasonido se puede realizar a través de un baño de agua o con otros dispositivos, tales como sondas, o sonoreactores [66]. La fuente más barata y disponible de irradiación de ultrasonidos es el baño de ultrasonidos [67], pero en la actualidad se ha desarrollado sistemas más eficiente para la sonicación de muestras; como la sonda cilíndrica [68]. La elección entre los baños de ultrasonidos y la sonda dependerá de los requerimientos para la análisis de los contaminantes. Si el objetivo es la extracción total sólido líquido, el uso de una sonda podría ser mejor porque el tiempo necesario para la extracción sería menor, sin embargo, cuando un gran número de muestras necesitan ser analizadas el baño de ultrasonidos es la mejor opción [62].

1.5.1. PRINCIPIOS DE LA EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO

Los ultrasonidos comprenden ondas mecánicas que necesitan un medio elástico (sólido, líquido o gaseoso) para propagarse. La diferencia entre el sonido y el ultrasonido es la frecuencia de la onda; la frecuencia audible para el oído humano están entre (16 Hz a 16 - 20 kHz) mientras que el ultrasonido tiene frecuencias superiores a la audición humana pero por debajo de las frecuencias del microondas (de 20 kHz a 10 MHz). Según el uso que se le da a los ultrasonidos se pueden distinguir dos grupos: alta intensidad y baja intensidad [69] [70].

Los ultrasonidos de baja intensidad - alta frecuencia (100 kHz - 1 MHz), de baja potencia (típicamente $< 1 \text{ W/cm}^2$); están involucrados en el análisis no destructivo, en particular para la evaluación de calidad. Esta técnica se aplica más comúnmente como una técnica analítica para proporcionar información sobre las propiedades físico-químicas de los alimentos (por ejemplo, la firmeza, la madurez, contenido de azúcar y la

acidez). Sin embargo, los ultrasonidos de alta intensidad - baja frecuencia (16 - 100 kHz) de alta potencia (típicamente 10 - 1000 W/cm²) - pueden alterar las propiedades física o químicamente de los alimentos [71] [69]. Los ultrasonidos de alta intensidad se utilizan, entre otras aplicaciones, para acelerar y mejorar la eficiencia de la preparación de muestras.

1.5.2. EFECTOS DEL ULTRASONIDO

Las ondas de sonido son vibraciones mecánicas que necesitan un medio para viajar. Por lo tanto, al estar en movimiento dichas ondas, crean ciclos de expansión y de compresión dentro del medio. En un ciclo de expansión, las moléculas se separan mientras que en un ciclo de compresión estas se juntan [72].

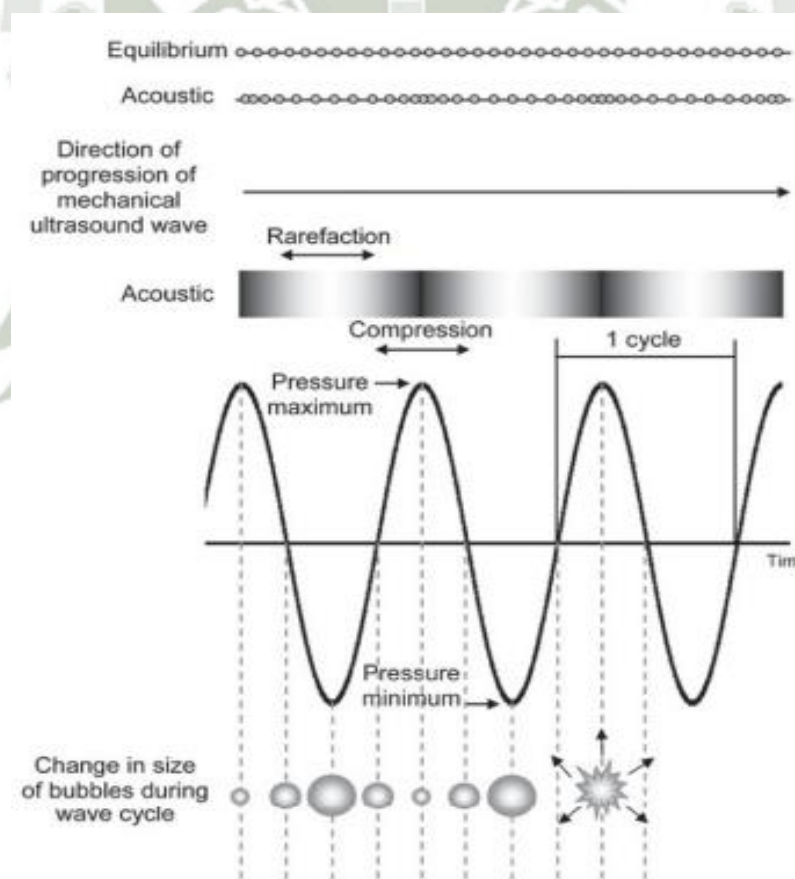


Figura 6. Desarrollo y colapso de las burbujas por cavitación [65] [73]

En un líquido, el ciclo de expansión produce una presión negativa; si el ultrasonido es lo suficientemente fuerte como el ciclo de expansión puede crear burbujas y cavidades en

el líquido. Esto es así cuando la presión negativa ejercida excede la tensión de tracción local del líquido, que varía dependiendo de la naturaleza y la pureza. El proceso por el cual las burbujas de vapor crecen y experimentan un colapso implosivo es conocido como cavitación. Todo el proceso se lleva a cabo en 400 microsegundos aproximadamente [72].

De hecho, la cavitación es un proceso nucleado. En otras palabras, se produce en los puntos débiles pre-existentes, tales como grietas de gas en las partículas en suspensión, en líquidos y la mayoría de los líquidos que incluyen suficientes cantidades de pequeñas partículas para la cavitación [74].

Después de cierto tiempo, las burbujas no pueden continuar absorbiendo la energía del ultrasonido y no pueden crecer y así colapsan (Figura 6). Una rápida compresión adiabática de gases y vapores dentro de las burbujas producen altas temperaturas y presiones alrededor de 5000 °C y 2000 atm (Figura 7) [70] [72] [75], llamados puntos calientes (Hot spots).

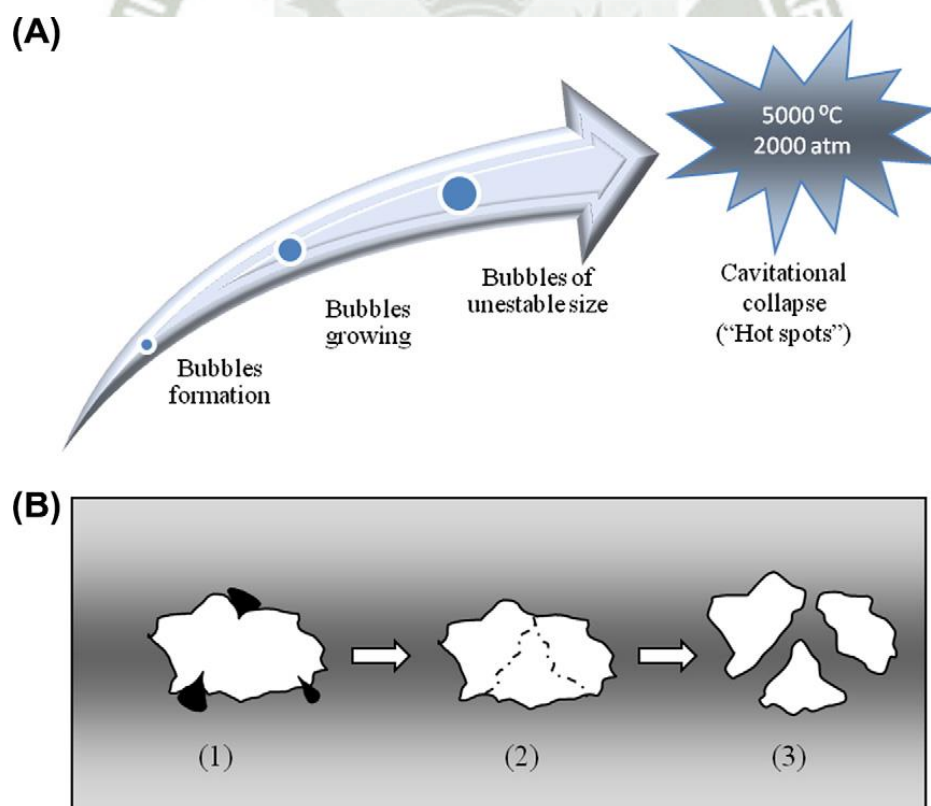


Figura 7. Fenómeno de cavitación. (A) Desarrollo y colapso de las burbujas por cavitación. (B) Colapso cavitacional en la interface solido-líquido. [75].

Sin embargo, esta extremada alta cantidad de calor producido no puede afectar las condiciones del medio, ya que las burbujas son muy pequeñas y el calor se disipa en un periodo de tiempo muy corto. En otras palabras, la velocidad de enfriamiento después de la implosión de la burbuja se ha estimado en 10 billones de °C por segundo [72].

La extracción asistida por ultrasonido depende de los efectos destructivos de las ondas ultrasónicas. Las posibles ventajas del ultrasonido en la extracción son: la intensificación de la transferencia de masa, la disrupción celular, la penetración mejorada y efectos capilares [76].

Mejora en la transferencia de masa debido a la creación de temperaturas muy altas y efectivas, las cuales aumentan la solubilidad y difusividad, y las presiones que favorecen la penetración y el transporte [72].

1.5.3. EXTRACCION ASISTIDA POR SONICACION EN PEQUEÑAS COLUMNAS

Una técnica de extracción en miniatura basado en la radiación de ultrasonidos, llamado extracción asistida por sonicación en pequeñas columnas (sonication assisted extraction in small columns - SAESC), fue desarrollado para la determinación de contaminantes orgánicos en el suelo por Sánchez-Brunete et al. [77].

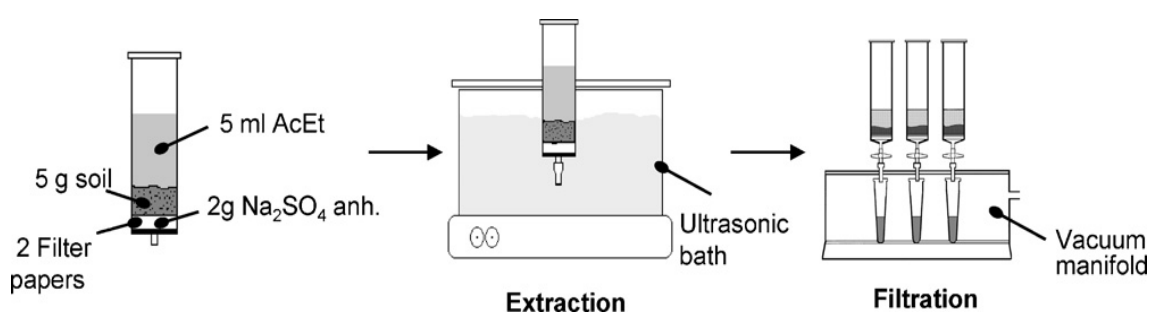


Figura 8. Esquema de la SAESC (sonication assisted extraction in small columns) [62].

En la Figura 8 se muestra un diagrama esquemático de la extracción de muestras de suelo utilizando SAESC. Es un método simple, utiliza bajos volúmenes de solvente, También ha sido utilizado para la extracción de plaguicidas en suelos [78].

1.6. ANALISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Dijinovic y colaboradores [79] en el año 2008, cuantificaron por medio de cromatografía de gases y espectrometría de masas la cantidad de benzo[a]pireno formado durante el asado de la carne, cuando se utilizaba carbón procedente de diez tipos de madera distintos, los investigadores concluyeron que efectivamente el tipo de madera empleada en el asado influye sobre la cantidad formada de este compuesto en la carne, los valores más bajos se encontraron con las maderas de manzano y aliso ($6.04 \mu\text{g kg}^{-1}$) y los más altos, cuando se utilizó la madera de pino (*Picea conífera*) (en el intervalo de $47.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $470,91 \mu\text{g kg}^{-1}$) [19].

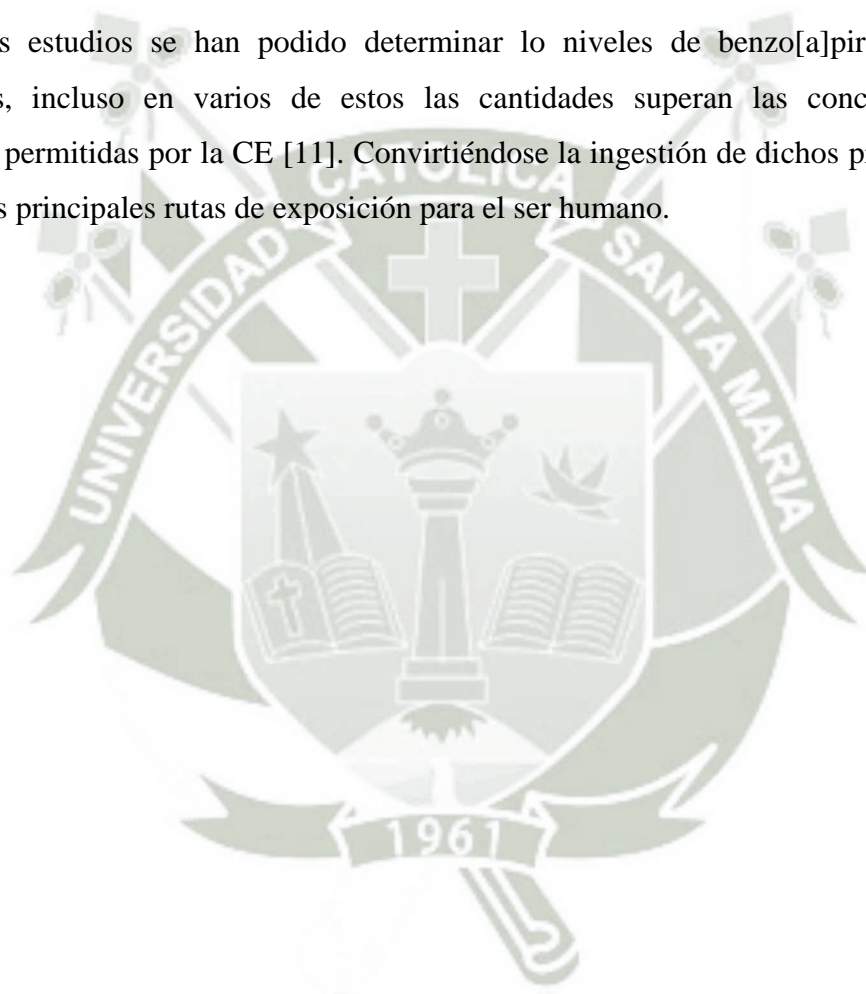
Jira y colaboradores [80] en el año 2008, determinaron hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en productos cárnicos ahumados y aceites comestibles. El nivel máximo de benzo[a]pireno encontrado fue en la carne de cerdo ahumado con $17.63 \mu\text{g kg}^{-1}$ encima del máximo permitido por la comisión europea (CE) [11].

