

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEÚTICAS



***“DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA
LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN ALIMENTOS GRASOS
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y
CALIBRACIÓN MULTIVARIADA”***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
académico de Doctor en Química por:**

FRANCIS PAMELA ALARCÓN RODRÍGUEZ

Directores de Tesis

**Dr. Edwar Fuentes P.
Dr. Pablo Richter D.**

**Santiago - Chile
2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

FRANCIS PAMELA ALARCÓN RODRÍGUEZ

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Título de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido el día ____ de _____ de 2013.

Directores de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes Pérez.

Dr. Pablo Richter Duk.

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Marcelo Campos Vallete. (Presidente)

Dra Juanita Freer Calderón

Dra. María Inés Toral Ponce

Dra. Verónica Arancibia Moya

*Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará
inteligente y aunque sea débil se transformará en fuerte.*

Leonardo da Vinci

AGRADECIMIENTOS

¿Cómo agradecer a todos sin que se me quede alguno en el tintero? Siempre que pensamos en agradecimientos parece que se nos hace un nudo en la garganta y las emociones fluyen con un elevado número de Reynolds. Por eso es que dejé para el final lo más importante de una tesis, sea de pregrado, doctoral, postdoctoral o ultra-mega-postdoctoral. El motor de nuestros trabajos no se alimenta sólo del egoísmo humano que nos lleva a satisfacer nuestras propias metas y ambiciones intelectuales; su principal combustible es el apoyo incondicional de quienes nos aman mas allá de un título, posición o nivel, de los que se alegran cuando triunfas y te levantan cuando fracasas, ellos son nuestras familias, amigos, hermanos de la vida y compañeros peludos fieles a prueba de todo.

Agradezco a mi madre por todos los valores entregados en mi crecimiento personal, por todas las atenciones que me dedicó, por su amor incondicional, por sus esfuerzos sobre humanos por hacer de mí una profesional, por estar conmigo desde siempre, por ser la mejor de las mamás. A mis tres madres más, mi abueli, tía Paty y tía Irma (mi gorda bella), porque fueron quienes me cuidaron mientras mami trabajaba arduamente por sacarnos adelante, porque han estado en todas conmigo, porque siempre han creído en mí, porque me hicieron una buena persona, consecuente con lo que pienso y siento.

Quiero agradecer a mi papá, por esforzarse cada día de su vida por reconstruir nuestra relación, por alegrarse de mis triunfos y acompañarme en mis penas y fracasos, por su locura sana en momentos complejos, por sus frases filosóficas en los momentos precisos. A mi Tatito por ser mi padre y gestor de todo lo que hoy sé, porque sin él no podría escribir ni leer, no podría restar, sumar ni multiplicar, no sabría tenderle la mano al que no tiene y apoyar al amigo cuando las cosas se ponen difíciles, gracias Gordito por seguir conmigo. A todos mis tíos: Uquito, Tono, Galo, Mario, Juan Carlos por hacerme dormir cuando chiquitita, por enseñarme que ¡las cosas se hacen bien o si no, no sirven! Jajaja, por apoyarme, por protegerme y simplemente por quererme.

A todos mis primos y primas, en quienes siempre inculqué ¡el amor por la ñoñería! A mi hermanita Catita nonita bella, porque aunque sólo nos una la sangre Rodríguez hermano es el que vive contigo desde chiquitito y comparte y pelea todos los días de su vida, siempre con mucho amor. Eres el orgullo de hermanita, ¡la mejor Cosmetóloga de todas!

A mi amado Sebita, hombre de gran paciencia que con su amor y ternura me ha apoyado en los momentos más complejos de mi corta vida. Son siete los hermosos años que hemos compartido y en cada uno de ellos has sido fundamental. A toda su familia, a los Riquelme y a los Vilches, a los Retamales y los Padilla porque desde el primer día en que entré a sus hogares me recibieron como una más del grupo y me brindaron toda la calidez que una familia tiene.

A mi gran amigo Paul, por estar en todas durante estos once años de amistad, sólo decirte en estas dos líneas que ¡eres mi Mejor Amigo! A mi querida amiga Tete, compañera de laboratorio, amiga de aventuras tropicales y psicóloga particular, gracias por tu sincera amistad. A mi buen compañero Luis, por depositar su confianza en mí y creer en mis opiniones, por ser todo un caballero de Mancha ante aquellos molinos difíciles de combatir. A mis compañeras y amigas de innumerables congresos: Karen, Carla y Marisol, sin ustedes esos eventos científicos no hubiesen sido lo mismo.

A quien fue mi tutor durante los primeros semestres del Doctorado, el profesor Claudio Olea, gracias por darme el coraje de enfrentar los problemas y solucionarlos con elegancia en el momento indicado, gracias por hacer de mí una mejor profesional.

A mis directores de tesis Edwar Fuentes y Pablo Richter, por confiar en mis capacidades y hacer de mí una buena investigadora. Por alentarme a rendir más y a superar las barreras, gracias a ustedes por el bello trabajo que aquí presentamos. Profesor Edwar, gracias por permitirme ser parte de esta investigación, gracias por sus palabras en momentos complejos, por su dedicación incondicional a todos sus alumnos, por compartir todo su conocimiento con quienes le rodean sin esperar algo a cambio, por estar siempre disponible para responder cualquier duda y para ayudar en

todo los problemas del laboratorio. Gracias por su paciencia y ayuda desinteresada. Profesor Pablo, gracias por creer siempre en mí, por responder y ayudar en cada interrogante que aparecía en el estudio, por ser positivo y alentador, por disfrutar la ciencia y sacar lo mejor de cada uno.

A Graciela y Alejandro quienes me recibieron con mucho cariño en Rosario y me entregaron nuevas herramientas no sólo para enfrentar la tesis sino que también para enfrentar la vida. A todos los del grupo de trabajo del Departamento de Química Analítica de la Universidad Nacional de Rosario, en especial a Vale Lozano y a “el Ale García” porque fueron ustedes quienes me hicieron olvidar la lejanía de casa y me incorporaron en sus vidas como una más de sus amigas.

A todos los profesores de la comisión, por sus críticas constructivas y buenas ideas para hacer de esta tesis un hermoso trabajo.

A CONICYT por otorgarme las Becas Nacional de Doctorado y Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral y a la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile, por haberme favorecido con la Beca de Estadías Cortas de Investigación, con la cual fue posible realizar una pasantía en la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

A quienes trabajan en el CEPEDQ, por su buena disposición y paciencia cada vez que pedí el espectrómetro de luminiscencia o el HPLC, gracias por sus buenas ondas.

A todos los que permiten que la U funcione y que pasan inadvertidos para muchos pero son grandes personas para quienes nos dimos el tiempo de conocerlos: a las tías del aseo, los y las guardias, los jardineros y maestros, los técnicos de laboratorio, las secretarias, Héctor y sus galletitas con una buena conversación agregada.

Por último y no por eso menos importante, a mi fiel amigo Newton, compañero de largas noches de escritura y búsquedas de papers, primer oyente de todos mis avances doctorales y exposiciones en congresos, cálido y peludo compañero de sueños. Entusiasta amigo de juegos y el más incondicional de los peludos perritos.

PUBLICACIONES

- ❖ Francis Alarcón, María E. Báez , Manuel Bravo , Pablo Richter and Edwar Fuentes, “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.
- ❖ Francis Alarcón, María E. Báez , Manuel Bravo , Pablo Richter , Graciela M. Escandar , Alejandro C. Olivieri and Edwar Fuentes, “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.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

2012 Espectroscopía de Fluorescencia y Calibración Multivariada: una alternativa a la determinación cromatográfica de PAHs en aceites comestibles. Francis Alarcón, Edwar Fuentes, Pablo Richter, María Báez, Manuel Bravo, Graciela Escandar, Alejandro Olivieri. VI Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Antofagasta, Chile. Oral.

2012 Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Aceites Comestibles mediante Fluorescencia Total y Calibración Multivariada de Segundo Orden: Una alternativa a los Métodos Cromatográficos. Alarcón, F.; Escandar, G.; Olivieri A.; Fuentes, E.; Richter, P.; Báez, M. y Bravo, M. V congreso Iberoamericano de Química Analítica y II Congreso Uruguayo de Química Analítica, Montevideo, Uruguay. Póster.

2011 Espectroscopía de Fluorescencia Total y Calibración Multivariada de Segundo Orden: Evaluación de su capacidad para determinar PAHs en aceites vegetales comestibles. F. Alarcón, A. Olivieri, G. Escandar, M. Báez, E. Fuentes y P. Richter, XXIX Jornadas Chilenas de Química, Termas de Quinamávida, Chile. Oral.

2011 Extracción Líquido-Líquido y Sólido-Líquido asociada al uso de medios miscelares para determinar HAPs en aceites vegetales por espectroscopía de fluorescencia. Luis Godoy, Francis Alarcón, María Báez, Pablo Richter y Edwar Fuentes, XXIX Jornadas Chilenas de Química, Termas de Quinamávida, Chile. Póster.

2010 Alternativas de pre-tratamiento de muestras para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceites vegetales mediante espectroscopía de fluorescencia y calibración multivariada. F. Alarcón, L. Molina, M. E. Báez, P. Richter y E. Fuentes., IV Congreso Iberoamericano de Química Analítica y X Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Concón, Chile. Póster.

2009 Potencialidad de la espectroscopía de fluorescencia para la determinación de PAHs en aceites comestibles mediante calibración multivariada. Francis Alarcón, Edwar Fuentes, María E. Báez, XXVIII Jornadas Chilenas de Química, Chillán, Chile. Póster.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvii
SUMMARY	xix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	4
2.2. Aceites vegetales	11
2.3. Historia del control y la regulación de los PAHs	15
2.4. Métodos analíticos para la determinación de PAHs en aceites vegetales comestibles	17
2.5. Espectroscopía de fluorescencia asociada a quimiometría	18
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3.1. Hipótesis	27
3.2. Objetivo general	27
3.3. Objetivos específicos	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Reactivos y soluciones	29
4.2. Aparatos y “software”	30

4.3.	Preparación de muestras	32
4.3.1.	Extracción líquido-líquido convencional	32
4.3.2.	Extracción líquido-líquido asistida por microondas	32
4.3.3.	Extracción en fase sólida	33
4.4.	Muestras	33
4.4.1.	Método de “screening”	33
4.4.1.1.	Set de muestras de calibración	33
4.4.1.2.	Set de muestras prueba	34
4.4.1.3.	Set de muestras para la evaluación de la eficiencia de MAE-SPE	35
4.4.2.	Método de cuantificación mediante calibración multivariada de segundo orden	35
4.4.2.1.	Set de muestras de calibración	35
4.4.2.2.	Set de muestras de validación	36
4.4.2.3.	Set de muestras prueba	36
4.4.2.4.	Muestras para el estudio de precisión intra e inter-día	37
4.4.2.5.	Aplicación en muestras reales	37
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1.	Espectros de absorción, excitación y emisión de los analitos y matrices	38
5.2.	Extracción L-L asistida por microondas como etapa de extracción de los PAHs	42
5.3.	Método de “clean-up”	44

5.4. Cifras de mérito del método de “screening”	50
5.5. Evaluación de la eficiencia de extracción del método MAE-SPE	54
5.6. Método de cuantificación mediante calibración multivariada de segundo orden	56
5.6.1. Set de muestras de validación	56
5.6.2. Set de muestras prueba	61
5.6.3. Set de muestras prueba conteniendo PAHs inesperados	65
5.6.4. Precisión del método	67
5.6.5. Aplicación en muestras reales	67
6. CONCLUSIONES	71
7. BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXO	86
Propiedades analíticas complementarias del método MAE-SPE asociado a espectroscopía de fluorescencia total junto con U-PLS/RBL.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras moleculares de algunos PAHs.	4
Figura 2. Vía de mono-oxigenación hacia la formación del diol-epóxido adyacente a la región bahía del PAH.	8
Figura 3. Producción mundial de aceites, período 2010-2011.	13
Figura 4. Espectros de (A) excitación (EX) y emisión (EM) de soluciones en n-hexano de 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BkF (verde) y 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de: BaP (negro), DBahA (rojo), BbF (azul), BaA (violeta), BghiP (magenta), e IP (burdeos) a λ_{ex} (nm)/ λ_{em} (nm): 290/410, 270/394, 290/454, 310/406, 290/388, 300/420, y 300/484 para BaP, DBahA, BbF, BkF, BaA, BghiP, e IP, respectivamente; (B) emisión de solución en n-hexano de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaA, BbF, BaP, DBahA, 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BkF y 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BghiP e IP a λ_{ex} : 290 nm; y (C) excitación (EX) y emisión (EM) de soluciones en n-hexano de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AN (azul), ACEN (burdeos), FLT (rosado), FEN (verde), PIR (amarillo), NAF (anaranjado), AC (morado), FLU (magenta) y CR (gris) a λ_{ex} (nm)/ λ_{em} (nm): 340/402, 255 386, 290/464, 264/390, 320/394, 275/380, 280/380, 280/380, y 275/380 para AN, ACN, FLT, FEN, PIR, NAF, AC, FLU y CR, respectivamente.	40
Figura 5. Espectros de absorción y emisión (λ_{ex} : 290 nm) de un aceite de oliva extra-virgen (A y B) y un aceite de maravilla refinado (C) diluidos en n-hexano.	41
Figura 6. 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 OEV obtenido por MAE (A) y MAE-SPE (B).	42
Figura 7. Estructuras químicas de las fases sólidas: sílica, C18, carbón grafitizado no poroso (CGNP) y carbón grafitizado no poroso-aminopropil sílica (CGNP-NH ₂).	45

Figura 8. Espectros de emisión de muestras de aceite OEV fortificadas con una mezcla de 7 PAHs (concentración total: 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$) sometidas a SPE en columnas de sílica, C18, CGNP y CGNP-NH ₂ .	45
Figura 9. Espectros de absorción de feofitina y clorofila (A) y espectros de emisión de PAHs en presencia de feofitina (B) y clorofila (C) antes y después de SPE en columnas de sílica.	47
Figura 10. Gráfico de contorno obtenido para la optimización multi-respuesta: recuperación de PAHs totales e intensidad de emisión del grupo de tocoferoles, de 2 factores: volumen de elución y porcentaje de diclorometano, en términos de la función de deseabilidad de Derringer.	49
Figura 11. Gráficos tridimensionales de las matrices de excitación-emisión correspondientes a: (A) una muestra de calibración conteniendo 1,06 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaA, BbF, BaP, DBahA y BghiP, 0,290 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BkF y 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IP, (B) una muestra de validación conteniendo los 7 PAHs al mismo nivel de concentración, (C) una muestra de aceite OEV orgánico y (D) una muestra de aceite MR.	58
Figura 12. Gráficos de concentraciones predichas por U-PLS/RBL en función de los valores obtenidos por HPLC-FLD para BaA y BaP y las correspondientes regiones elípticas de confianza (95% confianza). El círculo negro en la elipse indica el punto teórico (1,0) de pendiente e intercepto.	64
Figura 13. Gráficos tridimensionales de las matrices de excitación-emisión correspondientes a: (A) una muestra de aceite de oliva puro y (B) una muestra de aceite OEV.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de algunos PAHs	6
Tabla 2. Concentraciones individuales y totales de PAHs en extractos MAE de aceite de oliva extra-virgen.	34
Tabla 3. Concentraciones individuales y totales de PAHs en las muestras OEV fortificadas.	34
Tabla 4. Cifras de merito del método de “screening” MAE-SPE con espectroscopía de fluorescencia, para la determinación de la concentración de PAHs totales en aceites comestibles, obtenidas al aplicar calibración univariada y calibración multivariada.	51
Tabla 5. Concentraciones de PAHs totales predichas en aceites BOEV, BMR y OEV (fortificados a niveles bajos de concentración de PAHs), a través el método MAE-SPE con espectroscopía de fluorescencia utilizando calibración univariada (emisión promedio) y multivariada.	53
Tabla 6. Recuperaciones individuales y totales (%) de los 7 PAHs en muestras de aceite OEV fortificadas sometidas al método MAE-SPE y líquido-líquido clásica-SPE (LL-SPE).	55
Tabla 7. Número de factores óptimos (A) e intervalos de excitación-emisión utilizados en PARAFAC y U-PLS.	57
Tabla 8. Resultados estadísticos de la determinación de PAHs en las muestras de validación.	60
Tabla 9. Parte A. Estudio de recuperación y capacidad predictiva de los 7 PAHs seleccionados en muestras fortificadas de diferentes tipos y marcas de aceites comestibles utilizando U-PLS/RBL y HPLC-FLD como método de referencia.	62

