

**Universidad Católica de Santa María**  
**Escuela de Postgrado**  
**Maestría en Química del Medio Ambiente**



**“EVALUACION DE LOS NIVELES DE BENZO[a] PIRENO POR  
CROMATOGRFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) EN POLLOS  
A LA BRASA, AREQUIPA – 2017.”**

Tesis presentada por la bachiller:

**Pacheco Torreblanca, Georgia Janette**

Para optar el Grado Académico de

**Maestro en Química del Medio Ambiente**

Asesor:

**Jaime Cárdenas García PhD.**

**Arequipa – Perú**

**2017**



*Universidad Católica de Santa María*

☎ (5154)251210 📠 (5154)251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> 📍 Apto. 1350  
AREQUIPA – PERÚ

*En la Ciencia y en la Fe esta nuestra Fortaleza para mayor Gloria de Dios*

13

Arequipa, 20 de diciembre del 2017

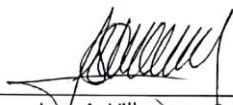
Señor Doctor,  
**Hugo Tejada Pradell**  
Director de la Escuela de Postgrado de la UCSM.  
Presente.

**Ref.: Dictamen de Borrador de Tesis - Expediente 57821**

De mi consideración,

Me es grato dirigirme a Ud. con el fin de saludarlo atentamente y en atención al nombramiento como DICTAMINADOR del Borrador de Tesis titulado “**EVALUACION DE LOS NIVELES DE BENZO[a]PIRENO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) EN POLLOS A LA BRASA, AREQUIPA - 2017**” con el que la bachiller **Georgia Janette Pacheco Torreblanca**, pretende optar el Grado Académico de **Maestro en Química del Medio Ambiente**, debo mencionar que realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, las mismas que han sido salvadas satisfactoriamente, considero se encuentra APTO para continuar con los tramites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela de Postgrado

Atentamente,



\_\_\_\_\_  
José A. Villanueva Salas, PhD  
Docente de la Escuela de Postgrado

(14)



*Universidad Católica de Santa María*

AREQUIPA - PERU ☎ (51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ [ucsm@ucsm.edu.pe](mailto:ucsm@ucsm.edu.pe) <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

**DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS PARA EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO**

Graduando: PACHECO TORREBLANCA, GEORGIA JANETTE

Título de la tesis: EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE BENZO[a]PIRENO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) EN POLLOS A LA BRASA, AREQUIPA-2017

**Dictamen:**

Se ha procedido a la revisión de la presente tesis la cual ha logrado obtener los objetivos establecidos y cumple con lo estipulado con la reglamentación vigente, por lo que considero que el trabajo está apto para su sustentación.

Arequipa 19 de diciembre del 2017

  
Jaime Cárdenas García, PhD  
Cod. 0838



*Universidad Católica de Santa María*

(51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ [ucsm@ucsm.edu.pe](mailto:ucsm@ucsm.edu.pe) <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

*IN SCIENTIA ET FIDE EST FORTITUDO NOSTRA*

*(En la ciencia y en la fe está nuestra fortaleza)*

Arequipa, 21 del Diciembre del 2017

Señor Doctor,  
**Hugo Tejada Pradell**  
Director de la Escuela de Postgrado de la UCSM  
Presente.

**Ref.: DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS PARA EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO**

Graduando: GEORGIA JANETTE PACHECO TORREBLANCA

Título de la Tesis:

EVALUACION DE LOS NIVELES DE BENZO(a)PIRENO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) EN POLLOS A LA BRASA, AREQUIPA-2017

Se ha procedido a la revisión de la presente tesis la cual ha logrado obtener los objetivos establecidos y cumple con lo estipulado con la reglamentación vigente por lo que considero que el trabajo está apto para su sustentación

Atentamente,



Dr. JULIO CESAR BERNABE ORTIZ

## DEDICATORIA

A **Dios**, porque supo entregarme lo que merecía en el tiempo que creyó que debía recibirlo.

A mis padres **Hermes** (†) y **Gaby**, porque supieron entregarme el apoyo, coraje y tenacidad que necesitaba, por su motivación continua y paciencia, porque creyeron en mí, porque sin ellos no estaría donde estoy.

A mis hermanos, **Noelia** y **Moisés**, porque hacen mis días alegres y por su apoyo constante en cada idea que se nos ocurre.

A mis abuelitos, **Jorge** (†), **Hermógenes** (†), **María** (†) que desde el cielo sé que me cuidan y guían mis pasos pero en especial a mi abuelita **Arencia**, por aconsejarme, cuidarme y darme una razón para seguir adelante.

A mi familia, tíos y primos por su cariño, apoyo y ánimos para continuar en mi superación.

A mis amigos y demás personas que gracias a su amistad me apoyan y me sostienen siempre que los necesito.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación tecnológica (CONCYTEC) por el financiamiento para la ejecución y desarrollo de éste trabajo de investigación a través del contrato N° 033-2015 FONDECYT, conjuntamente con la Universidad Católica de Santa María.

Al laboratorio “Proyecto Mercurio” de la Universidad Católica de Santa María, por el apoyo constante en los trabajos de investigación realizados, al Dr. José Villanueva Salas por la confianza, paciencia y enseñanzas impartidas en todo este tiempo, gracias.

A mis docentes de la Maestría en Química del Medio Ambiente, Dr. Gonzalo Dávila del Carpio, Dr. Jaime Cárdenas García, Dr. Badhin Gómez Valdez, Dr. Julio Cesar Bernabé Ortiz, por las lecciones y conocimientos transmitidos en el transcurso de ésta Maestría.

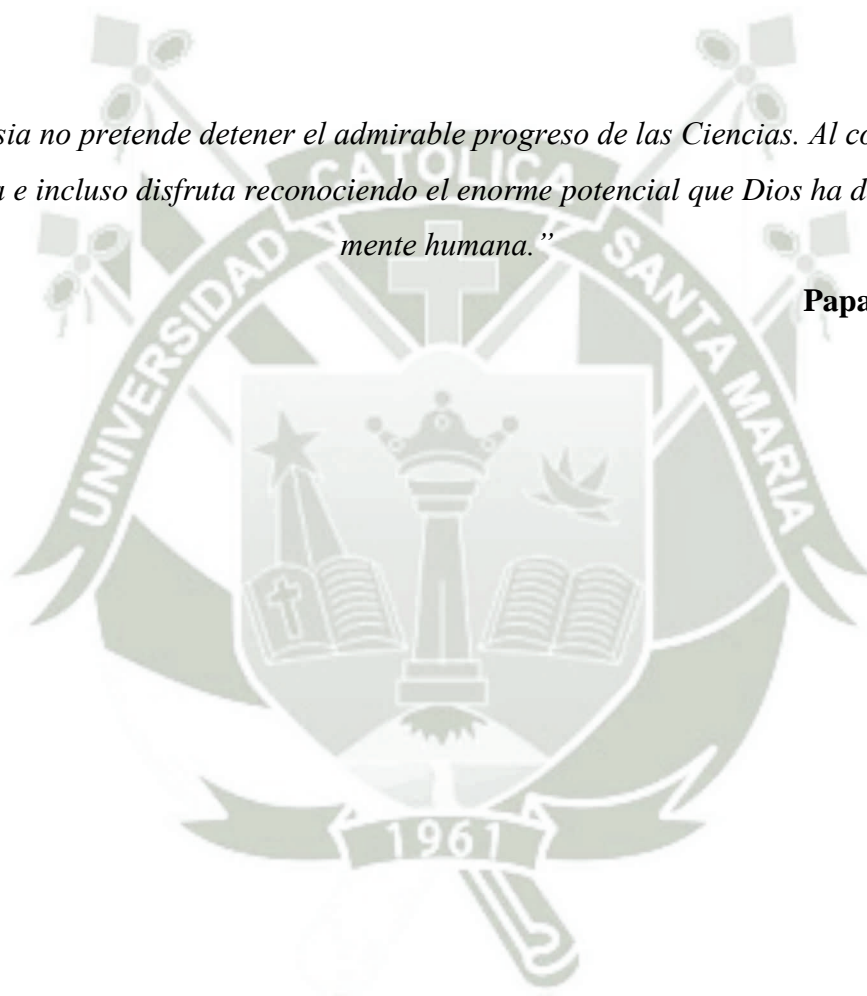
A la Magister Julitza Paredes Fuentes y la Magister Jeaneth Medina Pérez, por su amistad, enseñanza y apoyo incondicional en cada momento que compartimos.

**Muchas Gracias**

## EPIGRAFE

*“La Iglesia no pretende detener el admirable progreso de las Ciencias. Al contrario, se alegra e incluso disfruta reconociendo el enorme potencial que Dios ha dado a la mente humana.”*

**Papa Francisco**



## INDICE GENERAL

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**INTRODUCCION**

**HIPOTESIS..OBJETIVOS**

### CAPITULO I

<b>MARCO TEORICO</b> .....	1
1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos .....	1
1.1. Benzo[a]pireno.....	2
1.1.1. Propiedades Físicas y Químicas del Benzo[a]pireno.....	2
1.1.2. Benzo[a]pireno y los riesgos en la salud.....	2
a) Carcinogénesis.....	3
1.1.3. Contaminación de alimentos con Benzo[a]pireno.....	7
1.1.4. Benzo[a]pireno en el aire, agua y suelo.....	7
a) Aire.....	7
b) Agua.....	8
c) Suelo.....	9
1.1.5. Reglamentación de Benzo[a]pireno.....	9
1.1.6. Remediación del Benzo[a]pireno.....	9
2. Pollo a la Brasa.....	10
2.1. Buenas Prácticas Ambientales para la producción de Pollos a la Brasa – Prototipos.....	11
3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	16
3.1. Configuración Instrumental .....	16
3.2. Partes del HPLC.....	16
3.3. Tipos de Cromatografía.....	19
3.3.1. Cromatografía de Fase Normal de Alto Rendimiento (HP-NPC).....	19
3.3.2. Cromatografía de Fase Inversa de Alto Rendimiento (HP-RPC).....	19

3.3.3. Cromatografía de Intercambio Iónico de Alto Rendimiento (HP-IEX).....	19
4. Análisis de Antecedentes Investigativos.....	20

## CAPITULO II

<b>PLANTEAMIENTO OPERACIONAL</b> .....	23
1. Campo de Verificación.....	23
1.1. Ubicación Espacial.....	23
1.2. Ubicación Temporal.....	23
1.3. Unidades de Estudio.....	23
2. Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación.....	24
2.1. Materiales y Reactivos.....	24
2.2. Metodología y Análisis.....	24
2.2.1. Recolección de Muestras.....	24
2.2.2. Validación del Método Cromatográfico para la determinación del Benzo[a]pireno.....	25
2.2.3. Determinación de Benzo[a]pireno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	28
3. Estrategia de recolección de Datos.....	28
3.1. Análisis Estadístico.....	28

## CAPITULO III

<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	30
1. Validación del Método Analítico.....	30
1.1. Preparación de la Solución Estándar.....	30
1.2. Condiciones Óptimas para la determinación de Benzo[a]pireno.....	30
1.3. Validación del Método de determinación de Benzo[a]pireno por HPLC.....	34
1.3.1. Linealidad.....	34
1.3.2. Precisión.....	34
1.3.3. Exactitud.....	34
1.3.4. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	35

1.4. Muestreo de Pollo a la Brasa.....	42
1.5. Tratamiento de la muestra.....	42
2. Evaluación del Benzo[a]pireno en Pollo a la Brasa.....	47
3. Discusión.....	56

#### CAPITULO IV

<b>CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>SUGERENCIAS</b> .....	61
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	62
<b>ANEXOS</b> .....	67

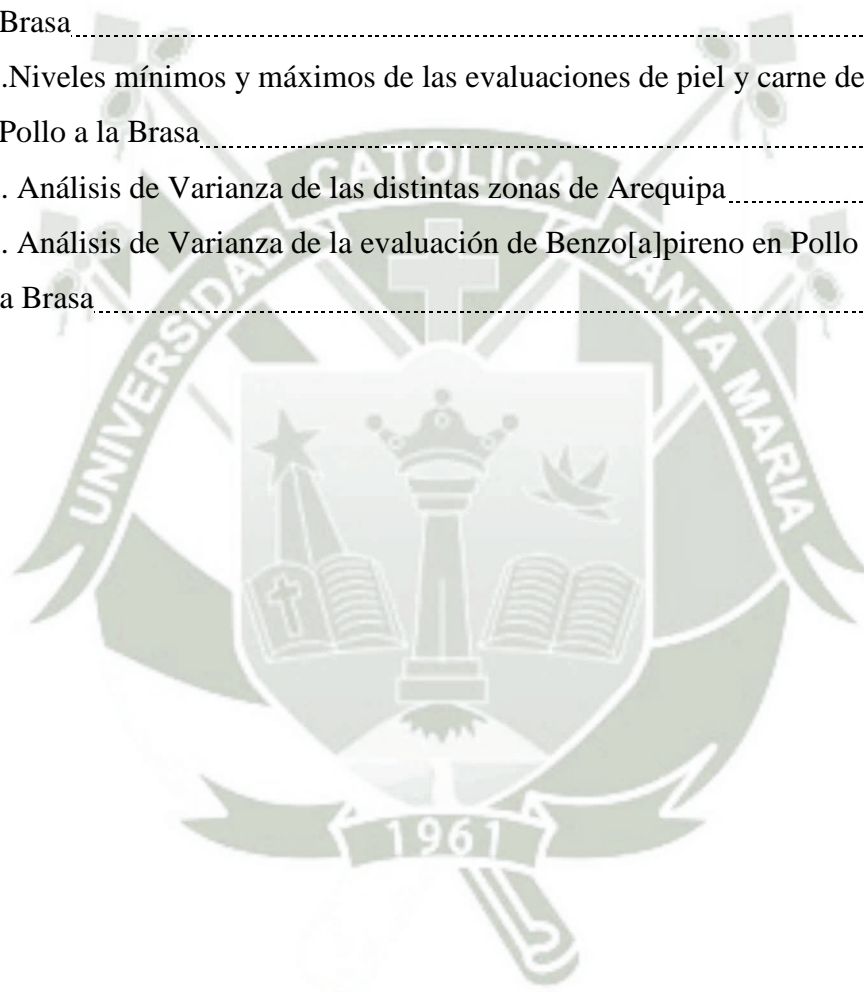


## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura del Benzo[a]pireno .....	4
Figura 1.2. Vía metabólica mediante la cual el Benzo[a]pireno se bioactiva a benzo[a]pirenoDE (benzo[a]pireno diol epóxido), metabolitos altamente reactivos .....	6
Figura 1.3. Partes del Horno de bajas emisiones para Pollerías .....	14
Figura 1.4. Componentes del sistema Mecatrónico .....	15
Figura 1.5. Esquema del sistema de HPLC genérico .....	18
Figura 3.1. Espectro de absorción del Benzo[a]pireno .....	32
Figura 3.2. Tiempo de retención del Benzo[a]pireno en HPLC .....	33
Figura 3.3. Curva de calibración para el método HPLC .....	37
Figura 3.4. Gráfica de concentración versus área .....	40
Figura 3.5. Gráfica de concentración versus desviación estándar .....	41
Figura 3.6. Piel triturada de Pollo a la Brasa .....	44
Figura 3.7. Carne de pollo triturada de Pollo a la Brasa .....	45
Figura 3.8. Cromatograma de una muestra y el estándar de Benzo[a]pireno .....	46
Figura 3.9. Primera evaluación en piel de Pollo a la Brasa .....	48
Figura 3.10. Primera evaluación de carne de pollo de Pollo a la Brasa .....	49
Figura 3.11. Segunda evaluación de piel de Pollo a la Brasa .....	50
Figura 3.12. Segunda evaluación de carne de pollo de Pollo a la Brasa .....	51
Figura 3.13. Tercera evaluación de piel de Pollo a la Brasa .....	52
Figura 3.14. Tercera evaluación de carne de pollo de Pollo a la Brasa .....	53
Figura 4.1. Pollo a la Brasa .....	67
Figura 4.2. Sistema de cocción a la Brasa .....	68
Figura 4.3. Muestras de piel y carne de pollo trituradas .....	69
Figura 4.4. Muestra en extracción por sonicación ultrasonido .....	70
Figura 4.5. Muestras analizadas en el equipo de HPLC .....	71
Figura 4.6. Gráfica de Linealidad de la primera evaluación de muestras .....	72
Figura 4.7. Gráfica de Linealidad de la segunda evaluación de muestras .....	73
Figura 4.8. Gráfica de Linealidad de la tercera evaluación de muestras .....	74

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Propiedades Químicas del Benzo[a]pireno .....	5
Tabla 2.1. Condiciones Cromatográficas .....	29
Tabla 3.1 .Datos para determinar la linealidad del método .....	36
Tabla 3.2. Datos para determinar la precisión del método .....	38
Tabla 3.3. Recuperación del método .....	39
Tabla 3.4 Muestra para la evaluación de Benzo[a]pireno en Pollos a la Brasa .....	43
Tabla 3.5. Niveles mínimos y máximos de las evaluaciones de piel y carne de Pollo a la Brasa .....	55
Tabla 4.1. Análisis de Varianza de las distintas zonas de Arequipa .....	75
Tabla 4.2. Análisis de Varianza de la evaluación de Benzo[a]pireno en Pollo la Brasa .....	76



## RESUMEN

Este estudio evaluó la concentración de benzo[a]pireno en Pollos a la Brasa en la ciudad de Arequipa, Perú. La evaluación se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Se determinaron 9 pollerías de la ciudad de Arequipa, ubicadas entre los distritos del Cercado, Jacobo Hunter, Yanahuara y Cayma para la toma de muestra, comparando los resultados obtenidos con el nivel máximo permitido de  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  dado por las Comisiones de las Comunidades Europeas.

Se tomaron como muestra la piel y la carne de pollo para realizar los análisis, obteniendo los siguientes resultados: para piel el nivel mínimo encontrado fue de  $12.95\mu\text{g}/\text{kg}$ , y el nivel máximo fue de  $99.55\mu\text{g}/\text{kg}$ . Mientras que para la carne de pollo se obtuvieron las siguientes cifras: nivel mínimo fue de  $12.75\mu\text{g}/\text{kg}$  y el nivel máximo fue de  $111.53\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**PALABRAS CLAVE:** *Benzo[a]pireno, HPLC, Pollo a la Brasa, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos*

## ABSTRACT

This study evaluated the concentration of benzo [a] pyrene in grilled chicken in the city of Arequipa, Peru. The evaluation was performed by High Resolution Liquid Chromatography. A total of 9 grilled chicken restaurants from Arequipa, located in the districts of Cercado, Jacobo Hunter, Yanahuara and Cayma, were determined for sampling, comparing the results obtained with the maximum allowed level of 5µg/kg given by the Commissions of the European Communities. .

The sample was taken from the skin and the chicken meat to perform the analyzes, obtaining the following results: for the skin the minimum level was 12.95 µg/kg, and the maximum level of 99.55 µg /kg. While for chicken meat it obtained the following quantities: minimum level 12.75 µg/kg and the maximum level 111.53 µg/kg.