Wretling y colaboradores [20] en el año 2010, cuantificaron hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en carne y pescado ahumado en Suecia, 38 muestras de carne y 39 de pescado ahumado fueron analizadas por cromatografía de gases de alta resolución acoplado a un espectrofotómetro de masas (HRGC-MS). Los resultados mostraron que nueve muestras de carnes ahumadas presentaron niveles elevados de benzo[a]pireno que varían desde $6.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ hasta $36.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ superando el nivel máximo permitido de $5.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ [11]. En las muestras de pescado ahumado los niveles de benzo[a]pireno también superaban lo permitido con $8.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $14.4 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Reinik y colaboradores [5] en el año 2013, determinaron hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en productos cárnicos de Estonia, para lo cual analizaron 322 productos cárnicos curados comerciales y 14 muestras de carne a la parrilla, como parte del programa de vigilancia de seguridad alimentaria en Estonia. Concluyendo que el 3.4 % de las muestras superaban el nivel máximo permitido para benzo[a]pireno y el nivel máximo para dicho contaminante fue de $31.20 \mu\text{g kg}^{-1}$. Las mayores concentraciones de HAP se detectaron en muestras de carne de cerdo a la parrilla.

Essumang y colaboradores [81], en el año 2012, cuantificaron mediante cromatografía de gases (GC/MS) hidrocarburos aromáticos policíclicos en 108 muestras de pescado. El nivel máximo de benzo[a]pireno encontrado fue de $73.78 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor muy por encima del permitido por la CE [11]. Los autores, resaltan el peligro de consumir pescado ahumado, por las altas concentraciones encontradas de HAP en Ghana, entre ellos el benzo[a]pireno, debido a su potencial cancerígeno; así también sugieren buscar otras alternativas de ahumado que no sea el ahumado tradicional [81].

En varios estudios se han podido determinar los niveles de benzo[a]pireno en los alimentos, incluso en varios de estos las cantidades superan las concentraciones máximas permitidas por la CE [11]. Convirtiéndose la ingestión de dichos productos en una de las principales rutas de exposición para el ser humano.



CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. CAMPO DE VERIFICACION

2.1.1. UBICACIÓN ESPACIAL

- Laboratorio del “Proyecto Mercurio” de la Universidad Católica Santa María Pabellón H-202.
- Establecimientos fijos de expendio de productos cárnicos ahumados en la ciudad de Arequipa.

2.1.2. UBICACION TEMPORAL

La ejecución del proyecto de investigación estará comprendida entre los meses de noviembre (2015) a marzo (2016).

2.1.3. UNIDADES DE ESTUDIO

- Productos cárnicos ahumados de 12 empresas distintas y de tres lotes diferentes cada una.

Tabla 7. Unidades de estudio

Población	Muestras
Productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa	36 productos cárnicos ahumados

2.2. TECNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACION

2.2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Merck Hitachi.
- Columna cromatografica RP-18 Thermo Scientific Hypersil Gold 250 x 4 mm con un tamaño de partícula 4 μm .
- Equipo ultrasonido Brandson[®] 2510E-DTH, frecuencia de 42 kHz \pm 6%
- Equipo Barnstead[®] Easy Pure II (agua 18.2 M Ω).
- Balanza analizadora de humedad Sartorius MA 45 (\pm 0.001 g)
- Balanza analítica OHAUS Pioneer Serie N° PA 214 (\pm 0.0001 g)
- Refrigeradora
- Bomba de aire
- Bomba de vacío
- Micropipetas
- Material de vidrio
- Fiolas ámbar
- Viales ámbar
- Filtros anotop de 0.45 μm .
- Filtros de fibra de vidrio de 0.45 μm x 47 mm.
- Estandar de benzo[a]pireno \geq 96 % grado HPLC (Sigma Aldrich)
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Hexano Macron chemicals
- Agua ultrapura 18.2 M Ω
- Sulfato de sodio anhidro
- Agua destilada
- Jeringas descartables de 20 mL
- Jeringas de tuberculina de 1 mL
- Bomba de aire AP – 500 Aquarium
- Cooler klimber 8L
- Gel Refrigerante Blue Ice Rubbermaid

2.2.2. ANALISIS Y METODOLOGIA

2.2.2.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras serán recolectadas de establecimientos fijos de expendio de productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa; todas las muestras serán recolectadas de 3 lotes diferentes, así también de distintas marcas, teniendo en cuenta la cadena de frío para su traslado hasta su respectivo análisis.

2.2.2.2. DETERMINACION DE BENZO[a]PIRENO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Las condiciones cromatograficas serán modificadas de acuerdo a los resultados obtenidos.

A) ESPECIFICACIÓN:

El tiempo de retención del principio activo en la muestra debe corresponder al estándar trabajado en las mismas condiciones según el método de HPLC para valoración.

B) VALORACION DE BENZOPIRENO

Método: Cromatografía Líquida (HPLC)

C) SISTEMA CROMATOGRAFICO

Equipo:

a) (HPLC) MERCK-HITACHI (Primaide)	
Detector Array Diode	: 1430
Column Oven	: 1310
Pump	: 1110

Columna Cromatográfica: RP-18 Thermo Scientific Hypersil Gold 250 mm x 4 mm

D) CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Longitud de onda	: 254 nm
Flujo	: 2.0 mL/min
Volumen de inyección	: 20 - 100 μ L
Temperatura de trabajo	: 25°C

Fase móvil: Acetonitrilo: agua (80:20). Mezclar y filtrar por membrana de fibra de vidrio de 0.45 μ m x 47 mm.

PROCEDIMIENTO

Solución estándar:

Transferir aproximadamente 1 mg de benzo[a]pireno estándar de referencia, pesados con exactitud, a una fiola ambar de 10 mL, agregar 6 mL de acetonitrilo, sonicar por 10 minutos hasta completa disolución; llevar a temperatura ambiente y completar a volumen con acetonitrilo, homogeneizar. Transferir 100 μ L de la solución anterior a fiola ambar de 10 mL enrasar a volumen con acetonitrilo, mezclar y filtrar con filtros anotop 0.45 μ m. (concentración aproximada: 1 mg L⁻¹).

2.2.2.3.DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS AHUMADOS

La determinación del contenido de humedad (%) se basara en base al método de la termobalanza [82], método establecido para la determinación de la humedad en alimentos.

A) FUNDAMENTO

La humedad es tomada como la pérdida de peso al secado, usando un instrumento de humedad, el cual emplea una balanza de torsión sensible para pasar la muestra y una lámpara infrarroja para secar [82].

B) PROCEDIMIENTO

Soltar el sujetador del plato para muestra, revisándolo para asegurarse de que el plato corre libremente sobre su soporte finamente punteado, y que esté limpio y seco. Ajustar al 0 y 100 %; colocar 5 g de la muestra pesada en la misma balanza y distribuirla cuidadosamente y uniformemente en el platillo, bajar la tapa de la balanza. La muestra comenzará a perder humedad y la manecilla se moverá hacia arriba. Después de pasado un tiempo de 10 a 20 minutos, deberá tomarse la lectura, y si ésta permanece constante durante 2 minutos se registrará como porcentaje total de humedad [82].

2.3. ESTRATEGIA DE RECOLECCION DE DATOS

El proyecto de investigación planteado tiene como finalidad la identificación y cuantificación de benzo[a]pireno en productos cárnicos de la ciudad de Arequipa para lo cual se realizara en dos etapas: en la primera se procederá a la establecimiento de las condiciones cromatograficas y validación del método analítico para la determinación de benzo[a]pireno; en la segunda se realizara el monitoreo de los productos cárnicos ahumados expendidos en la ciudad de Arequipa de diferentes marcas y lotes para realizar su cuantificación.

2.3.1. ANALISIS ESTADISTICO.

Una vez obtenido los datos del monitoreo se determinaran los siguientes parámetros estadísticos [83] [84]:

➤ Análisis de Varianza

El análisis de varianza (ANOVA) a utilizar es un ANOVA con diseño de bloques completos al azar (DBCA) considerándose tres fuentes de variabilidad: el factor entre grupos, el factor entre bloques y el error aleatorio, es decir, se tiene tres posibles causas de la variabilidad en los datos. Como algunos ejemplos de factores de bloqueo tenemos: lote, día, tipo de material, operador, método, etc. [84]. El bloqueo busca minimizar la variabilidad de las unidades experimentales dentro del bloque y así evitar que los efectos de los tratamientos se vean enmascarados por la heterogeneidad de las unidades experimentales a las cuales se asignan los tratamientos de interés [85].

Tabla 8. Fórmulas para un ANOVA con un Diseño de Bloques Completos al Azar.

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F
Entre grupos	SCTr	K-1	$CMT_r = \frac{SCT_r}{K-1}$	$\frac{SCT_r}{CME}$
Entre Bloques	SCB	B-1	$CMB = \frac{SCB}{B-1}$	$\frac{CMB}{CME}$
Error	SCE	(K-1)(B-1)	$CME = \frac{SCE}{(K-1)(B-1)}$	
Total	SCT	N-1		

Dónde: N: Numero de datos; K: Numero de tratamientos; B: Numero de bloques

Para analizar las medias entre lotes dentro de una misma muestra se utilizó un ANOVA de una vía

Tabla 9. Fórmulas para un ANOVA de una vía

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F
Entre grupos	SCE	K-1	$CME = \frac{SCE}{K-1}$	$\frac{CME}{CMD}$
Dentro de grupos	SCD	N-K	$CMD = \frac{SCD}{N-K}$	
Total	SCT	N-1		

Dónde: N: Numero de datos; K: Numero de tratamientos.

➤ Prueba de Especificidad: LSD (Least significant difference) [84].

Si en el análisis de varianza los resultados obtenidos fueran significativamente diferentes, se procederá a identificar estadísticamente cuál de ellos es más específico o cuál de ellos presenta mayor concentración de benzo[a]pireno; de no hallarse significancia en el ANOVA no será necesario ninguna prueba de especificidad.

Esta prueba se recomienda para datos analíticos, y se calcula con la siguiente expresión:

$$LSD = t_{95\%,(K-1)(B-1)} \sqrt{\frac{2}{B} CME}$$

Dónde: K: Numero de tratamientos; B: Numero de bloques; CME: Cuadrado medio del error.

2.3.2. ORGANIZACION

- Permisos para acceso y uso del laboratorio del “Proyecto Mercurio”, pabellón H, laboratorio 202.
- Recolección de las unidades de estudio.
- Preparación de las unidades de estudio.
- Evaluación y monitoreo

2.3.3. RECURSOS

A) Recursos humanos

- Investigador: Bach. Luis Miguel Lipa Mamani

B) Recursos físicos

- Laboratorio del “Proyecto Mercurio”, pabellón H, laboratorio 202.
- Biblioteca de Ingenierías de la Universidad Católica de Santa María.

- Biblioteca de Ingenierías de la Universidad Nacional de San Agustín
- Biblioteca de la Escuela de Posgrado de la Universidad Católica de Santa María.

C) Recursos económicos

- Propios

2.3.4. VALIDACION ANALITICA DEL METODO

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece mediante estudio de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas [86]. El objetivo de la validación de un procedimiento analítico cumple con los requisitos necesarios para la determinación analítica.

Para la validación los parámetros que se determinaran serán: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación.

A) Linealidad

La linealidad de un método analítico es la capacidad para obtener resultados proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en un intervalo dado [87]

El estudio de la linealidad no solo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Para realizar la evaluación estadística de la linealidad se considera la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación:

$$Y = a + bx$$

Dónde:

y: Valor medido en el ensayo

b: Valor de la pendiente

x: Concentración (mg L^{-1})

a: Término independiente (intercepto)

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo a y b los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, X_i la concentración y Y_i el valor medido en el ensayo.

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}\right)}}$$

El coeficiente de correlación (r) nos indica el grado de relación entre la variable X y la variable Y. Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. En la práctica, r es generalmente mayor de 0.99. La información obtenida mediante el cálculo del (r) es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo el coeficiente de determinación (r^2) el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de “y” explicada por el modelo.

Sin embargo, también podría ser utilizado como un buen indicador del modelo un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t con n- 2 grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido.

$$t_r = \frac{[r] \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Si el valor observado de test mayor que tabla, la correlación es lineal significativa con la probabilidad calculada.

B) Precisión:

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor central y corresponde de concordancia entre los ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea [88].

El objetivo del estudio es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Los factores a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, etc.) de aquí a importancia del estudio de la precisión.

- **Repetibilidad:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio en un periodo de tiempo corto.

La precisión de un método se expresa matemáticamente como el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (DSR) y se calcula de la siguiente manera:

$$CV (\%) = \frac{s}{x} * 100$$

Dónde:

S: Desviación estándar

X: Media aritmética de los resultados

Además se recomienda tomar en cuenta los intervalos de confianza en el estudio de la precisión.

Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiada.

Los intervalos de confianza se calculan a partir de:

$$x \pm t * s$$

Dónde:

x: media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.

t: Valor de la t de Student de tablas para n-1 grados de libertad y $\alpha=0.05$

s: Desviación estándar

En la Tabla 10 se observan los valores aceptables de coeficiente de variabilidad (CV) respecto a una concentración determinada.

Tabla 10. Valores aceptables del coeficiente de variabilidad según AOAC

Concentración	Coeficiente de variación (CV)
100 %	1 %
10 %	1.5%
1 %	2 %
0.1 %	3 %
0.01%	4 %
10 µg/g (ppm)	6 %
1 µg/g	8 %
10 µg/kg (ppb)	15 %

Fuente: AOAC, 2002 [88]

C) Exactitud:

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado (promedio) [88].

La exactitud se expresó en porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra.

$$\text{Porcentaje de recuperación (R)} = \frac{cc \text{ hallada}}{cc \text{ teorica}} \times 100$$

En la Tabla 11, se presentan los valores de recuperación aceptables según la AOAC [88].

Tabla 11. Límites de porcentaje de recuperación según la AOAC.

Concentración	Límites de Recuperación
100 %	98-101%
10 %	95-102%
1 %	92-105%
0.1 %	90-108%
0.01%	85-110%
10 ug/g (ppm)	80-115%
1 ug/g	75-120%
10 ug/kg (ppb)	70-125%

Fuente: AOAC, 2002 [88]

D) Límites de cuantificación y detección LDQ, LDD:

Límite de cuantificación (LDQ):

Se entiende por límite de cuantificación a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar con una adecuada precisión y exactitud [88].

$$LDQ = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de detección (LDD):

Se entiende por límite de detección a la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cumple con precisión y exactitud [88].

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Dónde:

Y_{bl}: Estimador de la respuesta del blanco para calcular el LDQ y LDD.