Tabla 9. Parte B. Estudio de recuperación y capacidad predictiva de los 7 PAHs seleccionados en muestras fortificadas de diferentes tipos y marcas de aceites comestibles utilizando U-PLS/RBL y HPLC-FLD como método de referencia.	63
Tabla 10. Parte A. Concentraciones de los 7 PAHs estudiados, determinadas en presencia de los restantes 9 PAHs de la US-EPA, en muestras de aceite OEV orgánico utilizando U-PLS/RBL y HPLC-FLD como método de referencia.	66
Tabla 10. Parte B. Concentraciones de los 7 PAHs estudiados, determinadas en presencia de los restantes 9 PAHs de la US-EPA, en muestras de aceite OEV orgánico utilizando U-PLS/RBL y HPLC-FLD como método de referencia.	66
Tabla 11. Precisión intra-día (n=4) e inter-día (n=4) de muestras de aceite OEV orgánico utilizando U-PLS/RBL.	67
Tabla 12. Concentraciones de PAHs obtenidas por U-PLS/RBL, HPLC-FLD y GC-MS en muestras reales de aceites comestibles de oliva extra-virgen (OEV), oliva puro (OP) y maravilla refinado (MR).	68

ABREVIATURAS

ϕ_{fl}	: rendimiento cuántico de fluorescencia.
λ_{ex}	: longitud de onda de excitación.
λ_{em}	: longitud de onda de emisión.
γ^{-1}	: inverso de la sensibilidad analítica.
AC	: acenafteno.
ACEN	: acenaftileno.
AN	: antraceno.
b	: pendiente.
BaA	: benzo[a]antraceno.
BaP	: benzo[a]pireno.
BbF	: benzo[b]fluoranteno.
BeP	: benzo[e]pireno.
BghiP	: benzo[g,h,i]perileno.
BkF	: benzo[k]fluoranteno.
BMR	: blanco maravilla refinado.
BOEV	: blanco de oliva extra-virgen.
CGNP (GCB)	: carbón grafitizado no poroso (graphitized carbon black).
CR	: criseno.
DBahA	: dibenzo[a,h]antraceno.
FEN	: fenantreno.
FLT	: fluoranteno.
FLU	: fluoreno.
GC-MS	: cromatografía de gases con espectrometría de masas.
HPLC-FLD	: cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia.
IP	: indeno[1,2,3-c,d]pireno
LOD	: límite de detección.
L-L	: extracción líquido-líquido clásica.
Log Kow	: logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua.
LOQ	: límite de cuantificación.

MAE : extracción líquido-líquido asistida por microondas (microwave assisted extraction).

MEE (EEM) : matrices de excitación emisión (excitation emission matrix).

MR (SO) : maravilla refinado (sunflower oil).

NAF : naftaleno.

OEV (EVOO) : oliva extra-virgen (extra-virgin olive oil).

OP : oliva puro.

PAH : hidrocarburos aromáticos policíclicos.

PARAFAC : análisis de factores paralelos (parallel factor analysis).

PCA : análisis por componentes principales (principal component analysis).

PCR : regresión por componentes principales (principal component regression).

PIR : pireno.

PLS : mínimos cuadrados parciales (partial least square).

r : coeficiente de correlación.

REP : error relativo de predicción.

RMSEP : raíz del error cuadrado medio de predicción.

RSD : desviación estándar relativa.

Sb : desviación estándar de la pendiente.

SD : desviación estándar.

SPE : extracción en fase sólida (solid fase extraction).

Sx/y : desviación estándar de la regresión.

US-EPA : Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (United State Environment Protection Agency).

U-PLS : mínimos cuadrados parciales desdoblados (unfolded partial least square).

U-PLS/RBL : mínimos cuadrados parciales desdoblados acoplados a bilinearización residual (unfolded partial least square coupled to residual bilinearization).

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), generados por combustión incompleta de materia orgánica, presentan particular interés debido a sus características cancerígenas y/o mutagénicas. Para el ser humano una de las vías de exposición a los PAHs es el consumo de alimentos grasos como los aceites vegetales. Los principales problemas de la determinación de PAHs en estas matrices oleosas son su baja concentración y la presencia de diversos interferentes. En general, su determinación involucra extracción seguida por “clean-up” y posterior análisis cromatográfico, lo que significa consumo de tiempo y solventes.

En esta investigación se estudió el potencial analítico de la extracción líquido-líquido asistida por microondas con extracción en fase sólida (MAE-SPE) asociado a espectroscopía de fluorescencia, para desarrollar un método rápido de “screening” y un método de cuantificación con el objetivo de detectar simultáneamente siete PAHs de alta masa molar ($228-278 \text{ g mol}^{-1}$) en aceites comestibles de oliva extra-virgen (OEV) y maravilla refinado (MR). Los compuestos estudiados fueron: benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno, dibenzo[*a,h*]antraceno, benzo[*g,h,i*]perileno e indeno[1,2,3-*c,d*]pireno. Para el desarrollo del método de “screening” los datos de fluorescencia de una vía (a una longitud de onda), dos vías (espectros de emisión) y tres vías (matrices de excitación-emisión, MME) fueron utilizados para construir los calibrados de concentración total de PAHs, aplicando regresión lineal simple, mínimos cuadrados parciales (PLS) y mínimos cuadrados parciales desdoblados (U-PLS), respectivamente. El método de cuantificación fue desarrollado utilizando calibración de segundo orden, aplicando mínimos cuadrados parciales desdoblados acoplado a bilinearización residual (U-PLS/RBL) y análisis de factores paralelos (PARAFAC), asociados a matrices de excitación-emisión.

El grupo de tocoferoles y pigmentos (clorofila y feofitina) presentes en los aceites fueron los principales interferentes en la detección de los PAHs por espectroscopía de fluorescencia, observándose solapamiento espectral parcial y fenómenos de filtro interno en el intervalo de longitudes de emisión de los analitos. La eficiencia para

remover estos interferentes utilizando extracción en fase sólida en distintos adsorbentes (sílica, C-18, carbón grafitizado no poroso-CGNP- y fase mixta de CGNP con aminopropil sílica) fue estudiada, encontrando que sílica era la fase más eficiente para eliminar pigmentos y tocoferoles, permitiendo detectar claramente la presencia de los PAHs en los aceites comestibles a través de espectroscopía de fluorescencia. Las recuperaciones individuales de los PAHs luego de aplicar MAE-SPE fueron obtenidas mediante HPLC-FLD, con resultados satisfactorios (62-84%).

Los límites de detección (LOD) alcanzados por el método de “screening” (expresados como concentración total de PAHs) dependieron del uso de datos espectrales de una, dos o tres vías y estuvieron comprendidos entre 0,79 y 7,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. La mejor sensibilidad analítica (0,24 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y el menor LOD (0,79 $\mu\text{g kg}^{-1}$) fue alcanzado aplicando U-PLS a los datos de tres vías. En el método de cuantificación, U-PLS/RBL resultó ser el mejor algoritmo aplicado para resolver la mezcla de PAHs en presencia tanto de matrices oleosas de gran complejidad (aceites de OEV y MR) como de PAHs inesperados. Los límites de detección obtenidos con este método estuvieron entre 0,07 y 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y las concentraciones predichas por U-PLS/RBL fueron satisfactoriamente comparadas con las obtenidas por HPLC-FLD. Por lo que el método propuesto es comparable y competitivo con el método cromatográfico, siendo sus principales ventajas la reducción considerable del tiempo de análisis y el consumo de solventes.

Finalmente, el método propuesto fue aplicado a 21 muestras reales incluyendo muestras comerciales de aceites de OEV, oliva puro (OP) y MR. Ninguna de las muestras de aceite de MR presentó PAHs a niveles de concentración detectables. Sólo en tres muestras de aceite OEV se detectó la presencia de un PAH (BkF). Las concentraciones predichas por el método propuesto fueron comparables con las obtenidas por el método cromatográfico. La muestra de aceite de OP fue la única que presentó más de un analito (BaA, BbF, BkF y DBahA) y sobre-exigió al modelo en las predicciones de BaA y BbF. La gran diferencia en la composición química de un aceite de OP y un OEV o MR provocó la mala descomposición de los datos.

SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), mostly formed by incomplete combustion of organic matter, stand out mainly by their carcinogenic and mutagenic characteristics. For humans one of the routes of exposure for PAHs is the intake of fatty food such as vegetable oils. The major problems in the determination of PAHs in oily matrices are the diversity of potential interferences present in the matrix and the low analyte levels. Most of the methods for determination of PAHs usually implicate an extraction step, followed by clean-up and finally a chromatographic determination, which involve solvent and time consumption.

In this study, the suitability of microwave assisted liquid-liquid extraction coupled to solid phase extraction (MAE-SPE) and fluorescence spectroscopy was investigated to develop a rapid screening and quantification method for the simultaneous determination of seven high molecular weight PAHs ($228\text{-}278\text{ g mol}^{-1}$) in extra-virgin olive oil (EVO) and sunflower oil (SO). The studied compounds were: benz[*a*]anthracene (BaA), benzo[*b*]fluoranthene (BbF), benzo[*k*]fluoranthene (BkF), benzo[*a*]pyrene (BaP), indeno[1,2,3-*c,d*]-pyrene (IP), dibenz[*a,h*]anthracene (DBahA), and benzo[*g,h,i*]perylene (BghiP). For the develop of the screening method fluorescence data of one (one wavelength), two (emission spectrum) and three way (excitation emission matrix, EEM) were used to build the calibration models for total PAHs concentrations, applying simple linear regression, partial least squares (PLS) and unfolded partial least square (U-PLS), respectively. The quantification method was performed using second order calibration applying unfolded partial least square coupled to residual bilinearization (U-PLS/RBL) and parallel factor analysis (PARAFAC), associated with EEMs.

Tocopherols and pigments (chlorophyll and pheopytin) present in oils were the principal interferences on the PAHs detection by fluorescence spectroscopy, observing partial spectral overlap and inner filter effects in the emission of analytes. The efficiency to remove the interferences from oil using solid phase extraction on different adsorbents (silica, C-18, graphitized carbon black -GCB- and dual phase GCB-aminopropyl silica) was studied. The results demonstrated that only silica was efficient enough to remove

pigments and tocopherols, allowing the correct detection of PAHs in edible oils by fluorescence spectroscopy. The individual recoveries of PAHs after the application of MAE-SPE were obtained by HPLC-FLD, with successful results (62-84%).

The limits of detection (LOD) achieved for the screening method (expressed as total concentration of PAHs) depended on the use of one, two or three way spectral data. The LODs were between 0.79 and 7.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The best analytical sensitivity (0.24 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and LOD (0.79 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were achieved applying U-PLS to three way fluorescence data. In the quantification method, U-PLS/RBL was the best algorithm applied to resolve the mixture of PAHs in presence of both complex oily matrices (EVO and SO) and other unexpected PAHs. The LODs obtained were between 0.07 and 2.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the concentrations predicted by applying U-PLS/RBL method were statistically comparable to those provided by the reference HPLC-FLD technique. Hence, the proposed method using here is comparable and competitive to chromatographic method, being their main advantage the reduction of both time of analysis and solvent consume.

Finally, twenty one commercial samples of EVOO, pure olive oil (POO) and SO were analyzed using the proposed method. None of SO samples exhibited PAHs at detectable concentrations. Only in three EVOO samples one PAH was detected (BkF). The predicted concentrations by the proposed method were similar compared to those obtained using the chromatographic method. Exclusively POO sample exhibited more than one PAH (BaA, BbF, BkF and DBahA) and the model was unable to predict the concentration of BaA and BbF concentrations. The great difference between the chemical composition of POO and EVOO or SO produces bad data decomposition.

1. INTRODUCCIÓN

Los PAHs son una familia muy amplia de compuestos orgánicos, constituidos por dos o más anillos aromáticos fusionados conteniendo átomos de carbono e hidrógeno en su estructura (Simon y col. 2008). Se destacan principalmente por las características cancerígenas y/o mutagénicas que presentan particularmente los de alta masa molar (5-6 anillos aromáticos) (Martínez y col. 2005). Se generan como consecuencia de la combustión incompleta de materia orgánica por lo que son incorporados continuamente al medio ambiente tanto por fuentes naturales como antropogénicas (Moret y col. 2002; Teixeira y col. 2007).

Los seres humanos estamos expuestos a los PAHs por inhalación directa de aire, el humo del tabaco, el contacto directo de la piel con suelos, hollín o alquitrán, el consumo de aguas y de alimentos principalmente grasos (animales o vegetales) (Arrebola y col. 2006). De acuerdo a Diletti y col. (2005) una de las principales fuentes de exposición a los PAHs para las personas no fumadoras son los alimentos, los cuales pueden ser contaminados con estos compuestos desde el aire, suelo y agua, y durante el procesado y cocinado.

Debido a su naturaleza lipofílica los PAHs pueden contaminar aceites y grasas, alimentos importantes dentro la dieta alimenticia consumidos tanto de forma directa como indirecta por su incorporación en otros alimentos (Teixeira y col. 2007).

Se ha sugerido que las principales vías de contaminación de los aceites vegetales con estos compuestos son la contaminación ambiental de la materia prima vegetal y la contaminación del aceite debida a su proceso de elaboración en el cual la etapa de secado, los solventes de 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, forman parte de esta fuente (Guillén y col. 2004; Lage y col. 2005; Moret y col. 2005; Teixeira y col. 2007).

Las características negativas de la mayoría de los PAHs de alta masa molar (cancerígenos y/o mutagénicos) sumado a las diversas fuentes de formación de estos compuestos, justifican su control analítico tanto en muestras ambientales como en alimentos (principalmente grasos).

España generó una disposición legal, efectiva desde el 1 de Julio del 2001, en la cual fija un límite máximo de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la suma de ocho PAHs pesados: benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, indeno[1,2,3-c,d]pireno y benzo[g,h,i]perileno; y de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para cada uno en aceite de orujo de oliva (Boletín Oficial del Estado 2001; Guillén y col. 2004; Moret y col. 2005; Purcaro y col. 2008). En Chile a partir del 2003, año en el que se modificó el Decreto Sanitario N° 977 de 1996, se estableció en el artículo 249 de dicho documento, los mismos límites fijados por la legislación española para el mismo grupo de 8 PAHs de alta masa molar, pero haciendo extensiva la prohibición a aceites y grasas comestibles en general (Ministerio de Salud República de Chile 2009).

Los principales problemas asociados a la determinación de PAHs en matrices complejas como en el caso de los aceites y grasas son la presencia de diversos compuestos interferentes y los bajos niveles de concentración de los analitos (Lage y col. 2005). La mayoría de las determinaciones de PAHs en matrices grasas involucran una extracción seguida por un “clean-up” y posterior determinación cromatográfica, lo cual apunta a metodologías que requieren de largos tiempos de preparación y análisis de las muestras, convirtiéndoles en métodos poco prácticos cuando el número de muestras a analizar es elevado. Por otra parte, los métodos cromatográficos, si bien son altamente selectivos y poseen límites de detección bajos, son costosos y requieren volúmenes importantes de solventes de alta pureza para la separación y extracción de los analitos, generando con ello cantidades no despreciables de desechos.

Los métodos espectroscópicos de luminiscencia como la fluorescencia y la fosforescencia son una alternativa más rápida y económica a los métodos cromatográficos clásicos. Sin embargo, la principal desventaja de éstos es su baja

selectividad, especialmente cuando compuestos químicamente similares deben ser cuantificados en matrices complejas. Actualmente una de las formas de mejorar la selectividad de estos métodos es el manejo de sus datos cualitativos y cuantitativos mediante procedimientos multivariados avanzados como la calibración multivariada (Sikorska y col. 2005).

El presente trabajo de tesis doctoral busca desarrollar métodos analíticos que incluyan una adecuada etapa de preparación de muestras, junto a espectroscopía de fluorescencia en asociación con análisis multivariado de datos, para la determinación de PAHs a nivel de residuos en aceites comestibles con el propósito de ser aplicados en aceites vegetales consumidos en Chile.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los PAHs, forman una gran familia de compuestos orgánicos, constituidos por dos o más anillos aromáticos fusionados, conteniendo átomos de carbono e hidrógeno en su estructura. En la Figura 1 se muestran las estructura de algunos PAHs.

