

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEÚTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y ANALÍTICA.



**ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA ASOCIADA A CALIBRACION  
MULTIVARIADA COMO HERRAMIENTA ANALITICA PARA EVALUAR LA  
PRESENCIA DE HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS EN  
ACEITES VEGETALES.**

Memoria Presentada A La Universidad De Chile Para Optar Al Grado De

Químico por:

**MÓNICA JAVIERA BAEZA ROCHA**

DIRECTOR DE TESIS

Dr. EDWAR FUENTES PÉREZ

Santiago - Chile

2014

*“Muchos fracasos ocurren en personas que no se dieron cuenta de lo cerca que  
estuvieron del éxito”.*

**Thomas Alva Edison**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la Universidad de Chile y a todos los profesores por siempre haber estado dispuestos a responder inquietudes y haberme formado como química. En especial quiero agradecer a mi profesor guía Edwar Fuentes por recibirme en su laboratorio, por su preocupación en mis múltiples problemas de salud, siempre haber estado disponible a responder dudas, por haberme dado la oportunidad de participar en la XXX Jornadas Chilenas de Químicas y depositar su confianza en mí para llevar a cabo esta tesis. Al Proyecto FONDECYT 1110114 vital para llevar a cabo la investigación.

A las profesoras María Baez y Jeannette Espinoza por haberme recibido de la mejor manera en el laboratorio. A mis compañeros de la Universidad con quienes compartí largas horas de estudios y de fiestas en especial a Ricardo a quien le tengo un cariño increíble que hizo mis tardes siempre muy entretenidas. A los Cheers en especial a Pilow, Cony, Consu y Javi que hicieron que todos los martes y sábados fueran diferentes y recordables por siempre. A todos mis amigos que me brindaron palabras de apoyo cuando las necesite.

A mi familia en especial a mi mamá por todo el sacrificio que ha hecho por nosotros por el apoyo incondicional para terminar mis estudios. A mi Chris por todo el apoyo y ánimo que me entregó durante todo este tiempo que hemos estado juntos.

## TABLA DE CONTENIDO

|  |             |
|--|-------------|
| <b>ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>  | <b>X</b>    |
| <b>ABREVIATURAS .....</b>  | <b>XII</b>  |
| <b>RESUMEN.....</b>  | <b>XV</b>   |
| <b>ABSTRACT: Fluorescence Spectroscopy Associated To A Multivaried Calibration As Analysis Tool To Evaluate The Presence Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Vegetable Oils .....</b> | <b>XIX</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>  | <b>5</b>    |
| 2.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....   | 5           |
| 2.2 Aceites .....  | 11          |
| 2.3 Métodos analíticos para determinar HAPs en aceites de origen vegetal .   | 15          |
| 2.4 Espectroscopía de Fluorescencia .....  | 16          |
| 2.5 Espectroscopía de Fluorescencia asociado a calibración multivariada ...  | 19          |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>  | <b>25</b>   |
| 3.1 Objetivo General .....   | 25          |
| 3.2 Objetivos Específicos .....  | 25          |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>27</b> |
| 4.1 Reactivos y soluciones.....   | 27        |
| 4.2 Equipos, condiciones de trabajo y softwares .....   | 27        |
| 4.3 Preparación de muestras .....   | 31        |
| 4.3.1 Extracción líquido-líquido asistida por microondas (MAE-SPE) y precipitación de aceite por disminución de temperatura ..... | 31        |
| 4.3.2 Extracción en fase sólida (SPE) .....   | 32        |
| 4.4 Muestras de Calibrado .....   | 33        |
| 4.4.1 Conjunto de Muestras de Calibrado en Solvente .....   | 33        |
| 4.4.2 Conjunto de Muestras de Validación en solvente .....  | 35        |
| 4.4.3 Conjunto de Muestras de Validación en matriz .....  | 36        |
| 4.4.4 Conjunto de prueba .....  | 36        |
| 4.4.5 Análisis de muestras reales .....   | 37        |
| 4.5 Generación de HAPs en muestras calentadas en presencia de materia orgánica .....  | 38        |
| <br>  |           |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>  | <b>40</b> |
| 5.1 Espectros de excitación y emisión de los HAPs estudiados .....  | 40        |
| 5.2 Calibrado en solvente .....   | 42        |
| 5.3 Validación con set preparado en solvente .....  | 45        |
| 5.4 Extracción de los HAPs desde aceite de oliva y limpieza de los extractos .....  | 47        |
| 5.5 Validación conjunto preparado en matriz .....   | 49        |
| 5.6 Modificaciones sobre los EEMs y tratamiento de las muestras en el set de validación .....                                     | 53        |
| 5.6.1 Uso de EEMs derivados .....   | 53        |
| 5.6.2 Precipitación de aceite (Triglicéridos) co-extraído por disminución de la temperatura .....                                 | 56        |
| 5.7 Análisis del set de prueba .....  | 60        |
| 5.8 Aplicación a muestras de aceite de oliva comercial .....  | 65        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.9 Generación de HAPs en muestras calentadas en presencia de materia orgánica ..... | 68        |
| <b>6. CONCLUSIÓN.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>   | <b>72</b> |
| <b>ANEXO .....</b>   | <b>77</b> |

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estructura molecular de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos considerados en el estudio .....   | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Rutas metabólicas que pueden seguir los HAPs en el cuerpo humano...  | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Esquema de las etapas para la elaboración del aceite de oliva.....   | 12 |
| <b>Figura 4.</b> Consumo per cápita aparente de Aceite de Oliva en Chile entre los años 2005 y 2012 .....   | 14 |
| <b>Figura 5.</b> Diagrama de niveles de energía mostrando algunos de los cambios de energía que ocurren en una especie molecular durante la absorción (a), relajación no radiante (b) y fluorescencia (c). .....  | 15 |
| <b>Figura 6</b>   |    |
| <b>6A.</b> Espectros de emisión de soluciones de cada patrón de HAPs en n-hexano. Concentraciones BkF: 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ , BaP, DBahA, BbF, BaA, BghiP, e IP: 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....  | 40 |
| <b>6B.</b> Espectro emisión de solución en n-hexano de BaA, BbF, BaP y DBahA: 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ , BkF: 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ BghiP y IP 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ a $\lambda_{\text{ex}}$ : 290 nm .....  | 40 |
| <b>6C.</b> Espectro excitación emisión de una muestra del calibrado preparado en n-hexano con concentraciones de 1 $\text{ng L}^{-1}$ BaA, BbF, DBahA, 0,75 $\text{ng L}^{-1}$ BkF, 3,0 $\text{ng L}^{-1}$ BaP 2 $\text{ng L}^{-1}$ IP 4,5 $\text{ng L}^{-1}$ . $\lambda_{\text{ex}}$ : 250-400 nm, $\lambda_{\text{em}}$ : 370-550 nm...41 |    |
| <b>Figura 7.</b>  |    |
| <b>7A.</b> Espectros de absorción y emisión ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 290 nm) para un aceite de oliva extra-virgen.....   | 47 |
| <b>7B.</b> Espectros de absorción y emisión ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 290 nm) para un aceite de oliva extra-virgen.....   | 47 |



**Figura 8.**

|  |    |
|--|----|
| <b>8A.</b> Espectro de emisión de los 7 HAPs en presencia de aceite de oliva, tratados con MAE. ....                   | 49 |
| <b>8B.</b> Espectro de emisión de los 7 HAPs en presencia de aceite de oliva, tratados con MAE y SPE sobre silica..... | 49 |

**Figura 9.**

|  |    |
|--|----|
| <b>9A.</b> Espectros de excitación ( $\lambda_{ex}$ : 250-400 nm) emisión ( $\lambda_{em}$ : 370-550 nm), obtenidos para la muestra 5 del calibrado. ....                | 50 |
| <b>9B.</b> Espectro de excitación ( $\lambda_{ex}$ : 325-380 nm) emisión ( $\lambda_{em}$ : 450-520 nm) para la muestra 1 del set de validación preparado en matriz..... | 50 |

**Figura 10.**

|   |    |
|---|----|
| <b>10A.</b> Espectros de excitación emisión para una muestra del set de validación (test1), obtenida por MAE-SPE..... | 54 |
| <b>10B.</b> Espectro excitación emisión derivado para la misma muestra de 10A. ....                                   | 54 |

**Figura 11.**

|  |    |
|--|----|
| <b>11A.</b> Espectros de fluorescencia clásica, concentraciones 0; 1,45; 3,63; 7,25; 10,88; 29,00 y 43,50 ng mL <sup>-1</sup> muestras tratadas por MAE-precipitación.....     | 57 |
| <b>11B.</b> Espectros de fluorescencia clásica, concentraciones 0; 1,45; 3,63; 7,25; 10,88; 29,00 y 43,50 ng mL <sup>-1</sup> muestras tratadas por MAE-Precipitación-SPE..... | 57 |

**Figura 12.** Gráficos de las regiones elípticas de confianza entre concentraciones predichas por U-PLS/RBL en función de los valores obtenidos por HPLC-FLD para BaA, BbF, BkF, BaP, DBahA, BghiP, IP.. ....62

**Figura 13.** Gráficos concentración BaA fortificado, BaA no fortificado, IP fortificado IP no fortificado v/s tiempo para aceites recalentados . ....69

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Características de HAPs con los que se trabajó.....   | 7  |
| <b>Tabla 2.</b> Programa optimizado de elución utilizado para el análisis por HPLC-FLD.....   | 30 |
| <b>Tabla 3.</b> Concentraciones de los HAPs en las muestras de calibrado en solvente. ....  | 34 |
| <b>Tabla 4.</b> Concentraciones de los HAPs en el set de muestras de validación en solvente, en matriz y set de prueba. ....  | 35 |
| <b>Tabla 5.</b> Aceites utilizados, origen y fecha de elaboración. ....   | 38 |
| <b>Tabla 6.</b> Número de componentes óptimos (CP), intervalos de excitación-emisión, muestras eliminadas y errores en la validación cruzada y auto-predicción para el set de calibrado mediante U-PLS.. .... | 44 |
| <b>Tabla 7.</b> RMSEP y REP obtenidos para la validación con set preparado en solvente para cada compuesto.. ....   | 46 |
| <b>Tabla 8.</b> Parámetros de calidad analítica obtenidos para el set de validación en la matriz de aceite obtenida por MAE-SPE.....  | 51 |
| <b>Tabla 9.</b> Parámetros de calidad analítica obtenidos para el set de validación en la matriz de aceite obtenida por MAE-SPE utilizando los EEMs derivados. ....   | 54 |
| <b>Tabla 10.</b> Masas de aceite co-extraídas para las muestras tratadas mediante MAE-precipitación y MAE-precipitación-SPE.....  | 58 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 11.</b> Parámetros de calidad analítica obtenidos para el set de validación en la matriz de aceite obtenida por MAE-precipitación-SPE utilizando los EEMs derivados..... | 59 |
| <b>Tabla 12.</b> Recuperación promedio y desviaciones estándar de cada analito en el set de prueba obtenida por HPLC-FLD y U-PLS/RBL.....   | 61 |
| <b>Tabla 13.</b> Concentración (ng g <sup>-1</sup> ) de cada analito encontrada en muestras reales.....   | 66 |

## ABREVIATURAS

**$\lambda_{ex}$** : Longitud de onda de excitación.

**$\lambda_{em}$** : Longitud de onda de emisión.

**%Rec**: Porcentaje de recuperación.

**ADN**: Ácido desoxirribonucleico.

**AO**: Aceite de oliva.

**BaA**: Benzo[a]antraceno.

**BaP**: Benzo[a]pireno.

**BbF**: Benzo[b]fluoranteno.

**BghiP**: Benzo[g,h,i]perileno.

**BkF**: Benzo[k]fluoranteno.

**DBahA**: Dibenzo[a,h]antraceno.

**EJCR**: Región elíptica de confianza conjunta.

**EEMs**: Matrices de excitación emisión.

**HAPs**: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

**HPLC-FLD:** Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia.

**IP:** Indeno[1,2,3-c,d]pireno

**LOD:** Límite de detección.

**LOOCV:** Validación cruzada dejando una muestra afuera (Leave-one-out cross validation).

**MAE:** Extracción líquido-líquido asistida por microondas.

**N°CP:** Número de componentes óptimos.

**PCA:** Análisis por componentes principales.

**PLS:** Mínimos cuadrados parciales.

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación.

**REP:** Error relativo de predicción.

**REPC:** Error relativo de la autopredicción.

**REPCv:** Error relativo de predicción de la validación cruzada.

**RBL:** Bilinearización residual.

**RMSEc:** Raíz cuadrada del error cuadrático medio de la autopredicción.

**RMSEcv:** Raíz cuadrada del error cuadrático medio de la validación cruzada.

**RMSEP:** Raíz del error cuadrado medio de predicción.

**SPE:** Extracción en fase sólida.

**US-EPA:** Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos

**U-PLS:** Mínimos cuadrados parciales desdoblados

**U-PLS/RBL:** Mínimos cuadrados parciales desdoblados acoplados a  
bilinearización residual

## RESUMEN

Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de compuestos orgánicos constituidos por 2 o más anillos aromáticos simples unidos, que no contienen heteroátomos ni otros sustituyentes. Generan diversos daños a la salud debido a su carácter cancerígeno y mutagénico. Considerando su carácter lipofílico los HAPs pueden acumularse en grasas y en los tejidos vegetales con una alta persistencia. Por esto los podemos ingerir indirectamente al incluir en nuestra dieta alimentos ricos en grasas o aceites como es el caso de los aceites vegetales. Las técnicas más ampliamente utilizadas para determinar las concentraciones de los HAPs en aceites han sido la cromatografía líquida de alta eficiencia asociada a detección por fluorescencia o espectrometría de masas. Sin embargo, al utilizar HPLC los tiempos de análisis y de preparación de muestra ocupan un tiempo considerable. Es un método relativamente costoso tanto en equipamiento de la técnica y en análisis. Una alternativa a estos métodos son aquellos basados en espectroscopía de fluorescencia, principalmente por su menor costo y rapidez. La relevancia de estos métodos ha sido limitada por su falta de selectividad, especialmente cuando compuestos similares deben ser analizados en matrices complejas. Una forma de alcanzar una mayor selectividad analítica es asociar la espectroscopía de fluorescencia con diferentes métodos quimiométricos de

análisis de datos, constituyendo un método de calibración multivariado. En trabajos recientes, realizados en el laboratorio donde se desarrolló la presente tesis, se ha propuesto una extracción líquido-líquido asistida por microondas (MAE) asociada a extracción en fase sólida con sílica (SPE) como etapa de preparación de los aceites, previa a la cuantificación por espectroscopía de fluorescencia y calibración multivariada.

En el presente estudio se utilizó la espectroscopía de fluorescencia asociada a calibración multivariada de segundo orden (U-PLS/RBL) para determinar un grupo de siete HAPs (Figuras 1-7: benzo[a]antraceno (BaA), benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), indeno [1,2,3-c,d]-pyreno (IP), dibenzo[a,h]antraceno (DBahA) y benzo[g,h,i]perileno (BghiP).

Se realizó una etapa de calibrado con mezclas de los estándares de los siete compuestos de interés preparados en solventes seleccionados, encontrando el intervalo espectral óptimo y el número óptimo de factores para cada HAPs. Se validó con un conjunto preparado en solvente, los valores obtenidos para el error relativo de predicción (REP) (entre 4,8% y 25,2% para BaP y BghiP) y la raíz de error cuadrado medio de predicción (RMSEP) (entre 0,03 ng mL<sup>-1</sup> para BkF y 0,88 ng mL<sup>-1</sup> para BghiP) se consideraron bajos por lo que las predicciones fueron satisfactorias.



La capacidad predictiva del modelo de calibración U-PLS/RBL fue evaluada utilizando muestras de aceite fortificadas con los siete compuestos desde el inicio del proceso obteniendo altos valores de REP y RMSEP. Con el objetivo de incrementar la selectividad y así mejorar la capacidad predictiva disminuyendo los parámetros anteriores, tanto las matrices de excitación emisión (EEMs) del grupo de validación preparado en matriz así como los del conjunto de calibrado fueron derivados y usados para predecir las concentraciones de los HAPs. Otra de las medidas tomadas para mejorar la capacidad predictiva fue que al tratamiento de muestra (MAE-SPE) se le incorporó la precipitación de aceite co-extraído por disminución de temperatura logrando bajar la carga de algunos de los interferentes, que perjudican el análisis y así obtener mejores resultados en la predicción.

Se preparó un nuevo grupo de muestras en duplicado fortificadas desde el comienzo del proceso, tratadas con MAE-precipitación de aceite co-extraído-SPE y analizadas mediante HPLC-FLD como método de referencia. Las recuperaciones promedio determinadas mediante HPLC-FLD estuvieron entre un 55 y 79%, no encontrándose diferencias significativas con los valores determinados mediante U-PLS/RBL para BbF, BkF, BaP, BghiP, DBahA e IP. Además, se estableció que los HAPs son estables al menos por dos meses en los extractos finales obtenidos luego del proceso de extracción; puesto que presentaron concentraciones semejantes entre ambos grupos duplicados, aun cuando uno de ellos se analizó después del tiempo señalado.

El método propuesto fue aplicado a 15 aceites de oliva virgen comerciales, en uno solo de ellos se detectaron concentraciones por sobre el límite de detección (LOD) para BaA  $1,62 \text{ ng g}^{-1}$  y BghiP  $1,88 \text{ ng g}^{-1}$  dando un total de  $3,5 \text{ ng g}^{-1}$  de HAPs. A pesar de esto, ambos HAPs se encuentran bajo los límites máximos permitidos por la legislación Europea.

Por último para investigar si al ser calentado el aceite de oliva en presencia de materia orgánica durante 24 horas, surgen modificaciones del perfil de concentraciones de dos HAPs modelo (BaA e IP), se aplicó el método MAE precipitación de aceite co-extraído SPE. El estudio mostró posibles fenómenos de sorción de los compuestos por la materia orgánica que varían en el tiempo.

## **ABSTRACT**

### **FLUORESCENCE SPECTROSCOPY ASSOCIATED TO A MULTIVARIATED CALIBRATION AS ANALYSIS TOOL TO EVALUATE THE PRESENCE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN VEGETABLE OILS.**

The Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are a group of organic compound composed of 2 or more simple aromatic rings joined together, which contain neither heteroatoms nor others substituents. They generate several health problems due to their carcinogenic and mutagenic nature. Considering their lipophilic nature, the PAHs can gather together in fat and vegetal tissues with a high persistence. For this reason we can ingest them indirectly when including fatty food or oils as in the case of vegetal oils. The techniques thoroughly used in order to determine the PAHs concentrations in oils have been the high efficiency liquid chromatography associated to detection by fluorescence or mass spectrometry. Nevertheless, HPLC analysis and the previous sample preparation take a considerable time. Moreover, is a relatively expensive method not only in the technique equipment, but also in the analysis. As alternative to these methods are those based on fluorescence spectroscopy, mainly because of its low cost and rapidity. The relevance of these methods has been limited by its lack of selectivity, specially when similar compounds must be analyzed in complex matrix. One way of achieving a bigger analytical selectivity

is associating the fluorescence spectroscopy with different chemometrics methods of data analysis, constituting a multivaried calibration method. In recent research, carried out in the laboratory where this thesis was developed, it has been proposed a liquid-liquid microwave-assisted extraction (MAE) associated to silica-based solid phase extraction (SPE) as preparation phase of oils, prior to the quantification by fluorescence spectroscopy and multivaried calibration.

In the present study it was used the fluorescence spectroscopy associated to a second order multivaried calibration (U-PLS/RBL) so as to determine a group of seven PAHs (Figures 1-7: benzo[a]anthracene (BaA), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), indeno [1,2,3-c,d]-pyrene (IP), dibenzo[a,h]anthracene (DBahA) and benzo[g,h,i]pyrene (BghiP).

It was carried out a calibrated phase with mixture of the seven compounds of interest prepared in solvent, finding the optimal spectrum interval and the optimal number of factors for each PAHs. It was validated with a set prepared in solvent, the values obtained for the relative-error prediction (REP) (between 4,8% and 25,2% for BaP y BghiP) and the root of the mean squared error of prediction (RMSEP) (between 0,03 ng mL<sup>-1</sup> for BkF and 0,88 ng mL<sup>-1</sup> for BghiP) were low so the predictions were satisfactory.