S_{bl}: Estimador correspondiente a la desviación estándar del blanco.

b: pendiente de la recta.

n: número de muestras

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

I. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

1.1. PREPARACION DE LA SOLUCION ESTANDAR

Para la preparación de la solución estándar inicial se utilizó el estándar de benzo[a]pireno $\geq 96\%$ grado HPLC adquirido de Sigma Aldrich (Figura 9), se transfirió aproximadamente 1 mg del estándar de benzo[a]pireno, pesados con exactitud, a una fiola ambar de 10 mL, se agregó 5 mL de acetonitrilo, luego se sónico por 10 minutos hasta completa disolución en un equipo ultrasonido Brandson[®] 2510-E; posteriormente se completó el volumen con acetonitrilo y se homogenizó. Se transfirió 100 μL de la solución anterior a una fiola de 10 mL se enrazo con acetonitrilo, se mezcló y filtró utilizando filtros anotop de 0.45 μm de porosidad. (concentración aproximada: 1 mg L^{-1}).

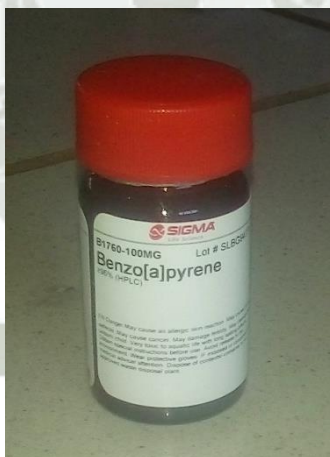


Figura 9. Estándar de benzo[a]pireno grado HPLC

Después de haber preparado la solución estándar se procedió a inyectar 20 μL usando una jeringa de capacidad de 100 μL ; teniendo en cuenta las siguientes condiciones cromatográficas para la determinación de benzo[a]pireno.

1.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA DETERMINACION DE BENZO[a]PIRENO

Se empleó un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución HPLC Merck Hitachi, constituido por una bomba de gradiente modelo 1110, un detector con arreglo de diodos modelo 1430, un horno para la columna 1310. Para la separación del sistema cromatográfico se utilizó una columna RP-18 Thermo Scientific Hypersil Gold 250 x 4 mm con un tamaño de partícula 4 μm . En la Tabla 12 se observa las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de benzo[a]pireno.

Tabla 12. Condiciones cromatográficas para la determinación de benzo[a]pireno

Condiciones cromatográficas	Valores
Tiempo de retención	4.37 min
Longitud de onda	254 nm
Temperatura de trabajo	25 °C
Flujo	2 mL min ⁻¹
Fase móvil	Acetonitrilo (80%) y agua ultrapura (20 %)
Volumen de inyección	20 μL

Fuente: Elaboración propia, 2016.

En la Figura 10 se observa el tiempo de retención para el estándar de benzo[a]pireno obtenido siguiendo las condiciones cromatográficas óptimas mencionadas en la Tabla 12.

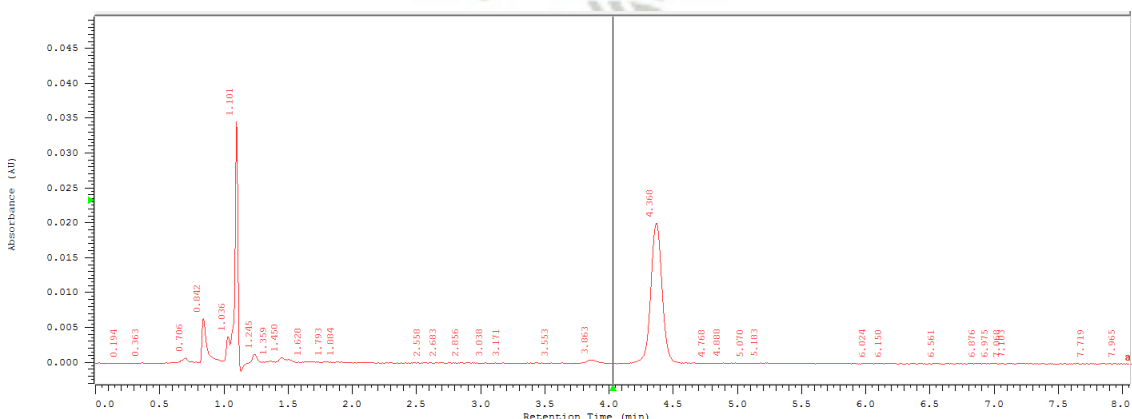


Figura 10. Tiempo de retención para el estándar de benzo[a]pireno.

1.3. VALIDACION DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE BENZO[a]PIRENO POR HPLC

Una vez elegidas las condiciones cromatográficas para la determinación de benzo[a]pireno por HPLC y el tratamiento de muestras se procedió a validar el método, para esto se evaluaron los parámetros propuestos: linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación.

1.3.1. LINEALIDAD

Establecida como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido [87], se estudiaron 6 niveles de concentración (5, 15, 25, 35, 45, 60 $\mu\text{g L}^{-1}$), se analizaron por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados representados en la Tabla 13.

Tabla 13. Datos para la linealidad del método

Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio áreas	DS
5	366	392	331	363.00	30.61
15	865	889	848	867.33	20.60
25	1392	1294	1338	1341.33	49.08
35	1902	1986	1926	1938.00	43.27
45	2361	2472	2496	2443.00	72.02
60	3392	3239	3286	3305.67	78.37

DS: Desviación estándar

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Con los datos de la Tabla 13 se construyó la curva para la linealidad representada en la Figura 11, en la que el valor del coeficiente de determinación (r^2) es igual a 0.9989, la cual expresa la proporción de la variación total en el modelo, dicho valor es

superior a 0.99 por lo que podemos afirmar que nuestro parámetro está dentro de lo establecido por la AOAC [88].

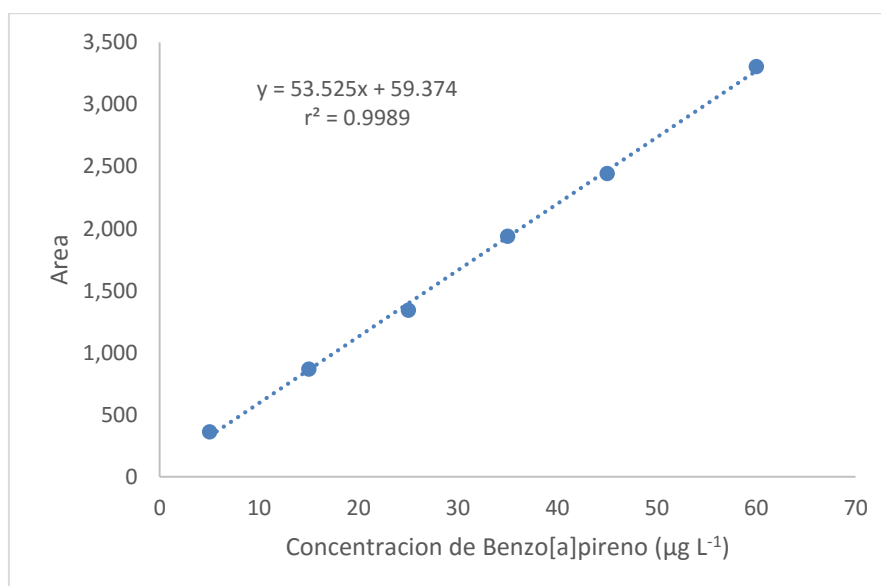


Figura 11. Grafica para la linealidad del método por HPLC.

1.3.2. PRECISION

Verificada la linealidad del método se procedió con la determinación de la precisión del método; para obtener un valor más representativo de la precisión en términos de repetibilidad se realizaron repeticiones simultáneas en diferentes momentos (pero el mismo día), en un mismo laboratorio y por un mismo analista [88], los datos son mostrados en la Tabla 14.

Tabla 14. Datos para la repetibilidad del método.

Concentración µg L ⁻¹	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio áreas	DS	CV %	Intervalos de confianza	
5	366	392	331	363.00	30.61	8.43	286.95	439.05
15	865	889	848	867.33	20.60	2.38	816.16	918.51
25	1392	1294	1338	1341.33	49.08	3.66	1219.39	1463.28
35	1902	1986	1926	1938.00	43.27	2.23	1830.51	2045.49
45	2361	2472	2496	2443.00	72.02	2.95	2264.08	2621.92
60	3392	3239	3286	3305.67	78.37	2.37	3110.96	3500.37

DS: Desviación estándar, CV: coeficiente de variabilidad

Fuente: Elaboración propia, 2016.

En la Tabla 14 los datos obtenidos muestran un coeficiente de variación menor al 8.43 %, según la AOAC indica que para concentraciones próximas a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ no debe superar el 15 % [88]. lo cual indica que el método es repetible bajo las condiciones de análisis establecidas en un rango de concentraciones de 5 a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de benzo[a]pireno

1.3.3. EXACTITUD

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia [86].

Para determinar la exactitud del método se preparó estándar de benzo[a]pireno a una concentración de $30 \mu\text{g L}^{-1}$, por triplicado tomando como muestra un producto cárnico ahumado procedente de un mercado de la ciudad de Arequipa, los datos son resumidos a continuación en la Tabla 15.

Tabla 15. Recuperación del método

	M ($\mu\text{g L}^{-1}$)	M + $30 \mu\text{g L}^{-1}$	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ct ($\mu\text{g L}^{-1}$)
R1	9.60	38.74	28.04	30.00
R2	9.52	37.34	26.71	30.00
R3	9.41	37.73	27.21	30.00
Promedio	9.51	37.94	27.32	30.00
DS	0.09	0.72	0.67	
Recuperación %	91.07			

Ct: Concentración teórica, Cd: Concentración determinada, R: Repetición, DS: Desviación estándar

Fuente: Elaboración propia, 2016.

En la Tabla 15 el promedio de la recuperación del método fue de 91.07 %, este resultado fue comparado con lo establecido por la AOAC estando dentro de los límites (70 – 125%) [88].

1.3.4. LÍMITES DE CUANTIFICACION (LDQ) Y DETECCION (LDD)

Se entiende por límite de cuantificación a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar con una adecuada precisión y exactitud, y por límite de detección a la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cumple con la precisión y exactitud [88].

Se determinó la pendiente de la curva de la linealidad tomando un valor de 53.525, de donde se pudo extrapolar a una concentración cero la ecuación de la recta (Figura 12), obteniéndose como señal ruido la correspondiente al término independiente, es decir Y_{bl} con un valor de 59.37.

Se construyó otra recta (Figura 13) tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas (áreas) y como eje de abscisas las concentraciones del analito en estudio, considerándose que la desviación estándar de las respuestas S_{bl} correspondiera al valor de la ordenada de origen de esta recta con un valor de 17.21.

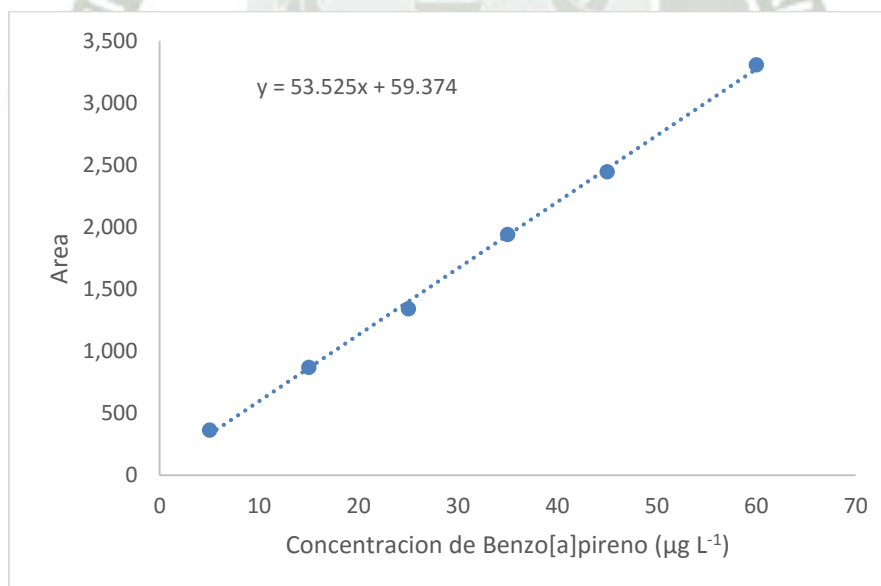


Figura 12. Grafica de la concentración versus área

Con los datos que se obtuvieron se calculó el límite de detección y límite de cuantificación

Utilizando las siguientes formulas:

Límite de detección (LDD):

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b \times \sqrt{n}}$$

Límite de cuantificación (LDQ):

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 YS_{bl}}{b \times \sqrt{n}}$$

Obteniéndose:

Límite de Detección (LDD) 0.85 $\mu\text{g L}^{-1}$ de benzo[a]pireno

Límite de Cuantificación (LDQ) 1.77 $\mu\text{g L}^{-1}$ de benzo[a]pireno

De modo que el método es capaz de cuantificar 1.71 $\mu\text{g L}^{-1}$ de benzo[a]pireno con una buena exactitud y precisión.

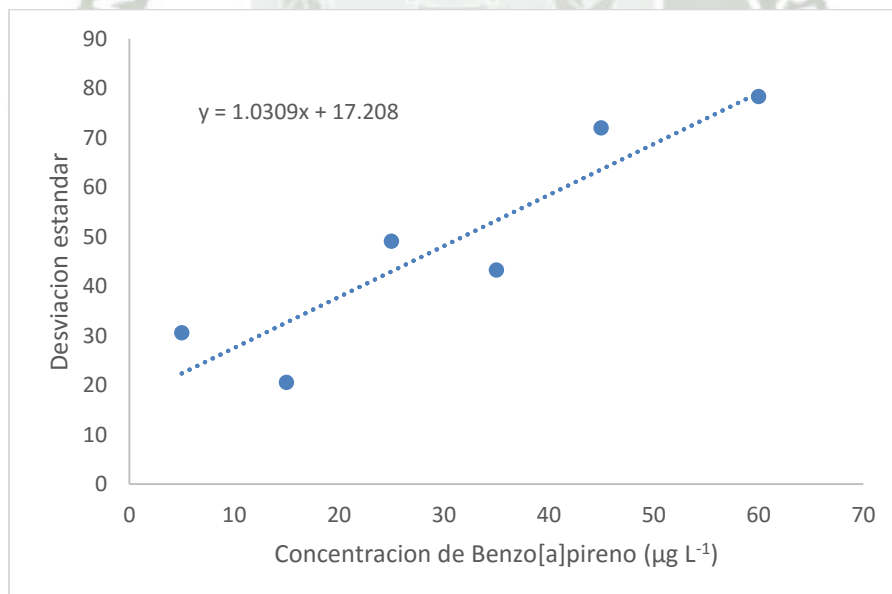


Figura 13. Grafica de la concentración versus desviación estándar.