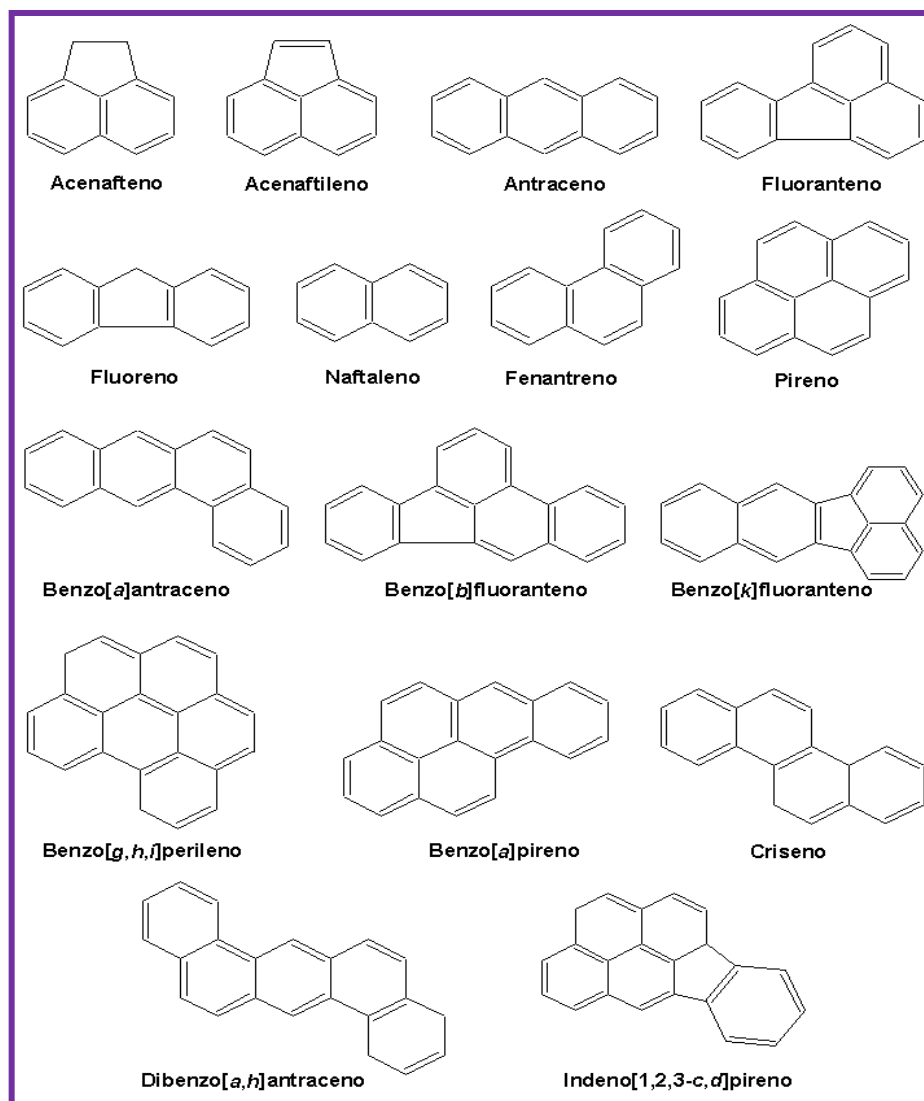


Figura 1. Estructuras moleculares de algunos PAHs.

Las propiedades físico-químicas de los PAHs están gobernadas por el tamaño (referido al número de átomos de carbono) y la forma de las moléculas. A temperatura ambiente todos los PAHs completamente insaturados son sólidos y poseen puntos de fusión y ebullición relativamente altos. Son solubles en lípidos e insolubles en sistemas acuosos. Su solubilidad en agua disminuye con el incremento de su masa molar. Sus presiones de vapor son bajas y están inversamente relacionadas con la masa molar. En la Tabla 1 se presentan las propiedades físico-químicas más importantes de algunos PAHs.

Estructuralmente, los PAHs pueden clasificarse como alternantes o no-alternantes. Los alternantes contienen sólo anillos de seis carbonos mientras que los no-alternantes poseen además, anillos con número impar de carbonos (generalmente 5 o 7). Cuando los anillos bencénicos están fusionados en una distribución lineal, el nombre del PAH termina en aceno, pero si el arreglo es angular su terminación es feno (Dabestani e Ivanov 1999).

De acuerdo a la masa molar los PAHs son clasificados como livianos o de baja masa molar ($152-178 \text{ g mol}^{-1}$), de masa molar intermedia (202 g mol^{-1}) y pesados o de alta masa molar ($228-278 \text{ g mol}^{-1}$). La resistencia a la oxidación, reducción y volatilización aumenta con la masa molar del PAH mientras que la solubilidad en agua disminuye, de ahí que los PAHs pesados son menos reactivos que los livianos. Por otra parte los livianos resultan altamente tóxicos en ambientes acuáticos mientras que los PAHs pesados son conocidos por sus propiedades cancerígenas y/o mutagénicas (Nagpal 1993).

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de algunos PAHs^a.

	Abreviación	Masa Molar (g mol ⁻¹)	Estado físico	Punto de Fusión (°C)	Punto de Ebullición (°C)	Densidad a 20°C (g mL ⁻¹)	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	Log Kow ^b	Presión de Vapor (mm Hg)
Acenafteno	AC	154,2	Sólido	95	96	1,23	1,9	3,98	4*10 ⁻³
Acenaftileno	ACEN	152,2	Sólido	92-93	265-275	-	3,9	4,07	0,029
Antraceno	AN	178,2	Sólido	218	342	1,25	0,08	4,45	2*10 ⁻⁵
Fluoranteno	FLT	202,3	Sólido	111	375	-	0,26	4,90	5*10 ⁻⁶
Fluoreno	FLU	166,2	Sólido	116-117	295	-	1,9	4,18	3*10 ⁻⁴
Naftaleno	NAF	128,2	Sólido	80	218	1,16	30	3,30	0.087
Fenantreno	FEN	178,2	Sólido	100	340	0,98	1,2	4,45	7*10 ⁻⁴
Pireno	PIR	202,3	Sólido	156	393	1,27	0,08	4,88	3*10 ⁻⁶
Benzo[a]antraceno	BaA	228,3	Sólido	158-159	400	1,27	0,010	5,61	2*10 ⁻⁸
Benzo[b]fluoranteno	BbF	252,3	Sólido	168	481	-	1*10 ⁻³	6,04	5*10 ⁻⁷
Benzo[k]fluoranteno	BkF	252,3	Sólido	216	480	-	8*10 ⁻⁴	6,06	9*10 ⁻¹¹
Benzo[g,h,i]perileno	BghiP	276,3	Sólido	273	550	-	3*10 ⁻⁴	6,50	1*10 ⁻¹⁰
Benzo[a]pireno	BaP	252,3	Sólido	179	495	1,35	2*10 ⁻³	6,06	6*10 ⁻⁹
Criseno	CR	228,3	Sólido	255-256	448	-	3*10 ⁻³	5,16	6*10 ⁻⁷
Dibenzo[a,h]antraceno	DBahA	278,4	Sólido	262	524	1,28	5*10 ⁻⁴	6,84	1*10 ⁻¹⁰
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	IP	276,3	sólido	164	530	-	0,06	6,58	1*10 ⁻¹¹

^a Lista de los 16 PAHs de la US-EPA

^b Logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua.

- Dabestani, R.; Ivanov I. N., "Invited Review A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons", Photochemistry and Photobiology, **1999**, 70 (1): 10-34.
- Muller P., "Potential for Occupational and Environmental Exposure to Ten Carcinogens in Toronto", Tox Probe Inc., **2002**, B: 78-95.
 - International Programme on Chemical Safety and the Commission of the European Communities, IPCS-CEC, "Naphthalene", **1999**, ICSC: 0667.

La actividad cancerígena y mutagénica de los PAHs ha sido asociada con el grado de no-planaridad de la molécula. En general, los PAHs planares son más estables, menos reactivos y biológicamente menos tóxicos que los no-planares. Se cree que el aumento en la reactividad de un PAH no-planar se debe al incremento del carácter olefínico de algunos enlaces en la molécula. La sustitución con un grupo metilo u otros grupos en el sistema de anillos aromáticos de los PAH produce una distorsión en la molécula sacándola de su estructura plana. Por ejemplo, el 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno es un compuesto potencialmente cancerígeno más reactivo que el benzo[*a*]antraceno. Por otra parte las propiedades biológicas de los PAHs pueden estar influenciadas por la distorsión provocada por el impedimento estérico entre anillos. Por ejemplo, benzo[*c*]criseno y dibenzo[*def,p*]pireno son potencialmente más cancerígenos que sus isómeros pentaceno y hexaceno, respectivamente (Dabestani e Ivanov 1999).

Los PAHs son compuestos químicos formados por sistemas complejos de anillos (en su mayoría bencénicos) policondensados, lo que les confiere propiedades físico-químicas de alta lipofilidad e inercia frente a reacciones químicas comunes. Por lo tanto, los PAHs son incapaces de actuar por sí mismos como electrófilos, especies que podrían ser blancos directos de un nucleófilo celular como las bases amino presentes en el ADN.

Para que los PAHs puedan generar un efecto cancerígeno, requieren de una conversión enzimática a un derivado electrofílico. Se ha informado que la vía enzimática por la cual se obtienen estos metabolitos biológicamente activos sería: epoxidación en la región anti-K (región K¹: zona olefínica de la molécula), hidrólisis del epóxido primario al dihidrodiol y posterior epoxidación en el doble enlace adyacente generando un diol-epóxido vecinal. El diol-epóxido que induciría la carcinogénesis es el que se forma adyacente a la región bahía del PAH en cuestión. En la Figura 2 se muestra la ruta enzimática de activación de los PAHs (Luch y Baird 2005).

¹K de Krebs palabra de origen Alemán que significa cáncer.

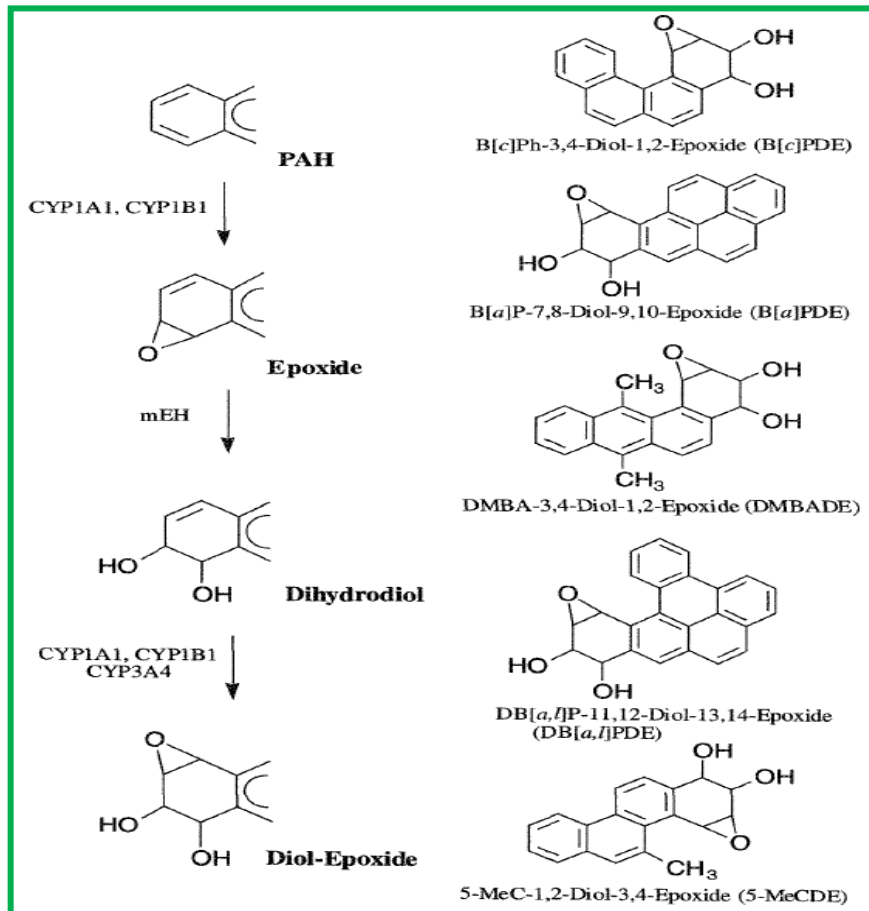


Figura 2. Vía de mono-oxigenación hacia la formación del diol-epóxido adyacente a la región bahía del PAH.

Existen alrededor de 10.000 PAHs pero sólo algunos se encuentran en cantidades considerables en el medio ambiente y los alimentos (Wenzl y col 2006).

Los PAHs se generan e incorporan en el medio ambiente, tanto por fuentes naturales como antropogénicas. Dentro de las fuentes naturales más importantes se encuentran las erupciones volcánicas y los incendios forestales, mientras que las fuentes antropogénicas más reconocidas son la quema de madera, los gases de combustión vehicular, los generadores industriales, los incineradores, la producción de alquitrán, asfalto y petróleo, la combustión incompleta de materia orgánica como: carbón, aceite, gas, basura, tabaco, etc. (Dabestani e Ivanov, 1999).

A nivel atmosférico la presencia de estos contaminantes se debe al uso de combustibles fósiles, la quema de madera y los incendios forestales, pero la principal fuente de contaminación son las emisiones vehiculares (Liu y col. 2007).

En los suelos, la acumulación de estos contaminantes orgánicos puede provenir del depósito de los PAHs asociados al material particulado que se encuentra en la atmósfera, luego de un largo período de transporte (Dabestani e Ivanov, 1999). Lo anterior, puede llevar a una contaminación potencial de vegetales y alimentos y por tanto causar una exposición directa o indirecta al ser humano (Mueller y Shann 2006). Además, la evaporación y migración de los PAHs que contaminan el suelo son posibles fuentes de contaminación de aguas subterráneas y re-contaminación del aire (Srogi 2007).

Las principales vías de contaminación de aguas superficiales son el depósito de PAHs provenientes de la contaminación atmosférica, las descargas urbanas, los efluentes municipales e industriales y los derrames de petróleo. El depósito vía atmosférica incluye depósitos húmedos y secos de partículas y vapores y es considerado la entrada más importante de estos contaminantes en aguas superficiales. La presencia de PAHs en agua potable puede atribuirse al uso de aguas superficiales y subterráneas como fuentes de obtención de agua potable o al uso de cañerías cubiertas de alquitrán en los sistemas públicos de suministro de agua (Srogi 2007).

Debido a su alta hidrofobicidad, los PAHs que entran en el ambiente acuático se asocian rápidamente con sedimentos y partículas suspendidas. La capacidad de retención de PAHs que poseen los sedimentos puede relacionarse con propiedades físico-químicas como el tamaño de partícula y el contenido de materia orgánica. Según Viguri y col. (2002), el contenido de materia orgánica en el sedimento está directamente relacionado con la capacidad de sorción hacia estos hidrocarburos.

Una vez que los PAHs son introducidos al medio ambiente, pueden distribuirse en aire, agua, suelo y sedimentos. De igual forma plantas y animales están expuestos a

estos contaminantes, siendo el destino inequívoco de esta cadena alimenticia el ser humano.

Los seres humanos estamos expuestos a los PAHs por diversas vías, desde la inhalación directa de aire contaminado, el humo del tabaco, el contacto directo de la piel con suelos contaminados, hollín o alquitrán y el consumo de aguas contaminadas hasta el consumo de alimentos, principalmente aquellos de origen graso (animal o vegetal) (Arrebola y col. 2006).

La alimentación aparece como la principal fuente de ingesta de PAHs para aquellas personas no expuestas ocupacionalmente a estos contaminantes (Srogi 2007; Martí y col. 2008). De acuerdo a Diletti y col. (2005) una de las principales fuentes de exposición a los PAHs para las personas no fumadoras son los alimentos, los cuales pueden ser contaminados con estos compuestos desde el aire, suelo y agua, y durante el procesado y cocinado. En este mismo sentido, algunos autores indican que la alimentación sería la principal vía de exposición a los PAHs, sobrepasando la exposición ambiental (Cejpek y col. 1998; Barranco y col. 2003; Wenzl y col. 2006; Pucaro y col. 2007).