The predictive capacity of the calibration model U-PLS/RBL was evaluated using fortified oil samples with the seven compounds from the beginning of the process obtaining high values of REP and RMSEP. With the purpose of

increasing the selectivity and, in that way, also improving the predictive capacity reducing the previous parameters, not only the Emission Excitation Matrix (EEMs) of the validation group prepared in matrix, but also those from the calibration set were derived and used in order to predict the HAPs concentrations. Another measure taken in order to improve the predictive capacity was incorporating to the sample treatment (MAE-SPE) the precipitation of co-extracted oil through temperature reduction lowering the charge of some of the interferents.

It was prepared a new duplicated sample group fortified from the beginning of the process, treated with MAE- low temperature precipitation-SPE and analyzed through HPLC-FLD as reference method. The average recoveries determined by HPLC-FLD fluctuated between 55 and 79%, finding no significant differences with the determined values through U-PLS/RBL for BbF, BkF, BaP, BghiP, DBahA and IP. Furthermore, it was established that HAPs are steady at least for two months in the final extracts obtained after the extraction process; due to the fact that they presented similar concentrations between both duplicated groups, even though one of them was analyzed after the indicated period of time.

The proposed method was applied to 15 commercial virgin olive oils, only in one of them were detected concentrations over the limit of detection (LOD) for BaA 1,62 ng g<sup>-1</sup> and BghiP 1,88 ng g<sup>-1</sup> revealing a total of 3,5 ng g<sup>-1</sup> of HAPs.

In despite of this, both HAPs are under the maximum limits allowed by the European legislation.

Lastly, the method was applied to evaluate possible change of the profile of two selected PAHs (BaP and IP) in olive oil heated up in presence of organic matter for 24 hours. The study showed possible sorption phenomena of the compounds on the organic matter depending on time.



## 1. INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de compuestos orgánicos constituidos por 2 o más anillos aromáticos simples unidos que no contienen heteroátomos ni otros sustituyentes. Se ha demostrado en variados estudios que generan diversos daños a la salud, ya que pueden comportarse como agentes cancerígenos y mutagénicos. Estos compuestos se caracterizan por su baja solubilidad en agua y elevada en disolventes orgánicos no polares. Los seres humanos pueden estar expuestos a los HAP por inhalación de aire contaminado, humo de tabaco, suelos contaminados, hollín y especialmente por ingesta de aguas o alimentos contaminados, entre ellos alimentos grasos como los aceites comestibles, debido a la afinidad que tienen los HAP a las grasas.

Aquellos HAP que poseen un alto peso molecular son los que presentan un mayor carácter lipofílico y se pueden acumular en grasas como en las de los animales y en los tejidos vegetales con una alta estabilidad. Debido a esto los podemos ingerir indirectamente al incluir en nuestra dieta alimentos ricos en grasas o aceites como es el caso de los aceites vegetales (oliva, girasol, maíz, etc.). La contaminación de este tipo de alimentos con HAP es producto de la contaminación de las materias primas y al procesamiento que reciben al ser fabricados.



Debido a su carácter cancerígeno y mutagénico diversas legislaciones han establecido límites máximos permitidos de los HAP en alimentos. En este sentido, las Autoridades Europeas de Seguridad Alimentaria publicaron la actualización de un reglamento que establece un límite de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  para BaP y  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para la suma de cuatro HAPs (BaP, criseno, BaA y BbF) en los aceites de orujo de oliva. Según el reglamento sanitario de los alimentos Dto. 977/96 Artículo 249 de Chile, no se aceptarán más de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  de cada uno ni más de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de la suma de los 8 hidrocarburos aromáticos policíclicos volátiles en aceites y grasas. Los 8 HAPs relacionados son: Benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, indeno[1,2,3-0,d]pireno.

En vista de los antecedentes señalados, la determinación de los HAP en aceites vegetales ha adquirido una alta relevancia, ya que así se puede contar con información acerca de la situación de los aceites nacionales más consumidos en la actualidad (oliva y girasol) en cuanto a presencia de este tipo de contaminantes. Para ello se requiere de métodos analíticos adecuados en sensibilidad y selectividad.

La cromatografía líquida de alta eficiencia asociada a detección por fluorescencia o espectrometría de masas es el método al que habitualmente se recurre para determinar HAP en aceites. Sin embargo, al utilizar HPLC los tiempos de análisis y preparación de muestra ocupan un tiempo considerable,

es un método relativamente costoso tanto en equipamiento de la técnica y en análisis ya que requiere de importantes volúmenes de solventes de alta pureza para la separación y extracción de los analitos. Una alternativa a los métodos cromatográficos para la determinación de HAP son aquellos basados en espectroscopía de fluorescencia, principalmente por su menor costo y rapidez. Sin embargo, la relevancia de estos métodos ha sido limitada por su falta de selectividad, especialmente cuando compuestos similares deben ser analizados en matrices complejas. Una forma de alcanzar una mayor selectividad analítica es asociar la espectroscopía de fluorescencia con diferentes métodos quimiométricos de análisis de datos, constituyendo un método de calibración multivariado.

En trabajos recientes, realizados en el laboratorio donde se desarrolló la presente tesis, se ha propuesto una extracción líquido-líquido asistida por microondas (MAE) asociada a extracción en fase sólida con sílica (SPE) como etapa de preparación de los aceites, previa a la cuantificación por espectroscopía de fluorescencia y calibración multivariada.

En el presente estudio se utilizó la espectroscopía de fluorescencia asociada a calibración multivariada de segundo orden (U-PLS/RBL) para determinar un grupo de siete HAPs (Figuras 1-7: benzo[a]antraceno (BaA), benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP),

indeno [1,2,3-c,d]-pyreno (IP), dibenzo[a,h]antraceno (DBahA) y benzo[g,h,i]perileno (BghiP)), en aceites de oliva virgen producidos y/o consumidos en Chile. Se aplicó en primer término un tratamiento de las muestras que implica la extracción de los HAPs desde el aceite (MAE) y limpieza de los extractos con SPE sobre sílica. Se intercaló una etapa de precipitación por disminución de temperatura del aceite co-extraído con MAE, con el objetivo de bajar la carga de interferentes antes de SPE. Por otra parte, se consideró trabajar con los espectros de fluorescencia total derivados para mejorar la selectividad en la calibración multivariada. Se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento de muestras tratadas con MAE-SPE sobre la determinación de los analitos estudiados, los que fueron cuantificados mediante calibración multivariada y HPLC con detector de fluorescencia. Se analizaron muestras reales de aceites de oliva virgen de varias marcas disponibles en el mercado para determinar la presencia de HAPs en ellas. Finalmente se evaluó la posible generación de HAPs en muestras de aceite calentadas en presencia de materia orgánica.

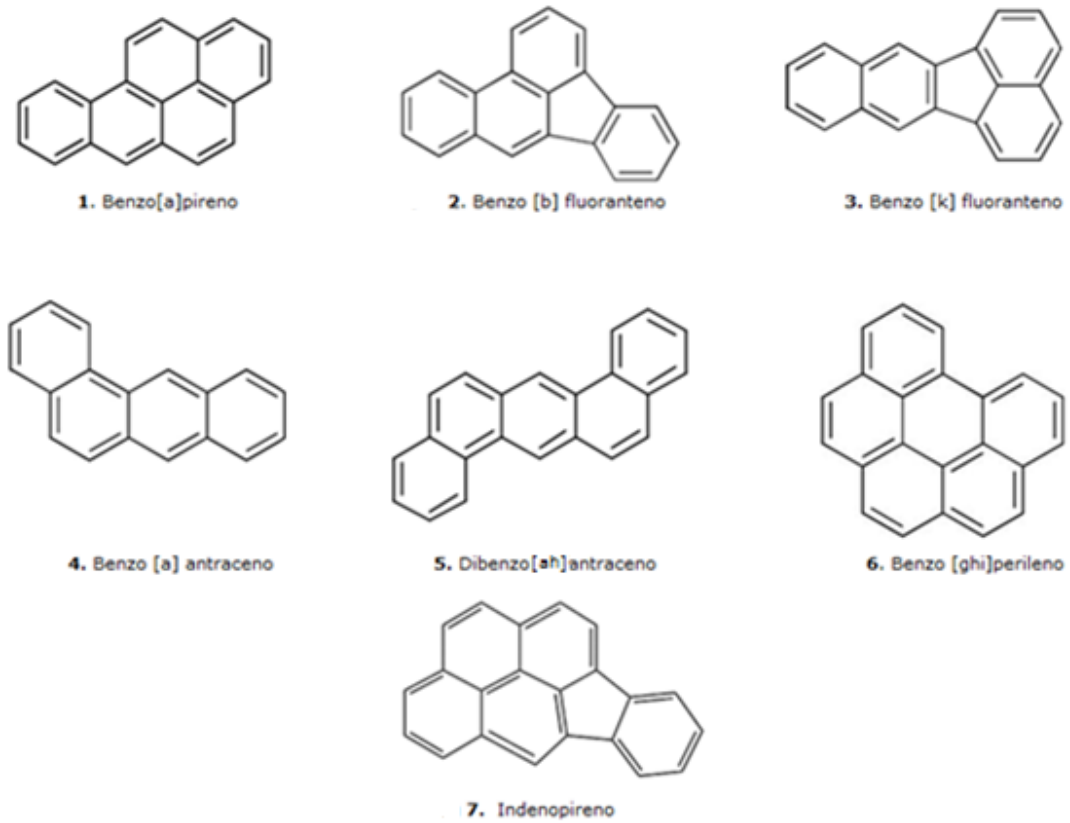
## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se caracterizan por estar formados por varios anillos bencénicos. El benceno es un hidrocarburo de fórmula molecular  $C_6H_6$  cuyos átomos de carbono se unen formando un anillo (posee un olor característico por eso se suele nombrar como anillo aromático). Los HAP contienen en su estructura 2 o más anillos bencénicos fusionados (policíclon) y no contienen heteroátomos ni otros sustituyentes. Como sustancias químicas puras generalmente se encuentran en estado sólido pudiendo tener una coloración blanca, verde amarillosa pálida o ser incoloros. Los de menor número de anillos son más volátiles que aquellos de cuatro o más anillos. Por lo general se les encuentra como una mezcla de distintos HAP.

Aquellos HAP que poseen un alto peso molecular son los que presentan un mayor carácter lipofílico. Esta característica en general se incrementa al aumentar la complejidad del compuesto y su masa molecular, es así como un HAP que contenga un mayor número de anillos y alto peso molecular presenta una mayor afinidad por las grasas que un HAP que posea una estructura más sencilla y de bajo peso molecular. Los que contienen menos de 5 anillos aromáticos son llamados HAPs livianos y los que tienen 5 o más anillos se conocen como HAPs pesados. En la Figura 1 se presenta la estructura

molecular de los hidrocarburos aromáticos policíclicos con los que se trabajó; mientras que en la Tabla 1 se resumen algunas de sus características:



**Figura 1.** Estructura molecular de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos considerados en el presente estudio.

**Tabla 1.** Características de HAPs con los que se trabajó.

|                              | <b>Abreviación</b> | <b>Masa molar<br/>(g mol<sup>-1</sup>)</b> | <b>Fórmula<br/>molecular</b>    | <b>Solubilidad en<br/>agua (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Punto<br/>ebullición(°C)</b> |
|------------------------------|--------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|
| <b>Benzo[a]pireno</b>        | BaP                | 252,3                                      | C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> | 2*10 <sup>-3</sup>                                 | 495                             |
| <b>Benzo[b]fluoranteno</b>   | BbF                | 252,3                                      | C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> | 1*10 <sup>-3</sup>                                 | 481                             |
| <b>Benzo[k]fluoranteno</b>   | BkF                | 252,3                                      | C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> | 8*10 <sup>-4</sup>                                 | 480                             |
| <b>Benzo[a]antraceno</b>     | BaA                | 228,3                                      | C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> | 0,01   | 400                             |
| <b>Dibenzo[a,h]antraceno</b> | DbahA              | 278,4                                      | C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> | 5*10 <sup>-4</sup>                                 | 524                             |
| <b>Benzo[ghi]perileno</b>    | BghiP              | 276,3                                      | C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> | 3*10 <sup>-4</sup>                                 | 550                             |
| <b>Indenopireno</b>          | IP                 | 276,3                                      | C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> | 0,06   | 530                             |

Los HAPs se forman como subproductos de la combustión incompleta de carbón, petróleo, gasolinas, basuras y materia orgánica en general. Esto hace que sean compuestos ampliamente difundidos en el medio ambiente, llegando a considerárseles como ubicuos. Se pueden distinguir dos tipos de fuentes de estos compuestos en el medio ambiente:

Fuentes naturales: Generadas por combustiones naturales de materia orgánica, como lo son las erupciones volcánicas y los incendios forestales.

Fuentes antropogénicas: Todas aquellas formas en que se originan HAP dependientes de la actividad humana como por ejemplo en calefacciones domésticas, emisiones de vehículos con motor, consumo de tabaco y en usos industriales.

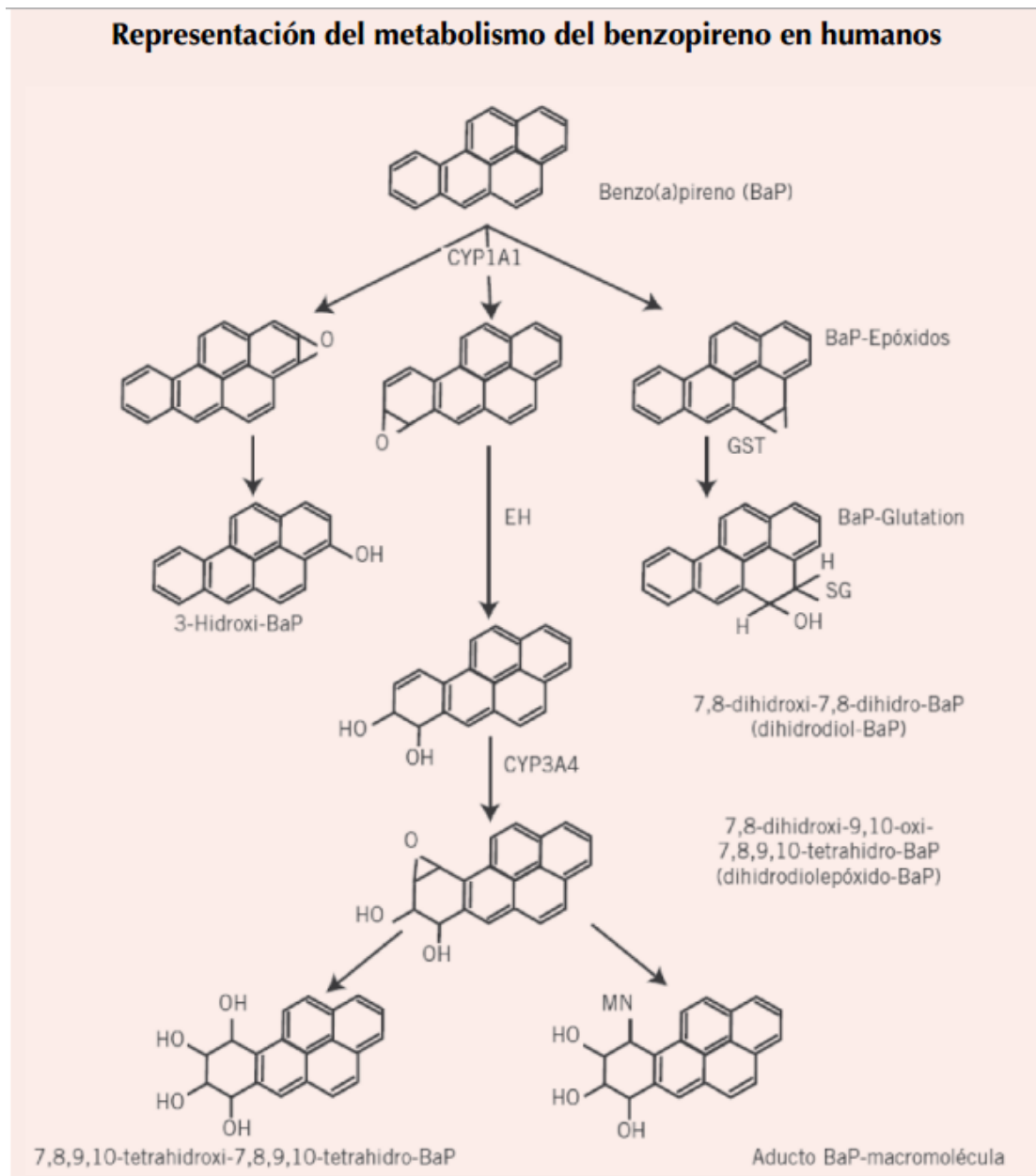
Los seres humanos pueden entrar en contacto con los HAP por vía inhalatoria al respirar aire contaminado, dérmica al encontrarse con suelos

contaminados o digestiva, especialmente por ingesta de aguas o alimentos contaminados. Considerando su carácter lipofílico descrito anteriormente los HAP pueden acumularse en grasas y en tejidos vegetales con persistencia. Debido a esto los podemos ingerir indirectamente al incluir en nuestra dieta alimentos ricos en grasas o aceites como es el caso de los aceites vegetales (oliva, girasol, maíz, etc.). La contaminación de este tipo de alimentos con HAP es producto de la contaminación de las materias primas y al procesamiento que reciben al ser fabricados.

Al ingresar al organismo, los HAPs son absorbidos por éste distribuyéndose ampliamente en todos los tejidos, especialmente en aquellos que tienen un mayor porcentaje graso como los pulmones, la piel y el sistema digestivo. La mayoría de los HAPs pasan por un proceso de detoxificación para ser eliminados por la orina y heces. La detoxificación ocurre principalmente en el hígado. En una primera instancia ocurre la oxidación de un doble enlace de los HAPs catalizada enzimáticamente, seguido por una conjugación en donde al compuesto oxidado se agrega una molécula abundante en el organismo como el glutatión. Con estos dos pasos se modifica el compuesto original para que se transforme en uno hidrosoluble, favoreciendo su eliminación por la orina.

Se puede generar otra vía de reacción luego de la oxidación inicial, la que involucra una hidrólisis catalizada por una enzima llamada epóxido hidrolasa microsomal (EH) seguida por otra oxidación por la enzima P-450,

generando como producto final un diol-epóxido. Estos compuestos son altamente reactivos y pueden unirse a moléculas complejas como proteínas y el ADN; generando finalmente mutagénesis. En la Figura 2 se representan las distintas rutas metabólicas del benzopireno como modelo de HAP en humanos:



**Figura 2.** Rutas metabólicas que pueden seguir los HAPs en el cuerpo humano.



Cabe señalar que la mayoría de los HAP no presentan un carácter genotóxico “per se” sino los productos de su metabolismo, particularmente los epóxidos (Figura 2) que se pueden unir al ADN. La presencia de moléculas ajenas al material genético puede provocar la copia defectuosa de este material durante la división celular, lo que genera mutaciones. Si éstas ocurren en aquellas células que controlan el crecimiento celular, se puede iniciar un cáncer. (Agudo A. 2010)

Otros de los efectos nocivos que producen los HAPs en animales sometidos a altas dosis de exposición son: debilitamiento del sistema inmunitario, problemas reproductivos, si la exposición se produce durante el embarazo podría afectar al feto generando defectos congénitos y disminución del peso corporal. (Agency for toxic substances and disease registry 1996)

Debido a que los HAPs podrían encontrarse en alimentos que consumimos diariamente y a su carácter cancerígeno y mutagénico, diversas legislaciones han establecido límites máximos permitidos de estos compuestos en alimentos. En este sentido, las Autoridades Europeas de Seguridad Alimentaria publicaron la actualización de un reglamento que establece un límite de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  para BaP y  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para la suma de cuatro HAPs (BaP, criseno, BaA y BbF) en los aceites de orujo de oliva. Según el reglamento sanitario de los alimentos Dto. 977/96 Artículo 249 de Chile, no se aceptarán más de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  de benzopirenos ni más de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de la suma de los 8 hidrocarburos

aromáticos policíclicos volátiles en aceites y grasas (Ministerio de Salud República de Chile 2009). Los 8 HAPs relacionados son: Benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, indeno[1,2,3-0,d]pireno.

## **2.2 Aceites**

### **Aceites de oliva**

El aceite de oliva es el aquel que proviene exclusivamente de la aceituna, fruto del olivo. Actualmente se clasifican en variados grupos debido a su procesamiento, composición o calidad.