Bishnoi y colaboradores [89], en el año 2005, cuantificaron hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa en frutas y vegetales, para la calibración del método analítico encontraron una linealidad (r^2) que

oscila entre 0.999 y 0.989, una desviación estándar relativa (RSD) entre 0.4 a 7 %, límites de cuantificación de 0.002 – 0.50 μg por inyección. Essumang y colaboradores [81] en el año 2012 analizaron hidrocarburos aromáticos policíclicos en pescados ahumados por GC/MS encontrado porcentajes de recuperación para la técnica analítico de 72 – 102 %, límites de detección y cuantificación en un rango de 0.10 – 2.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 0.30 – 6.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Dost y Cevat [90] en el año 2012 determinaron hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceites y alimentos a la parrilla por HPLC/UV-Vis encontrando coeficientes de determinación (r^2) de 0.996, límites de detección de 0.46 $\mu\text{g L}^{-1}$ y límites de cuantificación de 1.54 $\mu\text{g L}^{-1}$ para benzo[a]pireno. Nuestros parámetros de validación (linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación) guardan relación con los resultados reportados por los investigadores antes mencionados; asimismo dichos parámetros de validación están dentro de lo establecido por la AOAC [88].

1.4. MUESTREO DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS AHUMADOS

Se muestrearon 12 productos cárnicos ahumados procedentes de distintas empresas o productores que se expenden en la ciudad de Arequipa. Las muestras fueron ordenadas alfabéticamente (Tabla 16) y recolectadas en un cooler klimber 8L, acondicionadas con gel refrigerante (Figura 14) en su interior para mantener la cadena de frío hasta el traslado de dichas muestras para su respectivo análisis.



Figura 14. Cooler Klimber y gel refrigerante para el monitoreo de benzo[a]pirneo en productos cárnicos ahumados.

Tabla 16. Muestras para el monitoreo de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados.

Nro.	Codificación	Producto cárnico ahumado
1	A	Cabanossi ahumado
2	B	Salame ahumado
3	C	Hot dog de cerdo ahumado
4	D	Tosino ahumado
5	E	Cabanossi ahumado
6	F	Chorizo ahumado
7	G	Cabanossi ahumado
8	H	Tosino ahumado
9	I	Salchicha ahumada
10	J	Hot dog ahumado
11	K	Hot de pollo ahumado
12	L	Salchicha tipo Frankfurt ahumada

1.5. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

El tratamiento de la muestra se realizó tomando en cuenta varias investigaciones [1] [91] [46] [92], con algunas modificaciones. Las muestras se sometieron a un procedimiento de molienda, sonicación, filtración y concentración (Figura 17) para luego ser analizado por HPLC con un detector de arreglo de diodos, seleccionando las condiciones cromatográficas óptimas para la cuantificación de benzo[a]pireno

Se realizó una extracción con solventes (usando hexano como solvente) asistida por ultrasonido (UAE), considerándose una buena alternativa para la extracción de compuestos orgánicos de diferentes matrices, ya que proporciona un contacto más eficiente entre el sólido y el solvente debido a un aumento de la presión (que favorece la penetración y transporte) y la temperatura (lo que mejora la solubilidad y difusividad), como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente, trabajándose con una frecuencia de 42 kHz para los ultrasonidos. Asimismo varias extracciones pueden llevarse a cabo simultáneamente. [93] [94] [95]; para tal fin se acondicionó la extracción asistida por ultrasonido en pequeñas columnas [62] (Figura 15), se utilizó

hexano como solvente dado que para la extracción de HAP en alimentos se suelen emplear disolventes de baja polaridad tales como el diclorometano, hexano [96] con constantes dieléctricas (ϵ) de 9.14 y 1.89 respectivamente, teniendo en consideración que el benzo[a]pireno es soluble en solventes apolares [22], además se tomó en cuenta el bajo punto de ebullición del hexano ($69\text{ }^{\circ}\text{C}$) [25] para acortar los tiempos en la etapa de concentración de la muestra.

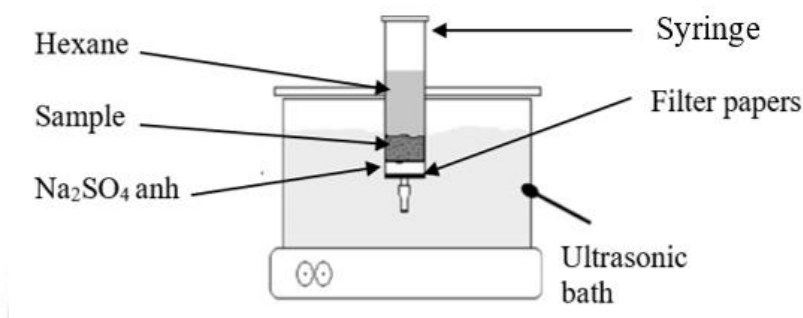


Figura 15. Acondicionamiento de la extracción por solvente asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas modificada. [62].

En tal sentido se procedió a realizar la extracción de las muestras notándose que la mayoría de interferentes, compuestos hidrofílicos (polares) se desplazan al lado izquierdo del cromatograma, siendo menos retenidos, eluyendo primero; el analito de interés, un compuesto más hidrofóbico (no polar) es retenido más fuertemente, observándose a los 4.37 min de tiempo de retención (Figura 16), asimismo se verificó la presencia de benzo[a]pireno, extrayendo muestras con y sin estándar, notándose un mayor crecimiento del área de la muestra con estándar del analito de interés respecto a la de sin estándar a los 4.37 min (Figura 16).

Para la concentración de la muestra se compararon los porcentajes de recuperación entre la extracción de la muestra, con una concentración de corriente de nitrógeno y una concentración usando corriente de aire, preparándose un estándar de benzo[a]pireno de $30\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla 17); usando la fórmula de la linealidad $y = 53.525x + 59.374$ (Figura 11), se calculó su área equivalente a 1665.

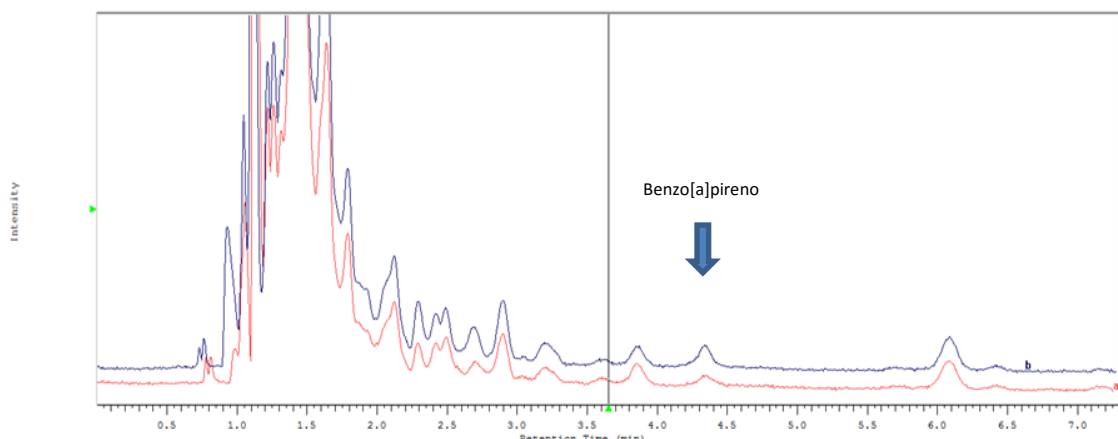


Figura 16. Cromatograma de un producto cárnico ahumado (Muestra D); donde: (a) es la muestra sin estándar y (b) muestra con estándar benzo[a]pireno.

Tabla 17. Comparación de los porcentajes de recuperación usando una concentración con corriente de nitrógeno y aire.

	Áreas		
	R	Corriente de nitrógeno	Corriente de aire
M + St	1	2054.00	2133.00
M	1	640.00	573.00
M + St	2	2213.00	2058.00
M	2	728.00	569.00
Cd	1	1414.00	1560.00
	2	1485.00	1489.00
Ct	1	1665.00	1665.00
	2	1665.00	1665.00
Recuperación %	1	84.92	93.69
	2	89.19	89.43

M: Muestra; Ct: Concentración teórica, Cd: Concentración determinada, R: Repetición, St: Estándar de benzo[a]pireno 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ equivalente a un área de 1665

Fuente: Elaboración propia, 2016.

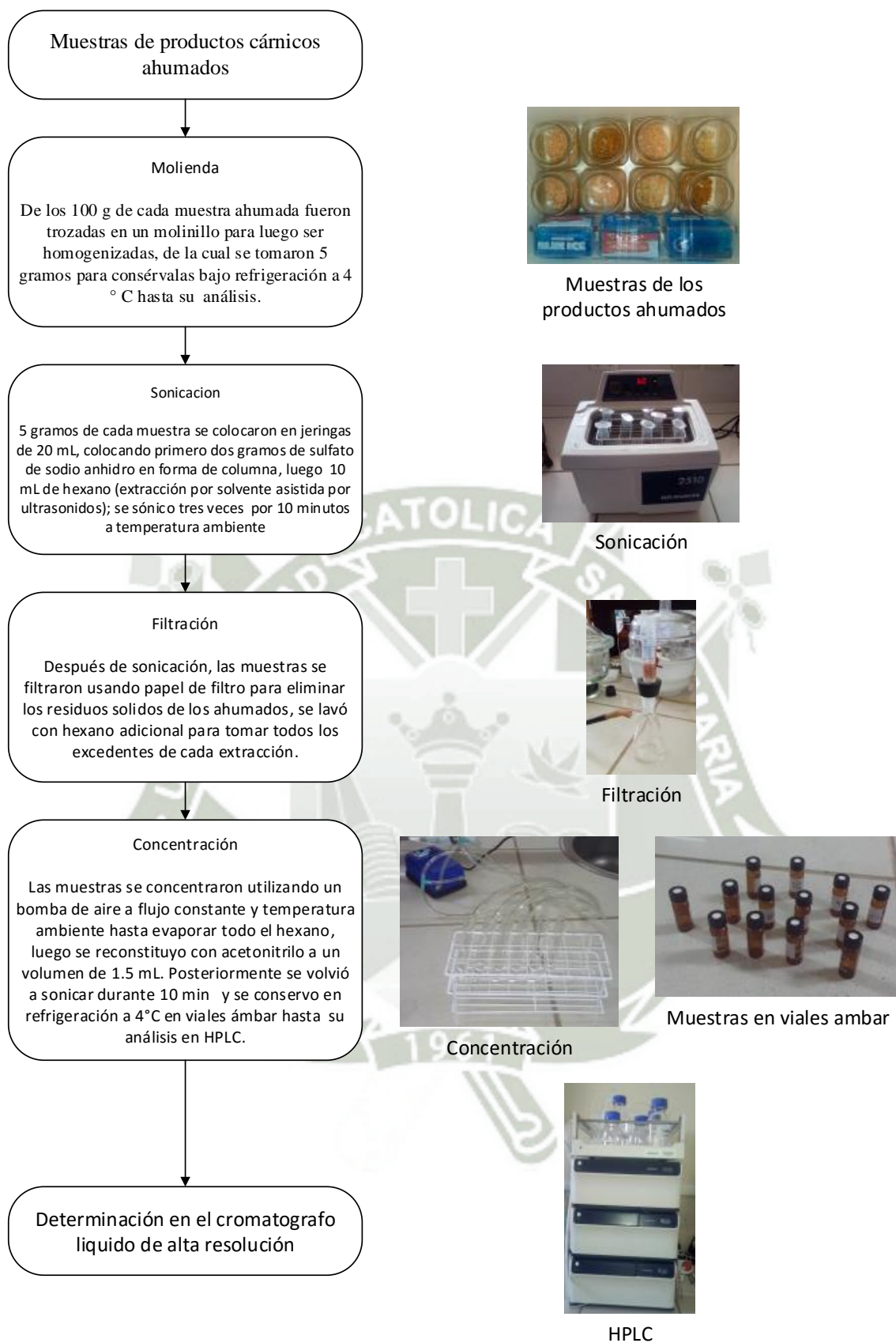


Figura 17. Esquema del tratamiento de las muestras para la determinación de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados.

Se compararon ambas formas de concentración utilizando un prueba t a un nivel de confianza de 95% encontrándose ($p > 0.05$) el cual se puede observar en la Tabla 24 (Anexos N°1); es decir, no hay diferencias estadísticas significativas a nivel del porcentaje de recuperación de las muestras que se concentraron usando una corriente de nitrógeno de las que se concentraron usando una corriente de aire, por ende se procede a realizar la concentración con corriente de aire como parte del tratamiento de las muestras para el monitoreo de productos cárnicos ahumados.

II. MONITOREO DE BENZO[a]PIRENO EN PRODUCTOS CÁRNICOS AHUMADOS

En el presente estudio se analizaron 12 muestras de productos cárnicos ahumados procedentes de diferentes empresas o productores, de las cuales en solo 7 se encontraron niveles cuantificables de benzo[a]pireno por el método propuesto, las muestras fueron tomadas de establecimientos de venta pública teniendo en cuenta que sean de lotes diferentes para la realización del monitoreo (3 lotes de cada muestra que correspondían a los meses de diciembre 2015, enero, febrero y marzo 2016).

2.1. NIVELES DE BENZO[a]PIRENO EN EL MONITOREO DE PRODUCTOS CÁRNICOS AHUMADOS DE LA CIUDAD DE AREQUIPA

El monitoreo de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados se puede observar en la Figura 18, donde se muestra la concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) encontrados en 7 productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa ordenados alfabéticamente, de 3 lotes diferentes cada uno, en la leyenda de la misma figura se resalta el contenido máximo de benzo[a]pireno permitido en carnes y productos cárnicos ahumados de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ [11], representado por una línea horizontal, la cual se ha tomado como normativa base para este estudio dado que en el país no se cuenta con una legislación referente para dicho contaminante.

En términos generales para el monitoreo de benzo[a]pireno podemos notar que las muestras A, B, D y E están encima del límite permitido de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ [11], por el contrario las muestras C, F y G (Figura 18), esto podría deberse a que las muestras son sometidas a un ahumado directo; es decir, las muestras durante el ahumado permanecen

en el mismo lugar donde el humo es producido ocasionando que los componentes del humo (componentes deseables que le confieren propiedades antioxidantes, bactericidas, conservativas, etc. y componentes no deseables como los hidrocarburos aromáticos policíclicos entre ellos el benzo[a]pierno) sedimenten, condensen o se acumulen sobre los productos ahumados, estudios relacionados confirman que hay una reducción de 33 y 45%. en el contenido de HAP en los productos que fueron ahumados indirectamente de los ahumados de manera directa [97]. Pero es importante resaltar que no es la única variable que se debe controlar en el proceso del ahumado [12].