Como consumidores de diversos alimentos, estamos expuestos a los PAHs principalmente a través de la ingesta de carnes a la parrilla, carnes rostizadas, pescados, cereales, vegetales, leche, aceites comestibles y grasas (Grova y col 2000; Diletti y col 2005; Grova y col 2006; Cheung y col 2007, Alomirah y col 2011).

2.2 Aceites vegetales

Los aceites vegetales están constituidos principalmente por triglicéridos (95-98%), y una pequeña fracción (2-5%) compuesta por una mezcla compleja de compuestos minoritarios que incluye alcoholes grasos, ceras, ésteres, hidrocarburos volátiles, pigmentos, compuestos fenólicos y ácidos triterpénicos (Sikorska y col. 2004).

Se ha sugerido que las principales vías de contaminación de los aceites vegetales con PAHs son la contaminación ambiental de la materia prima vegetal y la contaminación del aceite debida a su proceso de elaboración en el cual la etapa de secado de los residuos del prensado inicial (orujo), los solventes de 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, forman parte de esta fuente (Guillén y col. 2004; Lage y col. 2005; Moret y col. 2005; Teixeira y col. 2007).

De acuerdo al proceso mediante el cual el aceite vegetal es obtenido se definen diferentes calidades de estos (extra vírgenes, vírgenes, refinados, mezclas de refinados con vírgenes y de orujo). Los aceites extra vírgenes son extraídos directamente desde el fruto o semilla sólo por procesos mecánicos sin requerir otros tratamientos antes de su consumo. Esta ausencia de procesos de refinación ayuda a conservar las propiedades organolépticas y nutricionales que permiten diferenciar un aceite extra virgen de los demás aceites comestibles. Sin embargo, las etapas de refinado podrían ayudar a reducir el contenido de PAHs provenientes de la contaminación de las materias primas a través fuentes externas. Según Teixeira y col. (2007) la deodorización reduce fuertemente el contenido de PAHs livianos, mientras que el proceso de blanqueado con carbón activado sería una estrategia efectiva para reducir el contenido de PAHs pesados. Por otra parte, los aceites de orujo son obtenidos mediante el tratamiento de los residuos sólidos del proceso de extracción, el cual comprende un secado previo del residuo seguido de una extracción con solventes y refinado, incluyendo procesos de blanqueado y deodorización. En estos casos el uso de altas temperaturas tanto en el proceso de secado como de extracción aumentaría el

riesgo de contaminación (debida a procesos de elaboración) de estos aceites con PAHs (Martínez y col. 2005).

En general, la presencia de PAHs ha sido reportada en aceites de oliva, maravilla y pepita de uva (Diletti y col. 2005). Barranco y col. (2003) informan concentraciones elevadas de PAHs en muestras de aceites comerciales españoles de maravilla, palma y oliva (suma de concentraciones de 7 PAHs pesados en $\mu\text{g kg}^{-1}$: 21,6; 5,2; 2,3 respectivamente). Además, destacan la gran reducción de las concentraciones de estos compuestos entre una muestra de aceite de orujo de oliva comercial producida antes y una producida después del verano del 2001 ($298,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $7,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente), lo cual da cuenta del impacto provocado por la aparición de la regulación española en Julio del 2001. Moreda y col. (2004) observaron que de los aceites estudiados, el de maravilla refinado presentó concentraciones sobre los $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la suma de 8 PAHs de interés y de $2,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el caso individual del BaP. Martínez y col. (2005) realizaron un estudio dentro del cual determinaron la concentración de los PAHs regulados por la legislación española en diversas muestras de aceite de orujo de oliva, encontrando que 5 de las 25 muestras analizadas sobrepasaban los límites establecidos en más del doble de las concentraciones permitidas y que del total de PAHs estudiados se observaron cuatro en mayor proporción en aceites de orujo de oliva que fueron excesivamente calentados durante su producción (BaA, BbF, benzo[e]pireno y BaP). Teixeira y col. (2007) determinaron el contenido de PAHs en aceites de maravilla, soya y oliva virgen evaluándolos en muestras comerciales y durante el proceso de refinación de cada uno de ellos. Los autores observaron que para las muestras comerciales el contenido de PAHs (suma de livianos y pesados) fue de $8,8-9,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ en aceites de maravilla, $9,3-10,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ en aceites de soya y $26,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $18,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para las dos muestras de aceite de oliva virgen. Los resultados obtenidos al evaluar el proceso de refinación indicaron que se produce una disminución muy significativa en el contenido total de PAHs a través del proceso de refinado (72%, 87% y 82% para aceite de maravilla, soya y oliva, respectivamente). Recientemente, Ciecierska y Obiedzinski (2013) determinaron la presencia de 19 PAHs en aceites comestibles poco comunes, encontrando concentraciones totales de PAHs entre 23,4 (aceite de semilla de amapola) y $243 \mu\text{g}$

kg⁻¹ (aceite de calabaza). Por otra parte en la mayoría de los aceites fue posible detectar BaA, CR, BbF y BkF. BaP fue detectado en aceites de amaranto, calabaza, sésamo, falso comino y borraja pero sólo en el aceite de calabaza las concentraciones de BaP ($15,7 \pm 0,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ para n=9) superaron los límites establecidos por las regulaciones.

En el escenario mundial de producción y consumo de aceites comestibles de origen vegetal, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estimó que la producción a nivel mundial de estos alimentos grasos para el período 2010-2011 llegaría a 144,8 millones de toneladas. Del total estimado, el 8,0% corresponde a la producción mundial de aceite de maravilla, posicionándose en el cuarto lugar después del aceite de palma, soya y raps, y el 2,0-2,2% al aceite de oliva. Si bien la producción de aceite de oliva sólo representa un poco más del dos por ciento del total de los aceites vegetales producidos a nivel mundial, su producción crece a una tasa de 0,3% anual y el consumo mundial aumenta un 1,0%. En la Figura 3 se muestra la producción por especie de aceite vegetal en el total mundial.

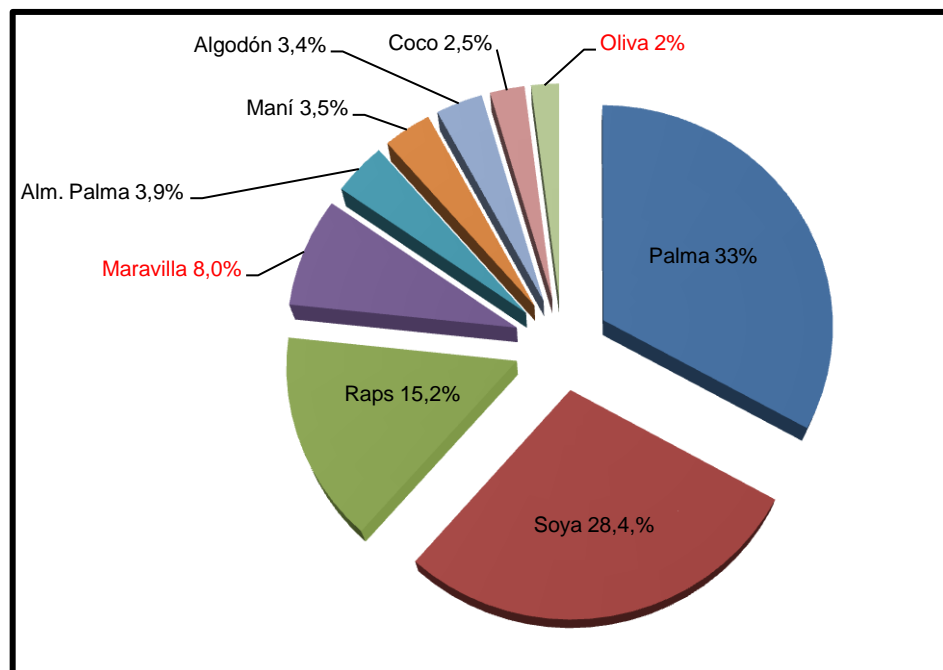


Figura 3. Producción mundial de aceites, período 2010-2011. Total producido: 144,8 millones de toneladas. Fuente: ODEPA.

En Chile, la exportación de aceite de oliva durante el año 2011 fue de 6.700 toneladas, es decir un 120% más que en el 2010, lo cual supone una inserción creciente del producto nacional en el mercado mundial (Chile Oliva 2011). Además se estimó que entre los años 2004 y 2011 el consumo nacional tuvo una variación de 461%, llegando en el año 2011 a $756 \text{ g hab}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y proyectándose un consumo de $900 \text{ g hab}^{-1} \text{ año}^{-1}$ para los próximos años (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias 2012). En cuanto al aceite de maravilla su importancia radica en las importaciones, que ponen en evidencia el gran consumo de este producto en nuestro país (aproximadamente $3 \text{ kg hab}^{-1} \text{ año}^{-1}$). Las importaciones de aceite de maravilla crudo y refinado para el 2011 fueron de 17.123 toneladas lo cual representa un aumento del 142.7% con respecto al 2010 (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias 2011). Aunque los aceites comestibles son reconocidos como una potencial fuente de PAHs para los seres humanos y en nuestro país el consumo de estos alimentos en la dieta diaria es relevante, no hay información disponible sobre el contenido de estos contaminantes orgánicos en los aceites consumidos en Chile.

2.3 Historia del control y la regulación de los PAHs

En el año 1970 la Agencia de Protección del Medioambiente de Estados Unidos (US-EPA) generó una lista de los PAHs más encontrados en muestras medioambientales sobre los cuales enfocó sus investigaciones, la reconocida lista de los 16 PAHs de la US-EPA (Simon y col. 2008). En el 2002 el Comité Científico sobre Alimentos de la Comisión Europea (SCF) evaluó la toxicidad de 33 PAHs y confirmó que ocho de los 16 PAHs listados por la US-EPA y siete adicionales eran los de mayor importancia para la salud humana (European Commission 2002). Los 15 PAHs que la SCF consideró como fundamentales son: BaA, BaP, BbF, BghiP, benzo[*j*]fluoranteno, BkF, CR, ciclopenta[*c,d*]pireno, DBahA, dibenzo[*a,e*]pireno, dibenzo[*a,h*]pireno, dibenzo[*a,i*]pireno, dibenzo[*a,l*]pireno, IP y 5-metilcriseno. En Octubre del año 2005 la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), estudió 60 PAHs y los reclasificó dejando al BaP como cancerígeno (IARC Grupo I), ciclopenta[*c,d*]pireno, DBahA y dibenzo[*a,l*]pireno como probablemente cancerígenos (IARC Grupo IIA) y nueve de los 15 PAHs del SCF: BaA, BbF, benzo(*j*)fluoranteno, BkF, CR, dibenzo(*a,h*)pireno, dibenzo(*a,i*)pireno, IP y 5-metilcriseno como posiblemente cancerígenos (IARC Grupo IIB) (Straif y col. 2005).

Un año antes de que el SCF opinara sobre los riesgos que generaba la presencia de PAHs en los alimentos, controles analíticos realizados a un aceite de orujo de oliva importado por la República Checa dieron como resultado altos niveles de PAHs por lo que de acuerdo con la legislación europea (Dir 92/59) se abrió un rápido procedimiento de alerta que consistió en un intercambio de información con los miembros de la Unión Europea (UE) con el objetivo de prevenir la venta de productos peligrosos para la salud de los seres humanos (Purcaro y col. 2008). En respuesta, España genera una disposición legal que se hace efectiva el 1 de Julio del 2001 en la cual fija un límite máximo de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la suma de ocho PAHs pesados: BaP, benzo[*e*]pireno (BeP), DBahA, BaA, BbF, BkF, IP y BghiP; y de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para cada uno en aceite de orujo de oliva (Boletín Oficial del Estado 2001; Guillén y col. 2004; Moret y col. 2005; Purcaro y col. 2008); disposiciones similares adoptan Italia, Grecia y Portugal (Fromberg y col. 2007). Por otra parte, la legislación canadiense da un límite máximo de $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ para

la suma de los mismos ocho PAHs pesados de la legislación española y la Sociedad Alemana de la Ciencia de la Grasa un límite máximo de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el total de los PAHs presentes y de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la fracción de los PAHs pesados (Barranco y col. 2003). Chile a partir del 2003, año en el que se modificó el Decreto Sanitario N° 977 de 1996, estableció en el artículo 249 de dicho documento, los límites fijados por la legislación española para el mismo grupo de 8 PAHs de alta masa molar pero haciendo extensiva la prohibición a aceites y grasas comestibles en general (Ministerio de Salud República de Chile 2009).

A principios del 2005 la UE introduce una nueva legislación para uniformar los límites de concentración de los PAHs en alimentos en los diferentes países miembros de los estados europeos y en respuesta a los problemas de contaminación destacados en la opinión del SCF en el 2002. Con esta regulación (N° 208/2005) la UE estableció que BaP podría ser utilizado como marcador de la presencia de PAHs en alimentos y que provisoriamente el límite máximo permitido en aceites y grasas de consumo humano directo o como ingrediente en alimentos sería de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por otra parte se recomendó que los países miembros de la UE investigaran los niveles de los restantes PAHs indicados por el SCF y adicionalmente el benzo[c]fluoreno, destacado por la Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives, para revisar los límites establecidos y agregar otras clases de alimentos (The Commission Of The European Communities 2005; Purcaro y col. 2008; Rodríguez y col. 2008; Simon y col. 2008). En el año 2008 la Autoridad Europea de Seguridad de los Alimentos (EFSA) publicó dos informes con los datos reunidos por los miembros de la Comunidad Europea, concluyendo que BaP no era un marcador adecuado de la presencia de PAHs en alimentos pero si lo sería la suma de cuatro PAHs pesados: BaP, CR, BaA y BbF (European Food Safety Authority 2008; Purcaro y col. 2008; Ciecierska y Obiedzinski 2013). Estas disposiciones se hicieron efectivas el año 2011 por medio de la regulación N° 835/2011 que estableció como límite máximo permitido $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la presencia individual de BaP y $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la suma de los 4 PAHs pesados en aceites y grasas comestibles de uso directo o como ingredientes en alimentos (Commission of the European Communities 2011).

2.4 Métodos analíticos para la determinación de PAHs en aceites vegetales comestibles

Los principales problemas asociados a la determinación de PAHs en matrices complejas, como en el caso de los aceites comestibles, son la presencia de diversos compuestos interferentes y los bajos niveles de concentración de los analitos (a nivel de $\mu\text{g kg}^{-1}$) (Lage y col. 2005). La mayoría de las determinaciones de PAHs en estas matrices oleosas involucran una extracción seguida por un “clean-up” y posterior determinación cromatográfica. El proceso de extracción de los PAHs ha sido realizado de diversas formas, como por ejemplo por medio de una 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), extracción en fase sólida (SPE) (Moret y col. 2005; Purcaro y col. 2008), micro-extracción en fase sólida (SPME) (Vichi y col. 2007), extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Zougagh y col. 2004; Lage y col. 2005) y “head-space” (HS) (Arrebola y col. 2006). Diversos procedimientos de “clean-up” basados en la SPE con sorbentes como C18, florisil y sílica (Rose y col. 2007; Teixeira y col. 2007; Simon y col. 2008; Wu y Yu 2012), así como también la cromatografía de permeación en gel (GPC) (Cejpek y col. 1998; Fromberg y col. 2007) han sido utilizados. La determinación analítica de los PAHs se ha llevado a cabo principalmente mediante HPLC-FLD (Moret y col. 2002; Barranco y col. 2003; Moreda y col. 2004; Lage y col. 2005; Martínez y col. 2005; Moret y col. 2005; Teixeira y col. 2007; Ciecierska y Obiedzinski 2013), o cromatografía de gases (GC) acoplado a espectrómetros 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).

Todo lo anterior apunta a metodologías que requieren de largos tiempos de preparación y análisis de las muestras lo cual los convierte en métodos poco prácticos cuando el número de muestras a analizar es alto. Por otra parte, los métodos cromatográficos clásicos si bien son altamente selectivos y poseen límites de detección bajos, son costosos y requieren volúmenes importantes de solventes de alta pureza para la separación y extracción de los analitos, generando con ello cantidades no despreciables de desechos.