Aceite de oliva virgen: Obtenido únicamente desde el fruto del olivo por procedimientos mecánicos (prensado) u otros procedimientos físicos que no conllevan a una alteración química del aceite. Este grupo se puede dividir en dos: Aquellos aptos para el consumo humano (aceite de oliva virgen, extra virgen y corriente) y aquellos no aptos para el consumo humano (aceite de oliva lampante).

Existen otros tipos de aceites de oliva como los refinados (obtenidos por el refinado de aceites de oliva vírgenes) aceite de oliva (mezcla de aceite de oliva

refinado y virgen) y aceites de orujo de oliva (obtenido por tratamiento con disolventes u otros procedimientos de la pulpa que queda después del prensado).

La Figura 3 muestra de forma esquemática las principales etapas que involucra la obtención del aceite de oliva, partiendo desde la recolección, almacenaje en la almazara, prensado, decantación y finalmente la elaboración, en el caso de aceites que lo requieran.



**Figura 3.** Esquema de las etapas para la elaboración del aceite de oliva.

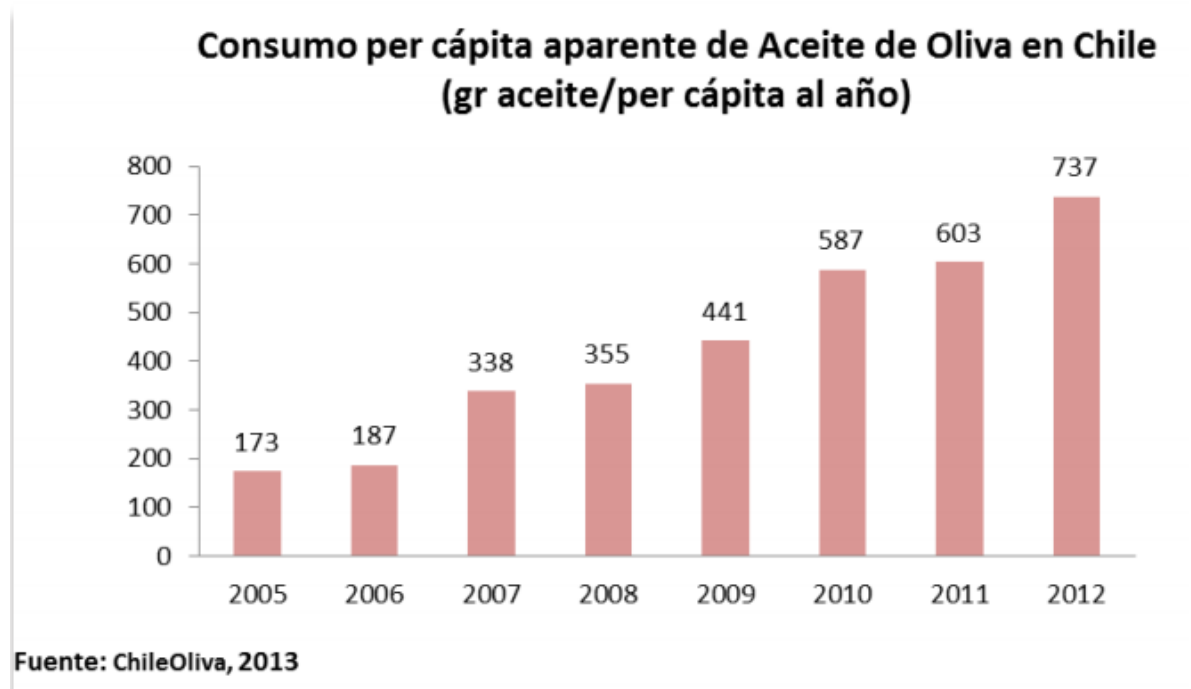
La composición de los aceites de oliva consta de dos fracciones: Una mayoritaria, también conocida como la fracción saponificable, que comprende entre el 98-99% del total y que está compuesta en gran parte por triglicéridos y en una cantidad menor por diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres (en mayor cantidad el ácido oleico) provenientes de las aceitunas. La otra fracción minoritaria corresponde a la fracción no saponificable y representa el 2% del peso del aceite de oliva. Resulta difícil determinar de forma precisa la totalidad de los compuestos menores dada su baja concentración y por su

naturaleza compleja. Incluye una alta variedad de compuestos químicos una parte de estos son derivados de ácidos grasos tales como fosfolípidos y ésteres de esteroides. La parte que no es derivado de los ácidos grasos son: Hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos (Lozano y col. 2009).

Los aceites se pueden contaminar con los HAPs en su proceso de elaboración y por la contaminación ambiental de la materia prima vegetal. En el proceso de elaboración la contaminación se puede producir en la etapa de secado de los residuos del orujo, los solventes involucrados en la extracción, el quemado de sólidos, el material de empaque y los residuos de aceites minerales utilizados como lubricantes en la maquinaria de las plantas de extracción de aceite. (Guillén y col. 2004; Lage y col. 2005; Moret y col. 2005; Teixeira y col. 2007).

En lo referente al consumo de este alimento, a nivel nacional ésta ha ido en aumento a través de los años, esto se puede deber a la promoción mundial de la dieta mediterránea, que destaca las propiedades nutritivas que se le atribuyen al aceite de oliva tales como: Aportar vitamina A, D, E y K; ayudar a prevenir la aterosclerosis y las afecciones cardíacas, reducir el colesterol total, mejorar el funcionamiento del estómago entre otras (Chile Oliva 2013). Se estima que el consumo per cápita del año 2012 fue de alrededor de 737 gramos por persona al año, representando un aumento del 22% comparándolo con el

año anterior. El 90% de los aceites de oliva generados en Chile corresponde a extra virgen. En la Figura 4 se muestra la evolución que ha tenido el consumo per cápita de aceite de oliva en Chile en el período 2004-2012.



**Figura 4.** Consumo per cápita aparente de Aceite de Oliva en Chile entre los años 2005 y 2012.

La producción de aceites de oliva en Chile también ha presentado un incremento considerable con el paso de los años, aumentando así el área destinada al cultivo de olivos para aceite. Si en el 2005 se producían 1800 toneladas de aceite, desde ese año se ha experimentado un crecimiento promedio anual de la producción del 45%, llegando al año 2012 a las 21600 toneladas de producción de aceite de oliva en Chile. Parte de los aceites

producidos son exportados a países como: Estados Unidos, Italia, Brasil, Venezuela, Canadá, Colombia, México, Inglaterra y Japón (Chile oliva, 2013).

### **2.3 Métodos analíticos para determinar HAPs en aceites de origen vegetal**

Uno de los principales problemas para la determinación de HAPs en aceites es la complejidad de la matriz, sus bajos niveles de concentración y los múltiples compuestos interferentes. Se han planteado múltiples formas de extracción de los analitos de interés y eliminación de estas interferencias previa a su determinación cromatográfica. Para el paso de la extracción se ha recurrido a la partición líquido-líquido (Guillén y col. 2004; Martínez y col. 2005; Ballesteros y col. 2006; Rose y col. 2007; Teixeira y col. 2007; Wu y Yu 2012), micro extracción en fase sólida (SPME) (Vichi y col. 2007), extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Zougagh y col. 2004; Lage y col. 2005), micro extracción en fase sólida desde el espacio de cabeza o “head space” (SPME-HS) (Arrebola y col. 2006) y extracción en fase sólida (SPE) (Moret y col. 2005; Purcaro y col. 2008).

Para la limpieza o “clean-up” también se han sugerido distintos tratamientos de muestra para esta etapa como la cromatografía de permeación en gel (GPC) (Cejpek y col. 1998; Fromberg y col. 2007) y algunas que implican

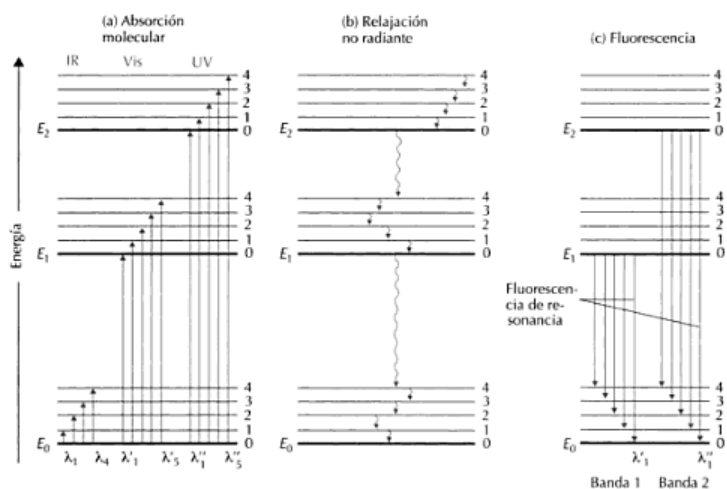
SPE con sorbentes de florisil, silica y C18 (Rose y col. 2007; Teixeira y col. 2007; Simon y col. 2008; Wu y Yu 2012). Las desventajas de varias de estas técnicas son los largos tiempos para la preparación de la muestra previa a su análisis que se incrementa con el número de muestras a analizar.

Entre los métodos cromatográficos para determinar la presencia y concentración de los HAPs, existen dos mayormente utilizados. Estos son la cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) (Moret y col. 2002; Barranco y col. 2003; Moreda y col. 2004; Lage y col. 2005; Martinez y col. 2005; Moret y col. 2005; Teixeira y col. 2007; Ciecierska y Obiedzinski 2013) y la cromatografía de gases (GC) acoplada a un espectrómetro de masas (MS) (Guillén y col. 2004; Diletti y col. 2005; Arrebola y col. 2006; Fromberg y col. 2007; Rose y col. 2007; Wu y Yu 2012). A pesar de que ambos métodos son selectivos y con bajos límites de detención, los tiempos de medición son largos y para el caso de HPLC-FLD se requieren de grandes volúmenes de solventes de alta pureza, por lo cual son costosos y eliminan una cantidad importantes de desechos.

## 2.4 Espectroscopía de Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el que átomos o moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética, volviendo posteriormente a su estado fundamental por relajación del estado singulete ( $S_1$  a  $S_0$ ) con la consiguiente emisión de esta energía en forma de fotones. En la Figura 5 se muestra un diagrama de energía simplificado de Perrin-Jablonski para una especie molecular hipotética, en el que se pueden visualizar algunas de las distintas vías en que un átomo o molécula vuelve a su estado fundamental luego de haber sido excitada.

El camino más probable será aquel que minimice el tiempo de vida media del estado excitado.  $E_0$ ,  $E_1$  y  $E_2$  representan distintos estados de energía electrónicos siendo  $E_0$  el estado fundamental y  $E_1$  y  $E_2$  estados excitados.



**Figura 5.** Diagrama de niveles de energía mostrando algunos de los cambios de energía que ocurren en una especie molecular durante la absorción (a), relajación no radiante (b) y fluorescencia (c).



Las flechas verticales que van desde los estados de menor energía  $E_0$  a  $E_1$  y  $E_2$  corresponden a la absorción molecular. Al exponer una molécula a una banda de radiación en el visible se pueblan los distintos estados vibracionales del estado excitado  $E_1$  correspondiente al de baja energía. De igual manera al irradiar la molécula con una radiación de longitudes de ondas más cortas, En un período de tiempo corto, se pueblan los niveles vibracionales  $E_2$  correspondiente al de alta energía.

La conversión interna es una transición no radiante entre dos estados electrónicos con igual multiplicidad de spin. En solución este proceso es seguido por una relajación vibracional hacia los niveles más bajos de energía. La pérdida del exceso de energía vibracional puede llevarse a cabo por medio de colisiones entre moléculas excitadas y moléculas del disolvente, donde la energía vibracional es traspasada a estas últimas moléculas.

La emisión de fotones que acompaña a la relajación de  $E_1 \rightarrow E_0$  es llamada fluorescencia. En ella las moléculas excitadas electromagnéticamente se pueden relajar a cualquiera de los estados vibracionales de  $E_0$  (Valeur 2002). Todas las moléculas después de haber sido excitadas por absorción radiante, podrían ser fluorescentes. Sin embargo, no lo son porque se privilegian los

caminos no radiantes debido a que el tiempo de relajación para volver a su estado basal es más corto por esa vía.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentan fluorescencia en disolución. Mostraran una mayor fluorescencia aquellos que manifiesten un mayor rendimiento cuántico, que es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de las moléculas excitadas, la que aumenta con el número de anillos y con el grado de conjugación que presente el compuesto (Skoog y col 2001).

## **2.5 Espectroscopía de Fluorescencia asociado a calibración multivariada**

Una alternativa más rápida y económica que la cromatografía es la espectroscopia de fluorescencia. Parte de la información espectral que se puede obtener a partir de un compuesto fluorescente puede ser de una vía (su intensidad de fluorescencia para un valor de  $\lambda_{exc}$  y uno de  $\lambda_{em}$ ); de dos vías (su espectro de fluorescencia obtenido para un  $\lambda_{exc}$ ) o de tres vías (su espectro o matriz de excitación-emisión, EEMs, obtenido en un intervalo de  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$ ).

La espectroscopia de fluorescencia tiene como ventaja su gran sensibilidad, la cual es en general, de uno a tres órdenes de magnitud más sensible que los métodos basados en absorción (Skoog y col 2001). Sin

embargo, es poco selectiva en compuestos químicamente similares, situación que podría darse al ser utilizada para analizar muestras reales y/o con varios constituyentes. Por ello, su aplicación en estos casos requiere mejorar su selectividad (mejorando su resolución). Esto se puede lograr al utilizar una mayor cantidad de la información espectral generada por la muestra (ejemplo datos de dos o tres vías), asociada a métodos quimiométricos para construir modelos de calibración multivariada con esta información.

Dependiendo del tipo de datos espectrales a analizar, la calibración multivariada puede ser primer orden (análisis de espectros), de segundo orden (análisis de las EEMs) o incluso superior. En cada caso se pueden emplear diferentes algoritmos como PLS (“partial least square”) para primer orden o U-PLS (“un-folded” PLS) para segundo orden. En este último caso, U-PLS se asocia a lo que se conoce como bilinearización residual (RBL) para alcanzar la “ventaja del segundo orden”, que es predecir la concentración de un analito en presencia de compuestos no modelados inicialmente en el calibrado. Con ello se puede utilizar un intervalo de mayor interés, pudiendo reducir señales de ruido y aumentar la selectividad.

PLS se basa en un método de análisis de factores en el cual forma una matriz correspondiente al espectro de emisión de una muestra (X) se correlaciona con un vector de concentración (Y) transformándose en una estructura del tipo:

$$X = T \cdot P^T + E \quad (1)$$

Donde, X es la matriz de calibración (espectros), P es la matriz de “loadings”, T de “scores” y E es la matriz de residuos. En forma simultánea a esta descomposición matricial, se establece una correlación entre el vector de concentración y la matriz de “scores”.

$$y_n = T \cdot v_n + e \quad (2)$$

Donde,  $v_n$  es el vector de coeficientes de regresión que correlaciona la respuesta  $y_n$  de cada analito y  $e$  es la matriz de residuos. Los factores  $v_n$  y P describen la máxima correlación entre los datos espectrales y el vector de concentración. Este tipo de calibración requiere la construcción de un conjunto de calibración lo suficientemente representativo de las muestras donde se modelan todos los componentes de la muestra, incluso aquellos interferentes desconocidos que pueden tener las muestras complejas. Lo que genera una gran desventaja, ya que las interferencias que no sean modeladas generarán una mala predicción de las concentraciones (Escandar y col, 2007).

En el caso de U-PLS/RBL, el algoritmo opera en dos etapas (Olivieri 2005), primero las  $X_{c,i}$  matrices de calibrado (de tamaño  $J \times K$ , donde J y K son el número de canales en cada modo de datos) son desdobladas, vectorizadas y agrupadas en una nueva matriz  $Z_x$ . Posteriormente esta matriz, junto con los vectores de concentración ( $I \times 1$ , donde I es el número de muestras de calibración), son usados aplicando el modelo PLS común para obtener los

“loadings” contenidos en la matriz  $P$  y los “loadings” de peso contenidos en la matriz  $W$  (ambos de tamaño  $JK \times A$ , donde  $A$  es el número de factores) y coeficientes de regresión  $v$  ( $A \times 1$ ). El parámetro  $A$  se selecciona comúnmente por validación cruzada (leave-one-out cross validation LOOCV). Si la calibración fuera exacta,  $v$  puede ser empleado para estimar las concentraciones de los analitos en una muestra desconocida utilizando la ecuación (3).

$$y_u = t_u^T v \quad (3)$$

Donde,  $t_u$  es el “score” de la muestra problema, obtenido por proyección de sus datos (desdoblados)  $X_u$  en el espacio de los factores  $A$  como se indica en la ecuación (4)

$$t_u = (W^T P)^{-1} W^T \text{vec}(X_u) \quad (4)$$

Como se mencionó previamente, cuando es necesario obtener la “ventaja de segundo orden” al utilizar U-PLS debido a que la muestra presenta interferentes que no están modelados en el calibrado, se puede utilizar la bilinearización residual. Este es un procedimiento utilizado después de la calibración, que separa las señales que pueden ser explicadas por el modelo de calibrado de aquellas que podrían ser potenciales interferentes. La matriz de datos  $X_u$  de una muestra con constituyentes inesperados, es vectorizada [ $\text{vec}(X_u)$ ] y luego expresada como se indica en la siguiente ecuación:

$$\mathbf{vec}(X_u) = P t_u + [B_{unx} G_{unx} (C_{unx})^T] + e_{RBL} \quad (5)$$

donde,  $e_{RBL}$  es el error residual de RBL y  $B_{unx}$ ,  $G_{unx}$ , y  $C_{unx}$  son obtenidos a partir del análisis de componentes principales (PCA, comúnmente realizado por descomposición de valores singulares, SVD) de una matriz residual obtenida luego de reformular el vector  $e_{RBL}$  calculado, asumiendo que las interferencias están ausentes como se indica en la ecuación (6):

$$B_{unx} G_{unx} (C_{unx})^T = SDV\{\mathit{reshape}[\mathbf{vec}(X_u) - P t_u]\} \quad (6)$$

Donde, “reshape” indica la operación inversa a la vectorización, es decir convertir el vector  $JK \times 1$  en la matriz  $J \times K$ , y la operación SVD es aplicada utilizando el primer componentes principal  $N_{unx}$ , donde  $N_{unx}$  es el número de componentes inesperados en la muestra.

El procedimiento de RBL consiste en mantener constante la matriz de “loadings”  $P$  en la ecuación (5) y variar  $t_u$ , con el objetivo de minimizar la norma de  $e_{RBL}$  ( $|e_{RBL}|$ ). En la ecuación (5) la desviación estándar ( $s_{RBL}$ ) de los residuos puede ser considerada como una medida de la bondad de ajuste y está dada por la ecuación (7).

$$s_{RBL} = \|e_{RBL}\| / [(J - N_{unx})(K - N_{unx}) - A]^{\frac{1}{2}} \quad (7)$$

Normalmente el número de componentes inesperados se fija de acuerdo al  $s_{RBL}$  obtenido para un número creciente de  $N_{unx}$ , asumiendo que el valor de

SRBL se estabiliza en un valor comparable con el ruido instrumental cuando el valor correcto de  $N_{unx}$  ha sido encontrado.

Si bien U-PLS/RBL permite predecir la concentración de los analitos en presencia de interferencias, algunas de éstas no son superables por esta vía y requieren ser eliminadas físicamente previo a la cuantificación. Un ejemplo de ello es el efecto de filtro interno que se puede observar debido a las interacciones con el entorno molecular del fluoróforo. Este efecto se produce cuando la emisión del analito presente en la muestra es absorbida por algún componente de la matriz. En el caso de los aceites vegetales, esta interferencia es producida fundamentalmente por los pigmentos como clorofila y feofitina (Alarcón y col., 2012). Ante tal situación es imperativo llevar a cabo un tratamiento previo de la muestra para eliminar o disminuir el efecto de filtro interno. Por otra parte, en el caso de los aceites comestibles, el nivel residual de HAPs que en ellos puede encontrarse requiere una etapa de pre-concentración. Sin embargo, el pre-tratamiento que se realice debe ser tan simple como sea posible, evitando el consumo excesivo de tiempo y reactivos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General:**

Evaluar la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en aceites de oliva extra virgen y girasol producidos y/o consumidos en Chile mediante espectroscopía de fluorescencia asociada a calibración multivariada de segundo orden.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- Realizar una etapa de calibrado con mezclas de los siete compuestos de interés preparados en solvente.
- Validar el modelo de calibración con muestras preparadas en la matriz de aceite obtenidas luego de aplicar el tratamiento de muestras inicialmente seleccionado (MAE-SPE) o con la inclusión de la precipitación de aceite co-extraído por disminución de temperatura.