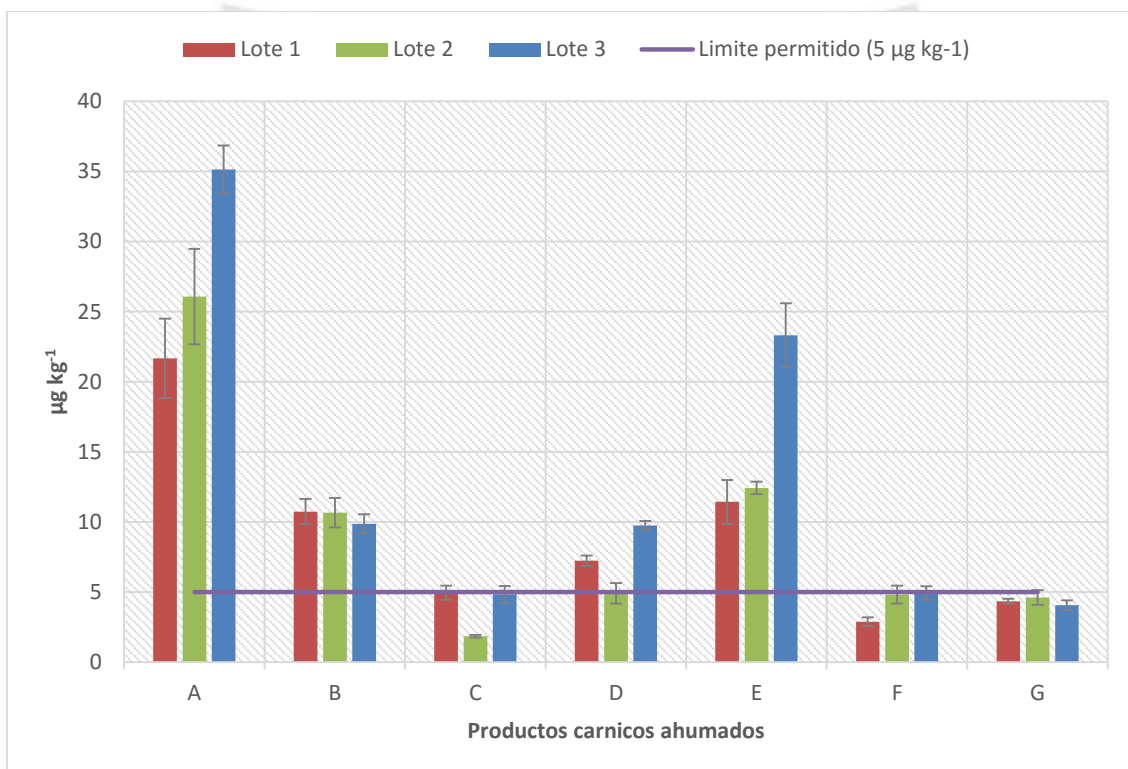


Figura 18. Monitoreo de benzo[a]pireno por lotes ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa.

A nivel de lotes; para el lote 1 el contenido de benzo[a]pireno oscila entre 2.88 y 21.67 $\mu\text{g kg}^{-1}$, presentando niveles dentro del límite establecido para las muestra C, F y G con 4.94, 2.88 y 4.34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Para el lote 2 el contenido de benzo[a]pireno oscila entre 1.85 y 26.07 $\mu\text{g kg}^{-1}$, con niveles dentro de lo permitido para las para las muestras C, D, F y G con 1.85, 4.90, 4.81 y 4.61 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Para el lote 3 los niveles de benzo[a]pireno oscilan entre 4.07 y 35.14 $\mu\text{g kg}^{-1}$, con niveles debajo del límite permitido para las muestras C, E y G con 4.82, 4.97 y 4.15 $\mu\text{g kg}^{-1}$

respectivamente (Tabla 18). Las muestras A, B y E presentaron niveles encima del límite permitido a través de los diferentes lotes excepto la muestra D que presentó un contenido de benzo[a]pireno debajo del límite permitido a nivel del lote 2. (Tabla 18).

Tabla 18. Contenido de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en el monitoreo de productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa.

Productos cárnicos ahumados	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Media ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	Media ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	DS	Media ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	DS	Media ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	DS	
A	21.67	2.83	26.07	3.41	35.14	1.72	27.62
B	10.74	0.90	10.66	1.06	9.86	0.69	10.42
C	4.94	0.50	1.85	0.09	4.82	0.59	3.87
D	7.23	0.36	4.90	0.73	9.75	0.30	7.29
E	11.43	1.56	12.43	0.44	23.30	2.29	15.72
F	2.88	0.30	4.81	0.63	4.93	0.48	4.21
G	4.34	0.17	4.61	0.53	4.07	0.34	4.34

A parte de los métodos de ahumado (directo e indirecto), hay otras variables que también deben tomarse en consideración para minimizar niveles de benzo[a]pireno como son: el tipo de combustible; productos ahumados con álamo, [98] y aliso [99] presentaron contenidos de benzo[a]pireno ($35.07 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$), respectivamente en carnes ahumadas. El uso de gasolina o un combustible similar para iniciar en fuego en el carbón aumenta en gran medida los HAP en los productos cárnicos [100]. Según el codex alimentarius CAC/RCP 68/2009 [12] se recomienda no usar maderas resinosas o maderas tratadas con productos químicos u otros combustibles en vez que las maderas naturales;

En la Figura 19 podemos visualizar el contenido de benzo[a]pireno entre lotes dentro de un mismo producto cárnico ahumado (muestras), notando que las muestras B y G no presentan diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$), las demás muestras si presentan diferencias estadísticas entre sus lotes pudiéndose deber a factores variables en el proceso del ahumado como son; la distancia del producto ahumado con la fuente de generación del humo, el tipo de combustible usado, como ya mencionamos tienen un

efecto considerablemente en el contenido de HAP [98], la duración del tiempo de ahumado, el contenido de grasa del producto cárnico que por sí solo tienen poca influencia sobre la cantidad total de HAP [97], pero el tipo de cubierta del producto ahumado tiene una mayor influencia.

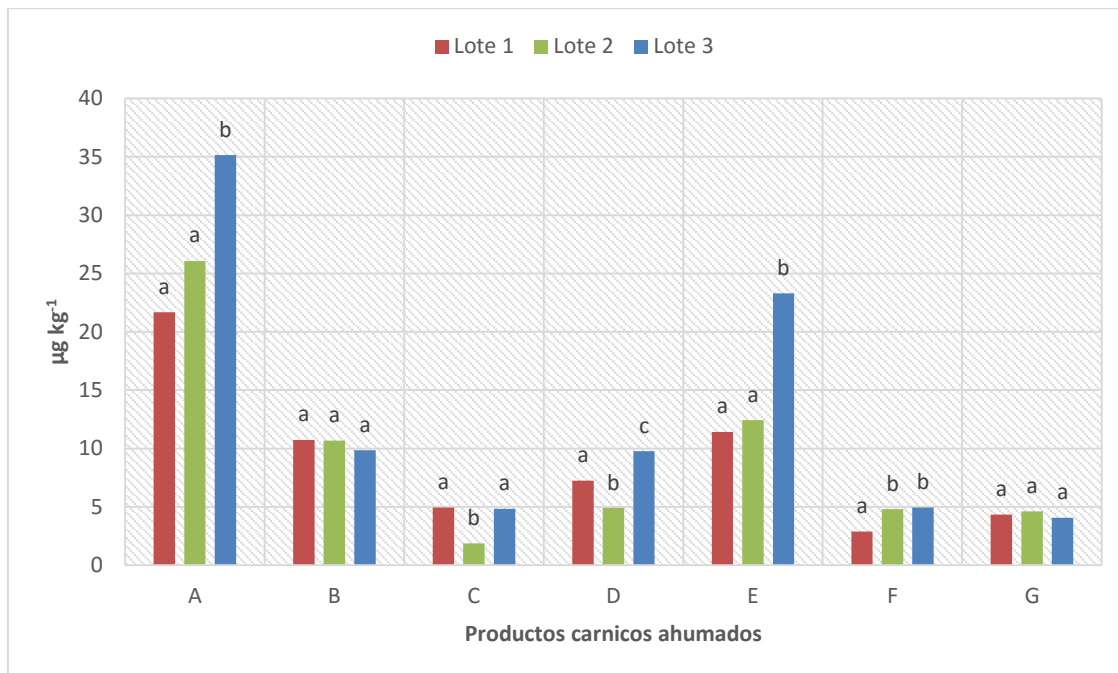


Figura 19. Niveles de benzo[a]pireno en diferentes lotes de productos cárnicos ahumados. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre lotes dentro de la misma muestra.

El tipo de cubierta del producto cárnico, tiene un importante efecto sobre el contenido de HAP de los productos cárnicos ahumados, dado que se encontraron niveles más bajos de HAP en salchichas ahumadas cubiertas con celulosa pelable, colágeno en comparación con las cubiertas con tripa natural [54], debido la alta porosidad (66.8%) de tripas naturales permite que la grasa fluya a través de la cubierta y cubra su superficie, por lo que es pegajosa y húmeda; este efecto, añade al producto rugosidad en su superficie permitiendo que las partículas de hollín se capturen con facilidad y se adhieran a ellas.

Estas partículas posteriormente comenzaran a migrar dentro del producto. En contraste, la baja porosidad (16.6%) de tripas sintéticas hace que el contenido de grasa permanezca en el interior del producto, la superficie de tripa sintética es seca, no

pegajosa y suave, no mostrando afinidad por las partículas de hollín, evitando la penetración de los HAP en el producto [47] [97] [101]. Estas variables y otras más deben ser consideradas por las empresas o productores dedicados a este rubro con el fin de obtener productos ahumados más saludables.

Tabla 19. Prueba LDS (Least significant difference) para el monitoreo de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa.

Productos cárnicos ahumados	Medias ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
A	27.62	a
E	15.72	b
B	10.42	b c
D	7.29	c d
G	4.34	d
F	4.21	d
C	3.87	d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

A nivel estadístico se realizó un ANOVA comparando las medias de cada muestra en un diseños de bloques completos al azar, bloqueando los lotes observándose diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre las 7 muestras analizadas (productos cárnicos ahumados) a un nivel de confianza del 95 %. (Ver Tabla 25 en anexo N°1). Con el fin de determinar qué medias son significativamente diferentes se realizó una prueba de especificidad LSD (Least significant difference), encontrándose diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$), como se puede ver en la Tabla 19, donde la muestra que presenta mayor contenido de benzo[a]pireno es la muestra A con $27.62 \mu\text{g kg}^{-1}$ notándose diferencias estadísticas significativas respecto a las demás muestras; seguido de la muestra E con $15.72 \mu\text{g kg}^{-1}$ y la muestra B con $10.42 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[a]pireno con diferencias estadísticas también significativas respecto a las demás muestras pero entre ellas no.

Tabla 20. Comparación de los niveles de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados encontrados en Arequipa con otros lugares.

Origen del producto ahumado	Muestras	Benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referencia
Germany	Smoked belly of pork	17.63	Jira et al., (2008) [80]
Estonia	Smoked sausage, ham, meat and chicken.	31.20	Reinik et al., (2007) [5]
Swedish	Ham produced by direct “sauna” smoking	36.9	Wretling et al., (2010) [102]
Malaysian	Smoking beef satay from a Malaysian market	6.98	Jahurul et al., (2013) [103]
Spain	Commercial smoked chorizos	3.21	Ledesma et al., (2015) [47]
Cape Town (South Africa)	Smoked pork	10.02	Olatunji et al., (2014) [104]
Arequipa	Productos cárnicos ahumados	27.62	

Las muestras D, G, F y C no se observan diferencias estadísticas significativas entre ellas, dado que presentan una misma letra en común como se puede observar en la Tabla 19. Respecto al límite máximo permitido de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ [11] a nivel de las medias de los lotes de cada muestra solo 3 muestras (muestra G, F y C) de las 7 muestras analizadas están dentro del límite permitido (Tabla 19).

Estos altos niveles de benzo[a]pireno encontrados en este estudio por encima del límite permitido de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ [11], se pueden contrastar con otras investigaciones realizadas en otros lugares del mundo (Tabla 20); tales como, en Suecia con $36.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ benzo[a]pireno en jamón ahumado de forma tradicional, es decir un ahumado directo [102], $10.02 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[a]pireno en carne de cerdo ahumado de la ciudad del cabo

en África del Sur [104], $6.98 \pm 2.01 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[a]pireno en carne de vaca ahumada en Malasia [103], $31.20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[a]pireno en carne comercial ahumada en Estonia [5], $17.63 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[a]pireno en carne de cerdo ahumada en Alemania [80] y $3.21 \pm 0.12 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[a]pireno en chorizos ahumados en España [47].

El Codex Alimentarius en su capítulo (Código de prácticas para reducir la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en los alimentos producidos por procedimientos de ahumado y secado directo) [12], señala que la formación de HAP (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) durante el ahumado y el secado directo depende de un conjunto de variables [105] (Figura 20); tales como: el tipo de combustible (maderas, diésel, gases, desechos líquidos/sólidos y otros combustibles); el método de ahumado o secado (directo o indirecto); el tipo de generación de humo en relación con la temperatura de la pirolisis y la circulación de aire en el caso de los generadores de humo (fricción, fuego sin llama, autocombustión); la distancia entre el alimento y la fuente de calor; la posición del alimento con respecto a la fuente de calor; el contenido de grasa del alimento; la duración del procesamiento del ahumado o secado directo; la temperatura durante el ahumado o secado directo; la limpieza y el mantenimiento de los utensilios involucrados; la estructura de la cámara de ahumado y del equipo utilizado para mezclar el aire y el humo (que repercute en la densidad del humo en la cámara de ahumado) [79] [1] [106] [98].

Todas estas variables deben ser controladas en los procesos de ahumado; por esta razón, la dificultad de controlar los niveles de HAP (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) en los productos ahumados finales.

De todo este gran número de variables recomendadas por el CAC/RCP 68/2009 [12] que alteran el contenido de HAP en los productos cárnicos ahumados, podemos resaltar tres variables que parecen tener mayor influencia que las otras [47]; las cuales son: a) El método de ahumado que puede ser directa (ahumado tradicional) o indirecta (fricción, humo líquido, ahumado electrostático), los métodos de ahumado indirecto, tales como la generación de humo por fricción pueden reducir altamente el contenido de HAP en los productos cárnicos, el humo líquido podría ser una buena alternativa si los procesos de fraccionamiento y purificación son optimizados para garantizar la ausencia de

tóxicos e impurezas cancerígenas: b) El tipo de cubierta del producto cárnico ahumado, el uso de cubiertas sintéticas (celulosas pelables) en vez de tripa natural contribuyen a evitar la penetración de HAP al interior de los productos cárnicos por cualquier tipo de ahumado, c) La temperatura para la generación del humo, una temperatura de generación de humo por debajo de 600 °C debe aplicarse para prevenir la formación de HAP [47].