2.5 Espectroscopía de fluorescencia asociada a quimiometría

La espectroscopía de fluorescencia asociada a quimiometría es una alternativa más rápida y económica a los métodos cromatográficos clásicos. La principal desventaja de la espectroscopía de fluorescencia es su baja selectividad, especialmente cuando compuestos químicamente similares deben ser cuantificados en matrices complejas. Actualmente una de las formas de mejorar la selectividad de este método es el manejo de sus datos cualitativos y cuantitativos mediante procedimientos multivariados avanzados como la calibración multivariada (Sikorska y col. 2005).

El uso de técnicas multivariadas es considerado parte del campo de la quimiometría y se desarrollaron a partir de los años 70 por Bruce Kowalski y Svante Wold. La quimiometría ha sido definida como la disciplina química que usa las matemáticas, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, entregar la información química más relevante mediante el análisis de los datos y obtener un mayor conocimiento de los sistemas químicos (Christensen y col. 2006).

Cuando se aplica la calibración multivariada, en vez de utilizar sólo uno de los muchos datos obtenidos, se utiliza el intervalo de mayor interés. Esto genera una serie de ventajas como por ejemplo reducir el ruido, que las señales no selectivas puedan volverse selectivas y que sólo se requiera información sobre los analitos y no sobre las demás señales presentes (Bro 2003).

La calibración que habitualmente se utiliza es aquella en la que se correlaciona un vector de concentración con un vector de respuesta, es decir, datos de una vía (calibración de orden cero). Sin embargo, la correlación puede ser realizada entre un vector de concentración y una matriz correspondiente a los espectros de emisión para cada muestra, generando datos de dos vías (calibración de orden uno). En este último caso se puede llevar a cabo una compresión de la información mediante un análisis de componentes principales (PCA) que descompone la matriz de información X en

matrices más pequeñas, una de “scores” (T), una de “loadings” (P) y una matriz E de residuos espectrales, como se indica en la ecuación (1).

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

Esta nueva matriz T es entonces correlacionada con las concentraciones mediante una regresión múltiple llamada regresión por componentes principales (PCR), de este modo el vector de concentraciones para un analito dado (y_n) no es directamente correlacionado con las respuestas instrumentales sino con una matriz más pequeña.

$$y_n = Tv_n + e \quad (2)$$

Donde v_n es el vector de coeficientes de regresión correspondiente y e es el vector que recoge los errores de modelado.

Otra de las técnicas de regresión utilizadas en calibración multivariada de primer orden es la de los mínimos cuadrados parciales (PLS), basado en un método de análisis de factores por el cual un espectro X (matriz) y concentraciones y_n (vector) son transformados simultáneamente en una estructura del tipo:

$$X = TP^T + E \quad (3)$$

$$y_n = Tv_n + e \quad (4)$$

donde, P es la matriz de “loadings”, v_n es el vector de coeficientes de regresión que correlaciona la respuesta y_n de cada analito con la matriz T de “score” y E y e son las matrices de residuos. En este caso los factores v_n y P, describen la máxima correlación posible entre la matriz de datos espectrales y el vector de concentraciones del analito de interés (Brereton 2000; Devos y col. 2002). La principal desventaja de PCR y PLS es que la presencia de interferencias no modeladas genera una mala predicción de las concentraciones.

Cuando se dispone de medidas de fluorescencia total (fluorescencia de excitación-emisión), en las cuales cada muestra proporciona una matriz de datos de fluorescencia de excitación-emisión, se pueden realizar calibraciones multivariadas de tres vías (segundo orden) ya que una serie de matrices de datos obtenidas por múltiples muestras generarán un arreglo de tres vías, X . Uno de los modelos utilizados para la descomposición de datos de tres vías es el análisis de factores paralelos (PARAFAC) cuyo principio es minimizar la suma de cuadrados de los residuos, e_{ijk} , basado en un algoritmo de mínimos cuadrados. La descomposición matricial tiene la forma:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (5)$$

donde el elemento x_{ijk} de X representa los datos por muestra i en los canales instrumentales j y k (por ejemplo longitudes de excitación y emisión). El arreglo de tres vías es entonces descompuesto en un set de “scores”, a_{if} , “loadings” para el modo emisión, b_{jf} , y “loadings” para el modo excitación, c_{kf} . El intervalo del modelo está dado por el número de factores o componentes, F , necesarios para describir la variación sistemática en el arreglo de datos. La etapa crucial en el desarrollo del modelo es la determinación de F (Booksh 1996; Bro 1997; Christensen y col. 2006). Existen varios criterios para su evaluación, como el porcentaje de ajuste y la consistencia del núcleo (Booksh 1996; Bro 2003), que entregan una medida de la variabilidad de los datos experimentales reflejados por el modelo. Valores cercanos a 100 para ambos parámetros es lo deseado.

La descomposición de los datos de tres vías comúnmente entrega una solución matemática única para un número dado de componentes, no existiendo ambigüedades matemáticas en la solución. Además, si el modelo PARAFAC es una descripción de una estructura química, los parámetros del modelo tendrán interpretación química. Específicamente, cada componente PARAFAC será un estimado de la contribución de un fluoróforo y estará representado por el vector de “score” que contendrá las concentraciones relativas, un “loading” de emisión que será un estimado del espectro de emisión y un “loading” de excitación que será un estimado del espectro de excitación. Para evaluar la calidad de los perfiles reconstruidos, se utiliza el criterio de

similaridad (coeficiente de correlación, r) donde se compara el espectro real con el obtenido por el algoritmo PARAFAC. Un valor de r igual a 1 indica coincidencia total.

Otro de los modelos comúnmente utilizados en calibración multivariada de segundo orden es el de los mínimos cuadrados parciales desdoblados (U-PLS). Este modelo opera en dos etapas (Olivieri 2005), primero la información de la concentración es introducida en la etapa de calibración (sin incluir datos de muestras desconocidas) para obtener dos variables latentes: los “loadings” contenidos en la matriz P y los “loadings” de peso contenidos en la matriz W . Estos son estimados a partir de las I matrices de datos de calibración $X_{c,i}$ (de tamaño $J \times K$, donde J y K son el número de canales en cada modo de datos) y los y vectores de concentración ($I \times 1$, donde I es el número de muestras de calibración). Las $X_{c,i}$ matrices son primero desdobladas y luego vectorizadas y agrupadas en una nueva matriz Z_x como se indica en la ecuación (6).

$$Z_x = [\text{vec}(X_{c,1}) | \text{vec}(X_{c,2}) | \dots | \text{vec}(X_{c,I})] \quad (6)$$

Donde “vec” representa la operación de vectorización (desdoblado), que convierte las matrices $J \times K$ en vectores $JK \times 1$. Con esto la matriz Z_x de tamaño $JK \times 1$, es entonces utilizada para llevar a cabo el calibrado aplicando el modelo PLS común, proporcionando un set de “loadings” P y “loadings” de peso 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) (Haaland 1988). Si la calibración fuera exacta, v puede ser empleado para estimar las concentraciones de los analitos en una muestra desconocida utilizando la ecuación (7).

$$y_u = t_u^T v \quad (7)$$

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 (8).

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (8)$$

Sin embargo, cuando las muestras presentan constituyentes inesperados v no puede utilizarse directamente para predecir las concentraciones ya que se genera un gran residuo espectral al reconstruir la matriz X . En este caso U-PLS puede ser acoplado a bilinearización residual (RBL) para obtener la ventaja de segundo orden.

RBL es un procedimiento post-calibrado basado en PCA que permite modelar aquellos constituyentes de la muestra que no están presentes en el calibrado (Öhman 1990; Olivieri 2005, Bortolato 2008). 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 ecuación (9).

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + [\mathbf{B}_{\text{unx}} \mathbf{G}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T] + \mathbf{e}_{\text{RBL}} \quad (9)$$

Donde \mathbf{e}_{RBL} es el error residual de RBL y \mathbf{B}_{unx} , \mathbf{G}_{unx} , y \mathbf{C}_{unx} son obtenidos a partir del PCA (comúnmente realizado por descomposición de valores singulares, SVD) de una matriz residual obtenida luego de reformular el vector \mathbf{e}_{RBL} calculado, asumiendo que las interferencias están ausentes como se indica en la ecuación (10).

$$\mathbf{B}_{\text{unx}} \mathbf{G}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T = \text{SVD}\{\text{reshape} [\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} \mathbf{t}_u]\} \quad (10)$$

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 (9) y variar t_u , con el objetivo de minimizar la norma de \mathbf{e}_{RBL} ($|\mathbf{e}_{\text{RBL}}|$). Durante esta minimización, los perfiles de los constituyentes inesperados son continuamente actualizados a través de la ecuación (6). En la ecuación (9), la

desviación estándar (s_{RBL}) de los residuos puede ser considerada como una medida de la bondad de ajuste (GOF) y está dada por la ecuación (11) (Bortolato 2008).

$$s_{RBL} = \|e_{RBL}\| / [(J - N_{unx})(K - N_{unx}) - A]^{\frac{1}{2}} \quad (11)$$

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 s_{RBL} se estabiliza en un valor comparable con el ruido instrumental cuando el valor correcto de N_{unx} ha sido encontrado. Sin embargo, cuando el número de constituyentes inesperados es elevado, este método no es adecuado dado que la selección de N_{unx} óptimo a través de GOF generalmente subestima el error generalizado del modelo. Una alternativa a este procedimiento de estimación de N_{unx} óptimo es el criterio de validación cruzada generalizada (GCV), en el que primero se define un error residual penalizado (s_{pen}) como:

$$s_{pen} = s_{RBL} \left[(J \times K) / [(J - N_{unx})(K - N_{unx}) - A]^{\frac{1}{2}} \right] \quad (12)$$

Luego para determinar el número óptimo de componentes inesperados se calcula la razón R para un número creciente de N_{unx} , como se indica en la ecuación (13).

$$R = s_{pen}(N_{unx}) / [s_{RBL}(N_{unx} - 1)] \quad (13)$$

El primer valor de N_{unx} para el cual R no exceda a uno corresponde al número óptimo de componentes RBL o componentes inesperados.

A diferencia de lo que ocurre en la calibración multivariada de primer orden con los algoritmos PCR y PLS, la calibración de segundo orden permite predecir las concentraciones de los analitos aún en presencia de interferencias no incluidas en el modelo, lo cual constituye en esencia la ventaja de segundo orden (Olivieri 2008).

Los algoritmos descritos han sido utilizados junto con espectroscopía de fluorescencia para el análisis cuantitativo de diversos compuestos orgánicos incluyendo los PAHs (Sikorska y col. 2004). Los estudios de emisión fluorescente de los PAHs en matrices ambientales complejas con fines analíticos generalmente van acompañados de procedimientos multivariados avanzados puesto que fluorescen a longitudes de ondas muy parecidas y la matriz puede contener interferentes fluorescentes. En este sentido se han empleado espectros de emisión normal o de fluorescencia sincronizada (lo que mejora el potencial analítico de las mediciones) junto a calibración de primer orden o de fluorescencia total (matrices de emisión-excitación) junto a calibración de segundo orden.

Booksh y col. (1996) emplearon la matriz de excitación-emisión (MEE) en conjunto con PARAFAC para determinar naftaleno y estireno, en aguas oceánicas expuestas a contaminación por gasolina. El modelo logró predecir de manera adecuada las concentraciones de estos analitos pese a la presencia de un gran número de interferencias no modeladas, alcanzando límites de detección de $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ y $11 \mu\text{g L}^{-1}$ para naftaleno y estireno respectivamente. Hernández y col. (1998) determinaron simultáneamente seis PAHs de interés ambiental (BaP, BeP, BghiP, coroneno, DBahA e IP) en muestras de aguas marinas y agua potable mediante la técnica de fluorescencia de ángulo variable, utilizando un surfactante no iónico para incrementar su intensidad de fluorescencia, en conjunto con tres modelos de calibración multivariada para la resolución del sistema multicomponente: regresión lineal múltiple (MLR), PLS y redes neuronales artificiales (ANN). Los resultados mostraron la buena capacidad predictiva de los modelos MLR y PLS en comparación con la del modelo ANN. Lo anterior se debe a que en ANN no considera una relación *a priori* entre las variables analizadas y las distintas interferencias espectrales, haciendo más difícil una correcta modelación. Giamarchi y col. (2000) realizaron un estudio para la determinación de una mezcla de cinco PAHs: naftaleno, fluoreno, fenantreno, BaP y fluoranteno utilizando medidas directas de fluorescencia en conjunto con PCR; con el objetivo de fijar de manera adecuada las condiciones de una muestra ambiental, diluyeron los contaminantes en agua potable. Al analizar los espectros independientes para cada PAHs observaron que al excitar a una misma longitud de onda (263 nm)

cada PAHs mostró una λ_{em} específica pero en un intervalo similar (300-500 nm) mientras que el espectro de emisión de la mezcla de los cinco compuestos no permitió distinguir entre uno y otro. Al utilizar PCR y comparar las concentraciones reales con las predichas observaron que el modelo se ajustó adecuadamente a los datos por lo que pese al solapamiento espectral de los PAHs fue posible cuantificarlos sin requerir separaciones previas. Lee y col. (2004) aplicaron la técnica de fluorescencia inducida por láser en conjunto con regresión PLS para detectar fenantreno y pireno en suelos y compararon los resultados con los obtenidos por HPLC. Al evaluar los datos de concentración de ambos métodos obtuvieron coeficientes de correlación de 0,96 y 0,90 para fenantreno y pireno respectivamente. Con los resultados entregados a través de la regresión PLS demostraron que los PAHs en muestras de suelo podían ser discriminados y cuantificados por espectroscopía de fluorescencia inducida por láser. Nahorniak y Booksh (2006) evaluaron la capacidad de la fluorescencia total en conjunto con PARAFAC para determinar BaP, fenantreno y BkF en matrices complejas (extractos de aceite de motor y lixiviados de asfalto) y 2,3-benzofluoreno en presencia de otros PAHs en medio acuoso. Los resultados demostraron que el método permitía determinar estos PAHs en matrices complejas con errores de predicción relativamente bajos en la mayoría de los casos.

Otra aplicación de la espectroscopía de fluorescencia en conjunto con análisis multivariado de datos, es la caracterización de aceites vegetales. Sikorska y col. (2004) realizaron un estudio para caracterizar y diferenciar aceites comestibles comerciales de soya, canola, maíz, maravilla, linaza y oliva utilizando la espectroscopía de fluorescencia total. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de un máximo de emisión (λ_{em}) cercano a 320 nm en todos los tipos de aceite, para una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 290 nm, el que ha sido atribuido a tocoferoles. Por otra parte, en algunos casos se observó un segundo máximo a λ_{ex} de 405 nm y λ_{em} de 670 nm atribuido a pigmentos del grupo clorofilas. Observaron también máximos adicionales en el intervalo medio de longitudes de onda de excitación y emisión pero los compuestos que los provocaron no fueron identificados. Las posiciones exactas de los máximos de emisión de tocoferoles y pigmentos variaron levemente de un aceite a otro lo cual resulta de las diferencias en las respectivas composiciones de cada componente en los

aceites. Los autores citan que el contenido de tocoferoles en la mayoría de los aceites vegetales varía entre 70 y 1.900 mg kg⁻¹ y que el grupo incluye cuatro tocoferoles naturales (α , β , γ y δ) y cuatro tocotrienoles (α T3, β T3, γ T3 y δ T3). El grupo de los pigmentos incluye clorofilas a y b, feofitinas a y b y carotenoides (Díaz y col. 2003). Estos mismos autores realizaron una comparación entre las técnicas de fluorescencia total y sincronizada para clasificar distintos aceites comestibles: soya, canola, maní, oliva, pepita de uva, linaza y maíz, encontrando que ambos métodos permitían discriminar de forma adecuada los distintos tipos de aceites (Sikorska y col. 2005). Zandomeneghi y col. (2005) estudiaron los espectros de fluorescencia, utilizando la técnica front-face, de cuatro aceites de oliva extra vírgenes de distintas ciudades italianas producidos en años diferentes y de aceites de maní y maravilla. Los resultados indicaron la presencia de los mismos componentes indicados por E. Sikorska y col. (2004); los diferentes aceites de oliva mostraron espectros que variaban en su contenido de tocoferoles y pigmentos por lo que los autores indican que es posible utilizar la información de los espectros de emisión fluorescente para caracterizar un aceite de oliva de un año, origen geográfico y cultivo en particular. En los aceites de maní y maravilla observaron corrimientos en los máximos correspondiente a los tocoferoles a longitudes de onda más largas (400-500 nm) con respecto al aceite de oliva (máximos entre 300-400 nm) y sólo el aceite de maravilla presentó un máximo cerca de 666 nm revelando la presencia de derivados fluorescentes de la clorofila.