- Evaluar la capacidad predictiva del modelo de calibración U-PLS/RBL utilizando muestras de aceite fortificadas con los siete compuestos desde el inicio del proceso.
- Evaluar la eficiencia de extracción alcanzada con el tratamiento de muestra propuesto mediante HPLC-FLD como método de referencia y realizar una comparación con los valores predichos por U-PLS/RBL.
- Establecer la presencia de los HAPs en muestras de aceite de oliva virgen comercial mediante fluorescencia total y U-PLS/RBL.
- Establecer la generación de HAPs en muestras de aceite que hayan sido calentadas en presencia de materia orgánica.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos y soluciones

- Hexano, diclorometano, acetonitrilo calidad HPLC.
- Estándares de benzo[a] antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, dibenzo[g,h,i]perileno e indenopireno.
- Helio extra puro.
- Nitrógeno extra puro.

Se trabajó con soluciones “stock” de 100 mg/L de cada compuesto en acetonitrilo, preparadas a partir de los estándares sólidos certificados de benzo[a] antraceno (BaA), benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), dibenzo[a,h]antraceno (DBahA) , dibenzo[g,h,i]perileno (BghiP) y indenopireno (IP).

### 4.2 Equipos condiciones de trabajo y softwares.

- Balanza granataria modelo Precisa 4000C.
- Balanza analítica modelo Precisa 40SM-200<sup>a</sup>.

- Estufa WTC Binder.
- Extracción asistida por microondas:

Para la extracción líquido-líquido asistida por microondas se utilizó equipo marca Milestone (Soriso, BG, Italy) equipado con una unidad de microondas de alta eficiencia modelo mls-1200 Mega, un módulo de escape de gases modelo EM-45/A, un monitor de control modelo Mega-240 y un soporte para 10 muestras.

- Espectroscopía de Fluorescencia:

Las medidas de fluorescencia clásica y total fueron realizadas en un espectrómetro de luminiscencia Varian Cary-Eclipse (Mulgrave, Australia) equipado con dos monocromadores Czerny-Turner y una lámpara de destello de xenón; conectado a un computador mediante una interface serial IEEE 488 (GPIB). Los espectros de excitación-emisión fueron registrados en los intervalos:  $\lambda_{ex}$ : 250-400 nm cada 5 nm y  $\lambda_{em}$ : 370-550 nm cada 2 nm, a una velocidad de barrido de 600 nm min<sup>-1</sup>. Se trabajó con una celda de cuarzo de 1,00 cm y los slit de excitación y emisión para las medidas de fluorescencia clásica y total se fijaron en 10 nm para recoger los datos. Los espectros fueron guardados en formato ASCII para su manipulación posterior.

Las rutinas para la dispersión de Rayleigh en las matrices de excitación-emisión (Zepp y col. 2004) y procesado de los datos fueron escritas en MATLAB (The MathWorks Inc 2000). La rutina empleada para U-PLS/RBL y el algoritmo implementado utilizando la interface gráfica MVC2, se encuentran disponibles en Internet. (<http://www.models.kvl.dk/algorithms> y <http://www.chemometry.com>, respectivamente)

- Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia (HPLC-FLD):

Para el análisis por cromatografía líquida con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) se utilizó un cromatógrafo líquido Waters (Milford, MA USA, una bomba cuaternaria Waters 600, un detector de fluorescencia Waters 2475 multi- $\lambda$ , un autosampler Waters 717 Plus.

La separación de los analitos fue realizada por una columna Interstil HPLC ODS-P marca GL Sciences (Tokyo, Japón) de 250 mm x 4,6 mm de diámetro interno, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. La temperatura de la columna para los análisis se mantuvo constante durante todo el programa a 35°C.

Los volúmenes de inyección para todas las muestras fue de 20  $\mu\text{L}$ , la fase móvil se mantuvo a flujo constante de 1,4  $\text{mL min}^{-1}$  la cual correspondía a una mezcla de acetonitrilo y agua nanopura filtrada, se trabajó con un gradiente de elución indicando las condiciones en la tabla 2:

**Tabla 2.** Programa optimizado de elución utilizado para el análisis por HPLC-FLD.

| <b>Tiempo (min)</b> | <b>Acetonitrilo (%)</b> | <b>Agua nanopura filtrada (%)</b> |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| <b>0-10</b>         | 80                      | 20                                |
| <b>10-15</b>        | 90                      | 10                                |
| <b>20-32</b>        | 100                     | 0                                 |
| <b>35-38</b>        | 80                      | 20                                |

Se trabajó con cuatro canales a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión, para observar los distintos HAPs: Canal A 220 y 330, canal B 292 y 410, canal C 292 y 426, canal D 300 y 500 respectivamente.

El software utilizado para los análisis fue Empower Pro con el cual se controlaron las condiciones de trabajo, visualizaron espectros, determinaron áreas entre otras. La identificación de cada uno de los compuestos se realizó según los tiempos de retención comparándolos con los obtenidos por trabajos anteriores.

### **4.3 Preparación de muestras**

#### **4.3.1 Extracción líquido-líquido asistida por microondas (MAE-SPE) y precipitación de aceite por disminución de temperatura.**

El método que se utilizó para la extracción liq-liq con asistida por microondas fue diseñado previamente en el laboratorio (Fuentes y col 2009). En un matraz erlenmeyer de 50 mL, se introdujo  $1 \pm 0,01$  g de aceite de oliva, se agregó 30 mL de acetonitrilo y se adaptó una columna refrigerante sobre la boca del matraz. Este se puso en el horno y se sometió a las microondas a 150 W por 19 minutos. Al terminar el proceso se dejaron enfriar los matraces a temperatura ambiente y se traspasó cuantitativamente lo que pudo haber quedado en los refrigerantes con 2 mL de acetonitrilo. Cada vez que se realizó la extracción se pusieron 8 matraces en el soporte de muestras, de manera que la energía de microondas siempre se distribuyera entre el mismo número de estas.

Posteriormente se traspasó la fase superior a un tubo falcon® de fondo cónico de 50 mL con pipeta pasteur. Los tubos fueron puestos en un congelador a -20°C durante 12 horas. Pasado este tiempo la fase no precipitada se llevó a un matraz de fondo redondo de 50 mL para su posterior evaporación hasta sequedad en un equipo de rotaevaporación, conectado al vacío y sumergido en

un baño termoregulado de 65° C. Las muestras fueron reconstituidas en 1 mL de n- hexano.

#### **4.3.2 Extracción en fase sólida (SPE)**

El extracto disuelto en n-hexano obtenido en la etapa anterior fue cargado en la columna. Para esto se utilizaron columnas Discovery® DSC-Si SPE, marca Supelco de 12 mL de volumen y 2 g de sílica. Estas fueron previamente ambientadas con 5 mL de diclorometano y luego 5 mL de n-hexano. Se lavó el matraz de fondo redondo con 2 mL de una mezcla de n-hexano (80%)-diclorometano (20%) para arrastrar el remanente de la muestra a la columna y se procedió a eluir la muestra con la misma mezcla sobre un vial ámbar de 22 mL hasta alcanzar los 15 mL.

El contenido de los viales se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno, bajo campana a 40°C. Al finalizar este proceso el residuo se reconstituyó en 2 mL de hexano y se obtuvo su espectro de fluorescencia. Para su análisis por HPLC-FLD se usó 1,5 mL de la muestra anterior, se evaporó a sequedad y se reconstituyó en 1 mL de 2-propano.

## 4.4 Muestras de calibrado

### 4.4.1 Conjunto de Muestras de Calibrado en Solvente

Se preparó un set de calibrado en n-hexano a partir de soluciones de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada HAP, siguiendo un diseño experimental de compuesto central fraccionado, con mezclas de los 7 compuestos de interés: benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, dibenzo[g,h,i]perileno y indenopireno. Las concentraciones consideradas para: BaA, BbF, BaP, DBahA variaban entre 0 y 4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , BkF entre 0 y 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , BghiP entre 0 y 8  $\mu\text{g L}^{-1}$  y para IP entre 0 y 6  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para la creación del diseño se elaboraron 25 muestras de las cuales 2 eran centros y 1 un blanco. La Tabla 3 resume las concentraciones para las 25 muestras donde desde la muestra 1 a la 8 representan la parte factorial fraccionada del diseño, de la 9 a 22 la parte axial, 23 y 24 corresponden al centro y 25 al blanco. Se obtuvieron sus espectros de fluorescencia total y se procedió con los datos de acuerdo a lo antes señalado.



**Tabla 3.** Concentraciones de los HAPs en las muestras de calibrado en solvente.

| Concentraciones de los compuestos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |     |     |      |     |       |       |     |
|--|-----|-----|------|-----|-------|-------|-----|
| Muestras   | BaA | BbF | BkF  | BaP | DBahA | BghiP | IP  |
| 1  | 1   | 1   | 0,25 | 3   | 3     | 6     | 1,5 |
| 2  | 3   | 1   | 0,25 | 1   | 1     | 6     | 4,5 |
| 3  | 1   | 3   | 0,25 | 1   | 3     | 2     | 4,5 |
| 4  | 3   | 3   | 0,25 | 3   | 1     | 2     | 1,5 |
| 5  | 1   | 1   | 0,75 | 3   | 1     | 2     | 4,5 |
| 6  | 3   | 1   | 0,75 | 1   | 3     | 2     | 1,5 |
| 7  | 1   | 3   | 0,75 | 1   | 1     | 6     | 1,5 |
| 8  | 3   | 3   | 0,75 | 3   | 3     | 6     | 4,5 |
| 9  | 0   | 2   | 0,5  | 2   | 2     | 4     | 3   |
| 10   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 2     | 4     | 3   |
| 11   | 2   | 0   | 0,5  | 2   | 2     | 4     | 3   |
| 12   | 2   | 4   | 0,5  | 2   | 2     | 4     | 3   |
| 13   | 2   | 2   | 0    | 2   | 2     | 4     | 3   |
| 14   | 2   | 2   | 1    | 2   | 2     | 4     | 3   |
| 15   | 2   | 2   | 0,5  | 0   | 2     | 4     | 3   |
| 16   | 2   | 2   | 0,5  | 4   | 2     | 4     | 3   |
| 17   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 0     | 4     | 3   |
| 18   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 4     | 4     | 3   |
| 19   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 2     | 0     | 3   |
| 20   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 2     | 8     | 3   |
| 21   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 2     | 4     | 3   |
| 22   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 2     | 4     | 3   |
| 23   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 2     | 4     | 0   |
| 24   | 2   | 2   | 0,5  | 2   | 2     | 4     | 6   |
| 25   | 0   | 0   | 0    | 0   | 0     | 0     | 0   |

#### 4.4.2 Conjunto de Muestras de Validación en solvente

Para evaluar la capacidad predictiva del modelo de calibración, se preparó un set de 10 muestras que contenían mezclas de HAPs en n-hexano (Tabla 4), a concentraciones distintas a las empleadas en el set de calibración y seleccionadas en forma aleatoria. Para su preparación se procedió de igual forma que en el set de calibrado.

**Tabla 4.** Concentraciones de los HAPs en el set de muestras de validación en solvente, en matriz y set de prueba.

| Muestra | Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$ |      |      |       |      |       |     |
|---------|------------------------------------|------|------|-------|------|-------|-----|
|         | BaA                                | BbF  | BaP  | DBahA | BkF  | BghiP | IP  |
| 1       | 0,7                                | 0,53 | 2,5  | 0,62  | 0,2  | 5,6   | 2,6 |
| 2       | 1,8                                | 1,9  | 2,6  | 0,43  | 0,53 | 3,5   | 2,4 |
| 3       | 1,1                                | 0,85 | 0,81 | 0,5   | 0,1  | 2,1   | 4   |
| 4       | 2,2                                | 1,6  | 0,63 | 1,9   | 0,5  | 2,7   | 3,1 |
| 5       | 1,5                                | 2,1  | 1,7  | 1,7   | 0,53 | 5,2   | 2,5 |
| 6       | 0,58                               | 1,5  | 1,9  | 1     | 0,58 | 2,9   | 4,5 |
| 7       | 0,37                               | 2,6  | 1,3  | 2,8   | 0,31 | 5,1   | 2,9 |
| 8       | 0,62                               | 1,3  | 0,62 | 2,2   | 0,79 | 4,3   | 4,2 |
| 9       | 2,4                                | 0,67 | 2,8  | 2,2   | 0,62 | 3,3   | 3,7 |
| 10      | 0,87                               | 1,5  | 0,35 | 0,89  | 0,46 | 3,8   | 1,7 |

#### **4.4.3 Conjunto de Muestras de Validación en matriz.**

En la búsqueda de validar el modelo de calibración desarrollado, se preparó un grupo de mezclas de HAPs esta validación en presencia de matriz se realizó dos veces en distintos períodos de tiempo, en una primera oportunidad el tratamiento de muestra incluyó las etapas de MAE-SPE y en la segunda, a las anteriores dos etapas se le incorporó el paso intermedio de precipitación de aceite por disminución de temperatura. Las concentraciones y el número de muestras fueron las mismas del set anterior en solvente.

#### **4.4.4 Conjunto de prueba**

Con el propósito de evaluar la aplicabilidad del método investigado en términos de recuperación y capacidad predictiva, se preparó un conjunto de muestras de aceites fortificadas al comienzo del proceso con mezclas de HAPs a las mismas concentraciones de los set anteriores.

Se prepararon dos set de 10 muestras cada uno con las concentraciones anteriormente expresadas en la tabla 3, en iguales condiciones (tratamiento de muestra, número de muestras, etc.). Estos sets fueron preparados en distintos períodos de tiempo. Ambos sets no solo se cuantificaron mediante fluorescencia por U-PLS/RBL para la determinación de sus concentraciones sino también por HPLC-FLD. En el caso del segundo set, este se analizó por

HPLC-FLD después de dos meses desde su preparación, lo que permitió evaluar la estabilidad de las muestras en el tiempo.

#### **4.4.5 Análisis de muestras reales**

Para realizar el análisis de HAPs en muestras reales, se compraron diversas marcas de aceites de oliva disponibles en el mercado. Este estudio se realizó en dos bloques, primero con un stock de aceites comprados en noviembre del 2013, analizadas en ese período de tiempo, en el cual todos los aceites eran vírgenes y un segundo con aceites comprados en mayo del 2014 en donde además se incluyó un aceite de oliva común (mezcla de refinado y virgen). En la Tabla 5 se detallan los aceites utilizados.

**Tabla 5.** Aceites utilizados, origen y fecha de elaboración.

| <b>Nombre</b>           | <b>Origen</b>             | <b>Fecha de elaboración</b> |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <b>Banquete</b>         | Talca, Chile              | 15-10-2013                  |
| <b>Basso</b>            | Italia                    | 28-11-2012                  |
| <b>Carbonell</b>        | Madrid, España            | 30-06-2012                  |
| <b>Kardamili</b>        | Chile                     | 14-08-2013                  |
| <b>Montecristo</b>      | Melipilla, Chile          | 22-07-2013                  |
| <b>Nova Oliva</b>       | Valle de Colchagua, Chile | 23-04-2012                  |
| <b>Santiago Premium</b> | Valle de Colchagua, Chile | 10-06-2013                  |
| <b>Sol de Aculeo</b>    | Valle de Aculeo, Chile    | 24-09-2013                  |
| <b>Sol Limarí</b>       | Valle Limarí, Chile       | 06-20-2012                  |
| <b>Terramater Casta</b> | Curicó, Chile             | 08-08-2013                  |
| <b>Terrasanta</b>       | Curacaví, Chile           | 12-09-2013                  |
| <b>Basso*</b>           | Italia                    | 06-08-2012                  |
| <b>Borges*</b>          | España                    | 17-02-2014                  |
| <b>Carbonell*</b>       | Madrid, España            | 30-07-2013                  |
| <b>Chef* (Común)</b>    | Chile                     | 11-04-2014                  |

\*Aceites correspondientes al segundo stock, analizadas en mayo del 2014.

#### **4.5 Generación de HAPs en muestras calentadas en presencia de materia orgánica.**

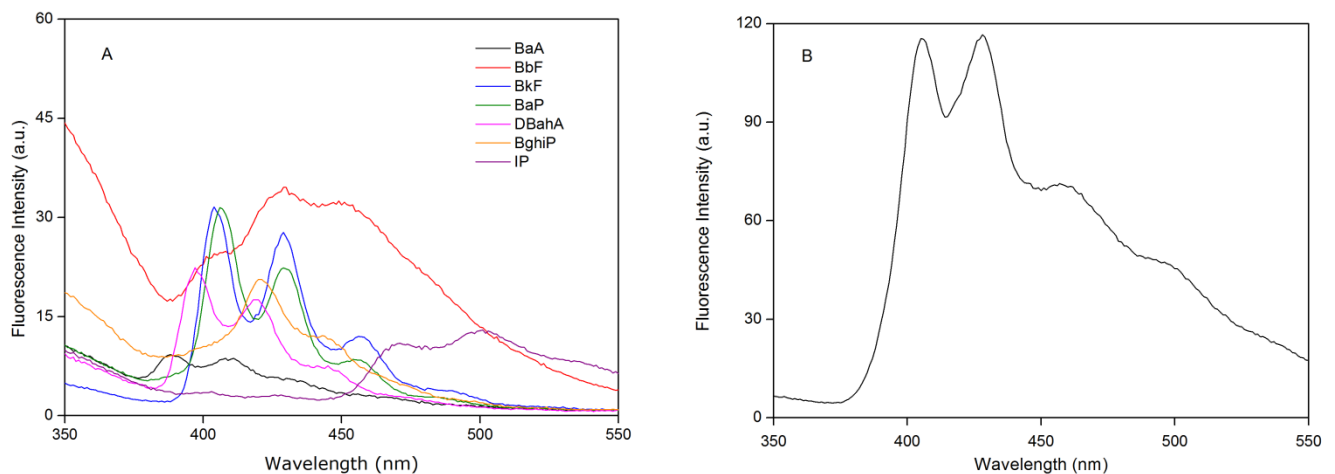
Se aplicó el método para evaluar la modificación del perfil de concentraciones de dos HAPs modelo (BaA e IP que presentaron las mejores predicciones en el estudio) en aceite de oliva al ser calentado en presencia de materia orgánica. Se trabajó con dos tipos de aceites uno de maravilla (Aceite Chef) y otro de oliva (Sol de acúleo), en presencia de materia orgánica.

En dos vasos precipitados se agregaron 20 g de aceite de oliva virgen y en otros dos 20 g de aceite de maravilla. Dos de las muestras, una del aceite de oliva y otra del de maravilla, fueron fortificadas con HAPs (BaP 5 mg g<sup>-1</sup> y IP 10 mg g<sup>-1</sup>) y las otras dos muestras no fueron alteradas. En todos los casos se añadió como materia orgánica un pedazo de papa (15 g promedio). Para evaluar el perfil de concentraciones en el tiempo, las muestras fueron calentadas en una estufa a 100°C y se recolectaron 2 mL de cada vaso en viales ámbar a las 0 (previo a que las muestras se introdujeran en la estufa), 2, 4, 6, 8, 10 y 24 hrs. A continuación se procedió al tratamiento habitual para las muestras incluyendo MAE, la etapa de congelamiento y SPE. La determinación de las concentraciones se realizó mediante U-PLS/RBL.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Espectros de excitación y emisión de los HAPs estudiados

En la Figura 6A se observan los espectros de emisión fluorescente para cada uno de los HAPs en estudio realizados por separado en n-hexano. Los diferentes compuestos presentan espectros característicos, en los casos de BaP, DBahA y BkF se pueden apreciar ciertas semejanzas no obstante, todos los HAPs señalados poseen espectros de emisión distintos lo que permite analizarlos por calibración multivariada.