**KEY WORDS:** *Benzo[a]pyrene, HPLC, Chicken grilled, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*

## INTRODUCCION

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son una clase de contaminantes orgánicos diseminados en el medio ambiente a través de la combustión incompleta de materiales orgánicos y por procesos naturales, esencialmente la consecuencia de actividades antropogénicas tal como la combustión de combustibles fósiles, carbón y madera, calefacción residencial, cocina y tabaquismo, y están muy extendidos en el aire, el agua y el suelo de áreas urbanas y rurales <sup>(1, 2)</sup> .

El benzo[a]pireno (BaP) es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), se define como un compuesto químicamente estable que contiene dos o más anillos aromáticos compuestos por átomos de carbono e hidrógeno. El benzo[a]pireno (BaP) se encuentra generalmente con otros HAP como en el humo del cigarrillo, vehículos, petróleo, combustible, carbón, procesamiento de gas natural y como subproducto de distintos procesos industriales.

Los alimentos pueden estar contaminados con HAP principalmente durante el proceso de cocción, como asar a la parrilla, asar y ahumar. La formación de aductos del benzo[a]pireno-ADN en el cuerpo humano puede interrumpir el proceso de replicación del ADN y se relaciona con un mayor riesgo de varios cánceres por la ingesta de

alimentos contaminados. Por esta razón, el benzo[a]pireno se clasifica como un compuesto que tiene un modo de acción mutagénico (MOA) para generar tumores. Por lo tanto, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud concluyó que el benzo[a]pireno es cancerígeno en animales de experimentación y probablemente en humanos <sup>(3)</sup>.

La preocupación por el consumo de pollo a la brasa ha aumentado en el Perú, El Instituto Nacional de Estadística e Informática reportó que en el año 2014, el consumo promedio de pollo a la brasa, dentro de los hogares, a nivel nacional fue de 24,4 kilos al año. Las pollerías aumentaron las ventas en mayo de 2015, la producción del subsector de restaurantes registró un crecimiento de 3,46%. En el mismo periodo las pollerías tuvieron un aumento en sus ventas de 2,6%, con respecto a similar mes del año anterior, últimas cifras reportadas a la fecha <sup>(4)</sup>.

Los hábitos de cocina de los consumidores y el aumento del consumo de pollo a la brasa pueden aumentar la exposición involuntaria al benzo[a]pireno y pueden causar problemas de salud, a su vez también causando daños al medio ambiente, ya que la técnica de “a la brasa”, desprende humo por chimeneas siendo una fuente más de contaminación del aire de la ciudad.

La presente investigación busca evaluar los niveles de benzo[a]pireno en pollos a la brasa de la ciudad de Arequipa con el fin de generar información a la población arequipeña, así mismo proporcionar datos y pruebas que permitan gestionar un reglamento peruano en cuánto a los límites máximos de consumo de esta sustancia.



## HIPOTESIS

Dado que el pollo a la brasa consiste en una técnica de cocción directa en brasa la cual desprende productos gaseosos y teniendo conocimiento que el benzo[a]pireno es uno de esos productos de combustión incompleta de materia orgánica teniendo efectos dañinos para la salud, es posible que dicho contaminante pueda acumularse en el pollo a la brasa que se consumen en la ciudad de Arequipa.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los niveles de benzo[a]pireno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en pollos a la brasa, Arequipa –2017.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Validar un método para el estudio y la determinación de benzo[a]pireno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en pollos a la brasa.
- Identificar y cuantificar la presencia de benzo[a]pireno en pollos a la brasa por HPLC.
- Contrastar los resultados obtenidos entre las diferentes zonas de muestreo junto con los límites permitidos.





## CAPITULO I MARCO TEORICO

### 1. HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se componen de átomos de hidrógeno y carbono colocados en dos o más anillos de benceno, no contienen heteroátomos ni portan sustituyentes. Los HAP que contienen hasta cuatro anillos de benceno fusionados se conocen como ligeros y los que contienen más de cuatro anillos de benceno se denominan pesados, los HAP pesados son más estables y más tóxicos que los ligeros. La mayoría son de naturaleza lipófila, aunque algunos pueden disolverse en agua. Los HAP se pueden encontrar en deposiciones ambientales, como resultado de la contaminación ambiental como erupciones volcánicas, incendios forestales, por derrames de petróleo y también surgen de la contaminación que el hombre realiza como el tráfico, la incineración, fumar así como algunos procesos de cocción para los alimentos como ahumar, asar, etc <sup>(5-7)</sup>.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son identificados como potentes carcinógenos o mutágenos y están registrados por la Comisión Europea (CE) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) como contaminantes prioritarios y han indicado que 16 principales son contaminantes prioritarios para ser monitoreado en el ambiente <sup>(8, 9)</sup>. Los más estudiados y más

abundantes son fluoreno (FLU), acenaftileno (ACY), antraceno (ANT), fluoranteno (FLT), pireno (PYR), benzo[a]antraceno (BAA), benzo[e]pireno (BEP), benzo[a]pireno (BAP), perileno (PRL), dibenz[a,h]antraceno (DBA) y benzo[g,h,i]perileno (BGP) <sup>(10)</sup>.

## 1.1 BENZO[A]PIRENO

El benzo[a]pireno, un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), se encuentra principalmente en gases de escape de gasolina y diésel, humo de cigarrillo, alquitrán de hulla y alimentos de cocción a base de carbón y otros alimentos, aminoácidos, ácidos grasos y productos de pirólisis de carbohidratos, humo de hollín, aceite de creosota, petróleo aceites de asfalto y pizarra, del humo del escape de los vehículos y los efluentes industriales <sup>(11, 12)</sup>.

### 1.1.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL BENZO[A]PIRENO

Es un hidrocarburo aromático que consta de cinco anillos de benceno fusionados y se forma durante la combustión incompleta de la materia orgánica, son cristales amarillo pálido, inodoro, <sup>(13)</sup>.

### 1.1.2 BENZO[A]PIRENO Y LOS RIESGOS EN LA SALUD

El benzo[a]pireno se ha relacionado con muchas afecciones fisiopatológicas, que incluyen enfermedades inflamatorias de la piel y cáncer de piel. Además, la exposición ocupacional a benzo[a]pireno a través del contacto dérmico se asocia con la alergia crónica a la piel, que es uno de los principales problemas relacionados con la salud pública. Este contaminante también se identifica en el humo de la madera y los alimentos a la brasa y está catalogado como carcinógeno del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, con posible toxicidad para los seres humanos y el medio ambiente <sup>(11)</sup>.

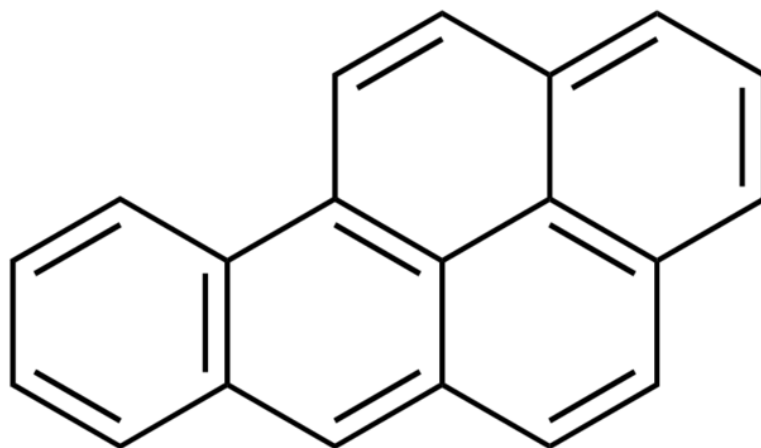
La exposición a largo plazo de benzo[a]pireno conduce a un aumento estimado del número de incidencia de cáncer de pulmón, cáncer de piel y vejiga; genotoxicidad; la exposición prenatal y de la vida temprana a los HAP puede afectar el progreso cognitivo de los niños y estar asociada con problemas de conducta como TDAH (trastorno por déficit de atención con hiperactividad). La OMS ha encontrado

nuevas pruebas que relacionan la exposición de los HAP a la morbilidad y mortalidad cardiovascular <sup>(14)</sup>.

#### a) **CARCINOGENESIS**

Para convertirse cancerígenos, los HAP deben ser metabolizados por la familia de monooxigenasas del citocromo P450 (CYP450) especialmente CYP1A1 (citocromo P450 1A1) y CYP1B1 (citocromo P450 1B1) para reactivar los metabolitos de diol-epóxido. Asimismo, los HAP activan el receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) que desempeña un rol imperativo en la regulación transcripcional de genes diana, incluyendo CYP1A1 y CYP1B1, así como varias enzimas de fase II.

Al unirse con el benzo[a]pireno, AhR se activa, ocasionando la translocación al núcleo y regula la transcripción. El citocromo P450 (CYP1B1) se expresa principalmente en el hígado, la piel muestra una regulación basal diferente, pero comparten la inducción a través del AhR. El benzo[a]pireno es oxidado por el CYP450 durante el metabolismo para originar especies intermedias tóxicas como el diolepóxido de benzo[a]pireno, lo que conduce a la inducción de apoptosis y genotoxicidad. La célula que sufre apoptosis finalmente muestra condensación nuclear seguida de escisión de ADN internucleosómico y activación de las cascadas de caspasa. Las caspasas, las proteasas activadas por cisteína se sintetizan en la caspasa 8 y la caspasa 9 que se activan en la apoptosis intrínseca e intrínseca, respectivamente, sirven para activar la caspasa 3, la principal muerte celular mediada por la caspasa efectora <sup>(15)</sup>.

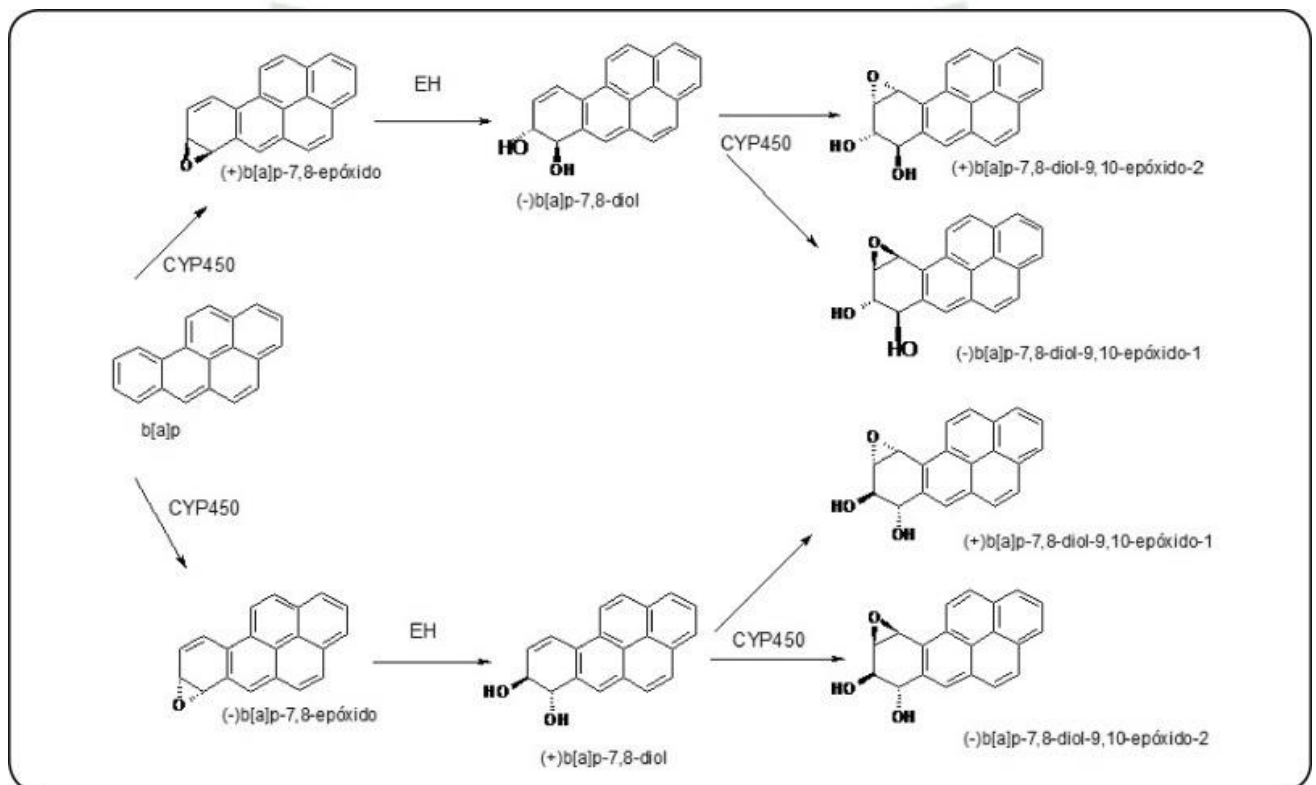


*Figura 1.1. Estructura del Benzo[a]pireno <sup>(12)</sup>.*

**Tabla N°1.1. Propiedades Químicas del Benzo[a]pireno**

<b>PROPIEDAD</b>	<b>VALOR</b>
Punto de ebullición	495- 496°C
Punto de fusión	177-180°C
Densidad relativa	1.35g/cm <sup>3</sup>
Log K <sub>ow</sub>	6.13

*Fuente: Tabla adecuada según <sup>(12, 16)</sup>*



**Figura N°1.2.** Vía metabólica mediante la cual el benzo[a]pireno se bioactiva a b[a]pDE (benzo[a]pireno diol epóxido), metabolitos altamente reactivos <sup>(17)</sup>.

### 1.1.3 CONTAMINACION DE ALIMENTOS CON BENZO[A]PIRENO

En los no fumadores las principales fuentes de exposición son comida y aire. Los alimentos, pueden contener y ser ricos en HAP derivados de procesos de calor; además, debido a sus propiedades lipofílicas, los HAP también pueden contaminar los alimentos por acumulación en la cadena alimentaria. El pescado, en particular, tiene una gran capacidad para acumular contaminantes y para crecer y reproducirse en ambientes contaminados. Además, los peces y otros vertebrados acuáticos son capaces de bioactivar el benzo[a]pireno y otros HAP a través de la actividad de enzimas endógenas que metabolizan xenobióticos. En particular, la subfamilia del citocromo P4501A (CYP1A) es una de las principales enzimas implicadas en el metabolismo del pescado de benzo[a]pireno, y puede estar regulada positivamente mediante la unión de benzo[a]pireno al receptor de hidrocarburo de arilo. Por todas estas razones, a pesar de los beneficios para la salud de una dieta de mariscos, es motivo de preocupación el riesgo potencial derivado del consumo frecuente de mariscos y la consiguiente exposición a contaminantes acuáticos <sup>(8)</sup>.

Los niveles más altos de benzo[a]pireno se encontraran en parrilladas, filetes y hamburguesas muy bien hechos a la parrilla y en pollo asado a la parrilla bien cocido con piel. Los niveles de benzo[a]pireno en artículos no cárnicos son generalmente bajos. Sin embargo, ciertos cereales y verduras por ejemplo, berza, col rizada tenían niveles de hasta 0,5 ng/ g. El pan cereal grano, y parrillada de carne asada, respectivamente, contribuyen con un 29 y 21 por ciento a la ingesta diaria media de benzo[a]pireno <sup>(18)</sup>.

### 1.1.4 BENZO[A]PIRENO EN EL AIRE, AGUA Y SUELO

#### a) AIRE

Alrededor del 90% o más de benzo[a]pirenos en el aire se adsorbe en aerosoles y cerca del 10% o menos se halla en la fase gaseosa. El valor objetivo para benzo[a]pirenos (medido en PM10) se estableció en 1 ng/m<sup>3</sup> como promedio anual.

La contaminación por benzo[a]pirenos es un problema creciente, especialmente en áreas donde el carbón doméstico y la quema de madera son comunes, ya que las

emisiones de benzo[a]pirenos aumentaron en la última década, debido al aumento de las emisiones de la combustión de combustibles domésticos. La combustión residencial es el sector de emisiones de benzo[a]pirenos más importante, ya que contribuye con el 85% de las emisiones totales de benzo[a]pirenos, datos de la UE en el 2012, principalmente a partir de la quema de leña y carbón.

La comunidad internacional, por lo tanto, ha implementado políticas para reducir sus emisiones como el Protocolo al Convenio de la ONU-CEPE sobre contaminación atmosférica transfronteriza de Longrange (CLRTAP) sobre contaminantes orgánicos persistentes (COP) obliga a las partes a informar las emisiones de HAP y tiene como objetivo controlar, reducir o eliminar vertidos, emisiones y pérdidas de COP, incluidos los HAP <sup>(14)</sup>.

#### **b) AGUA**

La principal fuente de benzo (a) pireno en el agua potable es la lixiviación de los revestimientos de los tanques de almacenamiento de agua y las líneas de distribución, así como también suele ser el recubrimiento de alquitrán que se aplica a las tuberías del sistema de distribución de agua de consumo para protegerlas de la corrosión <sup>(19, 20)</sup>.

El alto peso molecular y la naturaleza no polar del benzo[a]pireno proporcionan una baja solubilidad en agua. Sin embargo, las concentraciones en las aguas superficiales dependen en parte de la carga orgánica del sistema acuoso, y de la cantidad de partículas suspendidas a las que el benzo[a]pireno pueden adsorberse <sup>(21)</sup>.

La EPA ha instaurado una regulación aplicable para el benzo[a]pireno llamado nivel máximo de contaminante (MCL), cuyas concentraciones son a 0.0002 mg/L o 200 ng/L, cifra aún protectores de la salud humana. Los MCL se establecen lo más cerca posible de los objetivos de salud, teniendo en cuenta el costo, los beneficios y la capacidad de los sistemas públicos de agua para detectar y eliminar contaminantes mediante el uso de tecnologías de tratamiento adecuadas. La Ley de Agua Potable Segura requiere que la EPA revise periódicamente la reglamentación nacional de agua potable para cada contaminante y revise la reglamentación, si corresponde <sup>(20)</sup>.

### c) SUELO

Los HAP están presentes en el suelo como resultado de procesos naturales y antropogénicos que producen tanto fuentes puntuales como emisiones difusas y tienden a permanecer en el suelo por períodos prolongados debido a su vida media comparativamente larga, que puede variar de años a décadas.

La carga de benzo[a]pireno del suelo se debe principalmente a la deposición de partículas y aerosoles y al lavado de la atmósfera. La ocurrencia de benzo[a]pireno en el suelo, sin embargo, no es una función directa de la emisión, sino que depende en gran medida de las condiciones de transporte / migración. El suelo muestra una gran capacidad como barrera protectora contra la infiltración de benzo[a]pireno a través de la zona vadosa hacia aguas subterráneas <sup>(22, 23)</sup>.

La EPA fijó una nueva cifra de niveles de detección del benzo[a]pireno en suelos siendo 0.12mg/kg <sup>(24)</sup>.