Pese al potencial que posee la espectroscopía de fluorescencia en asociación con la calibración multivariada de datos para determinar mezclas de PAHs en matrices complejas, no hay investigaciones que informen su utilización en aceites comestibles. De acuerdo a lo anterior, esta investigación busca desarrollar métodos analíticos que incluyan una adecuada etapa de preparación de muestras, junto a espectroscopía de fluorescencia en asociación con análisis multivariado de datos, para la determinación de PAHs a nivel de residuos en aceites comestibles con el propósito final de ser aplicados a aceites comúnmente consumidos en nuestro país.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La extracción líquido-líquido asistida por microondas con posterior extracción en fase sólida (MAE-SPE), asociada a espectroscopía de fluorescencia con análisis univariado o multivariado de datos, puede ser utilizado como un método rápido y fácil para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos pesados (PAHs) en aceites de oliva extra-virgen y maravilla refinado.

3.2. Objetivo General

Desarrollar un método analítico eficiente para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos a nivel de residuos en aceites comestibles considerando para ello una adecuada preparación de muestras, espectroscopía de fluorescencia y calibración multivariada con la finalidad de ser aplicados a productos de este tipo comúnmente consumidos en Chile.

3.3. Objetivos Específicos

- Estudiar los espectros de absorción, excitación y emisión de aceites comestibles de oliva y maravilla y de los PAHs: benzo[*a*]pireno, dibenzo[*a,h*]antraceno, benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, indeno[1,2,3-*c,d*]pireno y benzo[*g,h,i*]perileno en solvente.
- Proponer y desarrollar métodos de preparación de muestras mediante extracción líquido-líquido y/o extracción en fase sólida, con fines de extracción y limpieza, de modo que permitan eliminar o disminuir los interferentes en la determinación de los PAHs mediante espectroscopía de fluorescencia.
- Evaluar la efectividad del procedimiento de limpieza de la muestra por medio de la espectroscopía de fluorescencia.

- Evaluar la recuperación de los analitos de interés mediante un método cromatográfico de referencia, HPLC-FLD.
- Desarrollar un método analítico de “screening” basado en espectroscopía de fluorescencia junto con calibración univariada ó multivariada, de primer orden de tipo PLS ó de segundo orden del tipo U-PLS, para la determinación de los PAHs en los aceites seleccionados.
- Evaluar la factibilidad de utilizar la espectroscopía de fluorescencia total junto con calibración multivariada de segundo orden del tipo PARAFAC y U-PLS/RBL, para cuantificar los PAHs de interés en los aceites comestibles mencionados.
- Validar los métodos basados en espectroscopía de fluorescencia, evaluando distintos parámetros de calidad analítica: límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, selectividad, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad y sus capacidades predictivas en presencia de otros PAHs.
- Aplicar los métodos propuestos a muestras de aceites comestibles de oliva y maravilla disponibles en el mercado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y soluciones

Se trabajó con estándares sólidos certificados de acenaftileno (ACEN), antraceno (AN), fenantreno (FEN), fluoranteno (FLT), fluoreno (FLU), benzo[*b*]fluoranteno (BbF), benzo[*k*]fluoranteno (BkF) e indeno[1,2,3-*c,d*]-pireno (IP) marca Accustandard (New Haven, CT, USA), acenafteno (AC), pireno (PIR) y criseno (CR) marca Supelco (Bellefonte, PA, USA), naftaleno (NAF), benz[*a*]antraceno (BaA) y benzo[*g,h,i*]perileno (BghiP) marca Aldrich (Steinheim, Germany), benzo[*a*]pyrene (BaP) y dibenzo[*a,h*]antraceno (DBahA) marca Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) y clorofila a marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Se utilizó n-hexano y acetona marca Merck (Darmstadt, Germany) grado análisis de residuos de pesticidas; acetonitrilo y 2-propanol marca Merck (Darmstadt, Germany) y diclorometano marca Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, PH, USA) grado HPLC. Todos los solventes fueron usados como se recibieron.

Las soluciones “stock” de los PAHs puros ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) fueron preparadas en acetonitrilo. A partir de ellas, soluciones más diluidas ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) en n-hexano fueron elaboradas tomando volúmenes apropiados de las soluciones “stock”, evaporándolos con nitrógeno y diluyendo en n-hexano. Todas las soluciones fueron almacenadas a 4 °C en viales ámbar silanizados y protegidas de la luz. Las soluciones permanecen estables por un período de seis meses. Los estándares sólidos así como las soluciones de PAHs fueron manipulados con extrema precaución, utilizando guantes y ropa de protección.

La solución “stock” de clorofila a ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue preparada en acetona. A partir de ésta se preparó una solución de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de feofitina a en acetona mediante acidificación con ácido clorhídrico (1 mol L^{-1}) de 10 mL de solución de clorofila a de acuerdo a lo descrito por Galeano y col. (2003).

Para el estudio de “clean-up” mediante extracción en fase sólida se utilizaron columnas Discovery® DSC-Si sílica (12 mL, 2 g), ENVI-Carb® (6 mL, 0,5 g) y ENVI-Carb/LC-NH₂ (6 mL, 1 g) marca Supelco (Bellefonte, PA, USA) y SuperSPE® C18 (6 mL, 0,5 g) marca Luknova (Mansfield, MA, USA).

4.2. Aparatos y “software”

Para la preparación de muestra se utilizó un sistema de microondas Milestone (Soriso, BG, Italy) equipado con una unidad de digestión por 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 rotor con 10 posiciones.

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 fluorescencia utilizados para la calibración de orden cero y primer orden fueron registrados a λ_{ex} : 290 nm y λ_{em} : 310 nm a 700 nm cada 2 nm a una velocidad de barrido de 600 nm min⁻¹ utilizando un promedio de tres barridos. Mientras que los espectros de excitación-emisión fueron registrados en los intervalos: λ_{ex} : 250-400 nm cada 5 nm y λ_{em} : 370-550 nm cada 2 nm, a una velocidad de barrido de 600 nm min⁻¹. Se trabajó con una celda de cuarzo de 1,00 cm y los “slit” de excitación y emisión se fijaron en 10 nm. Los espectros fueron guardados en formato ASCII para su manipulación posterior.

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) se realizaron en un cromatógrafo líquido marca Waters (Milford, MA, USA) equipado con una bomba cuaternaria Waters 600, un detector de fluorescencia Waters 2475 multi- λ y un “autosampler” Waters 717 Plus. El sistema de control, la adquisición y procesado de los datos se llevó a cabo con el “software” Empower. Para la separación cromatográfica de los PAHs se utilizó una columna

Intertsil HPLC ODS-P (250 x 4,6 mm diámetro interno, 5 μm tamaño de partícula) marca GL Sciences (Tokyo, Japan). La temperatura de la columna se mantuvo constante a 30 °C para obtener tiempos de retención reproducibles. La fase móvil usada consistió en una mezcla de acetonitrilo (A) y agua (B) y se trabajó a un flujo de 1,4 mL min⁻¹. El programa de elución optimizado fue: 0-10 min gradiente lineal de 70 a 90% A; 10-15 min 90% A isocrático; 15-20 min gradiente lineal de 90 a 100% A; 20-32 min 100% A isocrático y regreso a las condiciones iniciales; 32-35 min gradiente lineal de 100 a 70% A; 35-38 min 70% A isocrático. Se utilizó un volumen de inyección de 20 μL . Para la detección de los PAHs se trabajó simultáneamente con cuatro canales para definir los pares de longitudes de onda de excitación y emisión (λ_{exc} / λ_{em}): canal A 220/330; canal B 292/410; canal C 292/426; y canal D 300/500. La identificación de los PAHs se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_r en minutos) con los obtenidos para los estándares en las mismas condiciones. La identificación de los picos cromatográficos fue confirmada además mediante el método de co-inyección de extractos de aceites fortificados con los estándares correspondientes.

Los análisis por cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) fueron realizados por un laboratorio nacional de servicios.

Las rutinas para el pre-tratamiento (eliminación 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). Las rutinas empleadas para PLS, PARAFAC y U-PLS/RBL se encuentran disponibles en internet (<http://www.models.kvl.dk/algorithms>). Los algoritmos fueron implementados utilizando la interface gráfica MVC1 y MVC2, también disponible en internet (<http://www.chemometry.com>).

4.3. Preparación de muestras

4.3.1 Extracción líquido-líquido convencional

Como método convencional de extracción líquido-líquido (L-L) se utilizó el procedimiento propuesto por Martínez y col. (2005), con algunas modificaciones. Una masa de $1,00 \pm 0,01$ g de muestra de aceite fue pesada en un tubo de centrifuga y 10 mL de acetonitrilo fueron adicionados. La mezcla fue agitada vigorosamente por 3 min en un agitador por vortex y sonicada por 5 min. La suspensión fue centrifugada a 2500 rpm por 5 min y la capa superior transferida a un balón de fondo redondo de 50 mL utilizando una pipeta Pasteur. La extracción se repitió adicionando 10 mL de acetonitrilo al aceite restante. Luego de 3 etapas de extracción los extractos reunidos en el balón fueron evaporados a sequedad utilizando un equipo de rota-evaporación al vacío con un baño termo-regulado de agua a 65°C . El residuo fue pesado para determinar la masa de aceite co-extraída y luego re-disuelto en 2 mL de n-hexano para su análisis por fluorescencia o en 1 mL de n-hexano para su posterior “clean-up” por extracción en fase sólida.

4.3.2 Extracción líquido-líquido asistida por microondas

Para la extracción L-L asistida por microondas (MAE) se utilizó un sistema previamente diseñado en el laboratorio (Fuentes y col. 2009). Una masa de $1,00 \pm 0,01$ g de muestra de aceite fue pesada en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con boca esmerilada y 30 mL de acetonitrilo fueron adicionados. Un condensador de bolas fue adaptado al esmeril del matraz y el sistema fue introducido en el microondas por 19 min a 150 W. Un máximo de 8 muestras fue extraído al mismo tiempo. Una vez enfriado el sistema, los condensadores fueron lavados con 2 mL de acetonitrilo y posteriormente removidos del matraz. El extracto fue cuidadosamente transferido con pipeta Pasteur a un balón de fondo redondo de 50 mL y evaporado a sequedad en un equipo de rota-evaporación al vacío con un baño termo-regulado de agua a 65°C . El residuo fue pesado para determinar la masa de aceite co-extraída y luego re-disuelto

en 2 mL de n-hexano para su análisis por fluorescencia o en 1 mL de n-hexano para su posterior “clean-up” por extracción en fase sólida.

4.3.3 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida como etapa de “clean-up” fue realizada utilizando una columna de 2 g de sílica previamente lavada con 5 mL de diclorometano y acondicionada con 5 mL de n-hexano. Luego, 1 mL de extracto final obtenido por extracción L-L (convencional o MAE) fue cargado sobre la columna (1 mL para extractos de aceite de oliva y 0.5 mL para extractos de aceite de maravilla) y los PAHs eluídos con 15 mL de una mezcla n-hexano:diclorometano 80:20 (v/v). El eluato fue recolectado en un vial ámbar de 22 mL y evaporado con flujo de nitrógeno. El residuo fue disuelto en 3 mL de n-hexano y 2 mL fueron utilizados para el análisis por espectroscopía de fluorescencia; el volumen restante fue evaporado a sequedad con flujo de nitrógeno y re-disuelto en 1 mL de 2-propanol para el análisis por HPLC-FLD.

4.4. Muestras

4.4.1 Método de “screening”

4.4.1.1 Set de muestras de calibración

Se trabajó con un set de 7 muestras de calibrado consistentes en extractos de aceite de oliva extra-virgen fortificados con cantidades crecientes de los 7 PAHs (Tabla 2) al final de la etapa de MAE descrita anteriormente. Los extractos fueron luego llevados a la etapa de “clean-up” por SPE y finalmente analizados por espectroscopía de fluorescencia bajo las condiciones descritas.

Tabla 2. Concentraciones individuales y totales de PAHs en extractos MAE de aceite de oliva extra-virgen.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							Total
	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	
C1	0,40	0,40	0,10	0,40	0,40	0,40	0,80	3,0
C2	1,0	1,0	0,25	1,0	1,0	1,0	2,0	8,0
C3	2,0	2,0	0,50	2,0	2,0	2,0	4,0	14
C4	3,0	3,0	0,75	3,0	3,0	3,0	6,0	22
C5	5,0	5,0	1,2	5,0	5,0	5,0	10	36
C6	8,0	8,0	2,0	8,0	8,0	8,0	16	58
C7	12	12	3,0	12	12	12	24	88

4.4.1.2 Set de muestras prueba

Con el objetivo de evaluar la capacidad predictiva del método de “screening” se preparó un set de muestras prueba constituido por muestras blanco de aceite de oliva extra-virgen (BOEV) y maravilla refinado (BMR) y muestras de aceite de oliva extra-virgen (OEV) fortificadas con los 7 PAHs a niveles bajos de concentración. En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de cada analito en las muestras OEV fortificadas.

Tabla 3. Concentraciones individuales y totales de PAHs en las muestras OEV fortificadas.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							Total
	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	
OEV1	4,0	0,25	1,0	0,25	0,25	0,25	5,0	11
OEV2	0,25	0,25	0,16	0,25	0,25	0,25	1,0	2,4
OEV3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,0	0,00	4,0
OEV4	0,40	0,40	0,10	0,40	0,40	0,40	0,80	3,0

4.4.1.3 Set de muestras para evaluación de la eficiencia de extracción de MAE-SPE

Un set de 6 muestras de aceite OEV fortificadas al mismo nivel de concentración fue utilizado para evaluar la capacidad de extracción del método MAE-SPE y compararlo con el método de extracción L-L clásico-SPE. Las muestras fueron fortificadas con $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de BaA, BbF, BaP, DBahA y BghiP; $1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ de BkF; y $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ de IP (PAHs totales $31,6 \mu\text{g kg}^{-1}$) y divididas en dos grupos para aplicar ambos métodos de preparación de muestra. Los extractos MAE-SPE y L-L clásica-SPE fueron analizados por HPLC-FLD para determinar las recuperaciones individuales de los analitos y espectroscopía fluorescencia con calibración multivariada como método de "screening" para determinar la recuperación de PAHs totales.

4.4.2 Método de cuantificación mediante calibración multivariada de segundo orden

4.4.2.1 Set de muestras de calibración

Se preparó un set de 17 muestras de calibración conteniendo los 7 PAHs estudiados en n-hexano a partir de las soluciones diluidas de cada analito. Del set de 17 muestras, 12 de ellas correspondieron a soluciones preparadas de acuerdo a un diseño Palackett-Burman. Las concentraciones utilizadas estuvieron en el intervalo de: $0-2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para BaA, BbF, BaP y DBahA; $0-0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ para BkF; $0-4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para BghiP; y $0-2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para IP. Las restantes 5 muestras correspondieron a una solución blanco, una solución conteniendo los 7 PAHs a una concentración intermedia ($1,06 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaA, BbF, BaP, DBahA y BghiP; $0,29 \mu\text{g L}^{-1}$ de BkF; y $1,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de IP), una solución de $2,00 \mu\text{g L}^{-1}$ BbF y dos soluciones de BghiP a diferentes concentraciones ($2,00$ y $4,00 \mu\text{g L}^{-1}$). Los espectros de excitación-emisión de las muestras fueron obtenidos y los datos sometidos al análisis de segundo orden.

4.4.2.2 Set de muestras de validación

Un conjunto de 11 muestras de aceite OEV orgánico, obtenido en un supermercado de Santiago, fue utilizado para preparar el set de validación. Las muestras fueron procesadas de acuerdo al método de preparación MAE-SPE descrito anteriormente y fortificadas en la etapa final del proceso con diferentes volúmenes (orden de μL) de las soluciones diluidas de los 7 PAHs seleccionados. Los espectros de excitación-emisión (matrices de excitación-emisión, MEE) fueron obtenidos y los datos sometidos al análisis de segundo orden. Las muestras de validación fueron preparadas utilizando el mismo intervalo de concentraciones definido en el set de calibración.