**Figura 6**

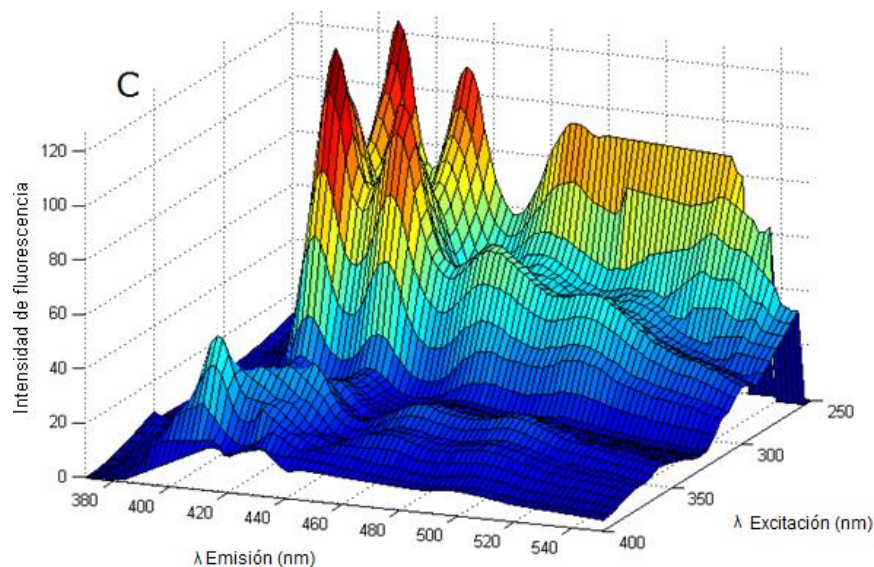
**6A** Espectros de emisión de soluciones de cada patrón de HAPs en n-hexano. Concentraciones BkF:  $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ , BaP, DBahA, BbF, BaA, BghiP, e IP:  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . **6B** Espectro emisión de BaA, BbF, BaP y DBahA:  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , BkF:  $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$  BghiP y IP  $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $\lambda_{\text{exc}}$ : 290 nm en n-hexano.

Para la preparación de muestras y patrones, las concentraciones consideradas en el caso del BkF, se mantuvieron siempre menores en comparación con el resto de los HAPs como se puede observar en la ilustración

de la figura ya que, presenta mayores intensidades de fluorescencia lo que podría interferir con las demás señales de los analitos.

Para una mezcla de los 7 patrones de HAPs en n-hexano el perfil de emisión es el señalado en la Figura 6B, se pueden observar un solapamiento espectral y cuatro máximos de emisión para los 403, 426, 455 y 500 nm.

Para los múltiples estudios que se desarrollaron se obtuvieron espectros de excitación-emisión generando una matriz como respuesta. En la Figura 6C aparece una muestra correspondiente al calibrado que contiene una mezcla de los 7 HAPs en n-hexano como solvente, se aprecia el solapamiento espectral por lo cual el poder determinar simultáneamente los distintos compuestos plantea un gran desafío.



**Figura 6C** Espectro excitación emisión de una muestra del calibrado con concentraciones de 1 ng L<sup>-1</sup> BaA, BbF, DBahA, 0,75 ng L<sup>-1</sup> BkF, 3,0 ng L<sup>-1</sup> BaP 2 ng L<sup>-1</sup> IP 4,5 ng L<sup>-1</sup>.  $\lambda_{ex}$ : 250-400 nm,  $\lambda_{em}$ : 370-550 nm preparado en n-hexano.



## 5.2 Calibrado en solvente

La resolución de mezclas mediante calibración multivariada incluye tres etapas. La primera de ellas es de calibración propiamente tal, en donde el conjunto de calibración empleado debe estar compuesto por mezclas de los analitos en concentraciones tales que engloben las posibles de encontrar en muestras futuras. Una segunda etapa es la validación, en donde se chequea el modelo mediante un grupo de muestras con concentraciones de analito que no se hayan incluido en la calibración. La validación puede tener etapas de complejidad creciente al considerar un set que incluya compuestos no modelados en la calibración (interferentes) y/o preparado en presencia de una matriz problema que igualmente representa compuestos no modelados. Finalmente, hay una etapa de predicción en donde se analizan muestras de concentración desconocida.

Entre los HAPs existe un importante solapamiento espectral en sus espectros de absorción y emisión. Por ello, la determinación de cada uno de ellos mediante espectroscopía de fluorescencia en mezclas complejas requiere asociar esta técnica espectroscópica con herramientas de análisis multivariado que ayuden a resolver esta situación. En este trabajo se utilizaron datos de tres vías (o también denominados de segundo orden), correspondientes a matrices de excitación-emisión, asociadas a calibración multivariada de segundo orden, aplicando como algoritmo U-PLS/RBL. Este algoritmo se seleccionó debido a

que demostró ser el más satisfactorio en cuanto a la determinación de HAPs en muestras de aceite (Alarcón y col., 2013).

La selección del intervalo espectral óptimo y el número óptimo de factores fue realizado utilizando el método de validación cruzada descrito por Haaland y Thomas (1998), sobre el set de calibrado. El número óptimo de factores fue estimado calculando la razón:

$$F(A) = \text{PRESS}(A < A^*) / \text{PRESS } A^* \quad (8)$$

Donde PRESS es la suma de errores cuadrados de predicción, definido como:

$$\text{PRESS} = \Sigma(\text{ynominal} - \text{ypredicho})^2 \quad (9)$$

A es el número de factores prueba y A\* corresponde al número de factor para el cual el valor de PRESS es mínimo. El número óptimo de factores será el primer valor para el cual la probabilidad asociada sea menor al 75% y F sea menor que 1. En esta etapa del calibrado, la bilinearización residual (RBL) no es requerida puesto que las muestras no incluyen componentes inesperados.

La Tabla 6 muestra el número de factores óptimos encontrados y el intervalo espectral seleccionado para cada analito. Además se incluyen aquellas muestras del calibrado que se excluyeron (outliers) debido a que no fueron correctamente modeladas por diferencias espectrales con el resto.

**Tabla 6.** Número de componentes óptimos (CP), intervalos de excitación-emisión, muestras eliminadas y errores en la validación cruzada y auto-predicción para el set de calibrado mediante U-PLS.

|              | <b>Excitación</b> | <b>Emisión</b> | <b>Outliers</b> | <b>N°CP</b> | <b>RMSEcv</b> | <b>REPCv(%)</b> | <b>RMSEc</b> | <b>REPC(%)</b> |
|--------------|-------------------|----------------|-----------------|-------------|---------------|-----------------|--------------|----------------|
| <b>BaA</b>   | 260-325           | 374-444        | 8, 20           | 6           | 0,16          | 9,0             | 0,11         | 5,9            |
| <b>BbF</b>   | 270-330           | 388-400        | 8, 20           | 7           | 0,28          | 15              | 0,10         | 5,6            |
| <b>BkF</b>   | 260-320           | 390-440        | 6, 8, 20        | 4           | 0,05          | 12              | 0,04         | 7,8            |
| <b>BaP</b>   | 280-320           | 380-442        | 8, 20           | 6           | 0,19          | 10              | 0,12         | 6,4            |
| <b>DBahA</b> | 260-340           | 380-460        | 8, 20           | 6           | 0,32          | 17              | 0,20         | 11             |
| <b>BghiP</b> | 255-330           | 380-490        | 8, 20           | 8           | 0,52          | 15              | 0,26         | 7,3            |
| <b>IP</b>    | 325-380           | 450-520        | 9               | 5           | 0,25          | 8,6             | 0,14         | 4,8            |

RMSEcv: Raíz cuadrada del error cuadrático medio de la validación cruzada.

RMSEc: Raíz cuadrada del error cuadrático medio de la autopredicción.

REPCv: Error relativo de predicción de la validación cruzada.

REPC: Error relativo de la autopredicción.

Para la determinación de los intervalos de excitación y emisión se buscó aquellos que permitían obtener los menores valores de REPC para cada analito en forma independiente. Los valores obtenidos para RMSEcv y RMSEc, son bajos por lo que la predicción en esas condiciones (intervalos de excitación emisión, N°CP y outliers) es buena y el modelo de calibrado puede ser utilizado para los posteriores análisis.

### 5.3 Validación conjunto preparado en solvente

Una vez realizada la etapa de calibración, se procedió a observar el comportamiento de predicción del modelo con un set de validación preparado en solvente, mencionado en 4.4.2. Se utilizaron los datos obtenidos en el punto anterior (Tabla 6) de intervalos, número de componentes óptimos y outliers obtenidos para la predicción de las concentraciones de cada HAP mediante U-PLS.

Para evaluar la capacidad de predicción del modelo construido, se analizaron 2 parámetros estadísticos que se señalan en la Tabla 5, la raíz de los cuadrados medios del error de predicción (RMSEP):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred} - y_{obs})^2}{n}} \quad (10)$$

Y el error relativo de predicción (REP), que es el valor anterior expresado como porcentaje respecto del valor promedio del set de calibrado:

$$REP(\%) = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred} - y_{obs})^2}{n}} \quad (11)$$

Menores valores para REP y RMSEP indican que existe una mejor predicción de los compuestos. La Tabla 7 resume los resultados obtenidos para el set de validación en solvente.

**Tabla 7.** RMSEP y REP obtenidos para la validación con set preparado en solvente para cada compuesto.

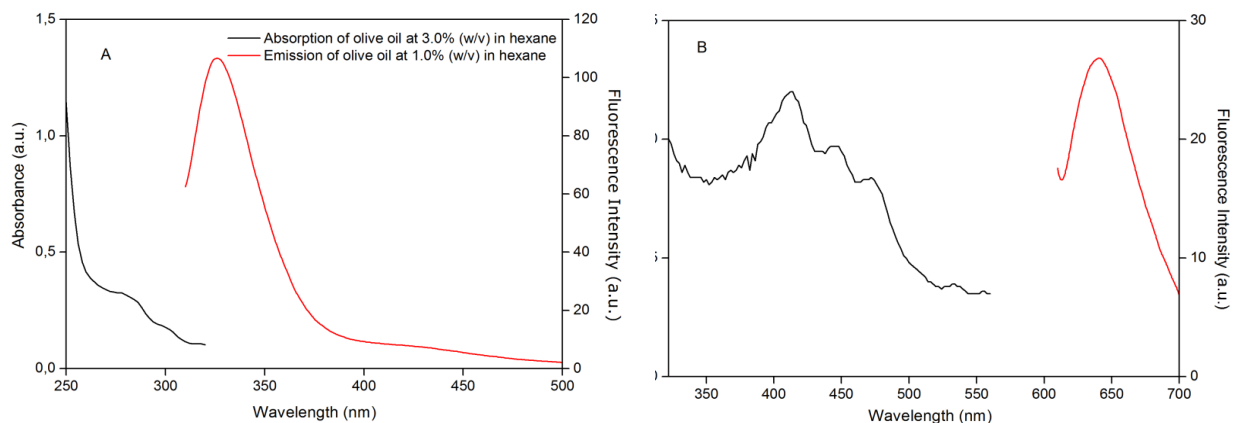
| <b>Compuesto</b> | <b>RMSEP (ng mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>REP(%)</b> |
|------------------|-----------------------------------|---------------|
| <b>BaA</b>       | 0,10                              | 5,5           |
| <b>BbF</b>       | 0,14                              | 7,3           |
| <b>BkF</b>       | 0,03                              | 5,8           |
| <b>BaP</b>       | 0,09                              | 4,8           |
| <b>DBahA</b>     | 0,18                              | 10            |
| <b>BghiP</b>     | 0,88                              | 25            |
| <b>IP</b>        | 0,22                              | 7,7           |

Los valores de RMSEP para BaA, BbF, BkF, BaP, DBahA e IP varían desde 0,03 hasta 0,22 ng mL<sup>-1</sup> demostrando valores bajos asociados al error de predicción de los cuadrados medios. De igual manera los valores de estos mismos analitos para REP son menores al 11% (REP < 11%), evidenciando que las diferencias entre los valores predicho y los obtenidos por la predicción son bajos, por lo que la calibración realizada en el paso anterior y los parámetros seleccionados para el análisis mediante U-PLS para la predicción de los valores de las muestras en n-hexano como solvente son satisfactorios.

Los valores de RMSEP y REP para el compuesto BghiP no fueron tan satisfactorios como en el caso de los demás HAPs y se estimó que los altos valores obtenidos se debían a un posible error sistemático y/o que es el compuesto que presenta un mayor solapamiento con el resto de los analitos.

## 5.4 Extracción de los HAPs desde aceite de oliva y limpieza de los extractos

Los espectros de absorción y emisión característicos del aceite de oliva (AO) se muestran en la Figura 7, en donde aparece una señal de absorción entre 250-310 nm y de emisión entre 310 y 370 nm que corresponden a la presencia de tocoferoles y otras dos señales de absorción 380-510 nm y de emisión sobre los 600 nm asociada a la presencia de pigmentos (clorofilas y feofitinas). (Sikorska y col., 2008) Dentro de los aceites vegetales, el aceite de oliva contiene una de las más altas cantidades de pigmentos. El contenido total de pigmentos en estos aceites se encuentra en el rango de 10 a 30 mg kg<sup>-1</sup> con una composición de 55% de feofitinas, 28% luteínas, 8%  $\beta$ -caroteno y 5% clorofila (Cerretani y col., 2008).

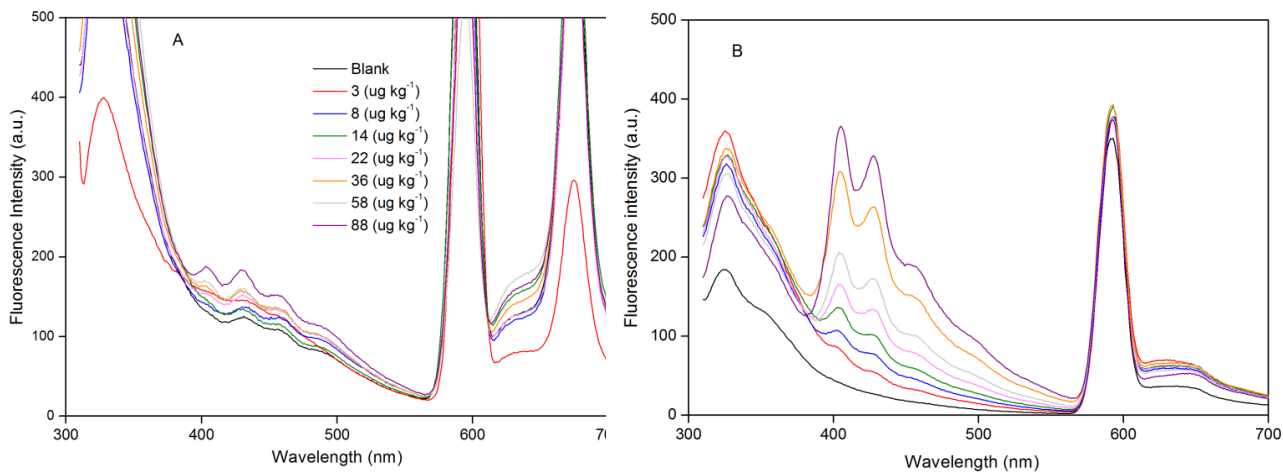


**Figura 7.**

**7A y 7B.** Espectros de absorción y emisión ( $\lambda_{exc}$ : 290 nm) para un aceite de oliva extra-virgen.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó que algunos pigmentos presentes en los aceites de oliva como las feofitinas y clorofilas generan un efecto de filtro interno sobre la fluorescencia de los HAPs, lo que dificulta su determinación en el aceite de oliva (Alarcón y col., 2012). Tanto la clorofila como la feofitina, como se observa en la Figura 7B tienen una banda de absorción entre 360 y 450 nm que se solapa con el espectro de emisión característico de los 7 HAPs (380- 550 nm). El filtro interno se genera debido a que los pigmentos absorben una parte de la energía de excitación de los HAPs (efecto filtro interno primario) o de la fluorescencia emitida por estos compuestos (filtro interno secundario), con lo cual disminuye la intensidad de emisión de los analitos, a la vez que no se logra la proporcionalidad requerida para el análisis de cada uno de ellos. Esto conlleva a la necesidad de realizar un tratamiento previo de las muestras de aceites para eliminar estos interferentes. En la Figura 8, se muestran los espectros de emisión de una mezcla de 7 PAHs (concentración total: 3,0; 8,0; 14; 22; 36; 58 y 88  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en presencia de un extracto de aceite de oliva virgen obtenido por MAE y MAE-SPE sobre sílica (Alarcón y col., 2012); lo cual demuestra que el proceso de limpieza por SEP aplicada al extracto obtenido con MAE permite eliminar los interferentes y obtener señales de fluorescencia proporcionales a las concentraciones de los analitos. Cabe señalar que este calibrado de HAPs

totales en presencia de matriz fue utilizado para hacer un “screening” de muestras que tienen o no presencia de HAPs.



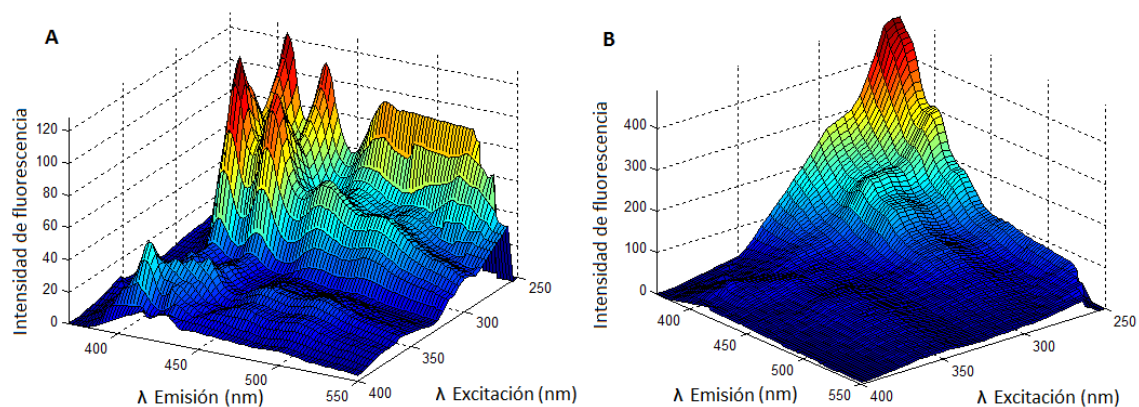
**Figura 8.**

**8A** Espectro de emisión de los 7 HAPs en presencia de aceite de oliva, tratados con MAE. **8B** Espectro de emisión de los 7 HAPs en presencia de aceite de oliva, tratados con MAE y SPE sobre sílica.

### 5.5 Validación conjunto preparado en matriz.

Se procedió a preparar un set de validación en presencia de la matriz obtenida luego de aplicar el tratamiento de muestras MAE-SPE. En la Figura 9, se muestra las EEMs para una muestra del calibrado y para una muestra del set de validación preparada en matriz.





**Figura 9.** Espectros de excitación ( $\lambda_{ex}$ : 250-400 nm) emisión ( $\lambda_{em}$ : 370-550 nm) obtenidos para: **9A** La muestra 5 del calibrado; **9B** La muestra 1 del set de validación preparado en matriz.

Ello permitió validar el modelo de calibración mediante muestras con la presencia de compuestos no modelados inicialmente, procedentes del aceite de oliva virgen. Se determinaron las concentraciones de los distintos HAPs y se compararon los valores predichos con los reales. La Tabla 8 resume los resultados obtenidos para esta etapa.

**Tabla 8.** Parámetros de calidad analítica obtenidos para el set de validación en la matriz de aceite obtenida por MAE-SPE.

|              | <b>Residuos calibrado<sup>a</sup></b> | <b>LOD (ng mL<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b> | <b>RMSEP (ng mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>REP (%)</b> | <b>Correlación (y<sub>real</sub> v/s y<sub>predicho</sub>)</b> | <b>R<sup>2</sup></b> |
|--------------|---------------------------------------|---|-----------------------------------|----------------|--|----------------------|
| <b>BaA</b>   | 0,91                                  | 0,49  | 1,43                              | 118            | y = 1,670x + 0,039   | 0,884                |
| <b>BbF</b>   | 0,27                                  | 2,5   | 1,48                              | 102            | y = -0,199x + 1,733  | 0,135                |
| <b>BkF</b>   | 2,5                                   | 0,07  | 0,15                              | 32             | y = 0,658x + 0,109   | 0,639                |
| <b>BaP</b>   | 0,66                                  | 0,39  | 1,12                              | 74             | y = 1,196x + 0,065   | 0,883                |
| <b>DBahA</b> | 0,82                                  | 0,37  | 1,11                              | 78             | y=0,110x + 1,467   | 0,02                 |
| <b>BghiP</b> | 0,58                                  | 0,77  | 0,98                              | 25             | y = 0,748x + 0,454   | 0,732                |
| <b>Ip</b>    | 0,23                                  | 0,74  | 0,38                              | 12             | y = 1,060x - 0,290   | 0,903                |

<sup>a</sup> Indica el valor asociado al residuo espectral no explicado por el modelo de calibrado. El residuo luego del proceso RBL no debe ser menor que este valor.