#### 1.1.5 REGLAMENTACION DE BENZO[A]PIRENO

La Comisión de las Comunidades Europeas (CE) ha rectificado recientemente el Reglamento (CE) N° 1881/2006 mediante el Reglamento (UE) N° 835/2011, de 19 de agosto de 2011, que fija nuevos límites máximos para los HAP en los productos alimenticios. Se implantaron nuevos niveles máximos para cuatro sustancias (benzo[a]pireno, benzo[a] antraceno, benzo[b] fluoranteno y criseno), manteniendo un nivel máximo separado para benzo[a]pireno, para asegurar la comparación en datos futuros. El contenido máximo permisible de benzo[a]pireno en carne ahumada y productos cárnicos ahumados fue de 5.0 µg/ kg hasta el 31 de agosto de 2014 y ha sido de 2.0 µg/ kg desde 1 de setiembre de 2014 <sup>(25)</sup>.

#### 1.1.6 REMEDIACION DEL BENZO[A]PIRENO

Se tienen la intención de remediar el benzo[a]pireno debido a su naturaleza mutagénica a cancerígena. Se han aplicado varios métodos para su remediación, incluida la contención, la desorción térmica y la biodegradación.

Estos métodos tienen limitaciones como la contención no es una solución permanente, la desorción térmica conduce a un alto costo y la degradación microbiana de benzo[a]pireno (como tiene más de 3 anillos) es lenta debido a su alta estabilidad y requiere un mantenimiento efectivo de condiciones optimizadas.

Dichos procesos de degradación microbiana se han examinado como un método de tratamiento alternativo en comparación con otros procesos químicos y físicos. Se han aislado varias bacterias por su capacidad de degradar HAP de bajo peso molecular como *Alcaligenes denitrificans*, *Mycobacterium sp.*, *Bacillus subtilis*, pero actualmente sabemos algunas cepas bacterianas que pueden utilizar HAP de cinco anillos, como benzo[a]pireno, por ejemplo el *Microbacterium maritypicum CB7* es capaz de utilizar benzo[a]pireno como única fuente de carbono y energía, y es capaz de degradar el 69% de la cantidad inicial de dicho compuesto.

Por lo tanto, varios estudios de biodegradación se han centrado en el aislamiento de microorganismos que tienen una capacidad de degradación significativa para este compuesto de alto peso molecular.

La fotodegradación utilizando un fotocatalizador es una vía favorable para la eliminación de benzo[a]pireno y otros contaminantes orgánicos persistentes como los pesticidas. El  $TiO_2$  en diferentes formas disponibles se ha utilizado ampliamente como fotocatalizador para la degradación en soluciones acuosas y en superficies de suelo. Sin embargo, hay escasos datos disponibles sobre la desintegración en presencia de óxidos de hierro. Los óxidos de hierro son opciones eficientes, baratas y cómodamente adquiribles para los otros fotocatalizadores existentes, también se investigó la fotodegradación del pireno mutágeno utilizando fase sólida de óxidos de hierro y detectaron el pireno como compuesto intermedio. El benzo[a]pireno es un potente carcinógeno y es considerado un indicador ambiental de la contaminación por HAP. Se han llevado a cabo varios estudios sobre la fotodegradación del benzo[a]pireno en presencia de microorganismos o  $TiO_2$  <sup>(26, 27)</sup>.

## 2. POLLO A LA BRASA

En los años 1950, en la ciudad de Lima, en el distrito de Chaclacayo se inició la receta de este plato. Roger Schuler, un ciudadano suizo, quien ideó la particular e ingeniosa cocción del pollo observando la preparación que realizaba su cocinera, y sucesivamente, junto a ella y otro socio, Franz Ulrich, creó el restaurante La Granja Azul tecnificando la producción. Fue el 19 de diciembre de una fecha referencial de lanzamiento del plato.

Inicialmente su consumo se concentraba en las clases altas (desde las décadas de 1950 hasta 1970 aprox.) pero gradualmente se fue generalizando. La versión

original radicaba en un pollo; cocido en las brasas de carbón y marinado solo con sal; con papas fritas y tomado directamente con las manos, sin cubiertos. Su fama habría aumentado a partir de los años 1970.

El día de hoy existen cadenas dedicadas y orientadas a un público exclusivo y otras que se dirigen a las clases populares; el plato suele ser el mismo con muy ligeras diferencias, la diferencia está en las facilidades, atención al cliente y lo atractivo de sus locales.

El plato lleva carne de pollo joven eviscerado, marinado y cocido a las brasas. Al calor de las brasas en un horno específico denominado “rotombo” se hornea la carne macerada, el horno que hace girar al pollo sobre su propio eje, recibiendo de forma uniforme el calor de las brasas. El horno puede trabajar en base a carbón o leña o gas, siendo el más habitual el de leña o carbón, la cual muchas veces suele ser del algarrobo. Este proceso se realiza de 45 minutos a 1 hora, dependiendo del tamaño y el calor que se le aplique al horno, normalmente se llega a temperaturas de 270 a 280 °C. Luego de sacar el pollo del horno se verifica que este dorado para poderlo consumir.

El aderezo o marinada de la carne contiene múltiples ingredientes, tales como el huacatay, romero, cerveza negra, sal y pimienta, comino, sillao y ají panca, en distintas proporciones. La preparación de este aderezo o marinado difiere según el local. Comúnmente esta comida se acompaña de papas fritas y ensalada de lechuga, con una variedad de salsas y cremas como la mayonesa, la mostaza y el ketchup, pero en especial destaca la salsa de ají, así cada pollería tienen un valor agregado según su receta para preparar este acompañamiento <sup>(28)</sup>.

## **2.1 BUENAS PRACTICAS AMBIENTALES PARA LA PRODUCCION DE POLLOS A LA BRASA - PROTOTIPOS**

Un diagnóstico realizado por la Municipalidad Provincial de Arequipa con el apoyo del PRAL identificó que las pollerías de Arequipa se centralizaban en su mayoría en el centro histórico de la ciudad, llegando a registrarse 99 restaurantes de este tipo solo en el centro.

Para la mejora de la calidad del aire y conservación del Centro Histórico de Arequipa se aplica tecnologías limpias para pollerías según el “Plan A Limpiar el Aire de Arequipa”, aprobado por el Decreto del Consejo Directivo del CONAM N° 024-2005 CONAM/CD. En el proceso de elaboración de mencionado plan, se

realizó encuestas las cuales mostraron que el 36.4% opinaron que se debería mejorar la tecnología de los hornos.

Las Autoridades de Arequipa, el Grupo Técnico de Calidad Ambiental de Arequipa junto con PRAL (Programa Regional Aire Limpio) y Swisscontact construyeron un prototipo de horno, el cual en el 2007 se implementó en una pollería piloto. Concluido el proceso se aplicó un test de aceptación por el cliente dando los siguientes resultados: Características Organolépticas: Pollo a la brasa en horno prototipo de bajas emisiones, piel crocante, carne jugosa. El 83.6% aceptó el producto horneado en el prototipo, y un 4.5% lo encontró desagradable. En cuanto a la reducción de emisiones atmosféricas se hicieron las comparaciones en un horno tradicional y en un horno de bajas emisiones teniendo como resultados: En horno tradicional  $282.8\text{mg/Ncm}^3$  y en horno de bajas emisiones  $82.79\text{mg/Ncm}^3$ , concluyendo que la propuesta tecnológica reduce 3.4 veces las emisiones de partículas.

Como incentivo y promoción del modelo a través de reuniones de coordinación con funcionarios de la Municipalidad Provincial de Arequipa; Sub Gerencia de Gestión Ambiental, Sub Gerencia de Salud, Sub Gerencia Tributaria y propietarios de pollerías, se realizó el Programa de Restaurantes Saludables a cargo de la Sub Gerencia de Salud, el programa permite otorgar una certificación a los restaurantes que acaten los requisitos, además los establecimientos certificados son publicitados de manera gratuita en los materiales de difusión pública de la MPA. La Sub Gerencia de Salud en coordinación con la Sub Gerencia de Gestión Ambiental han definido los criterios y procedimientos de para la evaluación de pollerías y han validado la metodología.

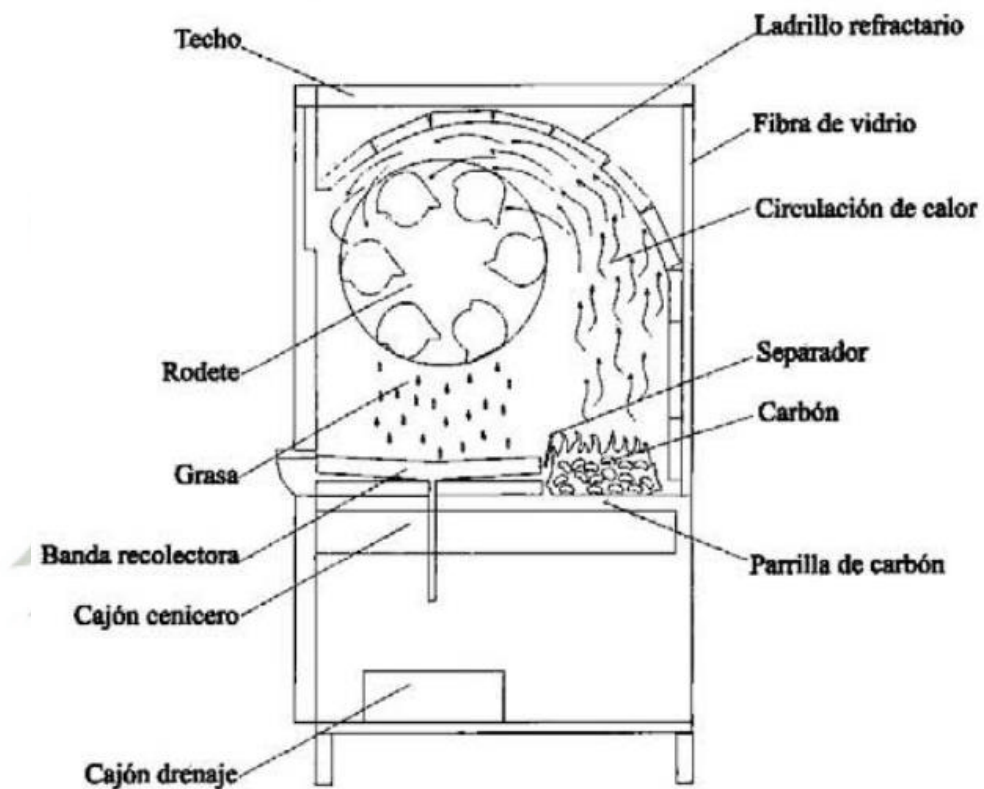
La Guía de Buenas Prácticas Ambientales para la producción de pollos a la Brasa es aplicable para pollerías a la brasa, en especial a los que cuentan con el horno de bajas emisiones, en dicha guía se incluyeron temas como el manejo que se debe tener con el alimento, el debido funcionamiento del horno, su mantenimiento y seguridad, adicionalmente cuenta con planos, manual de ensamblaje para la construcción del horno.

La propuesta de guía fue presentada en un taller realizado el 6 de junio del 2008 a dueños, administradores de establecimiento de pollerías y miembros del Grupo Técnico sobre calidad de aire. La Guía se hizo oficial a través de la OM-056/2008 y sus modificatorias, de manera que las nuevas pollerías debieran regirse por las

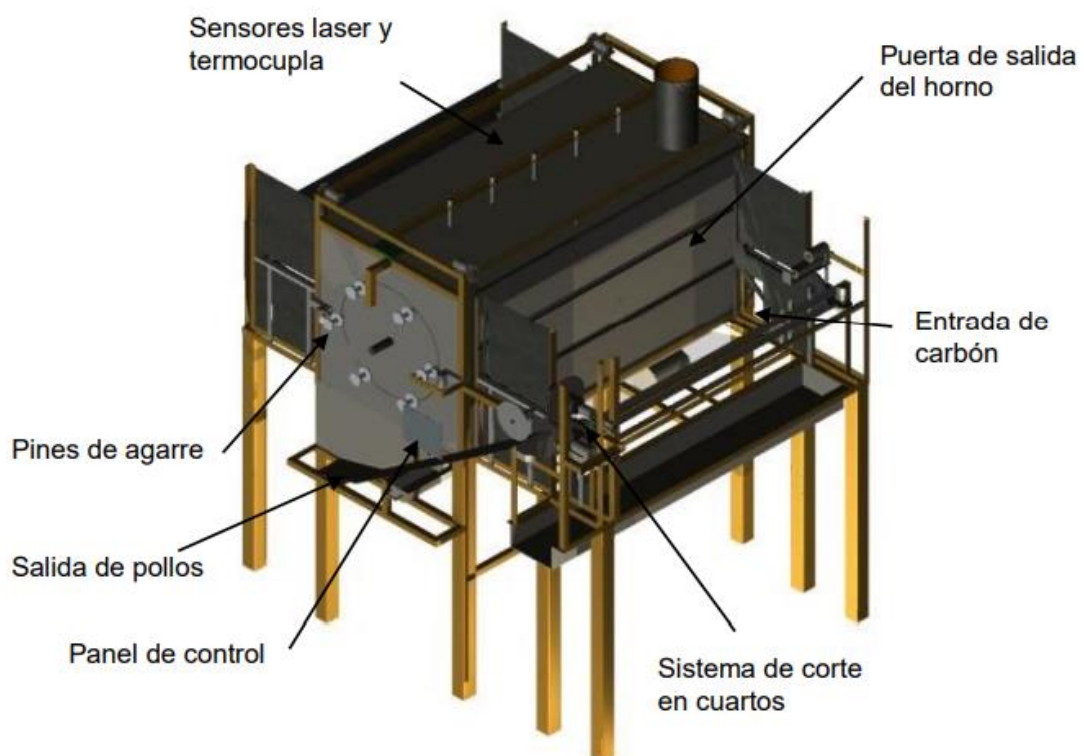
guías y las pollerías antiguas cuentan con un plazo para adoptarlas. Adicionalmente, en el TUPA (Texto Único de Procedimientos Administrativos) de la Municipalidad Provincial de Arequipa se han incluido consideraciones ambientales para otorgar la licencia de funcionamiento a restaurantes de pollos a la brasa, a través del requerimiento de la autorización de la Sub Gerencia Ambiental para el otorgamiento de la licencia <sup>(28-30)</sup>.

Difundir el tema a medios de comunicación, sensibilizar, informar y movilizar a la población y suscribir un pedido al alcalde para regular el tema, e incidir con los políticos para implementar las regulaciones pendientes es una tarea que aún se lleva a cabo, los ciudadanos emitieron 4 100 dirigidas al alcalde solicitando nueva regulación ambiental en autorizaciones a pollerías.

El Ingeniero Mecatrónico Frank Carlos Blanco Victorio para optar su título profesional en la Pontificia Universidad Católica del Perú en el 2015 presentó una Máquina para hacer Pollos a la Brasa, la cual tiene un sistema producción dividido en cinco partes; el ingreso del pollo, la cocción del pollo, la salida del pollo del horno, el corte del pollo y la manipulación de carbón conjuntamente con uso de sensores y motores en la línea de producción asegurando un alto nivel de precisión y control del funcionamiento. Dicho prototipo logró disminuir el tiempo de cocción en comparación a los hornos tradicionales, además de mantener el sabor y frescura del pollo, estas cualidades caracteriza a los mejores pollos a la brasa. Con el diseño del prototipo consiguió una máquina autónoma que operó a tiempo real, capaz de realizar el control y funcionamiento de toda la línea de producción sin intervención humana, desde el ingreso del pollo en barras hasta la salida del pollo cortado en cuartos, listo para servir. Consiguió diseñar un horno ecológico, que con satisfacción logró que las emisiones de gases sean menores a las de un horno de pollo tradicional, ya que contaba con un filtro en el conducto por donde se expulsan los gases. Adicionalmente, el sistema tiene un consumo de carbón natural o de madera menor a lo previsto porque se mejoró la eficiencia del dosificado del carbón. Quizá su desventaja sea el precio ya que sobrepasa los 5 000 dólares, pero viene a ser una propuesta muy interesante para los que laboran en el rubro <sup>(31)</sup>.



*Figura N°3 Partes del Horno de bajas emisiones para pollerías <sup>(29)</sup>*



*Figura N°4 Componentes del Sistema Mecatrónico <sup>(31)</sup>*

### 3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

Es una técnica de separación versátil con una extensa gama de aplicaciones, el proceso contiene gran cantidad de variables, que deben ajustarse adecuadamente antes de cada práctica; la optimización de los métodos de HPLC son procesos con varias variables (pH de la fase móvil, concentración del buffer, flujo, temperatura de la columna, longitud de onda del detector, etc.) deben controlarse para lograr las separaciones deseadas. La separación por HPLC de cada muestra se basa en su afinidad clara hacia el material adsorbente en la columna o en la fase móvil, lo que hace que varios constituyentes viajen a diferentes velocidades y se separen. Inicialmente se llamaba cromatografía líquida de alta presión desde entonces; depende de bombas de alta presión para permitir una separación más rápida <sup>(32)</sup>.

#### 3.1 CONFIGURACION INSTRUMENTAL

La técnica de HPLC moderna utiliza alta presión para forzar la fase móvil y un analito a través de una columna cerrada con partículas de tamaño micrométrico, que constituyen la fase estacionaria. La instrumentación HPLC se compone tradicionalmente de componentes básicos: fase móvil / depósito de disolvente, sistema de suministro de disolvente, dispositivo de introducción de muestras, columna, detector, sistema de recolección y salida de datos, procesamiento de eluyente postdetector y tubos y accesorios conectivos. Todos los componentes, son esenciales para realizar HPLC. La Figura N° 1.5 muestra un diagrama esquemático de un sistema genérico de cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

#### 3.2 PARTES DEL HPLC

**Depósito de fase móvil:** Es el recipiente limpio e inerte que almacena los solventes HPLC, a menudo se coloca un filtro adicional al final de la línea de entrada de la fase móvil para eliminar las partículas o precipitados que puedan formarse en la fase móvil durante su uso <sup>(33)</sup>.

**Bomba:** El propósito de la bomba es otorgar un flujo de fase móvil preciso, reproducible, constante y sin pulsos a la columna, las bombas más modernas pueden controlar la mezcla de diferentes solventes <sup>(32, 33)</sup>.