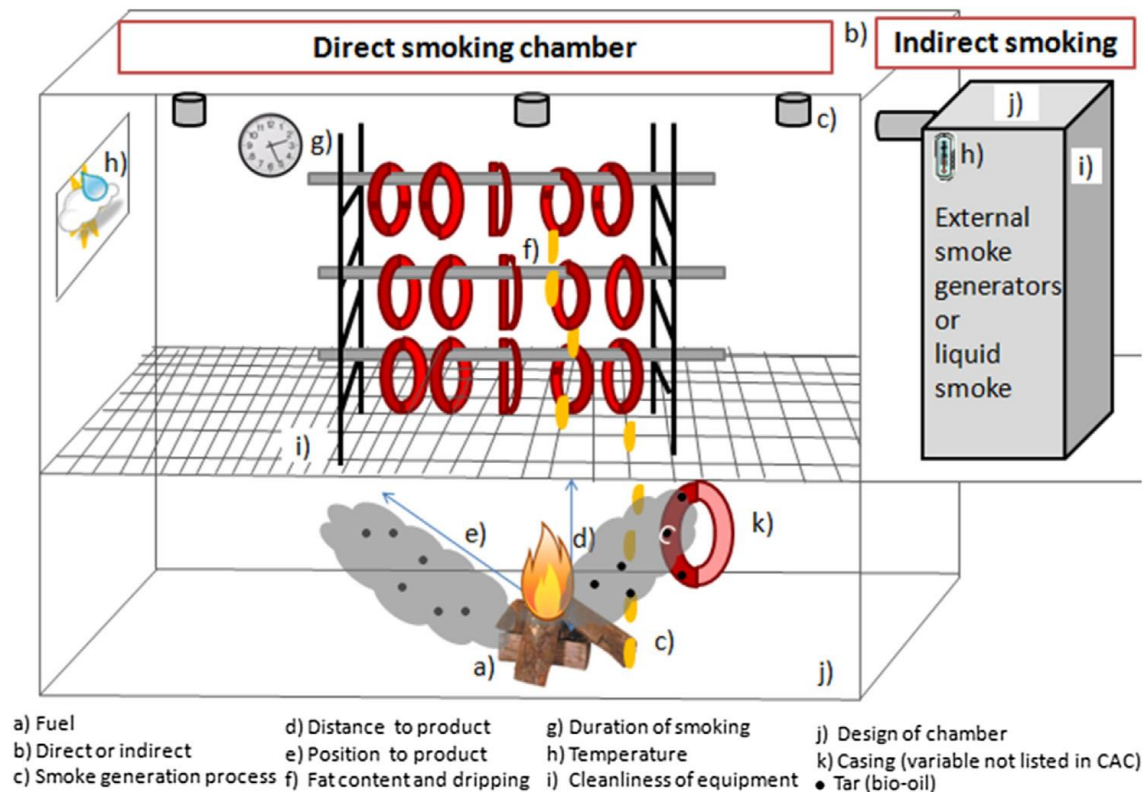


Figura 20. Cámara de ahumado: Representación de CAC/RCP 68/2009 [12] [47], variables para el control de la contaminación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en los procesos de ahumado.

Los niveles de HAP en alimentos ahumados podría reducirse al mínimo teniendo en cuenta las variables sugeridas por el Codex Alimentarius CAC/RCP 68/2009 [12]. Las empresas o productores dedicados a este rubro (productos cárnicos ahumados) deben tener en cuenta dichas variables y hacer modificaciones en sus procesos de ahumado para obtener productos más inocuos, especialmente con bajos niveles de benzo[a]pireno.

2.2. RELACION ENTRE EL CONTENIDO DE HUMEDAD Y BENZO[a]PIRENO EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS AHUMADOS

Uno de los fines más importantes del ahumado es el secado o la reducción del contenido de humedad, ya que dicha reducción tiene un efecto importante al conferirle buenas propiedades organolépticas, bactericidas, antioxidantes al producto ahumado, por lo tanto, extendiendo su vida útil [2].

Sin embargo, el Codex Alimentarius CAC/RCP 68/2009 [12] especifica y algunos estudios científicos confirman, el contenido de HAPs en los productos cárnicos generalmente aumenta durante el proceso de ahumado [79] [48]. El Codex Alimentarius sugiere que el proceso de ahumado debe ser optimizado para obtener productos ahumados con un bajo contenido de HAPs, pero con buenas características organolépticas en el producto final.

El método ideal no debería tener ningún efecto negativo sobre el producto ahumado; en la Figura 21, Figura 22 y Figura 23 se observa que hay una variada relación entre el contenido de humedad y los niveles de benzo[a]pireno, ya que un menor contenido de humedad indicaría un mayor tiempo de ahumado, por ende una mayor presencia de benzo[a]pireno [19].

A nivel del lote 1 en la Figura 21 notamos que de las muestras que están encima del límite permitido de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ [11], son las muestras A, B, D y E pero solo las muestras A y E presentan menor contenido humedad. A nivel del lote 2 en la Figura 22, las muestras A, B y E presentan concentraciones de benzo[a]pireno encima del límite permitido y solo las muestras A y E presentan menor contenido de humedad.

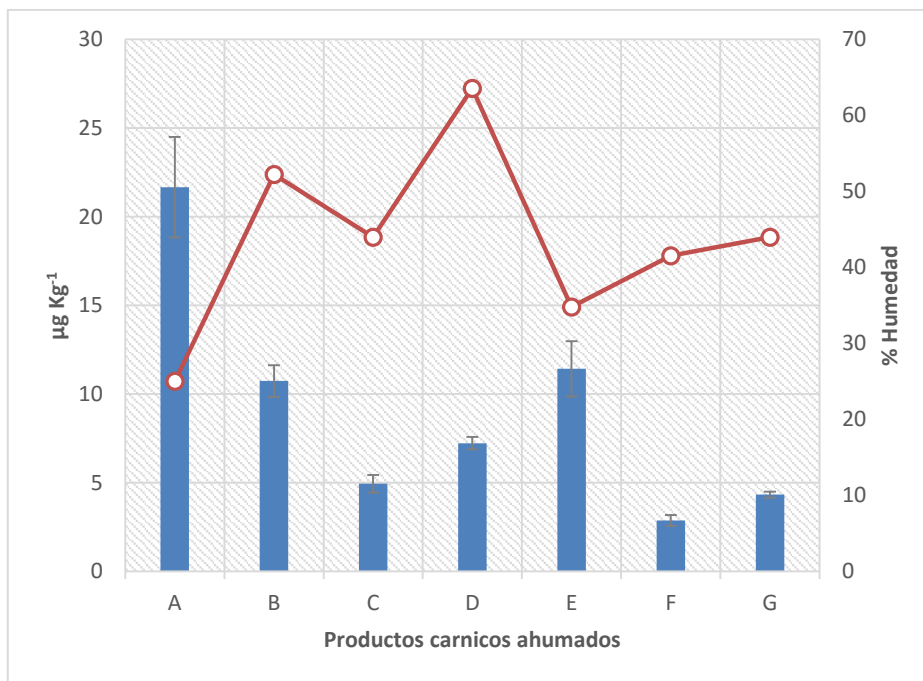


Figura 21. Concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y el contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados (Lote 1) que se comercializan en la ciudad de Arequipa.

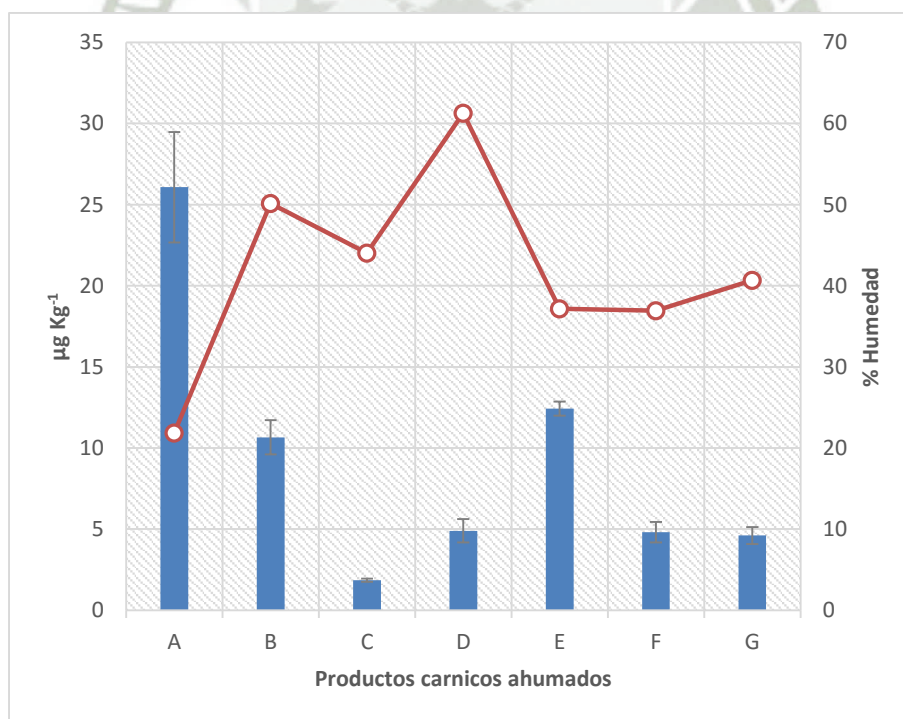


Figura 22. Concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y el contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados (Lote 2) que se comercializan en la ciudad de Arequipa.

Para el lote 3 en la Figura 23 se observa que las muestras A, B, D y E presentan niveles encima del límite permitido y nuevamente las muestras A y E presentan menores contenido de humedad. Para todos los lotes, las muestras que están dentro del límite permitido de benzo[a]pireno de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ [11], presentan un contenido de humedad muy variada entre ellas.

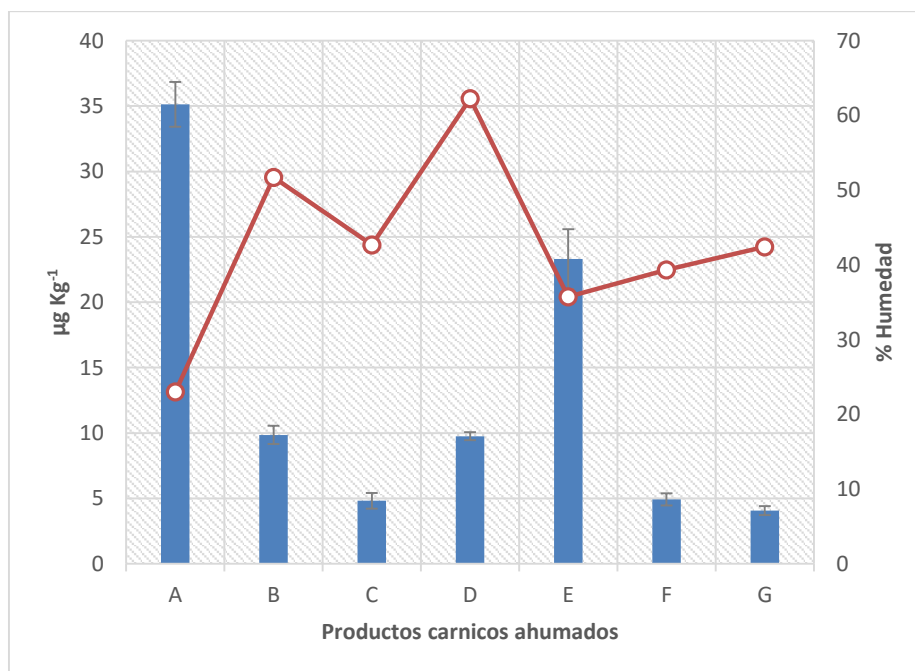


Figura 23. Concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y el contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados (Lote 3) que se comercializan en la ciudad de Arequipa.

En la prueba de especificidad LSD (Least significant difference) se encontró que las muestras A y E presentan mayores contenidos de benzo[a]pireno presentando diferencias estadísticas significativas respecto a la demás muestras (Tabla 19), notándose que dichas muestras a nivel de cada lote presentaron menores contenidos de humedad; en la prueba LSD (Least significant difference) del contenido de humedad se observa que las muestras A, E y F presentaron menores contenidos de humedad con diferencias estadísticas significativas respecto a las demás muestras (Tabla 22), es decir; las muestras A y E con mayores contenidos de benzo[a]pireno de 27.62 y $15.72 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente presentaron menores contenidos de humedad para la muestra A de 23.29% y la muestra E de 35.90% ; esto podría indicar de que a medida de que el

contenido de humedad disminuye, aumenta el contenido de benzo[a]pireno, como consecuencia del incremento del tiempo de ahumado [79].

Tabla 21. Contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016

Productos cárnicos ahumados	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Media (%)
	Media (%)	DS	Media (%)	DS	Media (%)	DS	
A	25.01	1.41	21.85	0.50	23.00	0.57	23.29
B	52.22	1.40	50.15	0.78	51.73	1.27	51.37
C	43.96	2.23	44.03	0.29	42.69	0.74	43.56
D	63.56	0.57	61.28	1.47	62.24	1.00	62.36
E	34.79	1.56	37.18	1.39	35.73	1.91	35.90
F	41.52	1.73	36.93	2.50	39.33	2.02	39.26
G	43.96	0.18	40.68	0.63	42.40	3.25	42.35

Donde; DS: Desviación estándar.

Tabla 22. Prueba LDS (Least significant difference) del contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa.

Productos cárnicos ahumados	Medias (%)	
A	23.29	a
E	35.90	b
F	39.26	c
G	42.35	d
C	43.56	d
B	51.37	e
D	62.36	f

Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p > 0.05$)

Sin embargo, otros resultados obtenidos también indicarían que los productos cárnicos ahumados con contenidos elevados de benzo[a]pireno pueden tener diferentes

contenidos de humedad, tal es el caso de la muestra B que presenta $10.42 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[a]pireno pero con un contenido de humedad de 51.37 % y la muestra D con $7.29 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo[a]pireno pero con un contenido de humedad de 62.36 %.