<sup>b</sup> Obtenido como el promedio de las 10 muestras de validación del set.

Al analizar para los distintos parámetros analíticos en este set, se puede observar que los resultados no son satisfactorios para la mayoría de los compuestos. Si vemos los valores de SEP para BaA, BbF, BaP y DBahA, estos son mayores al 70% y están muy por encima de los mismos obtenidos en la validación en solvente; indicando que existe un alto error de predicción. En el caso de REP (%) BaA y BbF arrojan valores incluso mayores al 100%.

Al analizar la correlación de las concentraciones reales v/s predichas (Tabla 8), se espera que el término de la pendiente sea un valor cercano a 1, indicando una buena relación entre los datos y que el intercepto sea 0. La

obtención de valores muy distintos a estos es un indicio de predicciones sobre o subestimadas respecto de los valores reales, como es el caso presente.

El último parámetro que se encuentra en la tabla es el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Para BbF y DBahA los valores son muy cercanos a 0, es decir no se aprecia una relación lineal entre la variable dependiente ( $y_{\text{predicho}}$ ) e independiente ( $y_{\text{real}}$ ). En los casos donde aún para un REP sobre el 70% se observa un  $R^2$  cercano al 0,8, ello sólo indica un error sistemático constante por exceso o defecto.

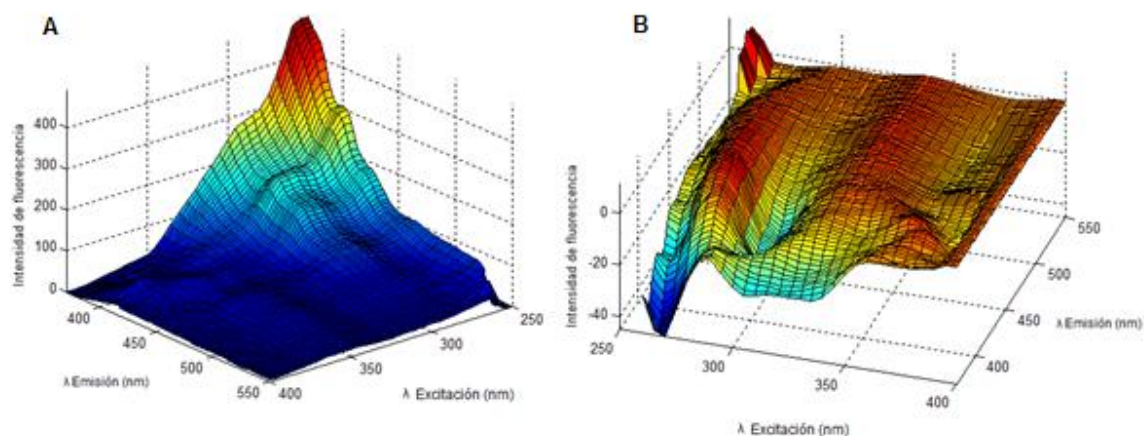
Se destaca el caso del IP en donde es visible que existe una buena predicción del modelo para este analito, incluso siendo los resultados cercanos a los señalados en la Tabla 6 cuando se realizó el set en solvente. La buena predicción es debido a que en la zona de emisión-excitación del IP no hay un solapamiento espectral tan marcado, producto a que los interferentes y los demás HAPs presentan otras  $\lambda_{\text{exc}}$ ,  $\lambda_{\text{em}}$ .

Como respuesta a los malos resultados obtenidos en general se hicieron dos modificaciones; una para el tratamiento de muestra al incluir la etapa de precipitación del aceite co-extraído por disminución de temperatura, previo al SPE y el trabajar con las EEMs derivadas.

## **5.6 Modificaciones sobre los EEMs y tratamiento de las muestras en el set de validación.**

### **5.6.1 Uso de EEMs derivados.**

Con el objetivo de incrementar la selectividad y así mejorar la capacidad predictiva, tanto los EEMs del set de validación preparado en matriz (punto 5.5), así como los del set de calibrado fueron derivados y usados para predecir las concentraciones de los HAPs. Para ello, las EEMs (91 filas para  $\lambda$  emisión y 31 columnas para  $\lambda$  excitación) fueron derivadas en el sentido de las filas; mediante el método de Savinsky-Golay (Savinsky y col., (1964)), con una ventana espectral de 5 puntos, aplicando un polinomio de segundo orden y considerando la primera derivada. La figura 10 corresponde a la EEMs antes y después de su derivación respectivamente para una muestra del set de validación (Test 1). Los resultados de la predicción del set de validación derivado se resumen en la Tabla 9.



**Figura 10.**

**10A** Espectros de excitación emisión para una muestra del set de validación (test1), obtenida por MAE-SPE. **10B** Espectro excitación emisión derivado para la misma muestra de 9A.

**Tabla 9.** Parámetros de calidad analítica obtenidos para el set de validación en la matriz de aceite obtenida por MAE-SPE utilizando los EEMs derivados.

|              | Residuos calibrado <sup>a</sup> | LOD (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> | RMSEP (ng mL <sup>-1</sup> ) | REP (%) | Correlación (y <sub>real</sub> v/s y <sub>predicho</sub> ) | R <sup>2</sup> |
|--------------|---------------------------------|---|------------------------------|---------|--|----------------|
| <b>BaA</b>   | 0,64                            | 0,63                                    | 0,59                         | 46      | y = 1,152x + 0,364   | 0,912          |
| <b>BbF</b>   | 0,08                            | 0,2                                     | 0,38                         | 26      | y = 1,150x - 0,245   | 0,791          |
| <b>BkF</b>   | 0,85                            | 0,59                                    | 0,13                         | 25      | y = 0,962x + 0,111   | 0,782          |
| <b>BaP</b>   | 0,52                            | 1,2                                     | 0,46                         | 19      | y = 1,122x - 0,007   | 0,986          |
| <b>DBahA</b> | 0,34                            | 0,69                                    | 0,39                         | 26      | y = 0,891x + 0,057   | 0,767          |
| <b>BghiP</b> | 0,34                            | 0,6                                     | 0,57                         | 20      | y = 1,127x - 0,918   | 0,899          |
| <b>IP</b>    | 0,07                            | 0,67                                    | 0,35                         | 12      | y = 0,889x + 0,366   | 0,828          |

<sup>a</sup> Indica el valor asociado al residuo espectral no explicado por el modelo de calibrado. El residuo luego del proceso RBL no debe ser menor que este valor.

<sup>b</sup> Obtenido como el promedio de las 10 muestras de validación del set.

Tal como se observa en la tabla 9, al aplicar la derivación de los EEMs por el método de Savinsky-Golay, el cual actúa como un filtro suavizando las fluctuaciones de ruido, preservando las características de la distribución inicial tales como los máximos y mínimos relativos; se obtuvieron mejores resultados en las predicciones en relación a los EEMs no derivados.

Los residuos del calibrado realizado en solvente, están vinculados con la parte no modelada asociada a ruido instrumental y/o de los EEMs por la presencia de múltiples analitos en las muestras. La disminución en estos valores al usar los espectros derivados, particularmente en el caso de BkF, se puede asociar a la eliminación del ruido que este proceso conlleva. Esto significa que las señales que no explica el modelo son menores.

RMSEP y REP para todos los HAPs presentó una disminución de su valor, el caso más notorio fue para el BbF donde su valor para los EEMs sin derivar fue de  $1,48 \text{ ng ml}^{-1}$  y 101,93% y al derivarlo fue de  $0,38 \text{ ng ml}^{-1}$  26% para RMSPE y REP respectivamente, presentando diferencias significativas. Otro de los HAPs en que ocurrió algo similar fue para el BaA que de  $1,43 \text{ ng ml}^{-1}$  pasó a  $0,59 \text{ ng ml}^{-1}$  para RMSEP y de 117,82 a 46% para REP. Para otros compuestos como IP y BkF la diferencia de los valores entre los EEMs no derivados y derivados fueron los que presentaron menores diferencias. Ambos, anterior a la derivación ya presentaban una buena predicción tanto para RMSEP y REP.

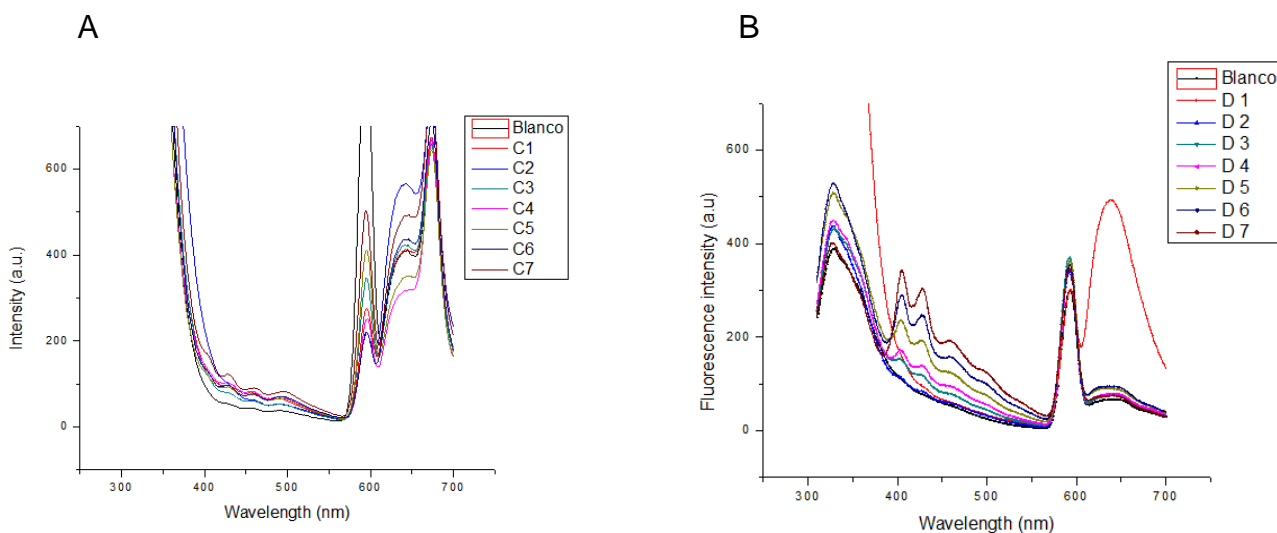
La relación lineal entre la variable dependiente ( $y_{\text{predicho}}$ ) e independiente ( $y_{\text{real}}$ ) mejoró para todos los casos excepto para IP en que se notó una pequeña diferencia en  $R^2$  con los datos anteriores. Los términos de la regresión lineal también mejoraron tanto para la pendiente como el intercepto.

Es notable que, bajos los parámetros estadísticos mencionados anteriormente la predicción al derivar los datos fueran satisfactorio para todos los compuestos en menores o mayores grados. Aquellos que presentaron las más altas mejorías en su predicción fueron el BaA, BbF, BaP y DBahA.

### **5.6.2 Precipitación de aceite co-extraído (triglicéridos) por disminución de la temperatura.**

Buscando bajar la carga de algunos de los interferentes procedentes del aceite que perjudican el análisis y así obtener mejores resultados en la predicción, se procedió a realizar un nuevo paso para el tratamiento de muestra (detallado en 4.3.1). De esta forma se buscaba precipitar parte de los interferentes antes de la extracción en fase sólida para que esta fuese más eficiente al eliminar pigmentos sin llegar a saturarse. Para evaluar si la precipitación en frío podía eliminar, junto con el aceite co-extraído en el MAE, los pigmentos interferentes; se prepararon 2 *set* de calibrado de 7 muestras cada una más un blanco, con concentraciones totales crecientes de HAPs (0; 1,45; 3,63; 7,25; 10,88; 29,00 y 43,50 ng ml<sup>-1</sup>). Un *set* se preparó en presencia

de matriz tratada por MAE-precipitación y el otro en la obtenida luego de MAE-precipitación-SPE. El primer grupo no mostró proporcionalidad entre la concentración total de los HAPs y la intensidad de fluorescencia; mientras que en el segundo grupo esto sí ocurrió como se manifiesta en la Figura 11. Esto demostró que si bien la precipitación baja la carga de aceite, ésta no elimina los pigmentos que generan el filtro interno.



**Figura 11.**

**11A** Espectros de fluorescencia clásica, concentraciones 0; 1,45; 3,63; 7,25; 10,88; 29,00 y 43,50  $\text{ng mL}^{-1}$  muestras tratadas por MAE-precipitación. **11B** Espectros de fluorescencia clásica, concentraciones 0; 1,45; 3,63; 7,25; 10,88; 29,00 y 43,50  $\text{ng mL}^{-1}$  muestras tratadas por MAE-Precipitación-SPE.

Por otra parte, se compararon las masas de aceite co-extraídas (Tabla 10) para ambos set, en donde se aprecia que en promedio se co-extrae menos aceite al incluir la etapa de precipitación junto a SPE. Sin embargo, el parámetro de las masas co-extraídas presentan mayor dispersión, lo que se asocia a una irreproducibilidad del proceso de limpieza con SPE.



**Tabla 10.** Masa de aceite co-extraídas para las muestras tratadas mediante MAE-precipitación y MAE-precipitación-SPE.

| <b>Masa de aceite co-extraído por tratamiento (g)</b> |                           |                                |
|---|---------------------------|--------------------------------|
| <b>Muestra</b>  | <b>MAE- Precipitación</b> | <b>MAE -Precipitación- SPE</b> |
| 1   | 0,034                     | 0,045                          |
| 2   | 0,047                     | 0,007                          |
| 3   | 0,054                     | 0,018                          |
| 4   | 0,069                     | 0,018                          |
| 5   | 0,054                     | 0,035                          |
| 6   | 0,047                     | 0,024                          |
| 7   | 0,085                     | 0,094                          |
| <b>Promedio</b>                                       | <b>0,056 ± 0,017</b>      | <b>0,034 ± 0,029</b>           |

Si bien la precipitación no elimina los pigmentos que producen la mayor interferencia sobre la fluorescencia, sí disminuye el aceite co-extraído que incrementa la línea base en los espectros. Por ello, se procedió a preparar un set de validación en presencia de la matriz obtenida luego de aplicar el tratamiento de muestras MAE-precipitación-SPE para establecer la calidad de la predicción del modelo U-PLS bajo estas condiciones. Además se trabajó con las EEMs derivadas de acuerdo a lo indicado anteriormente. Los resultados de la predicción del set de validación se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Parámetros de calidad analítica obtenidos para el set de validación en la matriz de aceite obtenida por MAE-precipitación-SPE utilizando los EEMs derivados.

|              | Residuos calibrado <sup>a</sup> | LOD (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> | RMSEP (ng mL <sup>-1</sup> ) | REP (%) | Correlación (y <sub>real</sub> v/s y <sub>predicho</sub> ) | R <sup>2</sup> |
|--------------|---------------------------------|---|------------------------------|---------|--|----------------|
| <b>BaA</b>   | 0,33                            | 0,83                                    | 0,21                         | 17      | y = 0,862x + 0,368   | 0,944          |
| <b>BbF</b>   | 0,08                            | 0,97                                    | 0,31                         | 21      | y = 1,042x - 0,205   | 0,828          |
| <b>BkF</b>   | 0,92                            | 0,13                                    | 0,12                         | 22      | y = 0,693x + 0,163   | 0,627          |
| <b>BaP</b>   | 0,52                            | 0,82                                    | 0,11                         | 9       | y = 0,869x - 0,119   | 0,971          |
| <b>DBahA</b> | 0,34                            | 0,67                                    | 0,23                         | 17      | y = 0,857x + 0,206   | 0,919          |
| <b>BghiP</b> | 0,34                            | 1,4                                     | 0,5                          | 12      | y = 0,887x + 0,556   | 0,894          |
| <b>IP</b>    | 0,06                            | 0,73                                    | 0,57                         | 22      | y = 0,448x + 1,264   | 0,717          |

<sup>a</sup> Indica el valor asociado al residuo espectral no explicado por el modelo de calibrado. El residuo luego del proceso RBL no debe ser menor que este valor.

<sup>b</sup> Obtenido como el promedio de las 10 muestras de validación del set.

Al comparar estos resultados con los obtenidos sin incluir la precipitación (Tabla 9) se observa que BaA, BbF, BaP, DBahA, mostraron menores valores para RMSEP mientras que para BkF y BghiP no presentaron grandes diferencias. El único de los analitos cuya predicción no mejoró fue IP, cuyo valor RMSEP fue de 12 y 22% sin precipitación y con la precipitación, respectivamente. El REP mostró una disminución para todos los HAPs, excepto para IP como se mencionó anteriormente. Se puede observar que para BaA,

BghiP y IP al analizar el término del intercepto en la ecuación, en la predicción se tienden a sobreestimar las concentraciones. En términos generales al realizar la precipitación de aceite co-extraído por disminución de la temperatura se mejora la predicción de los analitos.

### **5.7 Análisis del set de prueba.**

Con el propósito de evaluar la recuperación de los 7 HAPs desde muestras de aceite aplicando el procedimiento MAE-precipitación-SPE, así como también la capacidad predictiva del modelo de calibración multivariado; se analizó un set de muestras de aceite de oliva fortificadas desde el inicio con mezclas de HAPs. Para ello, los extractos obtenidos fueron analizados en forma paralela mediante HPLC-FLD (para evaluar la recuperación de manera independiente) y fluorescencia total asociada a U-PLS/RBL (para evaluar la capacidad de predicción del modelo de calibrado). Estos valores fueron comparados para establecer la existencia de diferencias entre ambos métodos de análisis. Cabe señalar que algunas de las muestras del set fueron preparadas en duplicado y sus extractos en hexano almacenados por dos meses a 4 °C, antes de su análisis, no encontrándose diferencias significativas con los valores del set inicial en términos de las recuperaciones de los analitos. Esto demostró que los HAPs fueron estables en los extractos durante el tiempo de almacenamiento.

Los resultados de la recuperación promedio obtenida para cada uno de los analitos en el set de prueba, tanto por HPLC-FLD como U-PLS/RBL, se resumen en la Tabla 12.