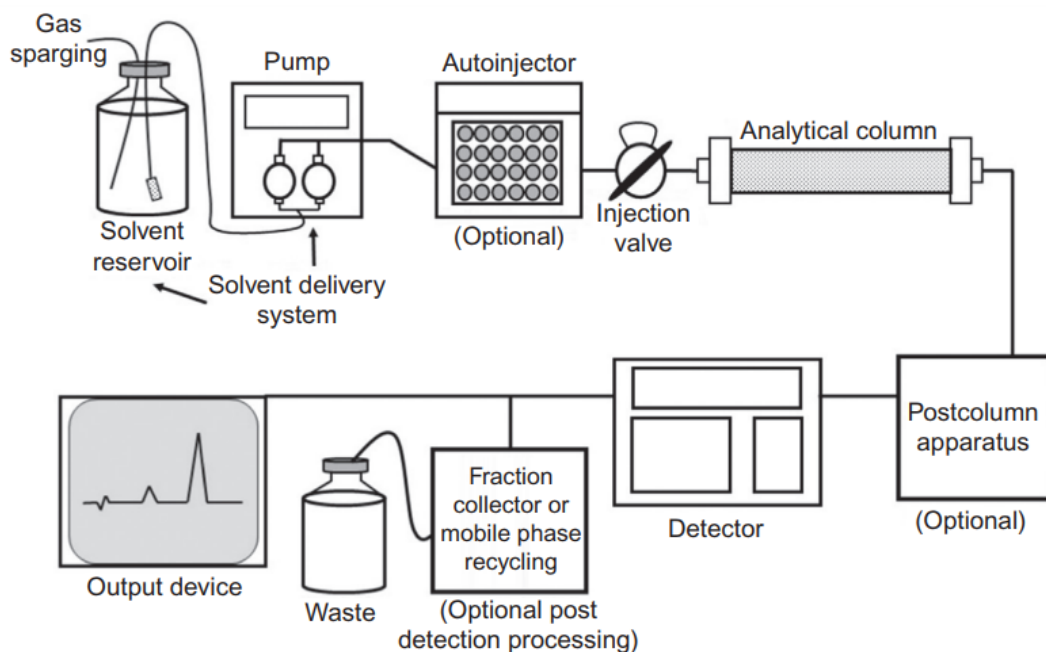
**Inyector:** Es el dispositivo que permite la introducción de la mezcla de analitos (muestra) en la corriente de la fase móvil antes de entrar en la columna sin interrumpir el flujo de solvente a través del sistema <sup>(34, 35)</sup>.

**Columna:** Es la parte donde se da la separación de los analitos, es importante para sistema HPLC, las dimensiones comunes para las columnas de escala analítica están en el rango de 10-30 cm de largo y 4-10 mm. Los tamaños de partícula comunes de empaque son de 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$  <sup>(33, 34)</sup>.

**Detector:** Permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada elemento de una muestra a la salida de la columna cromatográfica, al pasar el efluente de la columna a través del detector, algunas propiedades químicas o físicas del analito se traducen a una señal eléctrica, La señal eléctrica, es proporcional al nivel de alguna propiedad de la fase móvil o solutos. El detector más manejado es el de UV, permitiendo monitorizar la absorbancia UV a una establecida longitud de onda o en un lapso de longitudes de onda (arreglo de diodos) <sup>(33-35)</sup>.

**Horno:** El control de la temperatura puede perfeccionar la reproducibilidad cromatográfica y proveer oportunidades para mejorar la eficacia de la separación. Los instrumentos recientes pueden equiparse con hornos que controlan la temperatura de la columna a unas pocas décimas de grado desde cerca del ambiente hasta 150 ° C. En ocasiones, también se emplean enfriadores de columna, con algunos compartimentos de columna que abarcan rangos de temperatura controlada de 4-100 ° C <sup>(33)</sup>.

**Recopilación y salida de datos:** Un dispositivo de recopilación y salida de datos (por ejemplo, computadora, integrador o grabadora) está conectado a la salida electrónica del detector. Este Cromatograma resultante se puede evaluar para información cualitativa y cuantitativa <sup>(33)</sup>.



*Figura N°1.5 Esquema del Sistema de HPLC genérico* <sup>(33)</sup>

### 3.3 TIPOS DE CROMATOGRAFIA

#### 3.3.1 CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL DE ALTO RENDIMIENTO (HP-NPC)

La Cromatografía de fase normal se puede lograr realizándose en sílice no modificada que separa los analitos de acuerdo con su polaridad intrínseca. HP-NPC puede operarse en modo isocrático, de gradiente escalonado o de gradiente de elución, donde la fase móvil de retención contiene disolventes orgánicos menos polares y la fase móvil de elución consiste en disolventes orgánicos más polares y, en algunas situaciones, agua <sup>(36)</sup>.

#### 3.3.2 CROMATOGRAFIA DE FASE INVERSA DE ALTO RENDIMIENTO (HP-RPC)

Separa los compuestos según su relativa no polaridad o hidrofobicidad. En RPC (Cromatografía de Fase Inversa), la polaridad de la fase estacionaria y móvil es la inversa de la utilizada en NPC (Cromatografía de Fase Normal). Típicamente, los ligandos no polares se inmovilizan en la superficie de partículas de sílice esféricas, porosas o no porosas, aunque también pueden emplearse sorbentes poliméricos no polares (por ejemplo, los derivados de poliestireno-divinilbenceno reticulado). En HP-RPC, se usa un disolvente orgánico como un modificador de la tensión superficial en el eluyente cromatográfico, que tiene una fuerza de elución, viscosidad, y corte UV. HP-RPC puede operarse en el modo isocrático, de gradiente escalonado o de gradiente continuo, por lo que la fase móvil de retención es acuosa y la fase móvil de elución es un disolvente orgánico o una mezcla de disolvente orgánico acuoso. En términos de uso, debido a su versatilidad y flexibilidad, las técnicas HP-RPC dominan la separación de los metabolitos secundarios a nivel analítico, a escala de laboratorio y preparativo, ya que la mayoría de los metabolitos secundarios poseen algún grado de hidrofobicidad <sup>(36)</sup>.

#### 3.3.3 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO DE ALTO RENDIMIENTO (HP-IEX)

Este tipo de Cromatografía se realiza en fases estacionarias con ligandos cargados inmovilizados y se separa de acuerdo con las interacciones

electrostáticas entre la superficie cargada del analito (s) y la superficie cargada complementaria del sorbente. HP-IEX se puede operar en modo isocrático, gradiente escalonado o gradiente de elución. En la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HP-AEX), los analitos se separan según su carga neta negativa, donde la fase móvil de retención es acuosa, de alto pH y baja concentración de sal y la fase móvil de elución es acuosa, de alto pH y alta concentración de sal, o acuosa, y bajo pH. Por el contrario, la cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento (HP-CEX) se separa de acuerdo con la carga positiva de los analitos, donde la fase móvil de retención es acuosa, de bajo pH y baja concentración de sal y la fase móvil de elución es acuosa de bajo pH y alta concentración de sal, o acuoso, y alto pH<sup>(36)</sup>.

#### 4. ANALISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

A. Farhadian y colaboradores en el 2012 llevaron a acabo y estudiaron los efectos del marinado en la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno y fluoranteno) en carne de res a la parrilla, siete tratamientos de adobo que contienen 1) adobo básico, que incluye azúcar, agua, cebolla, cúrcuma, hierba de limón, sal, ajo, cilantro y canela, 2) aceite básico, 3) adobo comercial. 4) aceite de limón básico, 5) jugo de limón básico, 6) tamarindo de aceite básico y 7) tamarindo comercial en cuatro intervalos de tiempo (0, 4, 8 y 12 h) en muestras de carne antes de asar carbón. La extracción en tándem en fase sólida (SPE) se utilizó para limpiar las muestras. Se utilizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia para el análisis de PAH. El estudio mostró una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) (70%) de HAP en muestras de carne de res tratadas con el adobo ácido (que contiene 1,2% de jugo de limón). El limón básico > básico > aceite básico de limón > aceite básico fue el mejor orden de tratamiento de adobo. La duración del marinado no fue un factor significativo ( $p > 0.05$ ) en la reducción de HAP<sup>(37)</sup>.

Lechuga Noa y compañía en el 2015 realizaron la determinación y cuantificación de 3,4 benzopireno por HPLC y grado de alteración en aceites y mantecas comestibles según el tiempo de reutilización en la fritura en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco, en su investigación determinaron que en

sus muestras de manteca alteradas por recalentamiento en chicharronerías se halló al benzo(a)pireno en una concentración promedio de 12.06  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  mientras que en sus muestras de aceite alterado de pollerías dicha concentración promedio fue de 9.809  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . La prueba del Oxifrit-test mostró los siguientes resultados: a menos de 1 día de uso en un 71,4% el grado de alteración está en el rango de sin alteración, en cambio a más de 3 días de uso en un 85,7% el grado está totalmente alterado. Del estudio se concluye que todas las muestras de aceite y manteca analizadas presentaban cantidades que superan considerablemente el límite establecido por países europeos que es de 2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Además se encontró que la concentración de benzopireno está relacionada con el tiempo de reutilización de los aceites y mantecas <sup>(38)</sup>.

Keun-Cheol Park y colaboradores en el año 2016 investigaron los efectos de los métodos de cocción y marinados de té en la formación de benzo[a]pireno en el vientre de cerdo a la parrilla (Samgyeopsal), en la República de Corea, determinando los efectos de diferentes herramientas para asar, temperaturas y marinados de té sobre la formación de benzo[a]pireno en el vientre de cerdo a la parrilla, así como las capacidades antioxidantes de los adobos de té. Detectaron la menor cantidad de benzo[a]pireno en la barriga de cerdo a la parrilla modificada con carbón vegetal (1.28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y los factores de riesgo más altos para la formación de benzo[a]pireno que son el contacto directo con las llamas y el exceso de grasa en la fuente de calor. En cuanto a la marinación de los estómagos de cerdo con té aumentó la actividad de eliminación de radicales e impidió la oxidación de lípidos en proporción a la concentración de infusión de té y el tiempo de marinado. El adobo de té de yerba mate incrementó significativamente la actividad de eliminación de radicales e impidió la formación de benzo[a]pireno más que el adobo del té verde. El adobo de té se puede aplicar al condimento o salsa como pretratamiento para preservar la calidad de la carne y disminuir la formación de benzo[a]pireno durante la cocción <sup>(3)</sup>.

Luis Lipa M. en el 2016 realizó un monitoreo de benzo[a]pireno por HPLC en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, recolectó 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), y encontró que solo 3 muestras de las 7 muestras analizadas en el monitoreo de productos cárnicos ahumados están dentro del límite permitido de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , las cuales corresponden a las muestras G con 4.34  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , muestra F con 4.21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y muestra C con 3.87  $\mu\text{g}/\text{kg}$  <sup>(39)</sup>.

Wanwisa W. y colaboradores en el 2017 investigaron los efectos de los tipos de aceite y el pH del adobo sobre la formación los hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinógenos (HAP) en pollo a la parrilla, la formación de HAP en pechuga de pollo a la parrilla con diferentes adobos después de asar carbón durante 3 minutos / lado se evaluó mediante cromatografía líquida de alta resolución además compararon el tratamiento de marinado de control (sin aceite vegetal), la adición de aceite de palma comercial y aceite de girasol que contenía cantidades significativamente diferentes de ácidos grasos poliinsaturados y saturados condujo a un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los niveles de HAP en pollo a la parrilla 190,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 457,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 376,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente, y solo hubo una ligera diferencia entre ambos tratamientos con marinado en aceite debido a la presencia de compuestos antioxidantes en los aceites vegetales comerciales. Los valores de pH de los adobos para marinados ácidos y alcalinos usando ácido cítrico y bicarbonato de sodio, respectivamente, produjeron el valor de pH más alto (7.51, adobo alcalino) que resultó en un aumento mayor de más del 70% en los niveles de HAP en parrilla pollo. Los resultados de este estudio sugirieron que la adición de ingredientes de aceite y / o álcali en el adobo podría ser importante para aumentar los niveles de HAP en productos cárnicos a la parrilla <sup>(40)</sup>.

## **CAPITULO II**

### **PLANTEAMIENTO OPERACIONAL**

#### **1.1. CAMPO DE VERIFICACION**

##### **1.1.1. UBICACION ESPACIAL**

Ciudad de Arequipa a 2335 m.s.n.m. con coordenadas geográficas  $14^{\circ} 39'$  y  $19^{\circ} 16'$  de latitud sur,  $70^{\circ} 50'$  y  $75^{\circ} 05'$  de latitud oeste.

Las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María. Pabellón H-202 Laboratorio de Investigación Docente “Proyecto Mercurio” de nuestra institución.

##### **1.1.2. UBICACION TEMPORAL**

El presente estudio se efectuó en el segundo semestre del año 2017.

##### **1.1.3. UNIDADES DE ESTUDIO**

En el presente trabajo se utilizó muestras de distintas pollerías de la ciudad de Arequipa, distritos de Cercado, Jacobo Hunter, Yanahuara y Cayma, siendo un total de 9 pollerías por el periodo de Setiembre-Noviembre 2017.

## 1.2. TECNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACION

### 1.2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Merck Hitachi.
- Columna Cromatográfica RP-18 Thermo Scientific Hypersil Gold 250 x 4 mm con un tamaño de partícula 4  $\mu\text{m}$ .
- Equipo ultrasonido Brandson® 2510E-DTH, frecuencia de 42 kHz  $\pm$  6%
- Equipo Barnstead® Easy Pure II (agua 18.2 M $\Omega$ ).
- Balanza analítica OHAUS Pioneer Serie N° PA 214 ( $\pm$  0.0001 g)
- Refrigeradora Electrolux
- Micropipetas de 20  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Vasos precipitados de 250 mL
- Fiolas ámbar
- Viales ámbar de 2 mL
- Tubos falcon de 50 mL
- Filtros anotop de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Estándar de benzo[a]pireno  $\geq$  96 % grado HPLC (Sigma Aldrich)
- Acetonitrilo grado HPLC Merck
- Metanol grado HPLC Merck
- Agua ultra pura 18.2 M $\Omega$
- Sulfato de sodio anhidro P.A Merck
- Agua destilada
- Jeringas descartables de 3 mL
- Bomba de aire AP – 500 Aquarium
- Triturador de alimentos Oster
- Frascos de vidrio
- Papel aluminio

### 1.2.2. METODOLOGIA Y ANALISIS

#### 1.2.2.1. RECOLECCION DE MUESTRAS

La recolección de las muestras, se realizará una vez al mes, nueve pollerías de la ciudad de Arequipa serán evaluadas, las cuales se clasificarán por niveles económicos.

Cada muestra se recolectará en un envase de vidrio protegidas de luz y se conservó a una temperatura de 4°C (41), las muestras se dividirán en piel y carne de pollo tanto de la parte de pecho y pierna del alimento.

#### 1.2.2.2. VALIDACION DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA LA DETERMINACION DE BENZO[A]PIRENO

Se validará el método cromatográfico para la determinación de benzo[a]pireno, para la validación del método se utilizará estándar de benzo[a]pireno  $\geq 96$  % grado HPLC adquirido de Sigma Aldrich y se valorará en un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos.

En la validación se evaluarán los siguientes parámetros: Linealidad, Exactitud, Precisión, LDD y LDQ

##### a) VALIDACION

La validación de una técnica analítica es un procedimiento consignado a obtener certidumbre experimentalmente justificada de la capacidad de esta técnica para dar resultados caracterizados requeridos <sup>(42)</sup>.

**Linealidad:** Los métodos instrumentales dependen de la comparación de una señal de la concentración no conocida de un analito con la de una concentración conocida del mismo analito. La linealidad caracteriza la capacidad de un procedimiento analítico planteado para dar una señal de respuesta con la magnitud Y directamente proporcional a la cantidad X de un compuesto a determinar:

$$Y = a + bX \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Esto requiere la disponibilidad de un estándar de referencia, el procedimiento de calibración requiere la preparación de una serie de soluciones estándar a partir del material de referencia, mediante la dilución de una solución madre, cubriendo un rango razonable de respuesta de señal del instrumento. La linealidad en la práctica primero se estima visualmente a partir de la apariencia lineal de la gráfica de Y versus X. Si la gráfica es lineal, esta relación se estudia mediante métodos de análisis de regresión en términos de la ecuación

lineal. Se recomienda establecer el criterio de linealidad a un nivel del coeficiente de correlación “r” no inferior a 0,999 <sup>(42, 43)</sup>.

**Exactitud:** Significa cercanía del resultado de la prueba al valor "verdadero" o aceptado. La recuperación es la fracción o porcentaje del analito que se recupera cuando la muestra de prueba se realiza a través de todo el método. La exactitud de los procedimientos analíticos debe determinarse utilizando muestras homogéneas con concentraciones exactamente conocidas de los compuestos que se determinarán. Con fines de validación, se prepara una serie de tales soluciones usando el compuesto original de referencia. La exactitud se puede formular tanto en la forma clásica, como la diferencia ( $X - \mu$ ) entre el valor experimental promedio ( $X$ ) y el valor verdadero ( $\mu$ ) con el intervalo de confianza correspondiente  $X\Delta$ , y en una forma alternativa (y más ilustrativa), en términos del porcentaje de recuperación de la cantidad conocida del compuesto estar determinado:

$$\text{Recuperación} = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Dónde:

$\bar{X}$  = Valor obtenido

$\hat{X}$  = Valor verdadero

Se considera valores apropiados aquellos entre el 70% y 90% <sup>(42, 43)</sup>.

**Precisión:** La precisión de un procedimiento analítico caracteriza la dispersión aleatoria (variación) de los resultados en relación con el valor medio. Debe enfatizarse que, para obtener resultados confiables, la muestra debe ser homogénea. Las variantes que conducen a errores aproximados deben rechazarse. La precisión de un procedimiento analítico se evalúa en términos de la desviación estándar (SD) de la desviación estándar relativa (porcentaje de RSD) determinada en una serie de mediciones y calculada mediante las fórmulas:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

Dónde:

n = número de medidas

X<sub>i</sub> = valor medido en el ensayo i

$\bar{X}$  = estimador de la medida poblacional

$$RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}} \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

La desviación estándar relativa permite calcular el error aleatorio correspondiente a la dispersión de datos en torno de la media <sup>(42)</sup>.

**LDD y LDC:** El límite de detección (LDD) se establece como la concentración mínima de sustancia analizada en la muestra, que puede detectarse en condiciones preestablecidas. Notoriamente, el LDD puede depender de los detectores y bombas de HPLC. Independientemente del método utilizado para la evaluación, es necesario tener un Cromatograma que demuestre que un pico de respuesta que excede y sea notablemente diferente al ruido de referencia y se observe realmente a una concentración correspondiente al LDD de la sustancia a detectar. La fórmula es la siguiente <sup>(42)</sup>:

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bi} + 3S_{bi}}{b \cdot \sqrt{n_i}} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración mínima de sustancia analizada que puede determinarse con una precisión aceptable y precisión en condiciones de análisis calificadas por un método determinado, y se puede determinar con la siguiente fórmula <sup>(42)</sup>:

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bi} + 10S_{bi}}{b \cdot \sqrt{n_i}} \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

### 1.2.2.3. DETERMINACION DE BENZO[A]PIRENO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

#### 1.2.2.3.1. Preparación de la Solución Estándar:

Pesar 1 mg del estándar de benzo[a]pireno y transferirlo a una fiola ámbar de 10 mL, disolver con Acetonitrilo (si es necesario llevarlo a sonicación), luego enrasar al volumen de la fiola. Transferir 100  $\mu$ L a otra fiola ámbar de 10 mL y completar el volumen de con Acetonitrilo, obteniendo así una concentración aproximada de 1000 $\mu$ g /L.