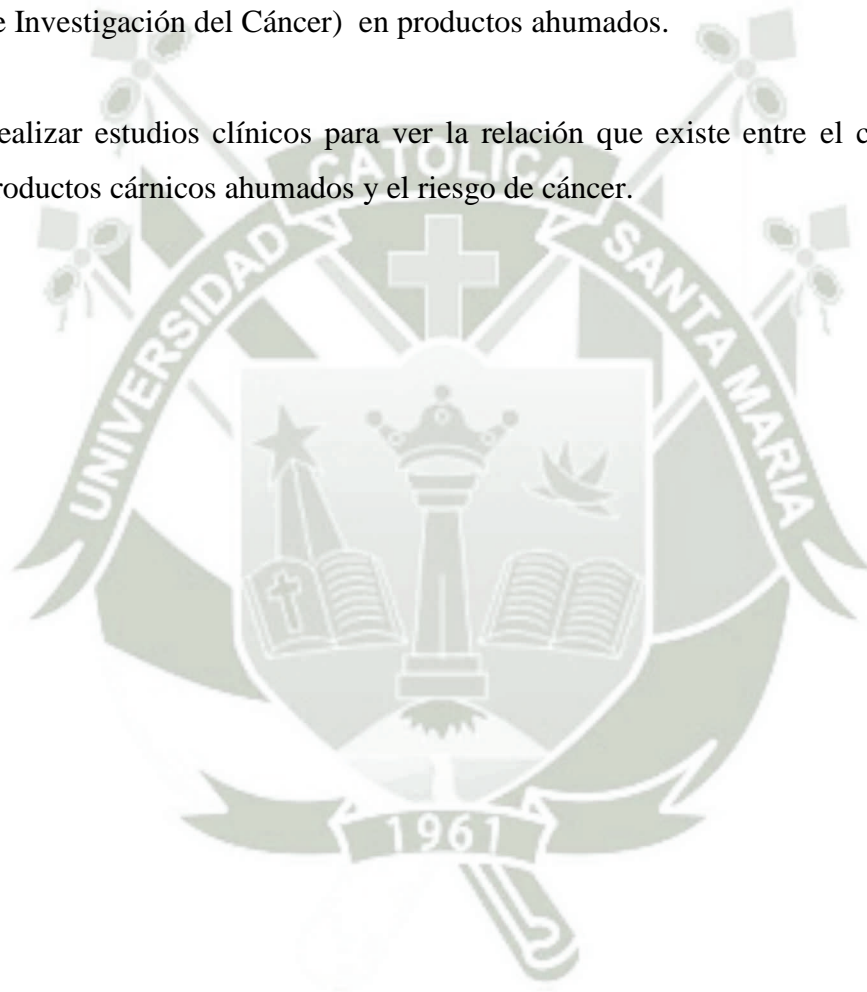
CAPITULO IV

CONCLUSIONES

1. Se validó el método por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de benzo[a]pireno en un rango de 5 a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ el que mostró ser lineal, preciso y exacto con límites de detección 0.85 $\mu\text{g L}^{-1}$ y de cuantificación de 1.77 $\mu\text{g L}^{-1}$.
2. Se identificó y cuantificó benzo[a]pireno en 7 muestras de productos cárnicos ahumados procedentes de distintas empresas o productores de 3 lotes diferentes cada una.
3. Se monitoreo los niveles de benzo[a]pireno en productos cárnicos ahumados que se comercializan en la ciudad de Arequipa encontrándose concentraciones promedio para la muestra A de 27.62 $\mu\text{g kg}^{-1}$, muestra E de 15.72 $\mu\text{g kg}^{-1}$, muestra B de 10.42 $\mu\text{g kg}^{-1}$, muestra D de 7.29 $\mu\text{g kg}^{-1}$, muestra G de 4.34 $\mu\text{g kg}^{-1}$, muestra F de 4.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y muestra C de 3.87 $\mu\text{g kg}^{-1}$.
4. Se encontró que solo 3 muestras de las 7 muestras analizadas en el monitoreo de productos cárnicos ahumados están dentro del límite permitido de 5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, las cuales corresponden a las muestras G con 4.34 $\mu\text{g kg}^{-1}$, muestra F con 4.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y muestra C con 3.87 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

RECOMENDACIONES

1. Investigar cómo influyen variables como (método de ahumado, tipo de cubierta del producto ahumado, temperatura para la generación del humo, tipo de combustible, contenido graso, etc.) en la acumulación de benzo[a]pireno en el producto ahumado final.
2. Realizar el monitoreo de otros hidrocarburos aromáticos policíclicos que son considerados como posibles carcinogénicos por la IARC (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer) en productos ahumados.
3. Realizar estudios clínicos para ver la relación que existe entre el consumo de productos cárnicos ahumados y el riesgo de cáncer.



BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Lorenzo, L. Purriños, R. Bermudez, N. Cobas, M. Figueiredo y M. Garcia Fontan, «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: “Chorizo gallego” and “Chorizo de cebolla”,» *Meat Science*, vol. 89, p. 105–109, 2011.
- [2] J. Girard, *Tecnología de la Carne y de los Productos Cárnicos*, España: Acribia, 1991.
- [3] B. Janooska, L. Warzecha, U. Blaszczyk y D. Bodzek, «Organic compounds formed in thermally treated high-protein food Part I: polycyclic aromatic hydrocarbons,» *Acta Chromatographica*, vol. 14, pp. 115 - 128, 2004.
- [4] F. Conde, J. Ayala, A. Afonso y V. Gonzalez, «Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke used to smoke cheese produced by the combustion of rock rose (*Cistus monspeliensis*) and tree heather (*Erica arborea*) wood,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 176 - 182, 2005.
- [5] M. Reinik, T. Tamme, M. Roasto, K. Juhkam, T. Tenno y A. Kiis, «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in meat products and estimated PAH intake by children and the general population in Estonia,» *Food Additives & Contaminants*, vol. 24, pp. 429 - 437, 2007.
- [6] M. García-Falcon y J. Simal-Gandara, «Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from different woods and their transfer during traditional smoking into chorizo sausages with collagen and tripe casings,» *Food Additives and Contaminants*, vol. 22, pp. 1 - 8, 2005.
- [7] M. Guillen, P. Sopelan y M. Partearroyo, «Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavourings obtained from direct types of wood. effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, pp. 5083 - 5087, 2000.
- [8] Scientific Committee on Food (SCF), Opinion of the Scientific Committee on food on the risk to human of polycyclic aromatic hydrocarbons in food.

- SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final. Health and consumer protection directorate-general, Brussels, 2002.
- [9] EC, «Commission Recommendation of 4 February 2005 (2005/108/EC) on the further investigation into the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in certain foods,» *Official Journal of the European Union*, vol. L34, pp. 43 - 45, 2005.
- [10] IARC, Chemical Agents and Related Occupations. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 100 F, 2012, pp. 137:1-628.
- [11] Comisión Europea, «Reglamento (UE) N° 835/2011. Modifica el Reglamento (CE) Nro 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios,» Brussels, 2011.
- [12] Codex Alimentario, Código de prácticas para reducir la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en los alimentos producidos por procedimientos de ahumado y secado directo CAC/RCP 68-2009, Roma: FAO, 2009.
- [13] Y. Yang, M. Wei, T. Huang, S. Lee y S. Lin, «Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from Radix Scutellariae.,» *Industrial Crops and Products*, vol. 45, pp. 182 - 190, 2013.
- [14] M. Arias, I. Penichet, F. Ysambertt, R. Bauza, M. Zougagh y A. Rios, «Fast supercritical fluid extraction of low- and high-density polyethylene additives: Comparison with conventional reflux and automatic Soxhlet extraction.,» *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 50, pp. 22 - 28, 2009.
- [15] N. Ratola, S. Lacorte, A. Alves y D. Barcelo, «Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles by gas chromatography–mass spectrometry comparison of different extraction and clean-up procedures.,» *Journal of Chromatography*, vol. 1114, pp. 198 - 204, 2006.
- [16] A. Stołyhwo y Z. Sikorski, «Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – A critical review,» *Food Chemistry*, vol. 91, pp. 303 - 311, 2005.

- [17] F. Silva, J. Cristale, M. Ribeiro y M. Marchi, «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in raw cane sugar (rapadura) in Brazil.» *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 24, pp. 346 - 350, 2011.
- [18] L. Valencia y F. Ruiz, Evaluación de la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en alimentos ahumados y enlatados Caso tipo: pollo y mejillones” Tesis profesional mancomunada, UNAM, Facultad de Química, 2004, pp. 10-53.
- [19] j. Djinovic, A. Popovic y W. Jira, «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia.» *Meat Sci*, pp. 80:449-56., 2008.
- [20] S. Wretling, A. Eriksson, G. Eskhult y B. Larsson, «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish.» *Food Compos Analysis*, pp. 23:264-72, 2010.
- [21] L. Vasiluk, L. Pinto, W. Tsang, F. Gobas, C. Eickhoff y M. Moore, «The uptake and metabolism of benzo[a]pyrene from a sample food substrate in an in vitro model of digestion.» *Food Chem Toxicol*, pp. 46:610-8, 2008.
- [22] IARC, Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2010, pp. 92: 1-853.
- [23] C. Bostrom, P. Gerde, A. Hanberg, B. Jernstrom, C. Johansson, T. Kyrklund, A. Rannung, M. Tornqvist, K. Victorin y R. Westerholm, «Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air.» *Environ. Health Perspect*, vol. 10 Suppl 3, pp. 451 - 488, 2002.
- [24] W. Baird, I. Van der y J. Grootegoed, «DNA repair mechanisms and gametogenesis.» *Reproduction*, vol. 121, pp. 31 - 9, 2001.
- [25] D. Dupont y G. Gokel, Quimica organica experimental, 1ra ed. Reverté, 2007, p. 592.
- [26] M. Ferreira, «Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR.» *Chemosphere*, pp. 44:

125-46, 2001.

- [27] IARC Monographs, «IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans, Chemical, environmental and experimental data,» *International Agency for Research on Cancer*, Vols. %1 de %2Vol. 32, Part 1., 1983.
- [28] B. Chen y Y. Chen, «Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the smoke from heated model lipids and food lipids,» *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 49, pp. 5238 - 5243, 2001.
- [29] R. Sharma, W. Chan, J. Seeman y M. Hajaligol, «Formation of low molecular weight heterocycles and polycyclic aromatic compounds (PACs) in the pyrolysis of α -amino acids.,» *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 66, pp. 97 - 121, 2003.
- [30] B. Larsson y G. Sahlberg, «Polycyclic aromatic hydrocarbons in lettuce. Influence of a highway and an aluminium smelter. In : Polynuclear Aromatic Hydrocarbons,» *Physical and biological chemistry*, pp. 417 - 426, 1982.
- [31] A. Barakat, «Assessment of persistent toxic substances in the environment of Egypt.,» *Environment International*, vol. 30, pp. 309 - 322, 2004.
- [32] K. Speer, E. Steeg, P. Horstmann, T. Kuhn y A. Montag, «Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe,» *Res. Chrom*, vol. 13, pp. 104 - 111, 1990.
- [33] H. Seto, «Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the lung,» *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 24, pp. 498 - 503, 1993.
- [34] D. Busbee, J. Normal y R. Ziprin, « Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B1 and benzo[a]pyrene.,» *Arch Toxicol*, vol. 4, n° 64, pp. 285 - 90, 1990.
- [35] ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Atlanta, GA: US

Department of Health and Human Services, 1995.

- [36] N. Grova, G. Rychen, F. Monteau, B. Le Bizec y C. Feidt, «Effect of oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on goat's milk contamination.,» *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 26, pp. 195 - 199, 2006.
- [37] J. Gozgit, K. Nestor, M. Fasco, B. Pentecost y K. Arcaro, «Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells.,» *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 196, pp. 58 - 67, 2004.
- [38] J. Michaelson, S. Trump, S. Rudzok, C. Grabsch, D. Madureira, F. Dautel, J. Mai, S. Attinger, K. Schirmer, M. Von Bergen, I. Lehmann y A. Beyer, «Transcriptional signatures of regulatory and toxic responses to benzo-[a]-pyrene exposure.,» *BMC Genomics*, vol. 12, p. 502, 2011.
- [39] L. Quiñones, K. Lee, N. Varela, M. Escala, K. García y L. Godoy, «Farmacogenética del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos.,» *Rev Med Chile*, pp. 134:499-515, 2006.
- [40] Q. Lan, J. Mumford, M. Shen, D. De Marini, M. Bonner, X. He, M. Yeager, R. Welch, S. Chanock, L. Tian, R. Chapman, T. Zheng, P. Keohavong, N. Caporaso y N. Rothman, «Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions.,» *Carcinogenesis*, vol. 25, n° 11, pp. 2177 - 2181, 2004.
- [41] K. Straif, R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F. El ghissassi y V. Cogliano, «Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons.,» *The Lancet Oncology*, vol. 6, pp. 931 - 2, 2005.
- [42] H. Shertzer, C. Clay, M. Genter, M. Chames, S. Schneider, G. Oakley, D. Nebert y T. Dalton, «Uncoupling-mediated generation of reactive oxygen by halogenated aromatic hydrocarbons in mouse liver microsomes.,» *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, n° 5, pp. 618 - 631, 2004.

- [43] k. Bock y B. Bock-Hennig, «UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): from purification of Ah-receptor UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): from purification of Ah-receptor,» *Drug Metab. Rev*, vol. 42, n° 1, pp. 5 - 12, 2010.
- [44] W. Popp, «DNA single strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers,» *Occup Environ Med*, vol. 54, pp. 176 - 83, 1997.
- [45] USDA, «United states departament of agriculture, Información sobre Inocuidad de Alimentos,» 2007. [En línea]. Available: http://www.fsis.usda.gov/PDF/Spanish_Smoking_Meat_and_Poultry.pdf. [Último acceso: 22 febrero 2016].
- [46] E. Fasano, I. Yebra-Pimentel, E. Martínez-Carballo y J. Simal-Gandara, «Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods,» *Food Control*, vol. 59, pp. 581 - 590, 2015.
- [47] E. Ledesma, M. Rendueles y M. Diaz, «Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention,» *Food Control*, vol. 60, pp. 64-87, 2015.
- [48] J. Ahmad, Smoked foods/applications of smoking, 2da ed. ed., Encyclopedia of food sciences and nutrition, 2003, pp. 5309-5316.
- [49] W. Müller, Verfahren der Heissraucherung dünnkalibriger Brühwurst ("Hot smoking process"), *Fleischforsch: Mitt. Bundesanst*, 1982, pp. 76, 5006.
- [50] P. Simko, «Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meats. Safety of meat and processed meat,» *Food microbiology and food safety*, pp. 343-363, 2009.
- [51] L. Woods, Smoked foods/principles. Encyclopedia of food sciences and nutrition, 2nd ed ed., 2003, pp. 5296-5301.
- [52] E. Essien, Fabricación de embutidos. Principios y práctica, Acribia, 2003, pp. 7 - 10.

- [53] K. Mohler, Das Rauchern [The smoking process]. Germany: A.V.D. Rheinhesischen Druckwerkst€atte (“title in German”)., 1978.
- [54] M. Pohlmann, A. Hitzel, F. Schwagele, K. Speer y W. Jira, «Influence of different smoke generation methods on the contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in frankfurter-type sausages,» *Food Control*, vol. 34, pp. 347 - 355, 2013.
- [55] V. Varlet, T. Serot, C. Knockaert, J. Cornet, M. Cardinal y F. Monteau, «Organoleptic characterization and PAH content of salmon (*Salmo salar*) fillets smoked according to four industrial smoking techniques,» *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 87, pp. 847 - 854, 2007.
- [56] J. Lingbeck, P. Cordero, C. O'Bryan, M. Johnson, S. Ricke y P. Crandall, «Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation,» *Meat Science*, vol. 97, pp. 197 - 206, 2014.
- [57] M. Vaz-Velho, Smoked foods/Production. Encyclopedia of food sciences and nutrition, 2nd ed ed., 2003, pp. 5302 - 5309.
- [58] K. Moller, El Ahumado, Acribia, 1984, p. 8.
- [59] R. Abburrá, Evaluación y Control de los Impactos Generados por Sustancias y Residuos no Convensionales (2da parte). Grupo editor Encuentro, Brujas, 2007.
- [60] Y. Kazakevich y R. Lobrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists, New Jersey, 2007, pp. 9,10.
- [61] D. Harvey, Modern Analytical Chemistry, 1 st ed The McGraw-Hill Companies, 2000, p. 581.
- [62] J. Tadeo, C. Sanchez-Brunete, B. Albero y A. Garcia-Valcarcel, «Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples,» *Journal of Chromatography*, vol. 1217, pp. 2415 - 2440, 2010.
- [63] D. Castro, «Los suelos en colombia,» [En línea]. Available:

<http://www.sogeocol.edu.co/documentos/05loss.pdf>. [Último acceso: 2016 05 14].