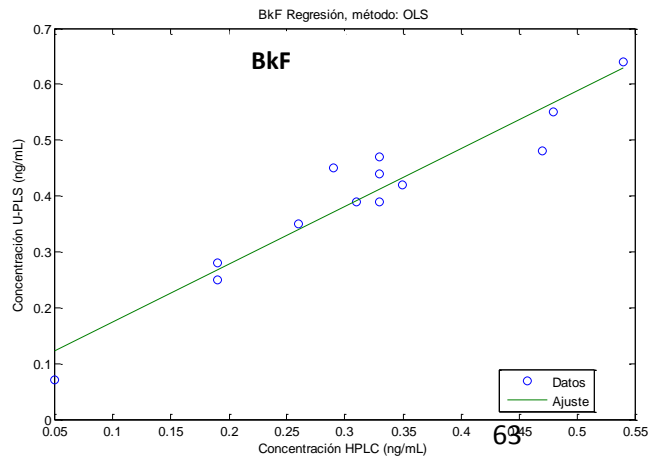
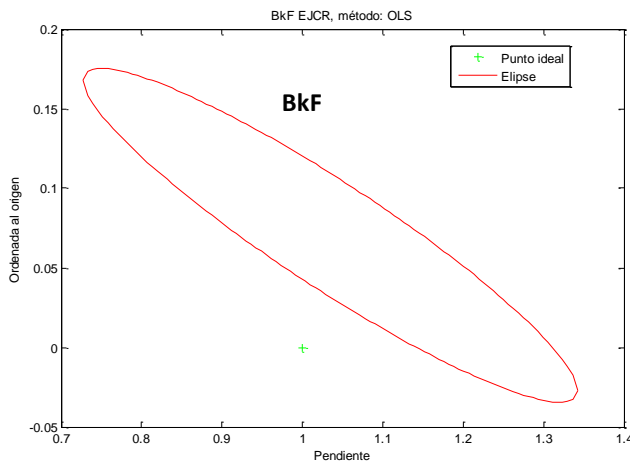
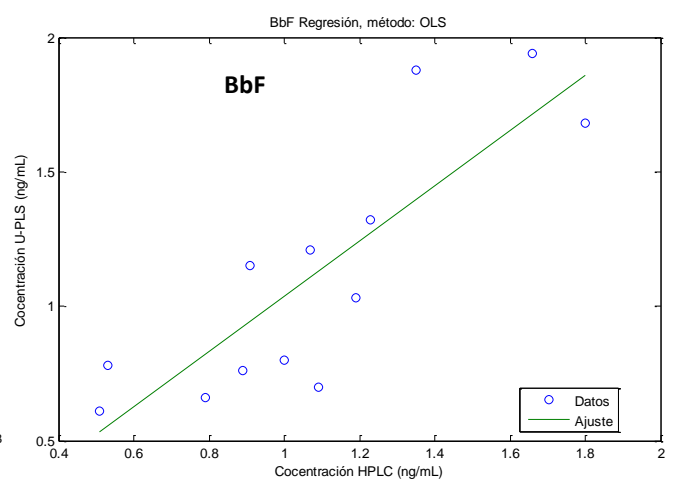
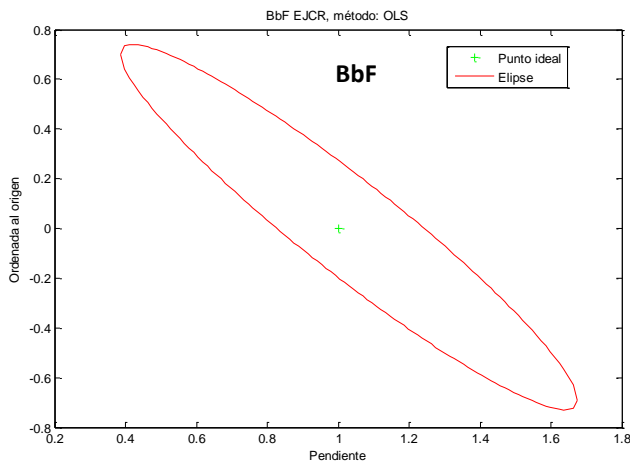
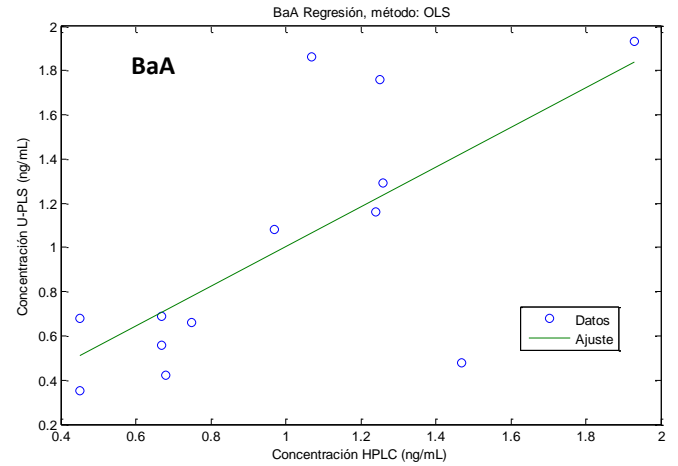
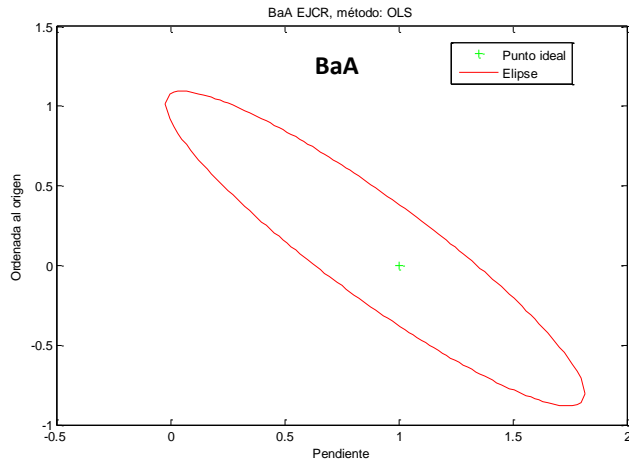
**Tabla 12.** Recuperación promedio y desviaciones estándar de cada analito en el set de prueba obtenida por HPLC-FLD y U-PLS/RBL.

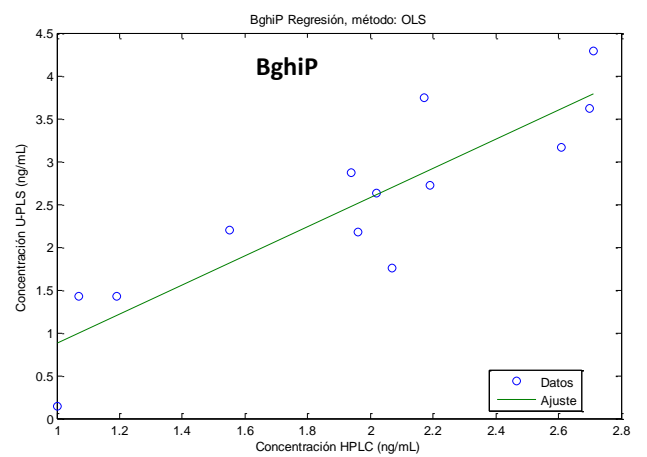
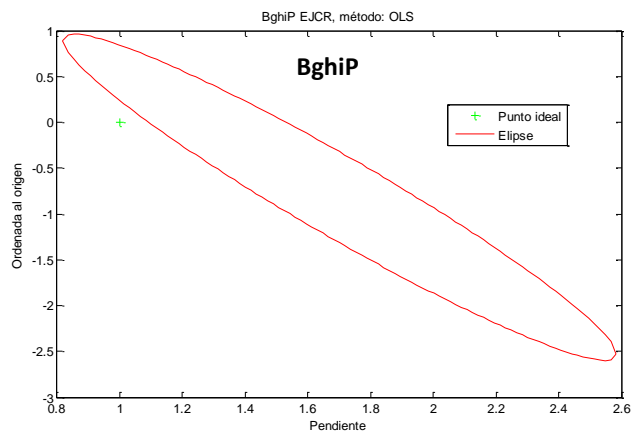
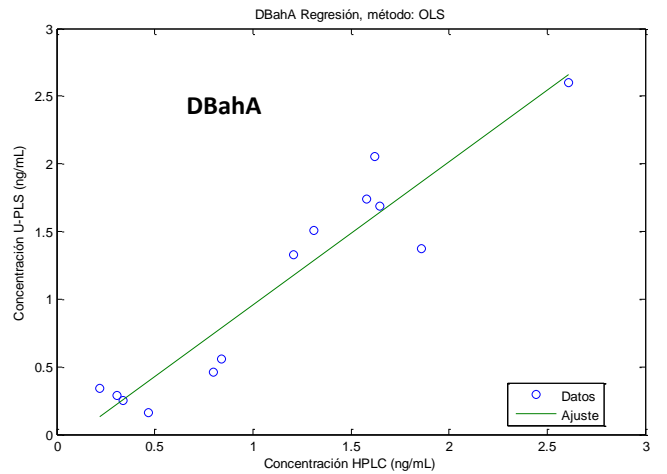
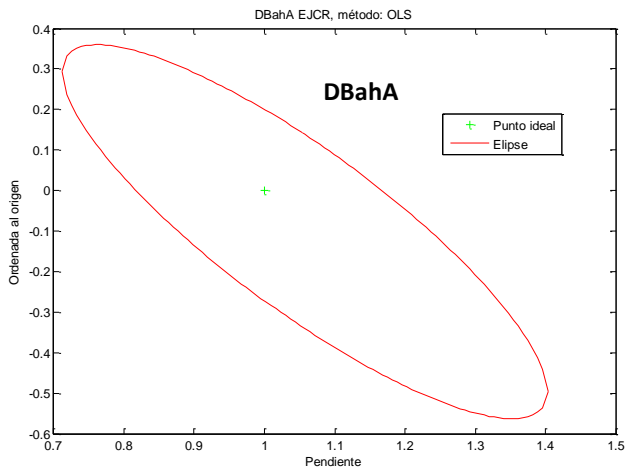
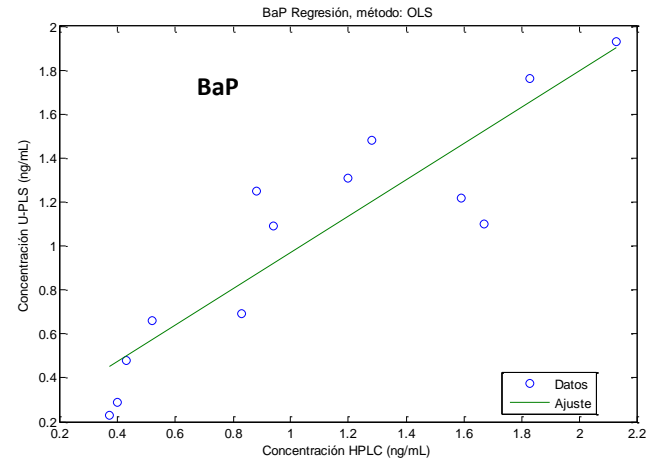
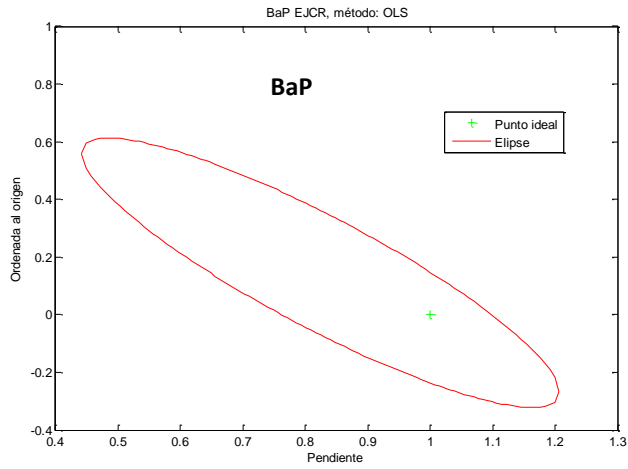
|              | HPLC-FLD(%) | Desviación Estándar HPLC | U-PLS/RBL(%) | Desviación Estándar U-PLS/RBL | p-value Test T | p-value Test F |
|--------------|-------------|--------------------------|--------------|-------------------------------|----------------|----------------|
| <b>BaA</b>   | 67          | 10                       | 66           | 20                            | 0,8834         | <b>0,017</b>   |
| <b>BbF</b>   | 61          | 8                        | 63           | 15                            | 0,6362         | 0,053          |
| <b>BaP</b>   | 64          | 12                       | 61           | 15                            | 0,6415         | 0,409          |
| <b>DBahA</b> | 79          | 17                       | 71           | 21                            | 0,2795         | 0,467          |
| <b>BkF</b>   | 63          | 11                       | 80           | 10                            | <b>0,0002</b>  | 0,932          |
| <b>BghiP</b> | 55          | 7                        | 72           | 12                            | <b>0,0001</b>  | 0,086          |
| <b>Ip</b>    | 57          | 9                        | 58           | 9                             | 0,7615         | 0,890          |

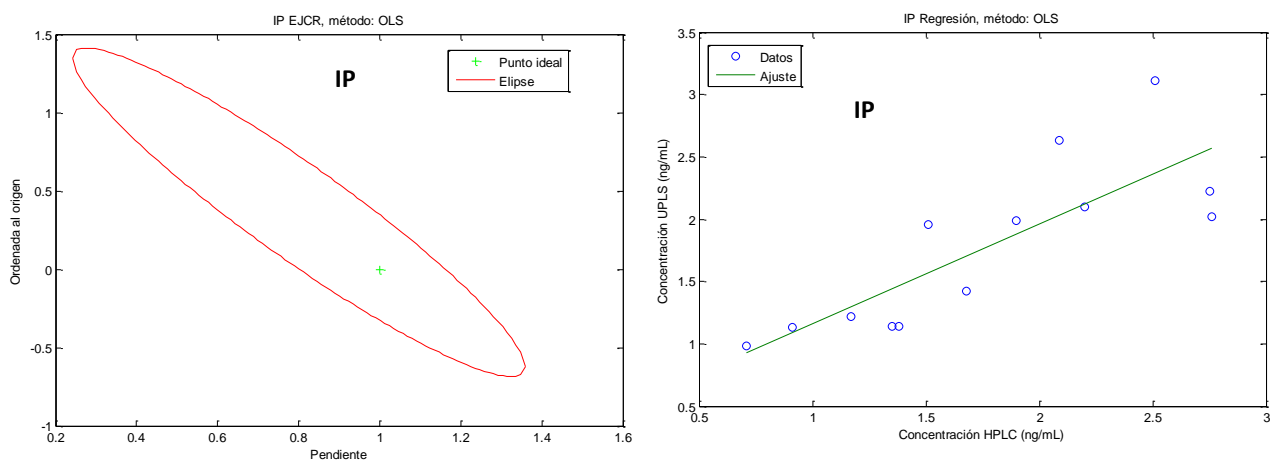
Los porcentajes de recuperación obtenidos por HPLC-FLD varían entre un 55% (BghiP) y 79% (DBahA), mientras que para U-PLS/RBL van desde 58% (IP) y 80% (BkF). Al comparar los porcentajes de recuperación promedio para cada analito mediante un Test T (p-value test T en la tabla), se determinó que para BaA, BbF, BkF, BaP y IP no existen diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los valores obtenidos por HPLC-FLD y U-PLS/RBL. Lo mismo se puede apreciar para las regiones elípticas de confianza derivadas de las regresiones

entre los valores predichos por U-PLS y medidos por HPLC (Figura 12). Aquí se observa que el punto ideal (1,0) para pendiente e intercepto, se encuentra dentro o en el borde de estas regiones para los analitos anteriormente indicados, mostrando de una forma visual que no se presenta diferencias significativas entre los valores obtenidos por ambos métodos. Mientras que para BghiP y BkF si hubo diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) lo que se corrobora con el punto ideal fuera de la elipse. En estos dos casos U-PLS/RBL tendió a sobreestimar el valor, entregando mayores porcentajes de recuperación al compararlo con HPLC. Esto puede ocurrir debido a que en los intervalos de emisión-excitación hay un mayor solapamiento espectral para estos compuestos.

Además, se realizó un Test F de comparación de las desviaciones estándar entre los valores predichos por U-PLS y medidos por HPLC. Según el test sólo se apreció una diferencia significativa para el BaA. La amplitud de las regiones elípticas son proporcionales al grado de dispersión de los datos (Figura 12), siendo la elipse asignada a BaA la que presenta la mayor amplitud.







**Figura 12.** Gráficos de las regiones elípticas de confianza (La cruz verde en la elipse indica el punto teórico ideal (1,0)) entre concentraciones predichas por U-PLS/RBL en función de los valores obtenidos por HPLC-FLD para BaA, BbF, BkF, BaP, DBahA, BghiP, IP.

Al observar los interceptos en las gráficas de la regresión, se aprecia como para algunos HAPs la predicción esta sobreestimada, entregando valores de concentraciones mayores de las contenidas realmente. Esto se puede evidenciar en los casos de IP, BaA y BghiP, que concuerda con lo resumido en la tabla 10.

### 5.8 Aplicación a muestras de aceite de oliva comercial

El método fue aplicado en muestras de aceite de oliva virgen y común compradas en octubre de 2013 (11 muestras) y mayo de 2014 (4 muestras) en supermercados de Santiago, detalles de los aceites en Tabla 4. En primer lugar se realizó un análisis de “screening” mediante el calibrado de HAPs totales en matriz (sección 5.4). Esto permitió determinar la existencia de los analitos de interés, para luego hacer el análisis detallado en las muestras positivas



mediante fluorescencia total y U-PLS/RBL. La Tabla 13 resume los resultados obtenidos.

**Tabla 13.** Concentración (ng g<sup>-1</sup>) de cada analito encontrada en muestras reales.

| Concentración ng g <sup>-1</sup> |             |      |      |      |       |             |      |            |
|----------------------------------|-------------|------|------|------|-------|-------------|------|------------|
| Aceite                           | BaA         | BbF  | BkF  | BaP  | DBahA | BghiP       | IP   | Total      |
| <b>Montecristo</b>               | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Kardamili</b>                 | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Banquete</b>                  | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Carbonell</b>                 | <b>1,62</b> | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <b>1,88</b> | <LOD | <b>3,5</b> |
| <b>Nova Oliva</b>                | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Casta</b>                     | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Sol de Aculeo</b>             | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Limarí</b>                    | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Terra santa</b>               | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Santiago</b>                  | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Basso</b>                     | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Basso</b>                     | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Borges</b>                    | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Carbonell</b>                 | <LOD        | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD  | <LOD        | <LOD | -          |
| <b>Chef</b>                      | -           | -    | -    | -    | -     | -           | -    | -          |

De las primeras 11 muestras que corresponden a las evaluadas el año 2013, solo en uno de los aceites de esa serie los valores encontrados mostraban concentraciones de HAPs por encima de los límites de detección

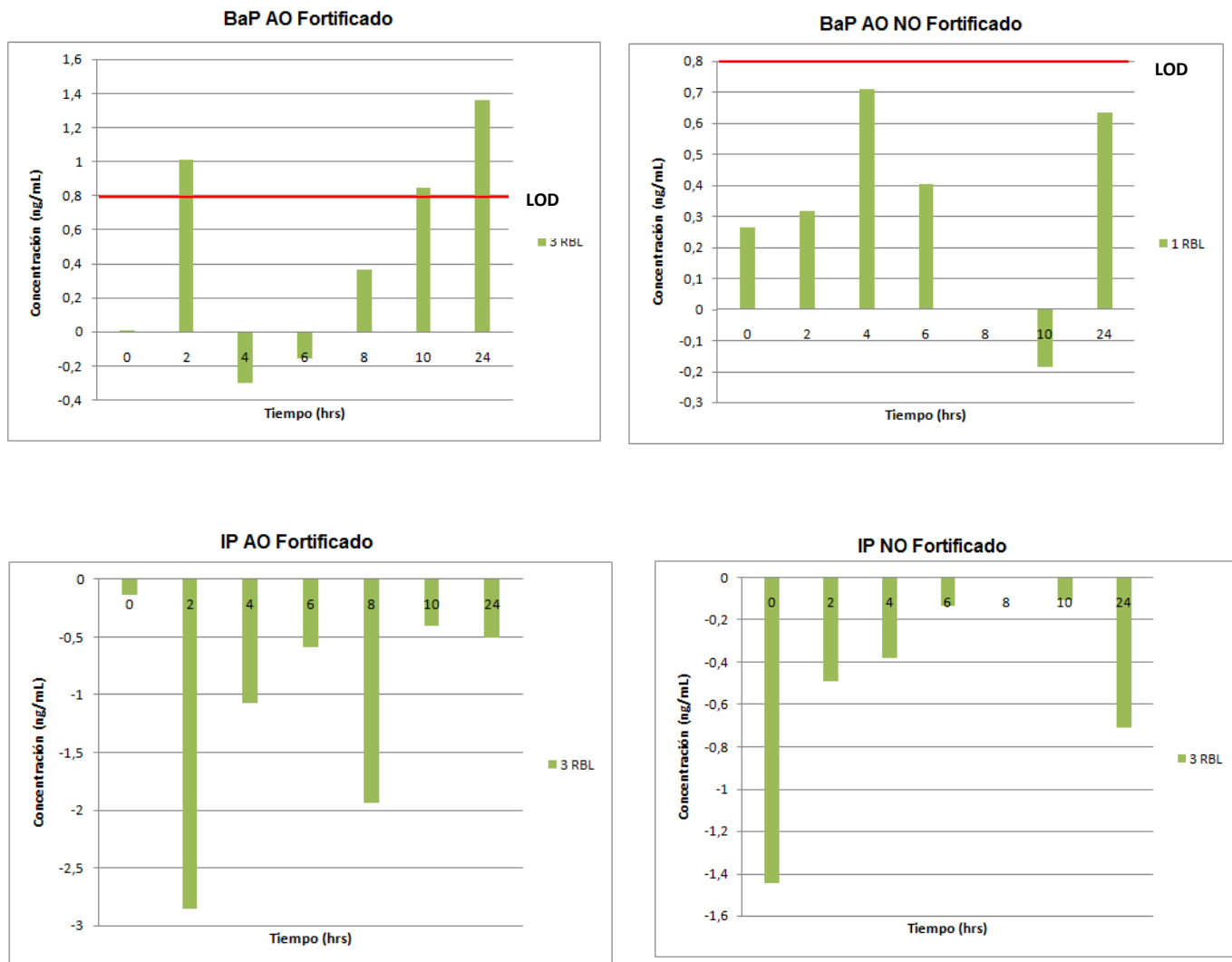
que tiene el método. Este aceite Carbonell de procedencia Española, mostró niveles cuantificables para BaA  $1,62 \text{ ng g}^{-1}$  y BghiP  $1,88 \text{ ng g}^{-1}$  obteniendo una concentración total  $3,5 \text{ ng g}^{-1}$  de HAPs. A pesar de esto, ambos HAPs se encuentran bajo los límites máximos permitidos por la legislación Europea, que estipula como límite máximo para cada uno de los HAPs de  $2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  y de  $10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  en total. Dentro de los 4 últimos aceites que corresponden al bloque analizado en el año 2014, se incluyó dentro de las muestras el mismo tipo de aceite Carbonell pero de un nuevo stock, para comparar con el analizado en el año 2013 determinando si contenía o no concentraciones cuantificables de BaA y BghiP como el par que se evaluó anteriormente. Como se muestra en la tabla 12 no se encontraron concentraciones sobre el límite de detección para ninguno de los HAPs, esto no sólo ocurrió para el aceite Carbonell sino también, para las marcas Borges y Basso. Para el último de los aceites que se señala en la tabla, aceite de oliva puro Chef, el modelo de calibrado no pudo predecir las concentraciones. Ello se atribuye a que este aceite, a diferencia de los demás, no era extra virgen por lo que en el tratamiento de muestra no se pudo eliminar los interferentes adicionales o en mayor cantidad que contenía. Al analizar los espectros no se pudieron visualizar señales claras de los analitos, sino sólo una gran señal en el intervalo de longitudes de onda considerado.