## 1.3. ESTRATEGIA DE RECOLECCION DE DATOS

La evaluación de benzo[a]pireno en pollos a la brasa en la ciudad de Arequipa constara de dos etapas, la primera etapa se establecerá las condiciones Cromatográficas y validará la metodología de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y en la segunda etapa se procederá a la recolección de muestras de las distintas zonas indicadas y se trabajará con las muestras determinando la concentración de benzo[a]pireno por HPLC.

### 1.3.1. ANALISIS ESTADISTICO

Los siguientes parámetros estadísticos se determinarán una vez recolectados los datos: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación, análisis de varianza, prueba de especificidad.

*Tabla N°2.1 Condiciones Cromatográficas*

CONDICION	VALOR
Fase móvil	: AcN : H <sub>2</sub> O (80:20)
Flujo de la fase móvil	: 2 mL /min
Longitud de onda	: 295 nm.
Detector	: UV (ultravioleta).
Volumen de inyección	: 20 µL.
Temperatura	: 25 °C.
Columna cromatográfica	: RP-18 Thermo Scientific Hypersil Gold 250 mm x 4 mm

*Fuente: Elaboración propia*

### **CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO**

##### **1.1. PREPARACION DE LA SOLUCION ESTANDAR**

Para la preparación de la solución estándar madre, se utilizó el estándar de benzo[a]pireno  $\geq 96$  % grado HPLC adquirido de Sigma Aldrich, se pesó 1mg y se transfirió a una fiola ámbar de 10 mL, luego se adicionó Acetonitrilo para disolverlo, se agitó y se completó el volumen final de la fiola. Se retiró 100  $\mu$ L de la solución madre a una fiola ámbar de 10 mL y se enrasó con Acetonitrilo hasta completar su volumen obteniendo así una concentración aproximada de 1000  $\mu$ g/L.

##### **1.2. CONDICIONES OPTIMAS PARA LA DETERMIANCIÓN DE BENZO[A]PIRENO POR HPLC**

Las condiciones que se tuvieron en cuenta para poder realizar; determinación de benzo[a]pireno fueron las siguientes:

- Fase Móvil: Acetonitrilo: Agua (80:20)
- Flujo: 2 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- Longitud de onda: 295nm
- Tiempo de retención: 4,37 min

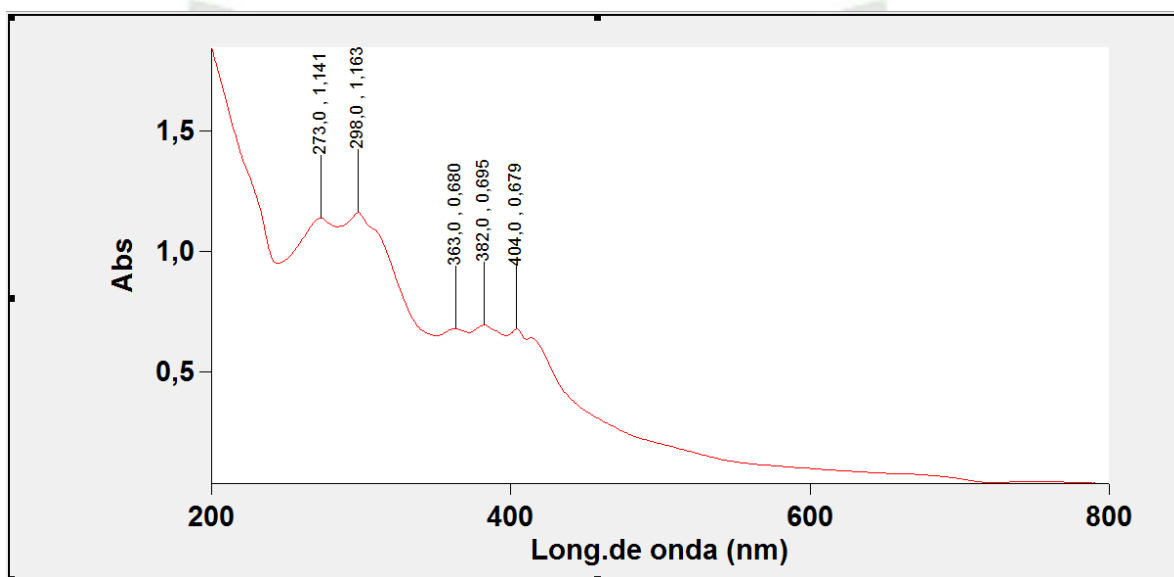
- Volumen de inyección: 20  $\mu$ L

Para la determinación de longitud de onda se hizo un barrido espectral en el espectrofotómetro Agilent Cary 60 Uv-Vis obteniendo el siguiente espectro de la figura N° 3.1.

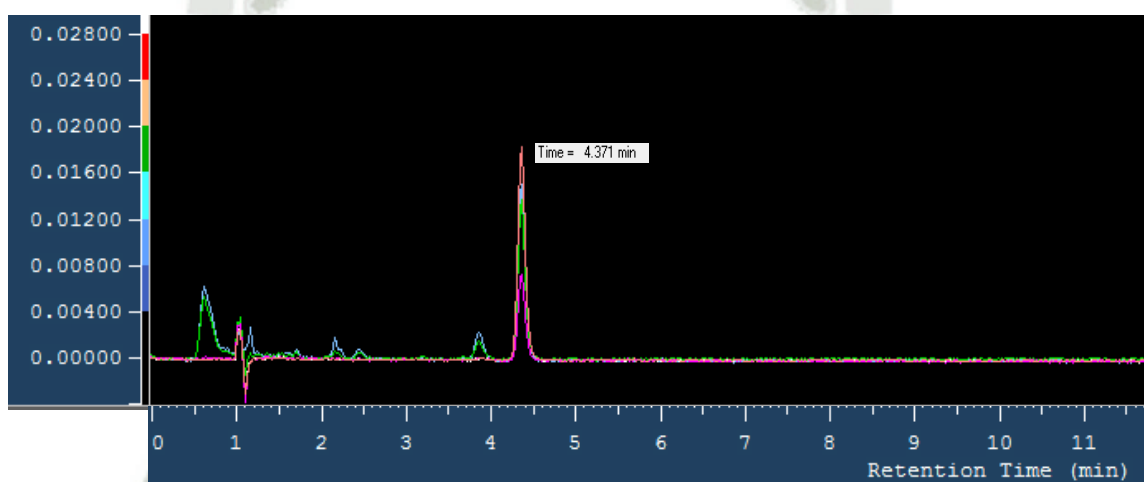
Como se observa en dicha figura existen dos picos algo semejantes de mayor absorción, finalmente se decidió escoger el pico con mayor absorbancia dado que así se obtiene mayor sensibilidad en las lecturas.

En la figura N° 3.2 se observa el tiempo de retención que tuvo el benzo[a]pireno en el HPLC.





*Figura N°3.1 Espectro de absorción del Benzo[a]pireno*



*Figura N°3.2 Tiempo de retención del Benzo[a]pireno en HPLC*

### 1.3. VALIDACION DEL METODO DE DETERMINACION DE BENZO[A]PIRENO POR HPLC

Una vez que se tienen las condiciones Cromatográficas de trabajo para la evaluación de benzo[a]pireno se procedió a evaluar los siguientes parámetros:

#### 1.3.1. LINEALIDAD

Para obtener la linealidad del método se prepararon 5 fioas de concentraciones de 100, 180, 260, 340 y 420  $\mu\text{g/L}$ , valores equidistantes. De la solución estándar de concentración 1000  $\mu\text{g/L}$  se retiró 200, 360, 520, 680 y 840  $\mu\text{L}$  respectivamente para las concentraciones mencionadas.

Se analizó por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados, demostrados en la Tabla N°3.1.

Con los datos mostrados en la tabla anterior se construyó la curva de calibración, obteniendo un  $r^2 = 0.9995$ , lo cual podemos afirmar que nuestro parámetro está dentro de lo establecido

#### 1.3.2. PRECISION

Determinada la linealidad del método, se procedió con la determinación de la precisión, se realizó con una misma muestra, con las mismas condiciones de trabajo establecidas, en el mismo laboratorio, por un mismo analista y el mismo día, los datos se muestran en la Tabla N° 3.2

Según la AOAC establece para cada nivel de concentración el valor del coeficiente de variación (C.V.%) aceptable, los resultados obtenidos, mostrados en la tabla pueden demostrar que cumplen con las especificaciones<sup>(43)</sup>.

#### 1.3.3. EXACTITUD

Para determinar la exactitud se prepararon 3 fioas con estándar de benzo[a]pireno a una concentración de 260  $\mu\text{g/L}$ , 3 fioas con muestra y 3 fioas de muestra adicionando estándar. Los resultados se mostraran en la Tabla N°3.3

La recuperación del método fue de 97.85%, cifra que se encuentra dentro de las normas establecidas.

#### 1.3.4. LIMITES DE DETECCION Y LIMITES DE CUANTIFICACION

Para obtener los límites de detección y los límites de cuantificación, se realizaron dos curvas, la primera curva fue de Área versus Concentración y la segunda de Desviación Estándar versus Concentración, con estas curvas obtendremos  $Y_{bi}$  y  $S_{bi}$ , datos importantes para obtener nuestros datos.

La figura N°3.3 nos brinda el valor de  $Y_{bi}$  y  $b$

En la Figura N°3.4 obtuvimos  $S_{bi}$ , resultando finalmente:

LDD: 12.3  $\mu\text{g/L}$  de Benzo[a]pireno

LDC: 14.3  $\mu\text{g/L}$  de Benzo[a]pireno

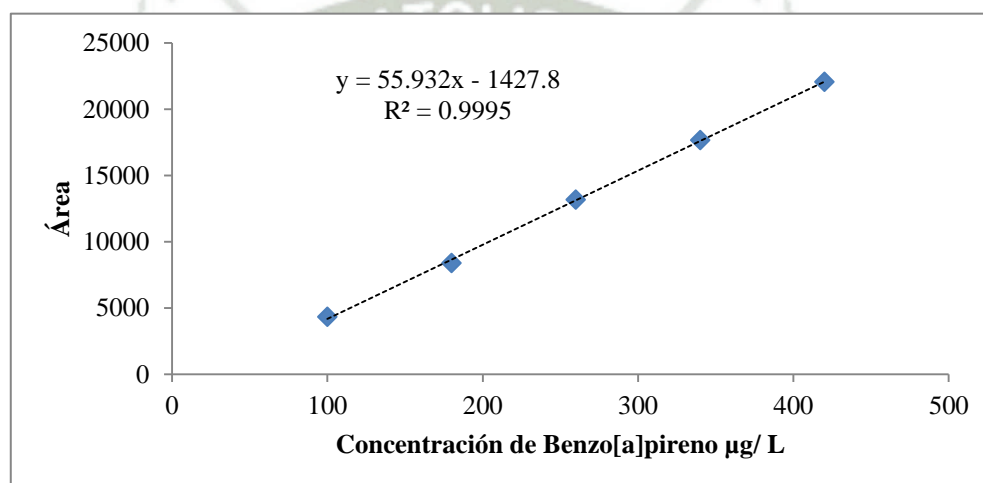
Quiere decir que el método puede, con una buena exactitud y precisión, los límites de detección y cuantificación.



**Tabla N°3.1 Datos para determinar la Linealidad del método**

<b>Concentraciones µg/L</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Promedio Áreas</b>	<b>Desviación Estándar</b>
100	4374	4301	4291	4322	45
180	8460	8350	8315	8375	76
260	13180	13125	13166	13157	29
340	17712	17702	17601	17672	61
420	22127	22058	21954	22046	87

*Fuente: Elaboración propia*



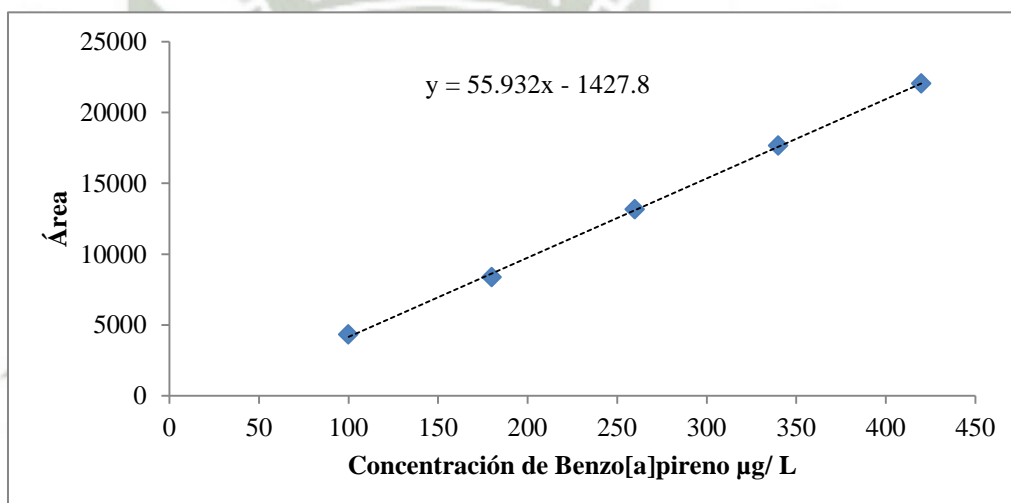
*Figura N°3.3 Curva de Calibración para el método HPLC*

**Tabla N°3.2 Datos para determinar la Precisión del Método**

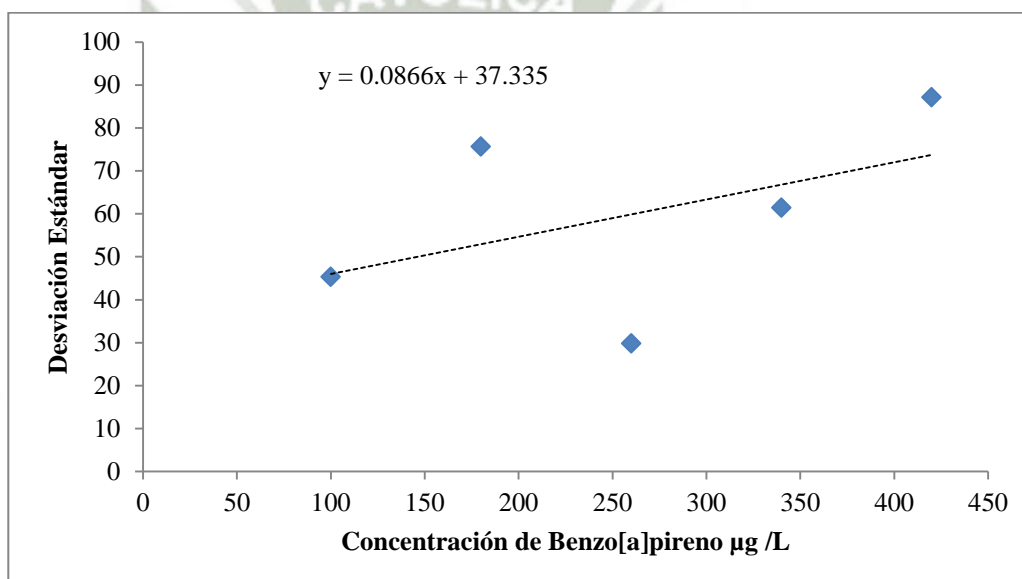
Concentraciones $\mu\text{g/L}$	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio Áreas	DS	Coficiente de Variación	Intervalos de Confianza	
100	4374	4301	4291	4322	45	1.05	4270.73	4373.27
180	8460	8350	8315	8375	76	0.90	8289.38	8460.62
260	13180	13125	13166	13157	29	0.22	13124.66	13189.34
340	17712	17702	17601	17672	61	0.35	17602.18	17741.15
420	22127	22058	21954	22046	87	0.40	21947.79	22144.88

**Tabla N°3.3 Recuperación del Método**

	Muestra ( $\mu\text{g/L}$ )	Muestra + Estándar 260 $\mu\text{g/L}$	Estándar 260 ( $\mu\text{g/L}$ )
<b>Repetición 1</b>	52.56	110.08	58.75
<b>Repetición 2</b>	52.33	109.43	58.08
<b>Repetición 3</b>	52.06	110.52	59.62
<b>Promedio</b>	52.32	110.01	58.82
<b>Desviación Estándar</b>	0.251	0.548	0.771
<b>Recuperación</b>	97.85 %		



*Figura N°3.4 Gráfica de Concentración versus Área*



*Figura N°3.5 Gráfica de Concentración versus Desviación Estándar*

#### 1.4. MUESTREO DE POLLO A LA BRASA

El muestreo se llevó a cabo una vez al mes, se recolectaron de 9 pollerías de la ciudad de Arequipa, al ser recolectadas las muestras, éstas eran ordenadas alfabéticamente enumeradas de acuerdo al número de evaluación, y su procedencia como se muestra en la Tabla N°3.4, y luego se conservaron a 4°C para su posterior análisis.

#### 1.5. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras luego de ser recolectadas y conservadas, se separaron la piel de la carne de pollo, pasando por un triturador de alimentos tanto piel como carne de pollo, después de trituradas se homogeneizaron y se conservaron en frascos de vidrio protegidas de la luz, y rotulados con el mismo código de recolección adicionándole si era piel o carne de pollo.

Se pesaron 5 g de la muestra de pollo a la brasa, tanto de piel como de carno de pollo, en tubos falcon se colocó 0.5 g de Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )<sup>(39)</sup>, luego la muestra pesada y 5 mL de Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), y luego se llevó a sonicación por un tiempo de 10 minutos, luego se centrifugó por 5 minutos a una velocidad de 60000 rpm, después se retiró el sobrenadante y se llevó las muestras a sequedad mediante bombas de aire, éste procedimiento se repitió 3 veces, terminado este paso se reconstituyó con Acetonitrilo ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ) en un volumen de 2 mL, como último paso se filtraron en filtros anotop para luego ser llevadas a su análisis por HPLC.

En la figura N°3.8 podemos observar como el pico del estándar y el pico de la muestra crecen muy cercanamente, sin mucha diferencia en su tiempo de retención.