4.4.2.3 Set de muestras prueba

Con el propósito de evaluar la aplicabilidad del método investigado, se analizaron muestras de distintas marcas y tipos de aceites comestibles. Para este propósito, muestras de cuatro marcas de aceite OEV y dos de aceite de maravilla refinado (MR) fueron obtenidas en supermercados de Santiago. Debido a que estas muestras no contienen PAHs o sus concentraciones están bajo los límites de detección de los métodos estudiados, fueron fortificadas con los 7 PAHs al comienzo del proceso para realizar un estudio de recuperación y capacidad predictiva de los métodos. Luego de la fortificación, las muestras fueron sometidas al método de preparación de muestra MAE-SPE descrito y las MEE fueron obtenidas. Un total de 25 muestras reales fortificadas fueron preparadas para este propósito: 17 muestras incluyendo 4 marcas diferentes de aceites OEV y 8 muestras incluyendo 2 marcas distintas de aceite MR. Las muestras fueron también analizadas por HPLC-FLD como método de referencia (Simon y col. 2008).

Por otra parte, con el objetivo de evaluar la capacidad predictiva de los modelos en presencia de PAHs potencialmente interferentes, un segundo set prueba de 4 muestras de aceite OEV orgánico conteniendo los restantes 9 PAHs de la US-EPA (a una concentración de $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada uno) fue preparado. Las concentraciones de los 7 PAHs estudiados fueron: $4,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de BaA, BbF, BaP y DBahA; $2,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ de BkF; y

6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de BghiP e IP. Este segundo set de muestras prueba fue analizado también por HPLC-FLD como método de referencia.

4.4.2.4 Muestras para el estudio de precisión intra e inter-día

Para el estudio de precisión intra e inter-día un conjunto de 8 muestras de aceite OEV orgánico, fortificadas con 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de BaA, BbF, BaP y DBahA; 0,75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de BkF; y 6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de BghiP e IP, fueron preparadas mediante el método MAE-SPE y las MEE fueron obtenidas. Del total de muestras, cuatro fueron preparadas el mismo día para el estudio de precisión intra-día y las restantes cuatro en días distintos (una muestra por día) para el estudio de precisión inter-día.

4.4.2.5 Aplicación en muestras reales

Finalmente un set de 21 muestras reales de aceites comestibles (14 marcas de aceite OEV, una de aceite de oliva puro, 5 marcas de aceite MR y una de aceite de MR utilizado para preparar pescado frito) fueron analizadas por el método propuesto, HPLC-FLD como método de referencia y GC-MS como método confirmatorio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Espectros de absorción, excitación y emisión de los analitos y matrices

Los espectros de excitación y emisión de los analitos así como los espectros de absorción y emisión de las matrices fueron obtenidos en n-hexano. En la Figura 4A se muestran los espectros de excitación y emisión de los 7 PAHs estudiados. Se observa que la diferencia en sus rendimientos cuánticos hace necesaria la mayor dilución de BkF ($\phi_{fl} = 1$; Debastani y col. 1999) y la menor dilución de BghiP e IP. Además, pese a que cada PAH tiene máximos de emisión específicos, el solapamiento espectral es evidente. En la Figura 4B se ilustra el espectro de emisión obtenido para una mezcla de los 7 PAHs; como resultado cuatro máximos de emisión fueron observados: 403, 426, 455 y 500 nm. En la Figura 4C se muestran los espectros de excitación y emisión de los restantes 9 PAHs de la US-EPA. Es notorio que el solapamiento espectral de los analitos estudiados se tornaría más complejo si estos PAHs estuviesen presentes. Por lo tanto la determinación fluorimétrica simultánea de estos compuestos orgánicos representa un desafío analítico.

En la Figura 5 se muestran los espectros de absorción y emisión (para λ_{exc} : 290 nm) de un aceite OEV y un aceite MR diluidos en n-hexano. En ambos aceites, el máximo con absorción en el intervalo 250-320 nm y emisión en 310-370 nm (Figuras 5A y 5C) ha sido atribuido principalmente a tocoferoles (Sikorska y col. 2005). Estudios recientes han demostrado que, en el caso de los aceites OEV, compuestos fenólicos derivados de glucósidos presentes en los olivos contribuyen también al máximo mencionado (Zandomenighi y col. 2005; Sikorska y col. 2008). Un segundo máximo a longitud de onda más larga con absorción en 360-510 nm y emisión en 610-700 nm fue observado particularmente en el aceite de oliva (Figura 5B) y ha sido atribuido a diferentes pigmentos (Zandomenighi y col. 2005; Sikorska y col. 2008; Moyano y col. 2010). El máximo de absorción observado en el intervalo 360-450 nm ha sido asignado al grupo de clorofilas (clorofila *a* y *b* y feofitina *a* y *b*) (Galeano y col. 2003) y se encontraría solapado con el máximo ubicado entre 450 y 520 nm atribuido a los carotenoides (Sikorska y col. 2008). Por otra parte, un máximo de emisión menos

intenso a 410 nm presente en aceite MR (Figura 5C) ha sido asignado a productos de oxidación (Sikorska y col. 2005). De acuerdo con estas observaciones, la obtención los espectros de emisión de los PAHs en el intervalo 380-550 nm en presencia de las matrices oleosas podría verse influenciada por fenómenos de filtro interno debido al grupo de pigmentos presentes y solapamiento espectral debido a polifenoles y tocoferoles. Por lo que una adecuada preparación de muestra es requerida para la correcta determinación y cuantificación de los analitos.

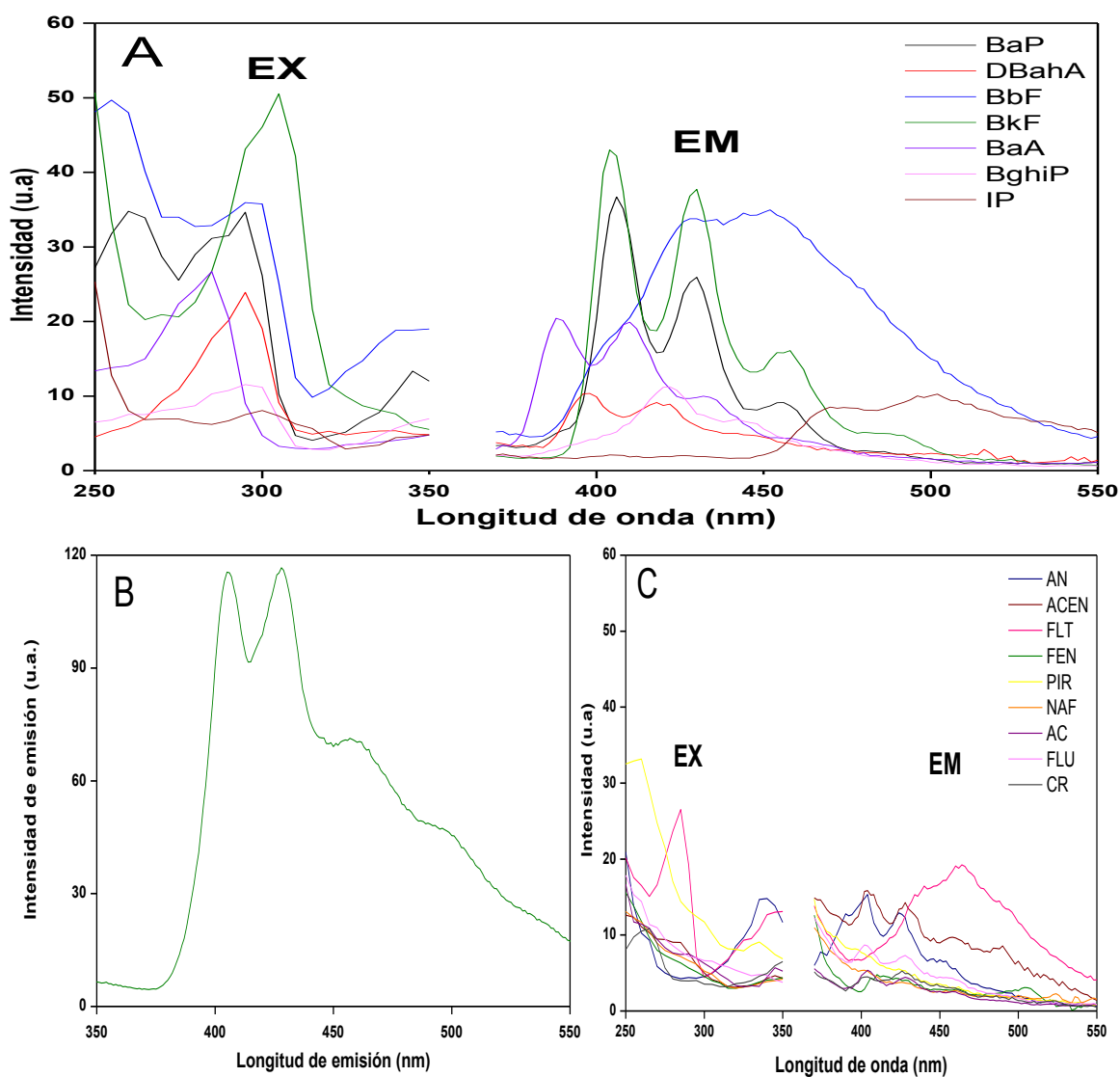


Figura 4. Espectros de (A) excitación (EX) y emisión (EM) de soluciones en n-hexano de $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de BkF (verde) y $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de: BaP (negro), DBahA (rojo), BbF (azul), BaA (violeta), BghiP (magenta), e IP (burdeos) a λ_{exc} (nm)/ λ_{em} (nm): 290/410, 270/394, 290/454, 310/406, 290/388, 300/420, y 300/484 para BaP, DBahA, BbF, BkF, BaA, BghiP, e IP, respectivamente; (B) emisión de solución en n-hexano de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaA, BbF, BaP, DBahA, $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de BkF y $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de BghiP e IP a λ_{exc} : 290 nm; y (C) excitación (EX) y emisión (EM) de soluciones en n-hexano de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de AN (azul), ACEN (burdeos), FLT (rosado), FEN (verde), PIR (amarillo), NAF (anaranjado), AC (morado), FLU (magenta) y CR (gris) a λ_{exc} (nm)/ λ_{em} (nm): 340/402, 255 386, 290/464, 264/390, 320/394, 275/380, 280/380, 280/380, y 275/380 para AN, ACN, FLT, FEN, PIR, NAF, AC, FLU y CR, respectivamente.

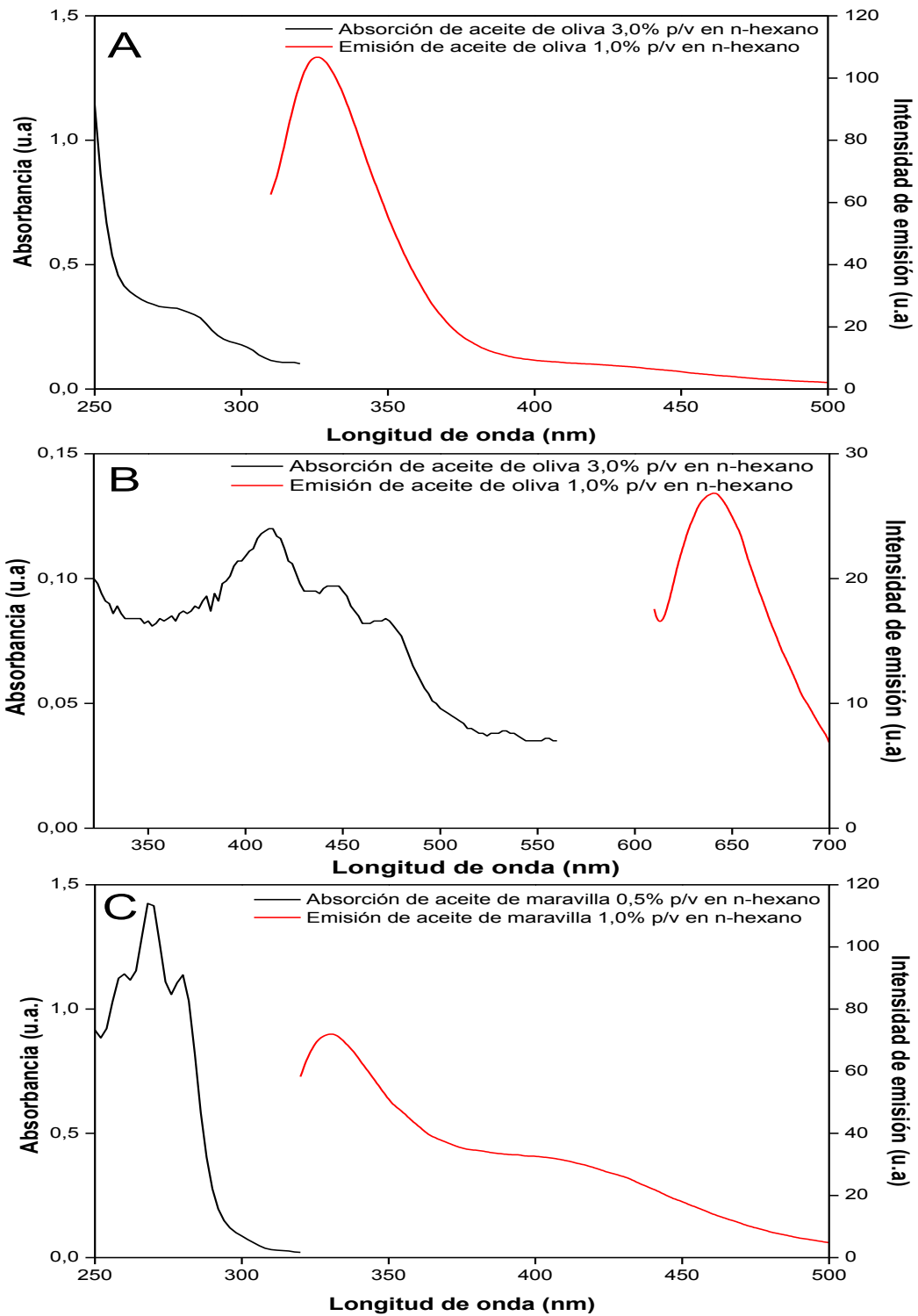


Figura 5. Espectros de absorción y emisión (λ_{exc} : 290 nm) de un aceite de oliva extra-virgen (A y B) y un aceite de maravilla refinado (C) diluidos en n-hexano.

5.2. Extracción L-L asistida por microondas como etapa de extracción de los PAHs

Se realizó extracción líquido-líquido asistida por microondas (MAE) a presión atmosférica, como una alternativa a la extracción L-L convencional, para extraer PAHs desde aceites de oliva y maravilla previo a la determinación fluorimétrica. Como primera etapa, se evaluó el perfil de emisión de los analitos en presencia de los compuestos co-extraídos desde los aceites, para lo cual se aplicó MAE a muestras blanco de un aceite OEV bajo las condiciones descritas previamente (punto 4.3.2). Los extractos MAE fueron fortificados con cantidades crecientes de PAHs (Tabla 2) y posteriormente analizados por espectroscopía de fluorescencia.