- [64] J. Capelo y A. Mota , «Curr. Anal.» *Chem 1*, vol. 1, p. 193, 2005.
- [65] C. Banks y R. Compton, *Analyst* 129, 2004, p. 678.
- [66] H. Santos y J. Capelo, *Talanta* 73, 2007, p. 795.
- [67] J. Huertas-Perez, M. del Olmo, A. Garcia-Campaña, A. Gonzalez-Casado y A. Sanchez-Navarro, *Journal Chromatogr A*, vol. 1102, p. 280, 2006.
- [68] M. Luque de Castro y F. Priego-Capote, «Analytical Applications of Ultrasound,» *1st ed., Elsevier, Amsterdam*, 2007.
- [69] Y. Pico , *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Elsevier, Oxford, UK, 2012, p. 117.
- [70] F. Chemat y M. Khan, *Ultrason. Sonochem.*, vol. 18, 2011, p. 813.
- [71] T. Mason, L. Paniwnyk y J. Lorimer, *Ultrason. Sonochem.* 3, 1996, pp. S253 - S260.
- [72] J. Luque-Garcia y M. Luque de Castro, « Ultrasound: a powerful tool for leaching,» *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 22, nº 1, pp. 41 - 47, 2003.
- [73] A. Soria y M. Villamiel, *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 21, 2010, p. 323.
- [74] K. Suslick, *The year of book of science and future*, Encyclopedia Britannica, 1994, p. 138.
- [75] C. Bendicho, I. De La Calle, F. Pena, M. Costas, N. Cabaleiro y I. Lavilla, «Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry,» *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 31, pp. 1 - 11 , 2012.
- [76] M. Vinatoru, M. Toma, O. Radu, P. Filip, D. Lazurca y T. Mason, «The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials,» *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 4, pp. 135 - 139, 1997.

- [77] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel y J. Tadeo, «Multiresidue analysis of fungicides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and gas chromatograph,» *Journal of Chromatography A*, vol. 976, pp. 319 - 327, 2002.
- [78] C. Sánchez-Brunete, J. Rodríguez y J. Tadeo, *J. Chromatogr A*, vol. 1007, p. 85, 2003.
- [79] J. Djinovic, A. Popovic y W. Jira, «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia,» *Meat Science* 80, p. 449–456, 2008.
- [80] W. Jira, K. Ziegenhals y K. Speer, «Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and edible oils,» *Food Additives and Contaminants*, vol. 25, pp. 704 - 713, 2008.
- [81] D. Essumang, D. Dodoo y j. Adjei, «Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in smoke-cured fish products. Ghana,» *Food Comp Anal* 27, pp. 128 -38, 2012.
- [82] NMX-F-428 ALIMENTOS, Determinacion de humedad (Metodo rapido de la termobalanza). Foods. Determination of moisture (thermobalance rapid method). Normas mexicanas, 1982.
- [83] J. N. Miller y J. C. Miller, Estadística y Quimiometria para quimica analitica, Cuarta Edicion, Madrid: Pearson Educacion S.A., 2002, pp. 189-218.
- [84] J. Hurtado y R. Gomez, Diseños experimentales, pp. 283,33-40.
- [85] M. Badii, J. Castillo, M. Rodriguez, A. Wong y P. Villalpando, Experimental Designs and Scientific Research, Mexico, 2007, pp. 329,293-297.
- [86] USP, The United States Pharmacopeia -NF19 The National Formulary, Chapter<1225> Validation of Compendial Methods, 2002.
- [87] Inti-Quimica, Requerimeintos sobre la validacion de metodos en el marco de la

acreditacion de laboratorios segun la norma ISO 17025: 2005, 2005.

- [88] AOAC, «Guidelines for single laboratory,» 2002. [En línea]. Available: http://www.aoac.org/vmeth/Validation_Guidelines.html. [Último acceso: 2016 febrero 6].
- [89] N. Bishnoi, U. Mehta y G. Pandit, «Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables using high performance liquid chromatography,» *Indian Journal of Chemical Technology*, vol. 25, 2005.
- [90] K. Dost y I. Cevat, «Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV–Vis detection,» *Food Chemistry*, pp. 193 - 199, 2012.
- [91] EPA, «Environmental Protection Agency,» [En línea]. Available: <http://www.caslab.com/EPA-Methods/>. [Último acceso: 26 05 2016].
- [92] I. Rozentale, I. Stumpe-Viksna, D. Zacs, I. Siksna y A. Melngaile, «Assessment of dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat products produced in Latvia,» *Food Control*, vol. 54, pp. 16 - 22, 2015.
- [93] Y. Tao, H. Yu, D. Chen, Z. Liu, Y. Yang, Y. Pan, L. Wang , Z. Huang y J. Yuan, *Journal Chromatogr B*, vol. 878, nº 3415, 2010.
- [94] S. Gomez-Gonzalez, J. Ruiz-Jimenez, F. Priego-Capote y M. Luque de Castro, «J. Agric,» *Food Chem*, vol. 58, p. 12292, 2010.
- [95] m. Gao y C. Liu, «Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa maxim*,» *World journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 21, pp. 1461 - 1463, 2005.
- [96] P. Rodríguez-Sanmartín, A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barreda y P. Bermejo-Barreda, *Talanta*, vol. 66, p. 683.
- [97] A. Gomes, C. Santos, J. Almeida, M. Elias y L. Roseiro, «Effect of fat content, casing type and smoking procedures on PAH contents of Portuguese traditional dry fermented sausages,» *Food and Chemical Toxicology*, vol. 58, pp. 369 - 374,

2013.

- [98] I. Stumpe-Viksna, V. Bartkevics, A. Kukare y A. Morozovs, «Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood,» *Food Chemistry*, vol. 110, p. 794 – 797, 2008.
- [99] A. Hitzel, M. Pohlmann, F. Schwagele, K. Speer y W. Jira, «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in meat products smoked with different types of wood and smoking spices,» *Food Chemistry*, vol. 139, pp. 955 - 962, 2013.
- [100] S. Chung, R. Yettella, J. Kim, K. Know, M. Kim y D. Min, «Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork,» *Food Chemistry*, vol. 129, pp. 1420 - 1426, 2011.
- [101] S. Skaljic, L. Petrovic, T. Tasic, P. Ikonic, M. Jokanovic y V. Tomovic, «Influence of smoking in traditional and industrial conditions on polycyclic aromatic hydrocarbons content in dry fermented sausages from Serbia,» *Food Control*, vol. 40, pp. 12 - 18, 2014.
- [102] S. Wretling, A. Eriksson, G. Eskhult y B. Larsson, «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Swedish smoked meat and fish,» *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 23, pp. 264 - 272, 2010.
- [103] M. Jahurul, S. Jinap, I. Zaidul, F. Sahena, A. Farhadian y P. Hajeb, «Determination of fluoranthene, benzo[b]fluoranthene and benzo[a]pyrene in meat and fish products and their intake by Malaysian,» *Food Bioscience*, vol. 1, pp. 73 - 80, 2013.
- [104] O. Olatunji, O. Fatoki, B. Opeolu y B. Ximba, «Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography e flame ionization detector,» *Food Chemistry*, vol. 156, pp. 296 - 300, 2014.
- [105] L. Roserio, A. Gomes y C. Santos, «Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product,» *Food*

and *Chemical Toxicology*, vol. 49, pp. 1340 - 1345, 2011.

- [106] C. Santos, A. Gomes y L. Roseiro, «Polycyclic aromatic hydrocarbons incidence in Portuguese traditional smoked meat products,» *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, pp. 2343 - 2347, 2011.
- [107] C. Santos, A. Gomes y L. Roseiro, «Polycyclic aromatic hydrocarbons incidence in Portuguese traditional smoked meat products,» *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, p. 2343–2347., 2011.
- [108] P. Burdaspal, T. Legarda y J. Sanchez, *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, 2001, pp. 11-17.
- [109] E. Lichtfouse, S. Apitz y M. Nanny, Ancient polycyclic aromatic hydrocarbons in modern soils: ¹³C, ¹⁴C and biomarker evidence. *Org Geochem*, 1999, pp. 26: 353-9.
- [110] TOXNET, «Toxicological Data Network,» [En línea]. Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>. [Último acceso: 10 Enero 2016].
- [111] H. Ryser, Chemical carcinogenesis. *N Engl J Med*, 1991, pp. 285: 721-34.
- [112] J. Henkjan, H. Verkade y P. Tso, Biophysics of intestinal luminal lipids. In: Mansbach CM. *Intestinal lipid metabolism*. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2001, pp. 1-19.
- [113] R. Buesen, M. Mock, H. Nau, A. Seidel, J. Jacob y A. Lampen, «Human intestinal Caco-2 cells display active transport of benzo[a]pyrene metabolites,» *Chem Biol Interact*, pp. 142:201-21, 2003.
- [114] S. Cavret y C. Feidt, «Intestinal metabolism of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium,» *Environ Res*, pp. 98:22-32, 2005.
- [115] x. Boulenc, M. Bourrie, I. Fabre, C. Roque, H. Joyeux y Y. Berger, Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line, Caco-2. *J*

Pharmacol Exp Ther, 1992, pp. 263:1471-8.

- [116] J. Kaarthik, Modulation of gene expression and DNA adduct formation by chlorophyllin in human mammary cells exposed to benzopyrenes. West Virginia: Department of Plant and Soil Science Morgantown, 2006.
- [117] M. Stayne, Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil. *Int Rev Food Sci Technol*, 2003, pp. 141:136-7.
- [118] w. Xue y D. Warshawsky, «Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage,» *Toxicol Appl Pharmacol*, pp. 206:73-93., 2005.
- [119] Q. Ruan, S. Gelhaus, T. Penning, R. Harvey RG y I. Blair, «Aldo-keto reductase- and cytochrome P450-dependent formation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in human bronchoalveolar cells,» *Chem Res Toxicol*, pp. 20:424-31, 2007.
- [120] Y. Wei, Y. Lin, L. Guo, A. Zhang y J. Cao, «Evaluation of the noncovalent binding interactions between polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and human p53 cDNA,» *Sci Total Environ*, pp. 408:6285-90, 2010.
- [121] M. Gao, Y. Li, Y. Sun, J. Long, Y. Kong y S. Yang, «A common carcinogen benzo(a)pyrene causes p53 overexpression in mouse cervix via DNA damage,» *Mutat Res*, pp. 724:69-75., 2011.
- [122] G. Mastrangelo, E. Fadda E y V. Marzia, «Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man,» *Environ Health Perspect*, pp. 104:1166-70, 1996.
- [123] Comision Europea, Opinion of the scientific committee on food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons, Brussels, 2002.
- [124] N. Kazerouni, R. Sinha, C. Hsu, A. Greenberg y N. Rothman, «Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study,» *Food Chem Toxicol*, pp. 39:423-36, 2002.

- [125] Comisión Europea, «Regulación N° 1881/2010 por la cual se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios,» 2010.
- [126] S. Cavret, C. Feidt, Y. Le Roux y F. Laurent, «Study of mammary epithelial role in polycyclic aromatic hydrocarbons transfer to milk,» *Dairy Sci*, pp. 88:67-70, 2005.
- [127] E. Ledesma , M. Rendueles y M. Diaz, «Benzo(a)pyrene penetration on a smoked meat product during smoking time,» *Food Additives and Contaminants*, vol. 31, pp. 1688 - 1698, 2014.
- [128] B. Berg, H. Lund, A. Kringstad y A. Kvernheim, «Routine analysis of hydrocarbons, PCB and PAH in marine sediments using supercritical CO2 extraction,» *Chemosphere*, vol. 38, pp. 587 - 599, 1999.
- [129] TALQ, «TÉCNICAS Y OPERACIONES AVANZADAS EN EL LABORATORIO QUÍMICO,» [En línea]. Available: <http://www.ub.edu/talq/es/node/252>. [Último acceso: 20 05 2016].

ANEXO 1

Tabla 23. Prueba F para varianzas de la concentración de las muestras (concentración con nitrógeno y concentración con aire)

	<i>Corriente de nitrógeno</i>	<i>Corriente de aire</i>
Media	90.27	94.94
Varianza	9.78	9.78
Observaciones	2	2
Grados de libertad	1	1
F	1	
P(F<=f) una cola	0.50	
Valor crítico para F (una cola)	0.01	

Tabla 24. Prueba t para la concentración de las muestras (concentración con nitrógeno y concentración con aire)

	<i>Corriente de nitrógeno</i>	<i>Corriente de aire</i>
Media	90.27	94.94
Varianza	9.78	9.78
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	9.78	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-1.49	
P(T<=t) una cola	0.14	
Valor crítico de t (una cola)	2.92	
P(T<=t) dos colas	0.27	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30	

Tabla 25. Análisis de varianza para el monitoreo de benzo[a]pireno por HPLC en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	1357,66	6	226,28	21,18	<0.0001
Entre Bloques	73,19	2	36,59	3,43	0,0665
Error	128,18	12	10,68		
Total	1559,03	20			

Tabla 26. Análisis de varianza del contenido de humedad (%) en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	2695.69	6	449.28	301.79	<0.0001
Entre Bloques	12.32	2	6.16	4.14	0.0430
Error	17.86	12	1.49		
Total	2725.87	20			

Tabla 27. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra A). Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	188.66	2	94.33	12.54	0.0349
Dentro de los grupos	22.56	3	7.52		
Total	211.22	5			

Tabla 28. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra B). Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	0.95	2	0.47	0.59	0.6065
Dentro de los grupos	2.40	3	0.80		
Total	3.34	5			

Tabla 29. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra C). Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	12.27	2	6.13	29.97	0.0104
Dentro de los grupos	0.61	3	0.20		
Total	12.88	5			

Tabla 30. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra D). Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	23.61	2	11.80	47.37	0.0054
Dentro de los grupos	0.75	3	0.25		
Total	24.35	5			

Tabla 31. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra E). Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	173.47	2	86.73	33.17	0.0090
Dentro de los grupos	7.84	3	2.61		
Total	181.31	5			

Tabla 32. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra F). Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	5.29	2	2.65	11.01	0.0415
Dentro de los grupos	0.72	3	0.24		
Total	6.01	5			

Tabla 33. Análisis de varianza de los niveles de benzo[a]pireno entre lotes dentro de la misma muestra (muestra G). Arequipa, 2016

Fuentes de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico F	p-valor
Entre grupos	0.29	2	0.15	1.03	0.4560
Dentro de los grupos	0.43	3	0.14		
Total	0.72	5			