**Tabla N° 3.4 Muestras la evaluación de benzo[a]pireno en pollos a la brasa**

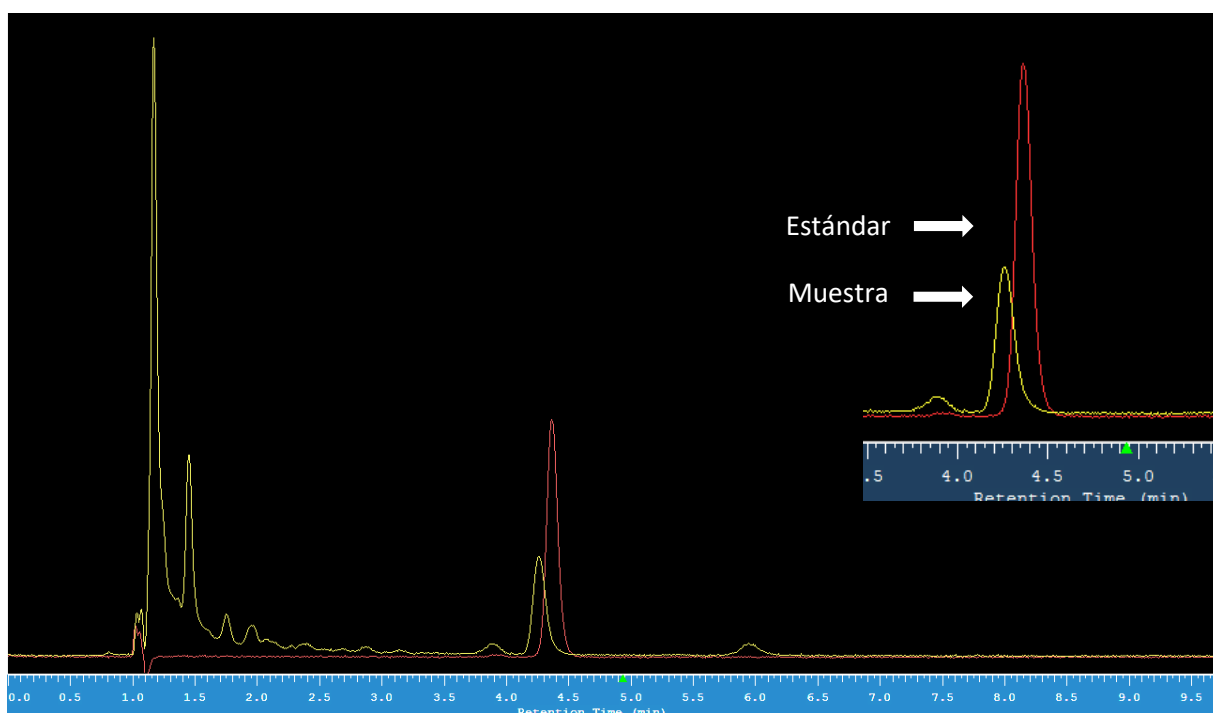
Codificación			Procedencia
A1	A2	A3	Hunter
B1	B2	B3	Hunter
C1	C2	C3	Hunter
D1	D2	D3	Cercado
E1	E2	E2	Cercado
F1	F2	F2	Cercado
G1	G2	G3	Yanahuara
H1	H2	H3	Yanahuara
I1	I2	I3	Cayma



*Figura N°3.6 Piel triturada de pollo a la brasa*



*Figura N°3.7 Carne de pollo triturada de polo a la brasa*



*Figura N°3.8 Cromatograma de una muestra y el estándar de benzo[a]pireno*

## 2. EVALUCION DE BENZO[A]PIRENO EN POLLOS A LA BRASA

En la siguiente evaluación se analizaron 54 muestras de piel de pollo como carne de pollo de las 9 pollerías de la ciudad de Arequipa, de las cuales 34 se encontraron cuantificables, en total de las tres evaluaciones realizadas entre los meses de Setiembre, Octubre y Noviembre del 2017. Absolutamente todas las muestras cuantificables sobrepasan los límites de  $5\mu\text{g}/\text{kg}$ .

En la primera evaluación se obtuvieron 6 muestras cuantificables de piel de pollo a la brasa y 5 de carne de pollo a la brasa. En la figura N°3.9 se muestran los datos de la primera evaluación de benzo[a]pireno en la piel de pollo a la brasa, teniendo como valor mínimo la muestra E1PI con una concentración de  $12.96\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que el valor máximo fue de la muestra I1PI con una concentración de  $33.45\mu\text{g}/\text{kg}$ .

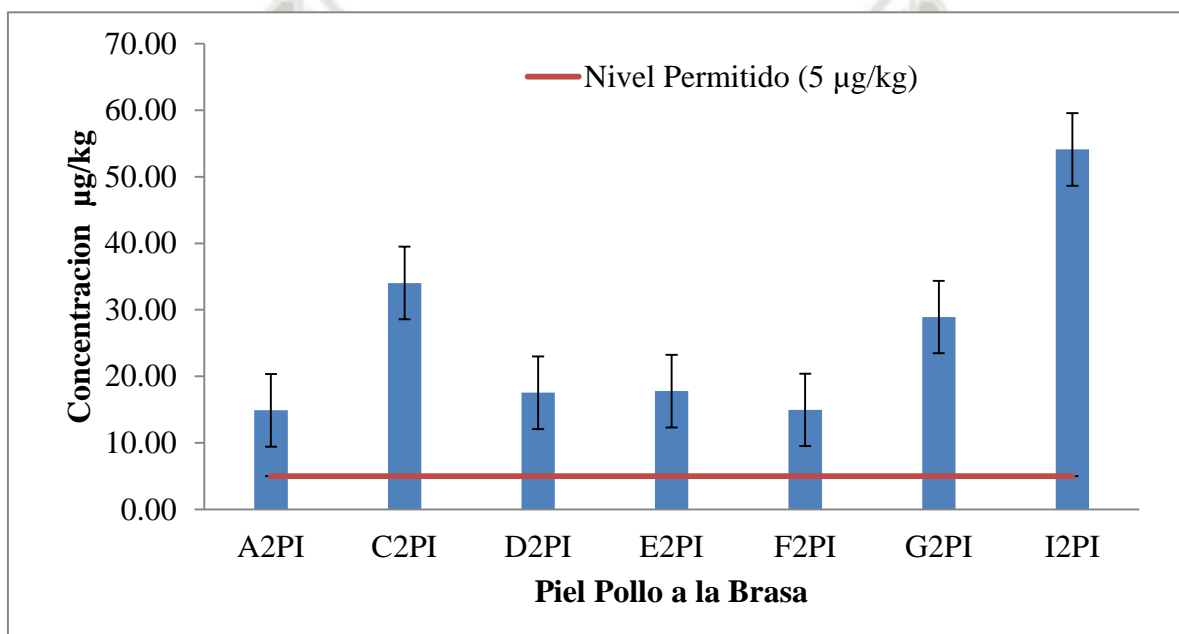
La figura N°3.10 nos muestra las concentraciones de benzo[a]pireno en la carne pollo a la brasa, siendo la muestra D1CP con menor concentración, el valor fue de  $13.87\mu\text{g}/\text{kg}$ . Y la muestra con mayor valor fue la F1CP con una concentración de  $99.55\mu\text{g}/\text{kg}$ .

En la figura N° 3.11 se muestran los resultados de la segunda evaluación, la muestra A2PI contiene  $14.90\mu\text{g}/\text{kg}$  mientras que la muestra I2PI contiene  $54.11\mu\text{g}/\text{kg}$ .

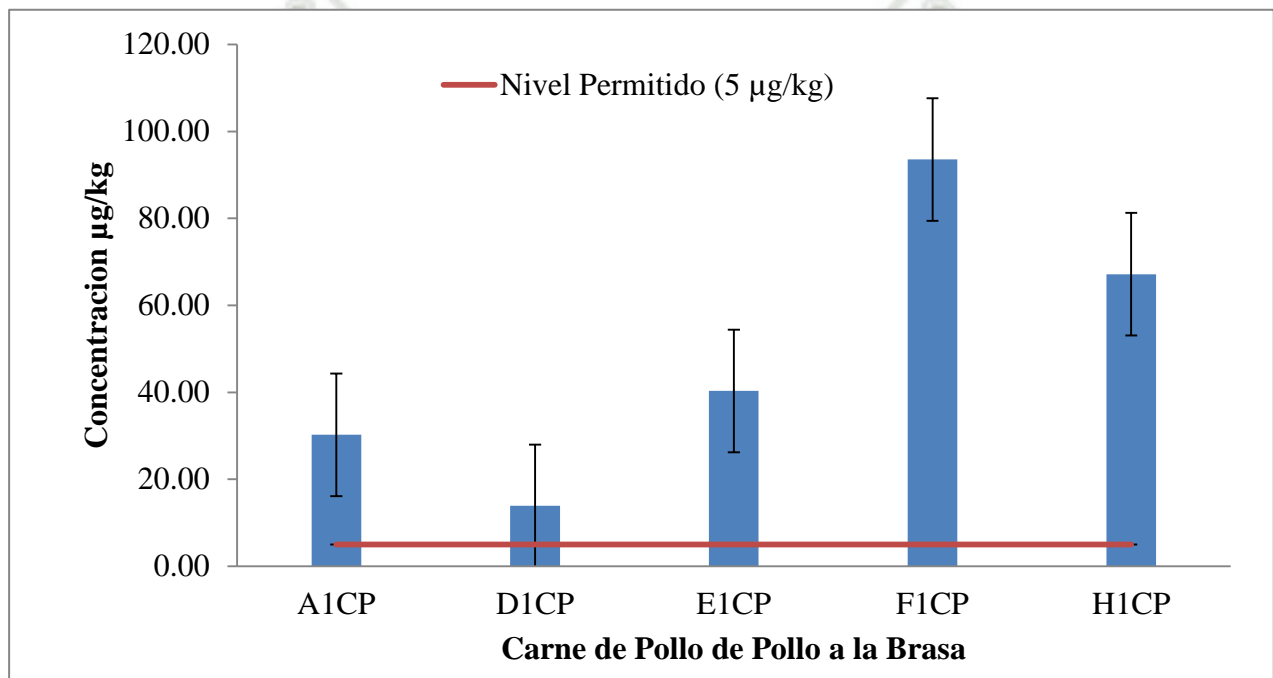
En la figura N° 3.12 solo dos muestras de carne de pollo a la brasa fueron cuantificadas, la menor con  $12.75\mu\text{g}/\text{kg}$  y la mayor con  $29.58\mu\text{g}/\text{kg}$ .

En la tercera evaluación de benzo[a]pireno en piel de pollo a la brasa, figura N°3.13, encontramos que la concentración mínima en la muestra F3PI fue de  $15.01\mu\text{g}/\text{kg}$  y la máxima fue de  $94.16\mu\text{g}/\text{kg}$  en la muestra I3PI.

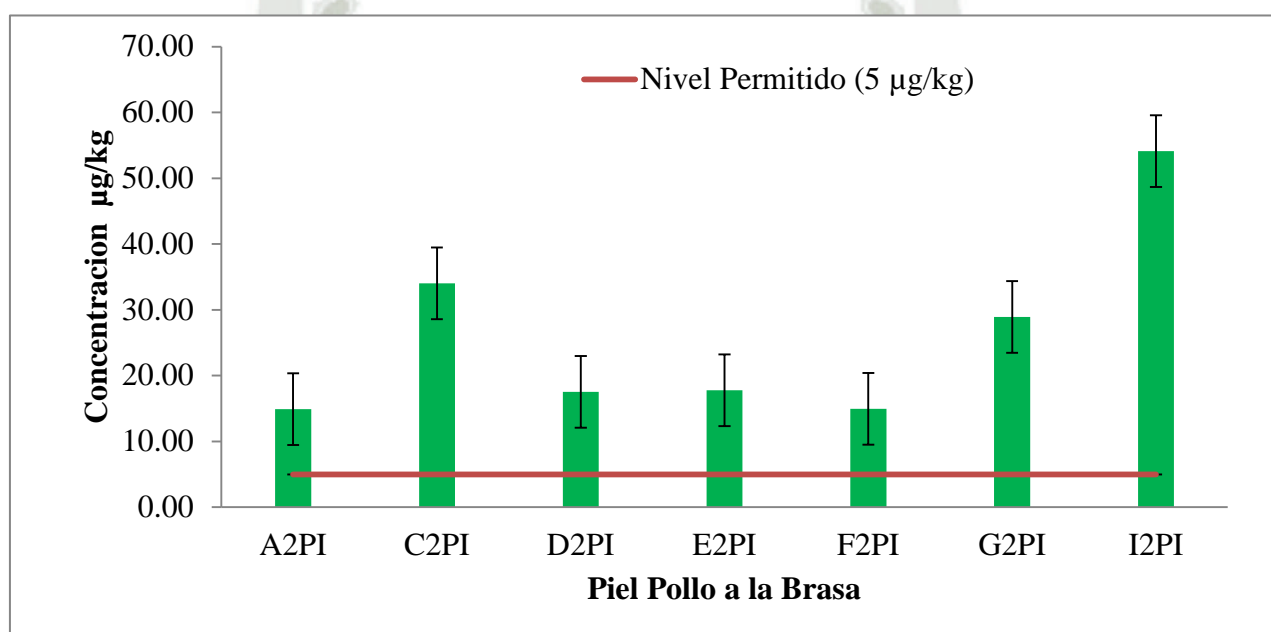
En la figura N°3.14 notamos que la menor concentración fue de la muestra B3CP con una concentración de  $18.18\mu\text{g}/\text{kg}$  y que la muestra G3CP tiene la mayor concentración de  $111.53\mu\text{g}/\text{kg}$ .



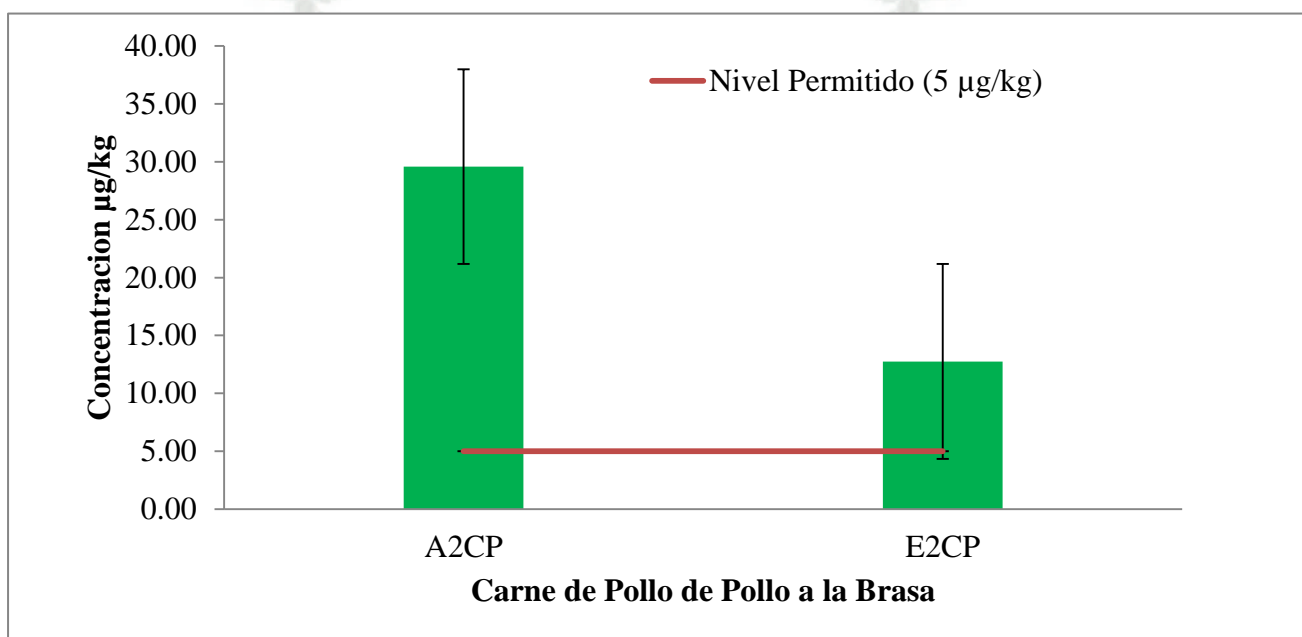
*Figura N3.9 Primera evaluación de benzo[a]pireno en piel de pollo a la brasa*



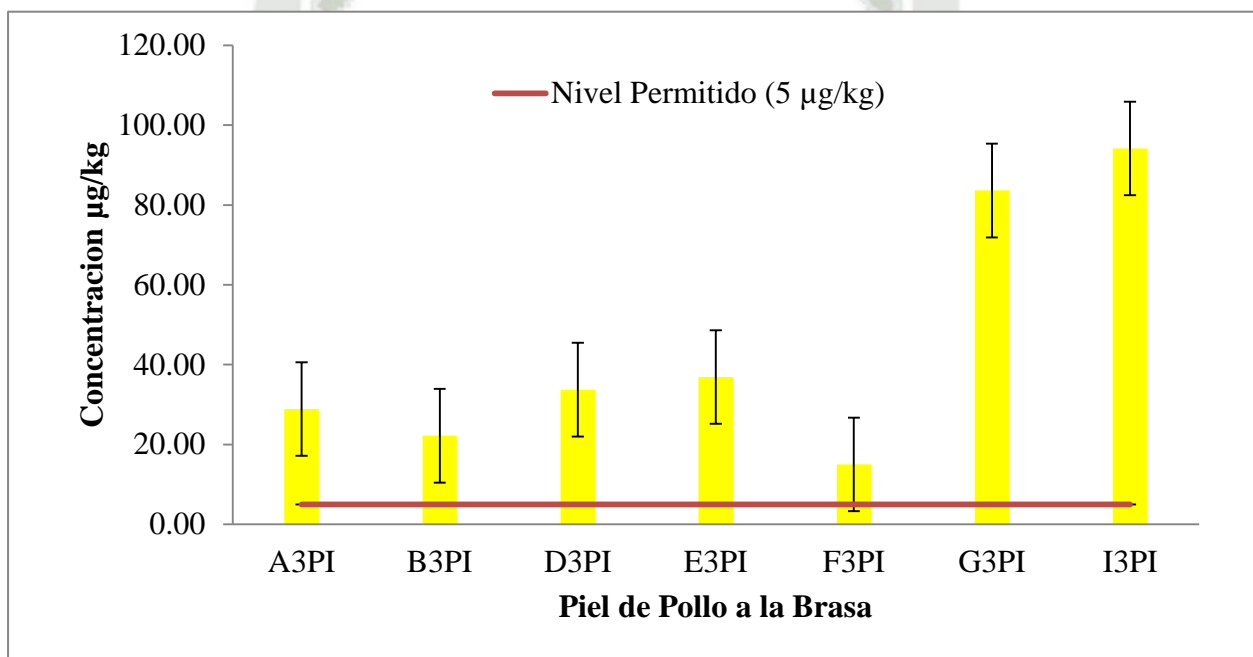
*Figura N°3.10 Primera evaluación de benzo[a]pireno en carne de pollo de pollo a la brasa*