## **5.9 Generación de HAPs en muestras calentadas en presencia de materia orgánica.**

Con el fin de evaluar la posible generación de HAPs al calentar un aceite de oliva en presencia de materia orgánica, se procedió de acuerdo a lo indicado en la sección 4.5. Los resultados para el aceite de oliva (Figura 13) fortificado mostraron una disminución inicial de las concentraciones de BaP hasta llegar a no ser detectado a las 4 horas. A partir de las 10 horas éste fue detectado nuevamente incrementando su concentración en el aceite en función del tiempo. Esto podría deberse a fenómenos de sorción inicial del BaP sobre la materia orgánica, que se ven revertidos por la degradación superficial de ésta producto del calentamiento. Valores negativos en los gráficos indicarían este efecto de degradación.

El IP es más hidrofóbico que BaP y presenta una mayor afinidad con la materia orgánica que este. Así, el IP fue sorbido en su totalidad por la materia orgánica y no presenta un aumento de la concentración en el tiempo.

Para las muestras sin fortificar no se obtuvieron valores de concentración mayor a los LOD del método para estos analitos, lo que indicaría que estos no se generarían en el aceite o si lo hicieron no fueron detectados por su baja concentración.



**Figura 13.** Gráficos concentración BaA fortificado, BaA no fortificado, IP fortificado IP no fortificado v/s tiempo para aceites de oliva recalentados.

Este estudio también fue realizado en un aceite de maravilla pero debido a que esta matriz es más compleja al igual que ocurrió con el Aceite de oliva puro Chef (Item 5.8), el modelo de calibrado no pudo predecir las concentraciones. Por lo que no se pudo determinar si ocurrían los mismos fenómenos anteriormente descritos.

## 6. CONCLUSIONES

Se obtuvo un modelo para predecir las concentraciones de siete HAPs mezclados, aplicando U-PLS/RBL sobre datos de fluorescencia total (espectros de excitación-emisión). Para ello, en una primera etapa de calibrado con mezclas de los siete compuestos preparados en solvente, se determinó el intervalo espectral y el número de factores óptimo para cada HAP. Posteriormente el modelo fue aceptado luego de analizar un set de validación preparado en solvente, obteniéndose valores de REP menores o iguales a 10%, con excepción de BghiP cuyo valor fue de 25%.

La capacidad predictiva del modelo de calibración U-PLS/RBL fue evaluada utilizando muestras de aceite sometidas a MAE-SPE y posteriormente fortificadas con los siete compuestos, obteniendo valores de REP entre 25 y 118%. El error en la predicción logró disminuirse al utilizar los EEMs derivados, con valores de REP comprendidos entre 12 y 46%.

Al agregar al tratamiento de muestra habitual (MAE-SPE) la precipitación de aceite co-extraído por disminución de temperatura, se logró bajar la carga de algunos de los interferentes que perjudican el análisis y así obtener mejores resultados en la predicción, con valores de REP que en esta oportunidad estuvieron comprendidos entre 9 y 22%.

La eficiencia de extracción y la capacidad predictiva del modelo de calibración U-PLS/RBL fue evaluada utilizando muestras de aceite fortificadas

desde el comienzo y sometidas a MAE-precipitación-SPE. Se determinó mediante HPLC-FLD que al utilizar este tratamiento las recuperaciones promedio de los 7 HAPs variaron entre un 55 y 79%. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre estos valores y los predichos por U-PLS/RBL para BaA, BbF, BkF, BaP e IP. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las desviaciones estándar de las recuperaciones para BbF, BkF, BaP, BghiP, DBahA e IP.

Al evaluar la presencia de los HAPs en muestras de aceite de oliva virgen comercial mediante fluorescencia total y U-PLS/RBL, solo para uno de los aceites se encontraron concentraciones cuantificables las cuales no superaban los límites establecidos. El tratamiento de muestra no es eficiente para aceites que no sean extra virgen ya que no puede eliminar todos los interferentes por lo que el modelo de calibrado no pudo predecir las concentraciones de HAP.

Al calentar aceite de oliva en presencia de materia orgánica en función del tiempo no se observó generación de HAPs (BaA e IP); siendo evidente sin embargo fenómenos de sorción de estos compuestos sobre la materia orgánica que varían en el tiempo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Agency for toxic substances and disease registry. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) [en línea] Atlanta GA, departamento de salud y servicios humanos de los EEUU. **1996** <[http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts69.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts69.pdf)> [consulta: Abril 2014]
- ❖ Agudo A. Instituto catalán de oncología. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral [en línea]. Secretaría de salud laboral y medio ambiente MCA-UGT. Madrid, España. **2010**. <<http://www.ugt.es/saludlaboral/hidrocarburos.pdf>> [consulta: Abril 2014]
- ❖ Alarcón F, Báez M, Bravo M, Richter P, Fuentes E “Screening of edible oils for polycyclic aromatic hydrocarbons using microwave- assisted liquid-liquid and solid phase extraction coupled to one- to three-way fluorescence spectroscopy analysis” *Talanta*, **2012**, 100, 439-446.
- ❖ Alarcón F, Báez M, Bravo M, Richter P, Escandar G, Olivieri A, Fuentes E “ Feasibility of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils via unfolded partial least-squares/residual bilinearization and parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices” *Talanta*, **2013**, 103, 361-370.
- ❖ Arrebola F, Frenich G, González M, Plaza P, Martínez J “Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil by a completely automated headspace tchnique coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, **2006**, 41, 822-829.
- ❖ Asociación de productores de aceite de oliva. Beneficios para la salud (s.a) [en línea] <[http://www.chileoliva.cl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=70&Itemid=76&lang=es](http://www.chileoliva.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=70&Itemid=76&lang=es)> [consulta: Mayo 2014]

- ❖ Ballesteros E, Sánchez A, Martos N "Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1111: 89-96.
- ❖ Barranco A, Salces R, Bakkali A, Berrueta L, Gallo B, Vicente F, Sarobe M "Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils", *Journal of Chromatography A*, **2003**, 988: 33-40.
- ❖ Chemometry Consultancy, <http://www.chemometry.com>
- ❖ Chile Oliva, Asociación de productores de aceite de oliva, "Informe Anual del Mercado Nacional de Aceite de Oliva-2013", Chile, **2013**.
- ❖ Chile Oliva, Asociación de productores de aceite de oliva, "Noticia Exportación 2011 ", Chile, **2013**.
- ❖ Ciecierska M, Obiedzinski M "Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from unconventional sources", *Food Control*, **2013**, 30: 556-562.
- ❖ Diletti G, Scortichini G, Scarpone R, Gatti G, Torreti L, Migliorati G "Isotope dilution determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive pomace oil by gas chromatography–mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1062: 247–254.
- ❖ Escandar G, Faber N, Goicoechea H, Muñoz de la Peña A, Olivieri A, Poppi R "Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications", **2007**, 26: 752-765.
- ❖ Fromberg A, Hojgard A, Duedahl-Olesen L "Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils combining gel permeation chromatography with solid-phase extraction clean-up", *Food Additives and Contaminants*, **2007**, 24: 758-767.
- ❖ Guillén M, Sopelana P, Palencia G "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Olive Pomace Oil", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52: 2123-2132.



- ❖ Haaland D. M, Thomas E.V. ("Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information" *Analytical Chemistry*, **1988**, 60: 1193–1202.
- ❖ <http://www.models.kvl.dk/algorithms>
- ❖ Lage M, Cortizo J "Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil", *Food Control*, **2005**, 16: 59-64.
- ❖ Lozano S. Segura A, Fernández A. **2009** Composición del aceite de oliva. Fundación unicaja, El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía, 194-222p.
- ❖ Martínez S, Morales A, Pastor A, Morales A, Guardia M "Sample Preparation Improvement in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Determination in Olive Oils by Gel Permeation Chromatography and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection", *Journal of AOAC International*, **2005**, 88: 1247-1254.
- ❖ MATLAB 6.0, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA, 2000.
- ❖ Ministerio de Salud República de Chile, Reglamento Sanitario de los Alimentos DTO N°977/96 Modificación Dto 115/03 Minsal, Artículo 249, **2009**, 97-98, Santiago, Chile.
- ❖ Moreda W, Rodriguez-Acuña R, Pérez-Camino M, Cert A "Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in refined olive pomace and other vegetable oils" *Journal of the science of food and agriculture*, **2004**, 84, 1759-1764.
- ❖ Moret S, Conte L. "A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils", *Journal of Separation Science*, **2002**, 25: 96-100.
- ❖ Moret S, Purcaro G, Conte L "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of soil and olives collected in areas contaminated with creosote release from old railway ties" *Science of the total environment*, **2007**, 386, 1-8.

- ❖ Olivieri A. "On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties", *Journal of Chemometrics*, **2005**, 19: 253–265.
- ❖ Purcaro G, Moret S, Conte L "Rapid SPE–HPLC determination of the 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils", *Journal of Separation Science*, **2008**, 31: 3936-3944.
- ❖ Rose M, White S, Macarthur R, Petch R, Holland J, Damant A "Single-laboratory validation of a GC/MS method for the determination of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oils and fats", *Food Additives and Contaminants*, **2007**, 24: 635-651.
- ❖ Savitzky A, Golay M. J. "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures *Anal. Chem.*" **1964** 1084, 36, 1627-1639
- ❖ Simon R, Gomez J, Von C, Wenzl T, Anklam E "Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination (PAHs) in edible vegetable oils" *Anal Bioanal Chem* **2007**, 391, 1397-1408.
- ❖ Skoog D, Vest Donald, Holler James "Fundamentos de Química Analítica" **2001**, 4ªEd, Barcelona, Editorial Reverté, Volumen 2.
- ❖ Teixeira VH, Casal S, Iliveira B "PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in comercial samples and during refining process" *Food Chemistry*, **2007**, 104, 106-112.
- ❖ Valeur Bernard "Molecular Fluorescence Principles and Applications" **2002**, Wiley-VCH, Capítulo 3.
- ❖ Vichi S, Pizzale L, Conte L, Buxaderas S, López-Tamames E "The occurrence of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oils from north-eastern Italy", *Food Control*, **2007**, 18: 1204-1210.
- ❖ Vives I, Grimalt J, Guitart R "Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana" *Apuntes de ciencias y tecnología*, **2001**, N°3.

- ❖ Wu S, Yu W "Liquid–liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils from China", *Food Chemistry*, **2012**, 134: 597-601
  
- ❖ Zeep R, Sheldon W, Moran, M "Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation–emission matrices", *Marine Chemistry*, **2004**, 89: 15-36.
  
- ❖ Zougagh M, Redigolo H, Ríos A, Valcárcel M "Screening and confirmation of PAHs in vegetable oil samples by use of supercritical fluid extraction in conjunction with liquid chromatography and fluorimetric detection", *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 525: 265-271

## ANEXO

Detalle de las recuperaciones obtenidas por HPLC-FLD y U-PLS/RBL en los set de pruebas sometidos a MAE-precipitación-SPE, para cada uno de los HAP estudiados.

| SET 1                |           |           | SET 2       |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| Real BaP             | %Rec HPLC | %Rec UPLS | Real BaP    | %Rec HPLC | %Rec UPLS |
| <b>2,5</b>           | 48        | 52        | <b>2,5</b>  |           |           |
| <b>2,6</b>           | 61        | 47        | <b>2,6</b>  | 70        | 68        |
| <b>0,81</b>          |           |           | <b>0,81</b> | 64        | 81        |
| <b>0,63</b>          | 58        | 37        | <b>0,63</b> | 68        | 77        |
| <b>1,7</b>           | 52        | 73        | <b>1,7</b>  |           |           |
| <b>1,9</b>           |           |           | <b>1,9</b>  | 88        | 58        |
| <b>1,3</b>           | 64        | 53        | <b>1,3</b>  | 72        | 84        |
| <b>0,62</b>          | 64        | 47        | <b>0,62</b> |           |           |
| <b>2,8</b>           | 46        | 53        | <b>2,8</b>  | 76        | 69        |
| <b>0,35</b>          |           |           | <b>0,35</b> |           |           |
| <b>Prom</b>          | 56        | 52        |             | 73        | 73        |
| <b>Desv.Estándar</b> | 7,6       | 11,1      |             | 8,4       | 9,9       |

| SET 1                |           |           | SET 2       |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| Real BbF             | %Rec HPLC | %Rec UPLS | Real BbF    | %Rec HPLC | %Rec UPLS |
| <b>0,53</b>          |           |           | <b>0,53</b> |           |           |
| <b>1,9</b>           | 58        | 37        | <b>1,9</b>  | 65        | 69        |
| <b>0,85</b>          |           |           | <b>0,85</b> | 60        | 72        |
| <b>1,6</b>           |           |           | <b>1,6</b>  | 57        | 72        |
| <b>2,1</b>           | 57        | 49        | <b>2,1</b>  | 64        | 89        |
| <b>1,5</b>           | 67        | 53        | <b>1,5</b>  |           |           |
| <b>2,6</b>           | 64        | 75        | <b>2,6</b>  | 69        | 65        |
| <b>1,3</b>           | 41        | 60        | <b>1,3</b>  | 68        | 59        |
| <b>0,67</b>          |           |           | <b>0,67</b> |           |           |
| <b>1,5</b>           | 53        | 44        | <b>1,5</b>  | 71        | 81        |
| <b>Prom</b>          | 57        | 55        |             | 64        | 71        |
| <b>Desv.Estándar</b> | 10,2      | 14        |             | 4,8       | 10,4      |

| SET 1                |           |           | SET 2       |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| Real BkF             | %Rec HPLC | %Rec UPLS | Real BkF    | %Rec HPLC | %Rec UPLS |
| <b>0,2</b>           |           |           | <b>0,2</b>  |           |           |
| <b>0,53</b>          | 55        | 85        | <b>0,53</b> | 61        | 88        |
| <b>0,1</b>           |           |           | <b>0,1</b>  | 51        | 70        |
| <b>0,5</b>           | 52        | 69        | <b>0,5</b>  |           |           |
| <b>0,53</b>          | 63        | 84        | <b>0,53</b> |           |           |
| <b>0,58</b>          |           |           | <b>0,58</b> | 82        | 82        |
| <b>0,31</b>          | 62        | 81        | <b>0,31</b> | 60        | 89        |
| <b>0,79</b>          | 45        | 53        | <b>0,79</b> | 68        | 81        |
| <b>0,62</b>          |           |           | <b>0,62</b> | 77        | 89        |
| <b>0,46</b>          | 68        | 85        | <b>0,46</b> | 71        | 84        |
| <b>Prom</b>          | 55        | 74        |             | 66        | 83        |
| <b>Desv.Estándar</b> | 7,3       | 13,5      |             | 11,4      | 7,4       |

| SET 1                |           |           | SET 2       |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| Real DBahA           | %Rec HPLC | %Rec UPLS | Real DBahA  | %Rec HPLC | %Rec UPLS |
| <b>0,62</b>          | 50        | 46        | <b>0,62</b> |           |           |
| <b>0,43</b>          | 79        | 58        | <b>0,43</b> |           |           |
| <b>0,5</b>           | 44        | 69        | <b>0,5</b>  | 94        | 33        |
| <b>1,9</b>           | 69        | 79        | <b>1,9</b>  | 87        | 89        |
| <b>1,7</b>           | 71        | 78        | <b>1,7</b>  | 93        | 102       |
| <b>1</b>             |           |           | <b>1</b>    |           |           |
| <b>2,8</b>           |           |           | <b>2,8</b>  | 93        | 93        |
| <b>2,2</b>           | 85        | 62        | <b>2,2</b>  |           |           |
| <b>2,2</b>           | 74        | 93        | <b>2,2</b>  |           |           |
| <b>0,89</b>          | 90        | 52        | <b>0,89</b> | 94        | 63        |
| <b>Prom</b>          | 67        | 69        |             | 92        | 79        |
| <b>Desv.Estándar</b> | 14,9      | 15,6      |             | 3,3       | 31,3      |

| SET 1                |           |           | SET 2      |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Real BghiP           | %Rec HPLC | %Rec UPLS | Real BghiP | %Rec HPLC | %Rec UPLS |
| 5,6                  |           |           | 5,6        |           |           |
| 3,5                  | 56        | 62        | 3,5        | 58        | 75        |
| 2,1                  |           |           | 2,1        | 51        | 68        |
| 2,7                  | 44        | 53        | 2,7        |           |           |
| 5,2                  | 52        | 82        | 5,2        | 52        | 70        |
| 2,9                  | 54        | 76        | 2,9        | 71        | 61        |
| 5,1                  |           |           | 5,1        | 58        | 90        |
| 4,3                  | 45        | 67        | 4,3        | 61        | 74        |
| 3,3                  |           |           | 3,3        |           |           |
| 3,8                  | 57        | 95        | 3,8        | 58        | 72        |
| <b>Prom</b>          | 50        | 68        |            | 58        | 73        |
| <b>Desv.Estándar</b> | 5,3       | 11,6      |            | 7,3       | 9,8       |

| SET 1                |           |           | SET 2   |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|
| Real IP              | %Rec HPLC | %Rec UPLS | Real IP | %Rec HPLC | %Rec UPLS |
| 2,6                  | 45        | 47        | 2,6     |           |           |
| 2,4                  |           |           | 2,4     | 58        | 48        |
| 4,0                  | 52        | 66        | 4,0     |           |           |
| 3,1                  | 49        | 63        | 3,1     |           |           |
| 2,5                  |           |           | 2,5     | 54        | 46        |
| 4,5                  |           |           | 4,5     |           |           |
| 2,9                  | 65        | 69        | 2,9     | 58        | 49        |
| 4,2                  | 60        | 74        | 4,2     | 65        | 53        |
| 3,7                  | 59        | 57        | 3,7     | 75        | 55        |
| 1,7                  | 42        | 58        | 1,7     | 54        | 66        |
| <b>Prom</b>          | 55        | 63        |         | 62        | 50        |
| <b>Desv.Estándar</b> | 7,7       | 9,6       |         | 8,2       | 3,7       |

| SET 1                |           |           | SET 2      |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Real BaA             | %Rec HPLC | %Rec UPLS | Real BaA   | %Rec HPLC | %Rec UPLS |
| <b>0,7</b>           | 64        | 98        | <b>0,7</b> |           |           |
| <b>1,8</b>           | 69        | 64        | <b>1,8</b> | 69        | 98        |
| <b>1,1</b>           | 61        | 63        | <b>1,1</b> | 68        | 60        |
| <b>2,2</b>           | 57        | 58        | <b>2,2</b> | 67        | 22        |
| <b>1,5</b>           | 64        | 72        | <b>1,5</b> |           |           |
| <b>0,58</b>          |           |           | <b>0,6</b> |           |           |
| <b>0,37</b>          |           |           | <b>0,4</b> |           |           |
| <b>0,62</b>          | 73        | 57        | <b>0,6</b> |           |           |
| <b>2,4</b>           | 45        | 77        | <b>2,4</b> | 81        | 80        |
| <b>0,87</b>          | 77        | 65        | <b>0,9</b> | 79        | 48        |
| <b>Prom</b>          | 62        | 70        |            | 71        | 65        |
| <b>Desv.Estándar</b> | 9,2       | 14,1      |            | 6,3       | 32,5      |