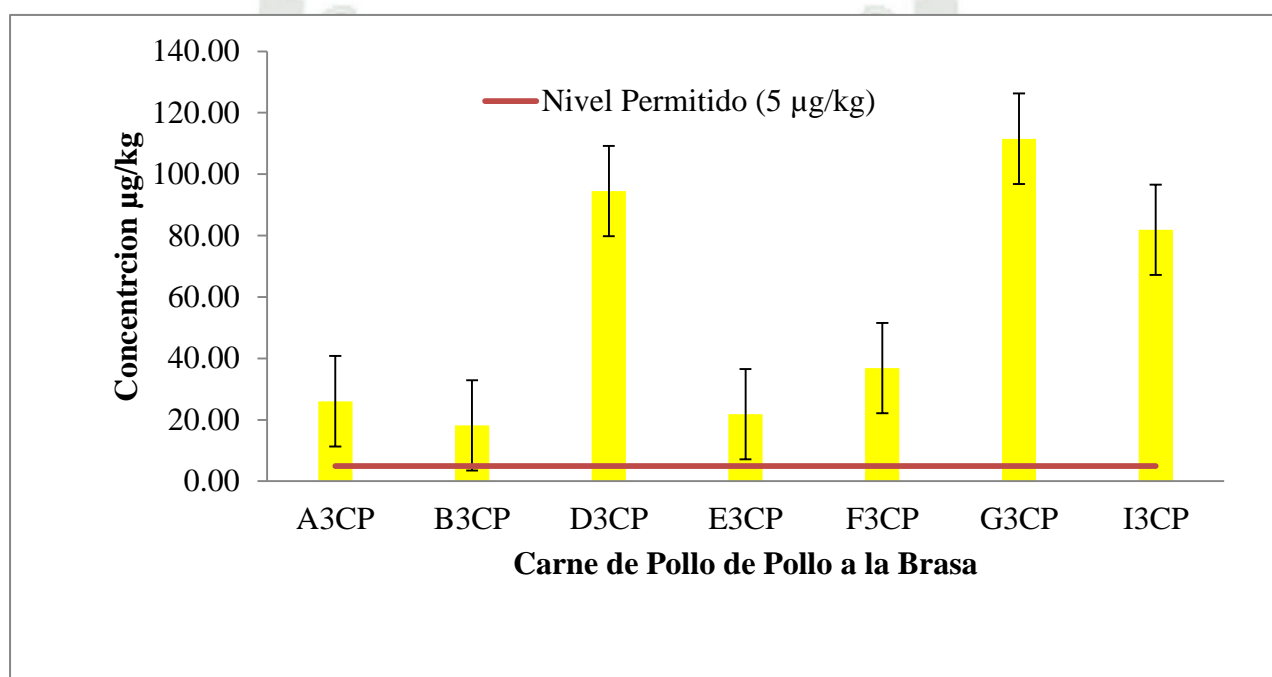
*Figura N°3.11 Segunda evaluación de benzo[a]pireno en piel de pollo a la brasa*



*Figura N° 3.12 Segunda evaluación de benzo[a]pireno en carne de pollo del pollo a la brasa*



*Figura N°3.13 Tercera evaluación de benzo[a]pireno en piel de pollo a la brasa*



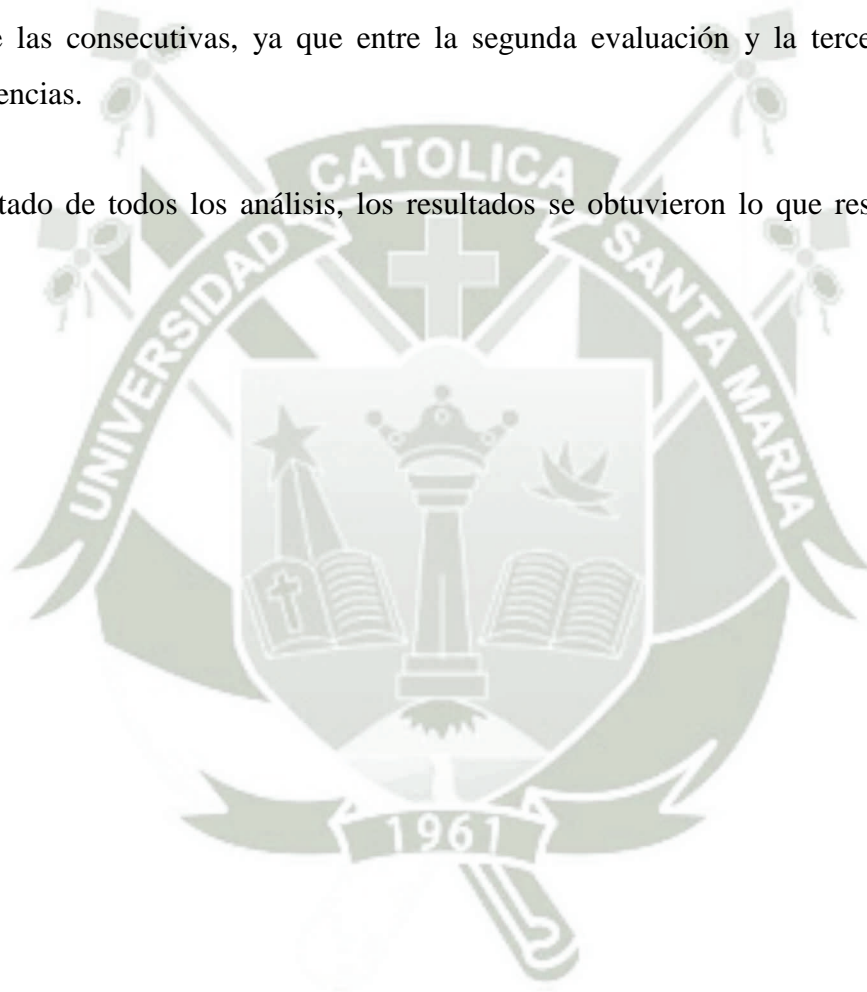
*Figura N° 3.14 Tercera evaluación de benzo[a]pireno en carne de pollo de pollo a la brasa*

Se realizó un ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre las diferentes zonas de Arequipa donde se recolectaron las muestras, y también se realizó el ANOVA para saber si existía diferencia significativa entre las evaluaciones realizadas.

En el caso del primer análisis  $p < 0.05$ , existiendo diferencias significativas entre las zonas de Arequipa, para ello se realizó la prueba de LSD, encontrando en entre todas las zonas existe diferencias.

En el segundo análisis revela que existen diferencias significativas entre las evaluaciones  $p < 0.05$ , igualmente se realizó la prueba de LSD, encontrando que la primera evaluación es diferente de las consecutivas, ya que entre la segunda evaluación y la tercera no existen dichas diferencias.

Como resultado de todos los análisis, los resultados se obtuvieron lo que resume la Tabla N°3.5



**Tabla N°3.5 Niveles mínimos y máximos de las evaluaciones de piel y carne de pollo a la brasa**

		<b>Evaluación 1</b>	<b>Evaluación 2</b>	<b>Evaluación 3</b>
		<b>(µg/kg)</b>	<b>(µg/kg)</b>	<b>(µg/kg)</b>
<b>Piel</b>	Mínimo	12.95	14.90	15.01
	Máximo	33.45	54.11	94.16
<b>Carne de Pollo</b>	Mínimo	13.87	12.75	18.18
	Máximo	99.55	29.58	111.53

*Fuente: Elaboración propia*

### 3. DISCUSION

En Malasia, M.H.A Jahurul y colaboradores, determinaron la cantidad de benzo[a]pireno y otros HAP en carne y pescado, cuarenta y dos tipos de productos se analizaron y estimaron una ingesta dietética, encontrando el nivel más elevado de HAP individuales fue fluoranteno (219,74 ng/g), mientras que el nivel más bajo fue benzo[a]pireno (24,33 ng /g). Cifra que en cierta forma guarda relación con los datos obtenidos en éste trabajo de investigación, ya que nuestro valor mínimo es de 12.75 µg/kg y el máximo de 111.53 µg/kg., la cifra de M.H.A Jahurul tiene similitud con los resultados de ésta evaluación <sup>(44)</sup>.

L.Duedahl-Olesen en su trabajo de investigación Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en carne asada danesa incluyó 203 muestras de carne comercialmente a la parrilla (carne de res, cerdo, pollo, salmón y cordero) y 15 muestras a la parrilla durante condiciones controladas de tiempo y calor. Encontrando concentraciones para un lomo de cerdo (195 µg/kg) considerada la más alta y más baja para pechuga de pollo (0.1 µg/kg) y controlada carne asada (<0.1 µg/kg) <sup>(45)</sup>.

En el estudio Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en carne a la parrilla, Afsaneh Farhadian, analizó nueve tipos de platos populares de carne a la parrilla de Malasia Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos tóxicos, como, fluoranteno, benzo[b]fluoranteno y benzo[a]pireno utilizando HPLC-FD. Fluoranteno se encontró en todas las muestras; la concentración más alta de HAP totales fue de 132 ng / g en carne de cerdo y la más baja fue de 3.51 ng / g en pollo a la parrilla. <sup>(46)</sup>. Este mismo investigador en otra de sus investigaciones evaluó los efectos del precalentamiento y envoltura de la carne sobre los niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la carne a la brasa. Este estudio investigó los efectos sobre los contenidos de PAH (Benzo (a) pireno (BaP), Benzo (b) Fluoranthene (BbFln) y Fluoranthene (Fln)) mediante el uso de dos tipos diferentes de tratamientos, precalentamiento (vapor y microondas) y envoltura (hoja de aluminio y banano) de las muestras de carne antes de asar el carbón. Los resultados mostraron que los tratamientos aplicados de precalentamiento y envoltura en las muestras afectan fuertemente los niveles de HAP en la carne a la brasa. No se detectaron PAH carcinogénicos (BaP y BbFln) en las muestras después del precalentamiento de vapor y microondas o tratamientos de envoltura de aluminio. Se observaron reducciones significativas del contenido de Fln, de hasta 46% y 81% en muestras de carne de res y pollo, respectivamente, en el estudio <sup>(47)</sup>.

En su estudio, SY Chung, encontró que los niveles de HAP dependieron del método de cocción y del tipo de fuente de calor utilizada, encontró niveles relativamente altos de HAP, 10.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en promedio, en muestras de cerdo a la brasa. Los niveles promedio de HAP en la carne de res no superaron los 0,80  $\mu\text{g} / \text{kg}$ . El asado de carbón de las muestras de cerdo dio como resultado niveles extremadamente altos de benzo[a]pireno (3,0  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ), mientras que los niveles promedio de benzo[a]pireno en las muestras de carne a la brasa fueron de 0,15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .<sup>(48)</sup>

Tsai HuaKao y colaboradores estudiaron la ocurrencia y exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos en productos cárnicos a la brasa con carbón de poco humo en Taiwán en productos de carne de pescado y mariscos, por GC-MS junto con un método QuEChERS, y estimar el riesgo potencial asociado con el consumo de esos productos en Taiwán. Entre varios PAH, se detectó el benzo[a]pireno altamente cancerígeno en pechuga de pollo a la parrilla a 84 ° C (30 min), corazón de pollo a 100 ° C (26 min), muslo de pollo a 74 ° C (20 min), pato muslo a 85 ° C (40 min) y filete de cordero a 88 ° C (12 min), con un nivel que asciende a 1.3  $\pm$  0.0, 2.4  $\pm$  0.1, 4.0  $\pm$  1.3, 3.1  $\pm$  0.0 y 5.8  $\pm$  0.5 ng / g , respectivamente.

La generación de HAP se asoció con el tiempo de cocción, la temperatura y el contenido de grasa. La ingesta diaria media diaria de PAH fue mayor para los adultos que para las personas mayores en Taiwán, sin embargo, el consumo de carne a la parrilla con carbón de poco humo no debería ser un problema de salud pública basado en la potencia del riesgo de cáncer.<sup>(49)</sup>

Los alimentos para asar a la parrilla implican altas temperaturas que conducen a la producción de tóxicos de cocina, como aminos aromáticos heterocíclicos (HA) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). O. Viegas estudio el efecto de los tipos de carbón y las condiciones de cocción sobre la formación de aminos aromáticos heterocíclicos (HA) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en alimentos musculares a la parrilla.

Cuantificó las AH y los HAP en muestras de carne y pescado bien cocidas a la parrilla con madera y carbón de cáscara de coco a 200 ° C. Los perfiles cuantitativos de HA y PAH fueron diferentes para la carne de vacuno y el salmón utilizando el mismo tipo de carbón. En el salmón se encontraron niveles más altos de HA y PAH. No se observó diferencias significativas para HA y HAP en muestras de carne de res a la parrilla con ambos tipos de carbón, mientras que el salmón a la parrilla con carbón de cáscara de coco presentó cantidades significativamente menores de HA y HAP que el salmón a la parrilla con carbón

de leña habitual. Las barbacoas continuas con el mismo carbón mostraron que la combustión de grasa que cayó durante el período de asado contribuyó a una mayor formación de HA y PAH. Se debe prestar especial atención a la ingesta de alimentos a la parrilla ya que se pueden tomar altas cantidades de AH y HAP en una sola comida <sup>(50)</sup> .

Investigaciones como las de Joo-Goo Lee que estudian los efectos de los procedimientos de cocción sobre los niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos en carnes a la parrilla, determinaron los efectos de los procedimientos de parrilla en el nivel de 4 HAP; benzo[a]antraceno (B [a] A), criseno (Chr), benzo[b]fluoranteno (B [b] F) y benzo[a]pireno (B [a] P).. Con respecto a la barbacoa de muestras sucesivas de carne con el mismo lote de carbón encendido, se observó que la combustión estable contribuye a la reducción de los HAP además observó reducciones significativas en la suma de los cuatro HAP a través de tratamientos que eliminaron los goteos de la carne y el humo con aparatos alternativos para asar. El nivel máximo de valores medios de PAH en carnes a la brasa fue de 3.62 µg / kg B [a] A en lomo de res; 4.15 µg /kg Chr en barriga de cerdo; 8.77 µg /kg B [b] F en el vientre de cerdo; 5,76 µg /kg B [a] P en el vientre de cerdo. Entre todas las carnes probadas, la panceta de cerdo a la brasa tenía niveles significativamente más altos de HAP debido a un alto contenido de grasa de 26.4% <sup>(51)</sup> .

En Nigeria, V.O.E. Akpambang determinó hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en pescado y carne ahumados / asados nigerianos de consumo común. Las muestras que fueron ahumadas o a la parrilla utilizando sistemas tradicionales, que utilizan un fuego de leña, estaban fuertemente contaminadas con benzo [a] pireno (BaP) a niveles que oscilaban entre 2.4 y 31.2 mg/kg de peso húmedo. Se encontraron niveles de contaminación considerablemente más bajos en las muestras ahumadas o a la parrilla en el laboratorio usando un fuego de carbón (BaP de 0.7 a 2.8 mg/ kg en peso húmedo). El riesgo para la salud asociado con un consumo diario de 100 g de estos productos también se evaluó utilizando el enfoque de margen de exposición (MOE). Se obtuvieron valores de MOE inferiores a 10,000 para todas las muestras comerciales ahumadas / a la parrilla, lo que indica una posible preocupación por la salud del consumidor <sup>(52)</sup> .

Euloge Yénoukounmè Kpoclou del Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, de la Universidad de Abomey-Calavi, Cotonou, Beni, estudió el efecto del tipo de combustible y horno en los niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en el

camarón ahumado, un condimento de comida de Benin ampliamente utilizado en las prácticas locales de cocina de Benin. Un estudio previo reveló que este producto está altamente contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). El presente estudio exploró las posibilidades de reducir los niveles de HAP en el camarón ahumado utilizando técnicas de ahumado de la industria artesanal con barriles y hornos de chorkor, reemplazando la madera por carbón de *Acacia auriculiformis* y *Mangifera indica*, como combustibles. Los resultados mostraron que solo el camarón ahumado con carbón de acacia en un horno de chorkor tenía niveles de HAP (benzo [a] pireno = 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y la suma de benzo [a] pireno, criseno, benzo [a] antraceno y benzo [b] fluoranteno = 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de acuerdo con un estándar europeo de 5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Sin embargo afirma que aún es necesario realizar más investigaciones para reducir la duración del contacto del producto con los gases de combustión a fin de reducir el contenido de HAP del camarón ahumado a niveles más seguros, en gran medida por debajo de los estándares <sup>(53)</sup>.

Como vemos los trabajos mencionados no son ajenos a los resultados de este trabajo de investigación, es bien sabido que la técnicas de a la parrilla o a la brasa definitivamente contaminan los alimentos con sustancias tóxicas y mortales al ser humano, la mayoría de los trabajos escapan de la norma establecida de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sin mencionar el daño y contaminación al medio ambiente. La realización de más estudios sobre los efectos de diferentes fuentes de calor, el contenido de grasa de la carne y los ingredientes de marinado son necesarios en un esfuerzo por reducir posiblemente la contaminación de HAP en estos alimentos

Estos datos se pueden usar para estimar la exposición alimentaria de los consumidores a HAP y para evaluar cualquier riesgo potencial asociado con la ingestión de estos alimentos.

## CONCLUSIONES

**PRIMERA:** Se validó un método para el estudio y la determinación de benzo[a]pireno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en Pollos a la Brasa presentando los siguientes parámetros: linealidad con un  $R^2 = 0.9995$ , la precisión presentó un coeficiente de variación de 0.26 %, la exactitud obtuvo una recuperación del 97.85%, un LDD 12.3  $\mu\text{g/L}$  y un LDC 14.3  $\mu\text{g/L}$ .

**SEGUNDA:** Se identificó y cuantificó la presencia de benzo[a]pireno en 32 muestras de 54 muestras analizadas en Pollos a la Brasa por HPLC, teniendo un tiempo de retención de 4.371 minutos.

**TERCERA:** Se contrastó los resultados obtenidos entre las diferentes zonas de muestreo junto con los niveles permitidos. Obteniendo un rango de 12.75  $\mu\text{g/kg}$  a 111.53  $\mu\text{g/kg}$  resultados muy por encima de los niveles de aceptación de la Comisión de las Comunidades Europeas que es de 5  $\mu\text{g/kg}$ .

## SUGERENCIAS

1. Realizar monitoreos de la calidad de aire contaminado por benzo[a]pireno y otros HAP sobre las chimeneas de las pollerías.
2. Investigar en otras fuentes alimenticias el benzo[a]pireno, en especial aquellos tipos de cocción como la parrilla.
3. Realizar estudios clínicos para ver si existe una relación entre el consumo de pollo a la brasa y el cáncer.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Gavrilović A, Ilijin L, Mrdaković M, Vlahović M, Mrkonja A, Matić D, et al. Effects of benzo[a]pyrene dietary intake to antioxidative enzymes of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae from unpolluted and polluted forests. *Chemosphere*. 2017;179(Supplement C):10-9.
2. Ogbonnaya UO, Oyelami AO, Umego MO, Okere UV, David OA, Fasina SA, et al. Assessment of PAH contaminated land: Implementing a risk-based approach. *Environmental Technology & Innovation*. 2017;8(Supplement C):84-95.
3. Park K-C, Pyo H, Kim W, Yoon KS. Effects of cooking methods and tea marinades on the formation of benzo[a]pyrene in grilled pork belly (Samgyeopsal). *Meat Science*. 2017;129(Supplement C):1-8.
4. AL AÑO SE CONSUME EN PROMEDIO 24 KILOS DE POLLOS A LA BRASA [press release]. Oficina Técnica de Difusión INEI, 15, Julio -2015 2015.
5. Duedahl-Olesen L. 13 - Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in foods. *Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods: Woodhead Publishing*; 2013. p. 308-33.
6. Wenzl T, Simon R, Anklam E, Kleiner J. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006;25(7):716-25.
7. Dat N-D, Chang MB. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies. *Science of The Total Environment*. 2017;609(Supplement C):682-93.
8. Zena R, Speciale A, Calabrò C, Calò M, Palombieri D, Saija A, et al. Exposure of sea bream (*Sparus aurata*) to toxic concentrations of benzo[a]pyrene: possible human health effect. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015;122(Supplement C):116-25.
9. Gupta H. PAH determination in effluent and sludge samples of paper industry. *Environmental Technology & Innovation*. 2018;9:115-21.
10. Eagar JD, Ervens B, Herckes P. Impact of partitioning and oxidative processing of PAH in fogs and clouds on atmospheric lifetimes of PAH. *Atmospheric Environment*. 2017;160(Supplement C):132-41.
11. Das DN, Naik PP, Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Meher BR, et al. Elimination of dysfunctional mitochondria through mitophagy suppresses benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;112(Supplement C):452-63.

12. PubChem. Benzo[A]Pyrene 2017/12/02 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2336#section=Top>.
13. ILO-ICSC. BENZO(a)PYRENE 2014 [International Chemical Safety Cards (ICSC) are data sheets intended to provide essential safety and health information on chemicals in a clear and concise way]. Available from: [http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_card\\_id=0104](http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=0104).
14. Guerreiro CBB, Horálek J, de Leeuw F, Couvidat F. Benzo(a)pyrene in Europe: Ambient air concentrations, population exposure and health effects. *Environmental Pollution*. 2016;214(Supplement C):657-67.
15. Das DN, Panda PK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Mallick B, Behera B, et al. Prediction and validation of apoptosis through cytochrome P450 activation by benzo[a]pyrene. *Chemico-Biological Interactions*. 2014;208(Supplement C):8-17.
16. Aldrich S. Safety Data Sheet - Benzo[a]pyrene - B1760. 2017;5.5.
17. Vázquez-Gómez G, Rubio-Lightbourn J, Espinosa-Aguirre JJ. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS DE ARILOS EN EL METABOLISMO DEL BENZO[A]PIRENO Y EL DESARROLLO DE TUMORES. *TIP*. 2016;19(1):54-67.
18. Kazerouni N, Sinha R, Hsu C-H, Greenberg A, Rothman N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology*. 2001;39(5):423-36.
19. Marco J. Química del Agua 2017 [Available from: <http://www.quimicadelagua.com/index.html>.
20. Agency USEP. Benzo(a)pyrene 2015 [Available from: <https://safewater.zendesk.com/hc/en-us/sections/202346487-Benzo-a-pyrene>.
21. Sorrell RK, Brass HJ, Reding R. A review of occurrences and treatment of polynuclear aromatic hydrocarbons in water. *Environment International*. 1980;4(3):245-54.
22. Twardowska I, Kolodziejczyk AM. Benzo[a]pyrene in soils and ground water: Occurrence, sources, distribution, interrelation. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 1998;66(1-4):127-44.
23. Vane CH, Kim AW, Beriro DJ, Cave MR, Knights K, Moss-Hayes V, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in urban soils of Greater London, UK. *Applied Geochemistry*. 2014;51(Supplement C):303-14.
24. Dwyer SD. EPA finds benzo(a)pyrene to be less toxic – higher, less stringent, screening levels expected to follow. *Environmental Practice*. 2017;19(2):104-5.

25. Ledesma E, Rendueles M, Díaz M. Spanish smoked meat products: Benzo(a)pyrene (BaP) contamination and moisture. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015;37(Supplement C):87-94.
26. Mansouri A, Abbas C, Landoulsi A. Combined intervention of static magnetic field and growth rate of *Microbacterium maritropicum* CB7 for Benzo(a)Pyrene biodegradation. *Microbial Pathogenesis*. 2017;113(Supplement C):40-4.
27. Gupta H, Gupta B. Photocatalytic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene by iron oxides and identification of degradation products. *Chemosphere*. 2015;138(Supplement C):924-31.
28. Facundo Farfán IA. Propuesta de un manual de buenas prácticas de manufactura para pollería El Bambú del Distrito de Castilla - Piura: Universidad Nacional de Piura; 2014.
29. PRAL "Programa Regional Aire Limpio" MPdA. Guía de Buenas Prácticas Ambientales para la Producción de Pollos a la Brasa. 2008.
30. COSUDE ejecutado por MINAM SyC. SISTEMATIZACIÓN DE EXPERIENCIAS PROGRAMA REGIONAL AIRE LIMPIO 2007 – 2009 2009.
31. Carlos BVF. Máquina para hacer pollos a la brasa. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2015.
32. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147(Supplement C):590-611.
33. LaCourse ME, LaCourse WR. Chapter 17 - General instrumentation in HPLC\* A2 - Fanali, Salvatore. In: Haddad PR, Poole CF, Riekkola M-L, editors. *Liquid Chromatography (Second Edition)*: Elsevier; 2017. p. 417-29.
34. Yucra Condori HR. Degradación Fotocatalítica de Metamidofos por Oxido de Zinc [Tesis Maestría en Química del Medio Ambiente]: UCSM; 2016.
35. Gonzales Condori EG. Evaluación del desempeño de *Eisenia foetida* (lombriz roja californiana) en la degradación de los pesticidas organofosforados Clorpirifos y Profenofos en suelos, Arequipa-2014 [Tesis Maetría en Química del Medio Ambiente]: UCSM.
36. Boysen RI, Hearn MTW. 9.02 - High Performance Liquid Chromatographic Separation Methods. *Comprehensive Natural Products II*. Oxford: Elsevier; 2010. p. 5-49.
37. Farhadian A, Jinap S, Faridah A, Zaidul ISM. Effects of marinating on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and fluoranthene) in grilled beef meat. *Food Control*. 2012;28(2):420-5.

38. Quehwarucho Acuña J. Determinación y cuantificación de 3,4 benzopireno por HPLC y grado de alteración en aceites y mantecas comestibles según el tiempo de reutilización en la fritura en chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2015.
39. Lipa Mamani LM. Monitoreo de Benzo[a]pireno por HPLC en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016. [Tesis Maestría en Química del Medio Ambiente]: UCSM; 2016.
40. Wongmaneepratip W, Vangnai K. Effects of oil types and pH on carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled chicken. Food Control. 2017;79(Supplement C):119-25.
41. Chen Y-H, Xia E-Q, Xu X-R, Li S, Ling W-H, Wu S, et al. Evaluation of Benzo[a]pyrene in Food from China by High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2012;9(11):4159-69.
42. Épshtein NA. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2004;38(4):212-28.
43. AOAC. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals 2002.
44. Jahurul MHA, Jinap S, Zaidul ISM, Sahena F, Farhadian A, Hajeb P. Determination of fluoranthene, benzo[b]fluoranthene and benzo[a]pyrene in meat and fish products and their intake by Malaysian. Food Bioscience. 2013;1(Supplement C):73-80.
45. Duedahl-Olesen L, Aaslyng M, Meinert L, Christensen T, Jensen AH, Binderup ML. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Danish barbecued meat. Food Control. 2015;57(Supplement C):169-76.
46. Farhadian A, Jinap S, Abas F, Sakar ZI. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. Food Control. 2010;21(5):606-10.
47. Farhadian A, Jinap S, Hanifah HN, Zaidul IS. Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. Food Chemistry. 2011;124(1):141-6.
48. Chung SY, Yettella RR, Kim JS, Kwon K, Kim MC, Min DB. Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. Food Chemistry. 2011;129(4):1420-6.

49. Kao TH, Chen S, Huang CW, Chen CJ, Chen BH. Occurrence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in kindling-free-charcoal grilled meat products in Taiwan. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;71(Supplement C):149-58.
50. Viegas O, Novo P, Pinto E, Pinho O, Ferreira IMPLVO. Effect of charcoal types and grilling conditions on formation of heterocyclic aromatic amines (HAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled muscle foods. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(6):2128-34.
51. Lee J-G, Kim S-Y, Moon J-S, Kim S-H, Kang D-H, Yoon H-J. Effects of grilling procedures on levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats. *Food Chemistry*. 2016;199(Supplement C):632-8.
52. Akpambang VOE, Purcaro G, Lajide L, Amoo IA, Conte LS, Moret S. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in commonly consumed Nigerian smoked/grilled fish and meat. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2009;26(7):1096-103.
53. Kpoclou EY, Anihouvi VB, Azokpota P, Soumanou MM, Douny C, Brose F, et al. Effect of fuel and kiln type on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) levels in smoked shrimp, a Beninese food condiment. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2014;31(7):1212-8.

## ANEXOS

### ANEXO N°1 CONDICIONES DE COCCION DE POLLO A LA BRASA EN LAS DISTINTAS POLLERIAS DE AREQUIPA



*Figura N°4.1 Pollo a la Brasa*



*Figura N° 4.2 Sistema de cocción a la brasa*

## ANEXO N°2 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA DETERMINACION DE BENZO [A] PIRENO



*Figura N°4.3 Muestras de piel y carne de pollo trituradas*

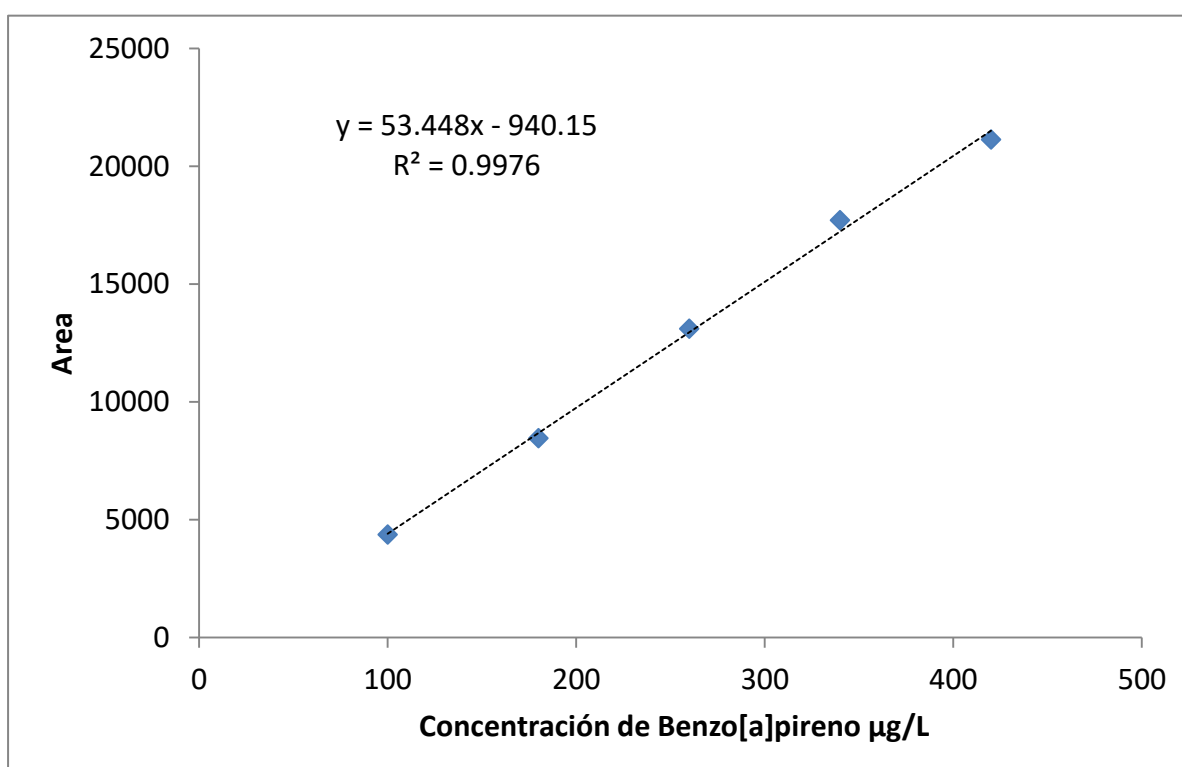


*Figura N°4.4 Muestras en extracción por ultrasonido*

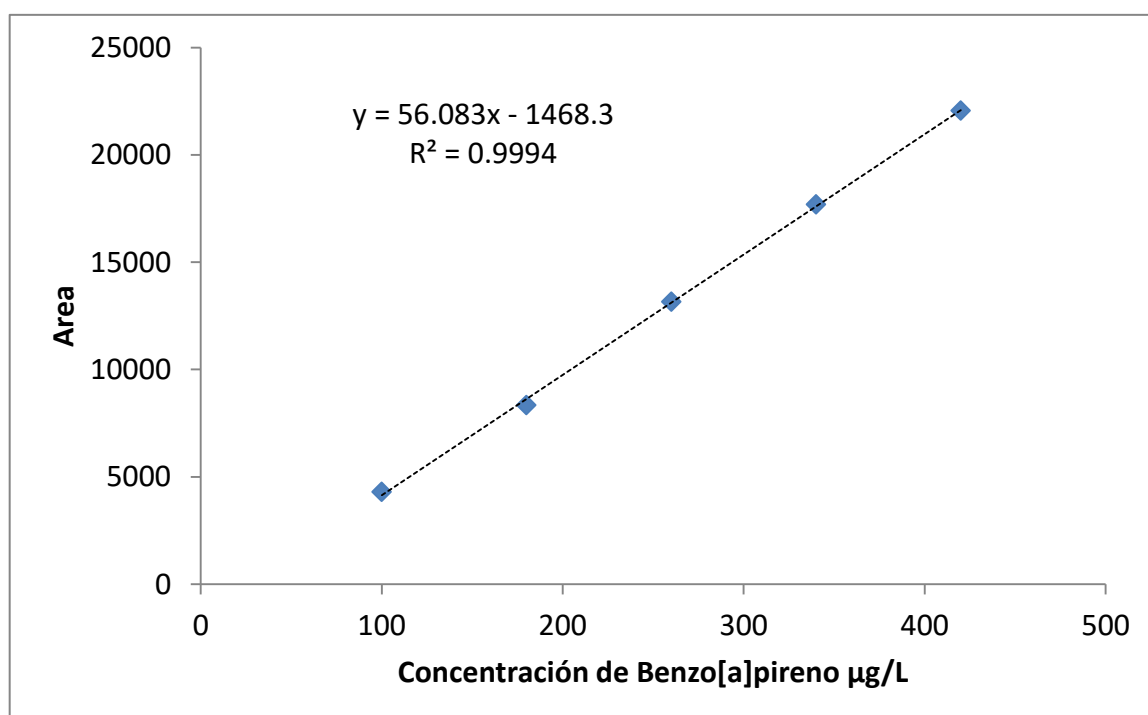


*Figura N° 4.5 Muestras analizadas en el equipo de HPLC*

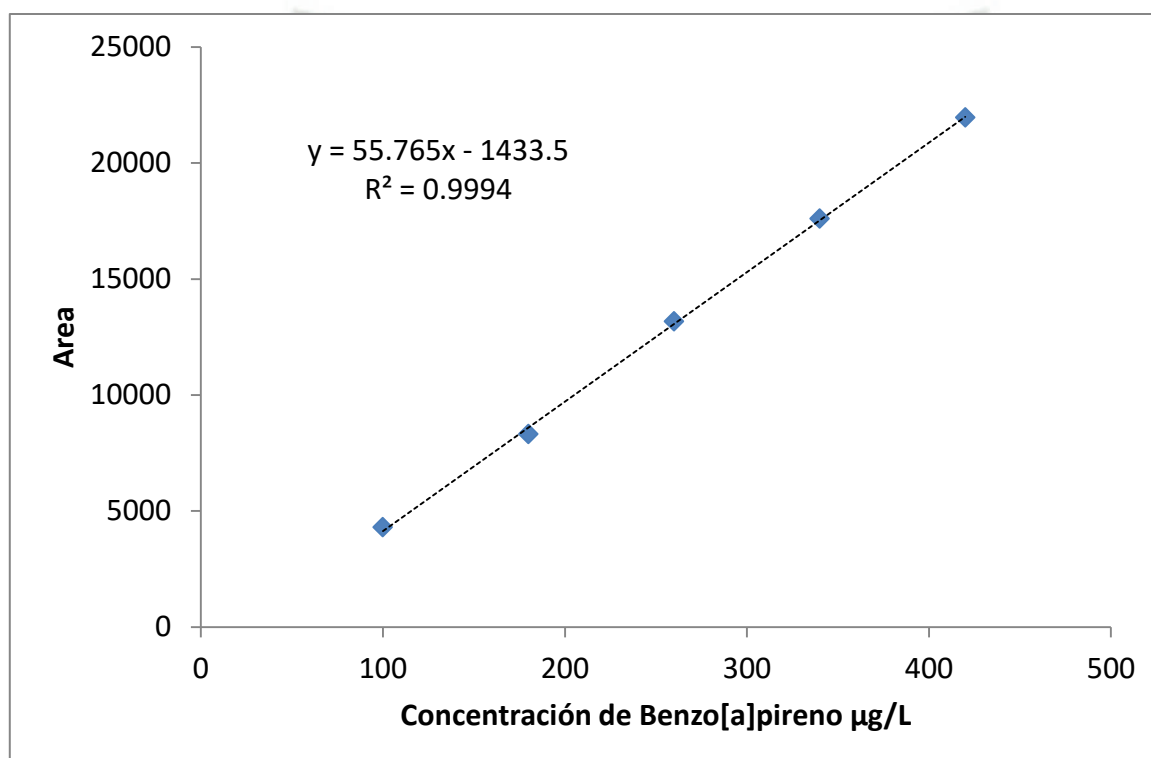
### ANEXO N°3 GRAFICAS DE LINEALIDAD



*Figura N° 4.6 Gráfica de Linealidad de la primera evaluación de muestras*



*Figura N° 4.7 Gráfica de Linealidad de la segunda evaluación de muestras*



*Figura N°4.8 Gráfica de Linealidad de la tercera evaluación de muestras*

**ANEXO N°4 TABLAS DE ANALISIS DE VARIANZA**

**Tabla N°4.1 Análisis de Varianza de las distintas zonas de Arequipa**

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
A	9	575.264607	63.91828967	1005.521935
B	15	493.2775513	32.88517009	711.2923543
C	10	249.9642423	24.99642423	34.72180152

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8108.507368	2	4054.253684	6.862324828	0.00340901	3.304817252
Dentro de los grupos	18314.76465	31	590.7988597			
Total	26423.27202	33				

**Tabla N° 4.2 Análisis de Varianza de las evaluaciones de benzo[a]pireno en pollo a la  
brasa**

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
E1	11	388.530716	35.3209742	596.9291199
E2	9	224.561968	24.9513298	178.168963
E3	14	194.265358	13.876097	171.3460535

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2850.66547	2	1425.33273	4.592045786	0.017917064	3.30481725
Dentro de los grupos	9622.141599	31	310.391664			
Total	12472.80707	33				