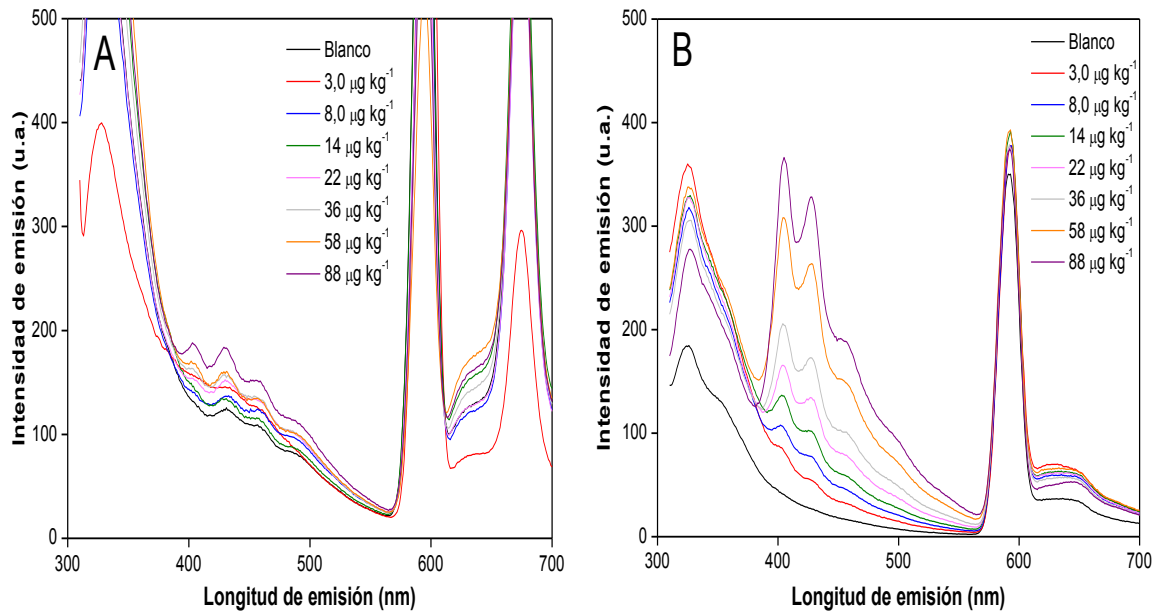


Figura 6. Espectros de emisión de una mezcla de 7 PAHs (concentración total: 3,0; 8,0; 14; 22; 36; 58 y 88 µg kg⁻¹) en presencia de un extracto de aceite OEV obtenido por MAE (A) y MAE-SPE sobre sílica (B).

El valor promedio de residuos co-extraídos desde los aceites en las muestras OEV fue de 91 ± 7 mg/g de aceite. Como se observa en la Figura 6A, la emisión de los PAHs se ubica en la zona de menor intensidad de fluorescencia de los aceites (380-550 nm). Sin embargo, el tocoferol co-extraído (emisión en 310-370 nm) presenta un solapamiento espectral parcial con los analitos y el incremento de la intensidad de emisión de los PAHs no es proporcional al aumento de sus concentraciones. Esto último fue atribuido a un fenómeno de filtro interno producido principalmente por la presencia del grupo de clorofilas y feofitinas en los extractos MAE, cuyos máximos de absorción ubicados en el intervalo de 360-450 nm dificultan la emisión de los analitos.

Dentro de los aceites vegetales, el aceite de oliva es uno de los que posee la mayor cantidad de clorofila. El contenido total de pigmentos en este aceite se encuentra entre $10-30 \text{ mg kg}^{-1}$ con una distribución típica de 55% de feofitina, 28% de luteína, 8% de β -caroteno y 5% de clorofila (Cichelli y Pertesana 2004; Cerretani y col. 2008). En el caso del aceite de maravilla, el fenómeno de filtro interno, relacionado con los pigmentos, no fue observado. Sin embargo, la principal interferencia fue el solapamiento espectral parcial de la emisión de los tocoferoles co-extraídos con la emisión de los PAHs. En los aceites refinados de maravilla la clorofila no está presente, pero por el contrario el contenido de tocoferoles es elevado y mayor al presente en aceites de oliva (671 y 158 mg kg^{-1} , respectivamente; Sikorska y col. 2005). De esto modo, la eliminación de tocoferoles y pigmentos por medio de una etapa de “clean-up” es requerida para lograr una detección selectiva de los PAHs en aceites de oliva y maravilla por espectroscopía de fluorescencia.

5.3. Método de “clean-up”

Se evaluó la extracción en fase sólida como método de eliminación o disminución de los efectos producidos por los compuestos co-extraído en MAE sobre la emisión de los PAHs. Como una prueba general, se estudió la eficiencia de 4 fases sólidas distintas (Figura 7) para remover las interferencias propias de los aceites: sílica (1g), C18 (0,5 g), carbón grafitizado no poroso (0,5 g CGNP) y una fase mixta de CGNP con aminopropil sílica (0,5 g CGNP + 0,5 g NH₂). Para este propósito, muestras de 0,2 g de un aceite OEV fortificado con 30 µg kg⁻¹ de cada PAH fueron diluidas en 1 mL de n-hexano y cargadas (200 µL de solución de aceite) en las diferentes columnas de SPE. De acuerdo con trabajos previos (Moret y col. 2002; Bogusz y col. 2004), la elución fue realizada con 7 mL de una mezcla n-hexano:diclorometano 70:30 en columnas de sílica, 7 mL de acetonitrilo en columnas de C18 y 10 mL de acetonitrilo en columnas de CGNP y CGNP-NH₂. Los eluatos fueron evaporados con N₂ y re-disueltos en 2 mL de n-hexano.

Los máximos de emisión atribuidos a los PAHs sólo fueron observados en los extractos obtenidos desde las columnas de sílica y C18 (Figura 8), siendo los de C18 significativamente menos intensos que los de sílica. Como ha sido discutido previamente, esta diferencia en intensidad de emisión se atribuye al efecto de filtro interno generado por la presencia de pigmentos. Por lo tanto, sólo la sílica fue lo suficientemente eficiente para eliminar esta interferencia (produciendo máximos de emisión más intensos para los PAHs) y además disminuir la emisión de los tocoferoles (λ_{em} 340 nm) que provocan solapamiento parcial con la emisión de los analitos. Por otra parte, los extractos obtenidos desde las columnas de CGNP y CGNP-NH₂ muestran una ausencia total de máximos de emisión de PAHs, incluso utilizando 20 mL de acetonitrilo como solvente de elución. Aunque el CGNP posee una alta afinidad por los pigmentos, también exhibe una gran afinidad por los PAHs, reteniéndolos irreversiblemente en las láminas de carbón (Figura 7).

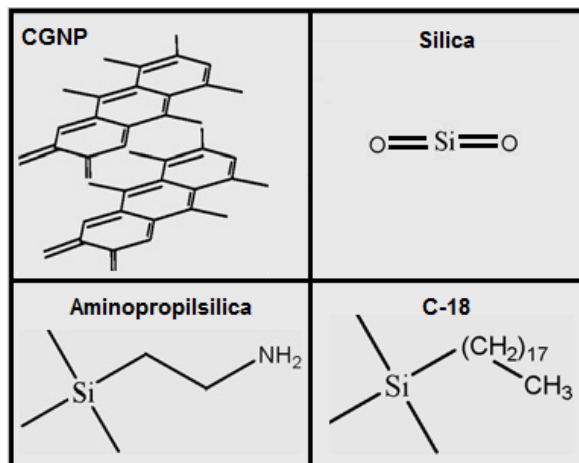


Figura 7. Estructuras químicas de las fases sólidas: sílica, C18, carbón grafitizado no poroso (CGNP) y carbón grafitizado no poroso-aminopropil sílica (CGNP-NH₂).

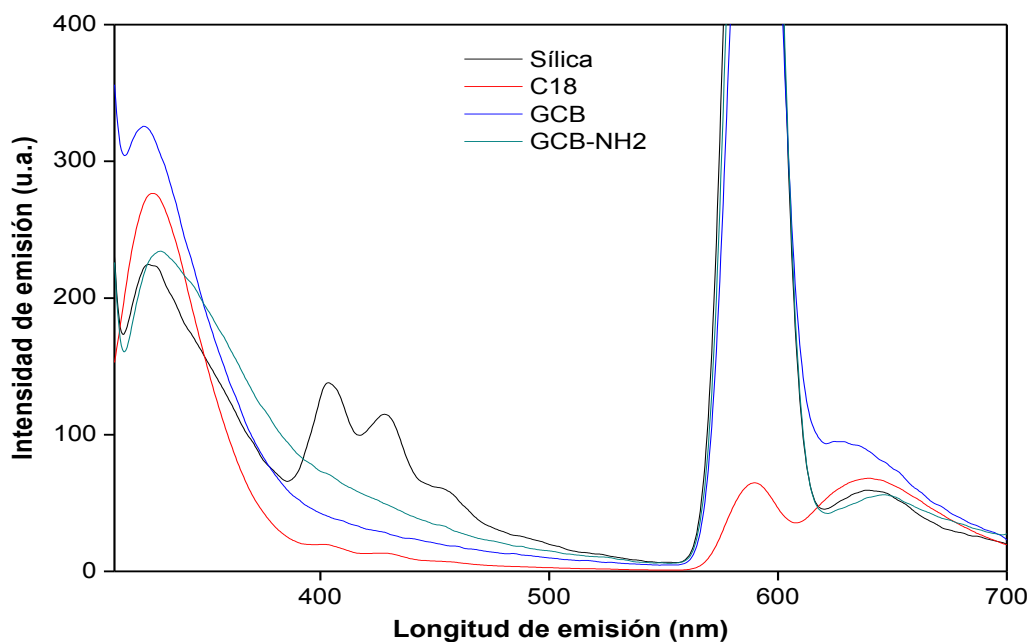


Figura 8. Espectros de emisión de muestras de aceite OEV fortificadas con una mezcla de 7 PAHs (concentración total: 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$) sometidas a SPE en columnas de sílica, C18, CGNP y CGNP-NH₂.

Se evaluó el efecto de la feofitina *a* y la clorofila *a* sobre la emisión de los PAHs comparando los espectros de emisión de la mezcla de los analitos estudiados en presencia de estos pigmentos puros a concentraciones esperadas para un aceite OEV (20 y 1 mg kg⁻¹, respectivamente), antes y después de una etapa de “clean-up” en columnas de sílica (Figura 9). De acuerdo con los espectros de absorción y emisión, el efecto de filtro interno es producido por ambos pigmentos; estos interfieren tanto por absorción de parte de la energía de excitación (filtro interno primario) como por absorción de parte de la energía de emisión (filtro interno secundario) de los PAHs, produciendo perfiles de emisión que difieren en intensidad y forma. Como resultado, la emisión de los PAHs es totalmente enmascarada o confundida en presencia de estos pigmentos. Sin embargo, el perfil de emisión de los analitos fue satisfactoriamente recuperado luego del tratamiento de extracción en fase sólida, en el cual los pigmentos fueron adsorbidos en la sílica. La eficiente absorción de la feofitina, clorofila y luteína (disueltas en n-hexano) sobre la sílica ha sido informada previamente (Shen y col. 2009).

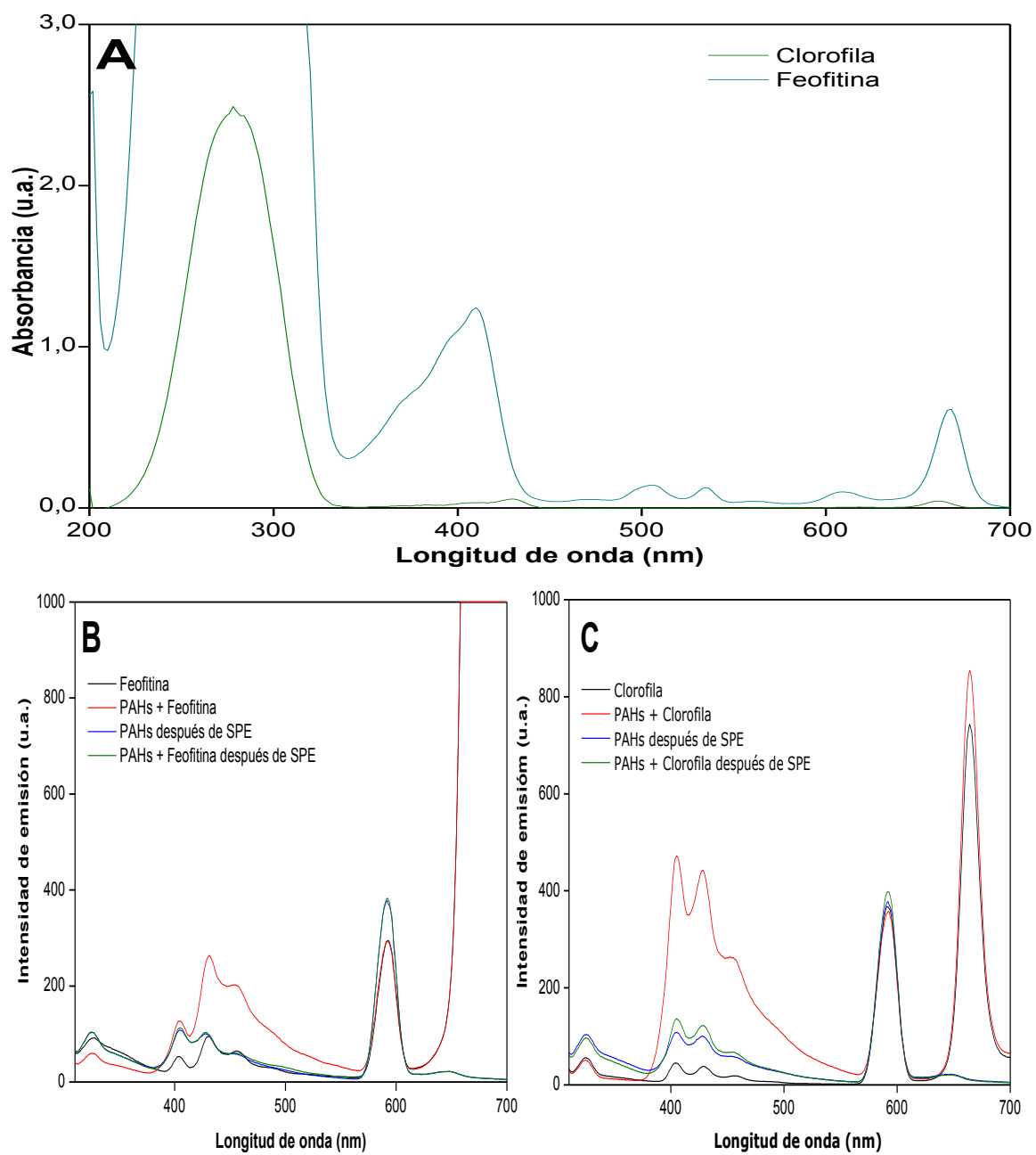


Figura 9. Espectros de absorción de feofitina y clorofila (A) y espectros de emisión de PAHs en presencia de feofitina (B) y clorofila (C) antes y después de SPE en columnas de sílica.

La etapa de “clean-up” en columnas de sílica asociada a extracción líquido-líquido asistida por microondas fue optimizada utilizando un diseño central compuesto con el objetivo de seleccionar el volumen óptimo de solvente de elución (15 a 26 mL) y su proporción volumétrica (n-hexano-diclorometano; 90:10 a 50:50). Se trabajó con muestras consistentes en extractos MAE disueltos en 1 mL de hexano y fortificados con $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada PAH ($3 \mu\text{g kg}^{-1}$ BkF). Las muestras fueron cargadas sobre columnas de 2 g de sílica manteniendo la proporción de carga en 50 mg de residuo de aceite por gramo de sílica. La recuperación de PAHs totales y la intensidad de emisión de tocoferoles (a 340 nm) fueron simultáneamente optimizadas utilizando la función de deseabilidad de Derringer (Derringer y col. 1980). En este análisis cada respuesta individual (i) fue asociada a una deseabilidad parcial (d_i), cuyo valor varía entre 0 y 1 de acuerdo con la cercanía de la respuesta al valor objetivo. Los valores de deseabilidad individual fueron combinados a través de la media geométrica para obtener la deseabilidad total (D) en todos los puntos del dominio experimental. Dichos valores fueron utilizados para realizar la optimización. La deseabilidad parcial de la recuperación de PAHs totales fue obtenida para un valor objetivo de 95% (bilateral; límite superior 105%; factores de peso, $s = t = 1$; factor de impacto, $I = 1$) y la deseabilidad parcial de la intensidad de emisión de los tocoferoles fue obtenida para su minimización (unilateral; factor de peso, $s = 3$; factor de impacto, $I = 3$).

El modelo entregó una adecuada representación de los datos puesto que la carencia de ajuste no fue significativa ($p = 0,075$) y el coeficiente de determinación fue de 0,8450. La función D quedó definida como:

$$D = 0,91 - 0,09A - 0,12B - 0,20AB - 0,41B^2$$

donde, A es el volumen de elución y B el porcentaje de diclorometano en la composición del solvente de elución.

Los valores de D más elevados fueron observados para todo el intervalo de volumen de elución y para composiciones de solvente (en porcentaje de diclorometano) entre un 20 y un 30 % v/v (Figura 10). De este modo, se consideró 15 mL de la mezcla n-hexano-diclorometano 80:20 % v/v como la condición óptima, con el menor consumo de solventes, para la elución selectiva del conjunto de analitos.

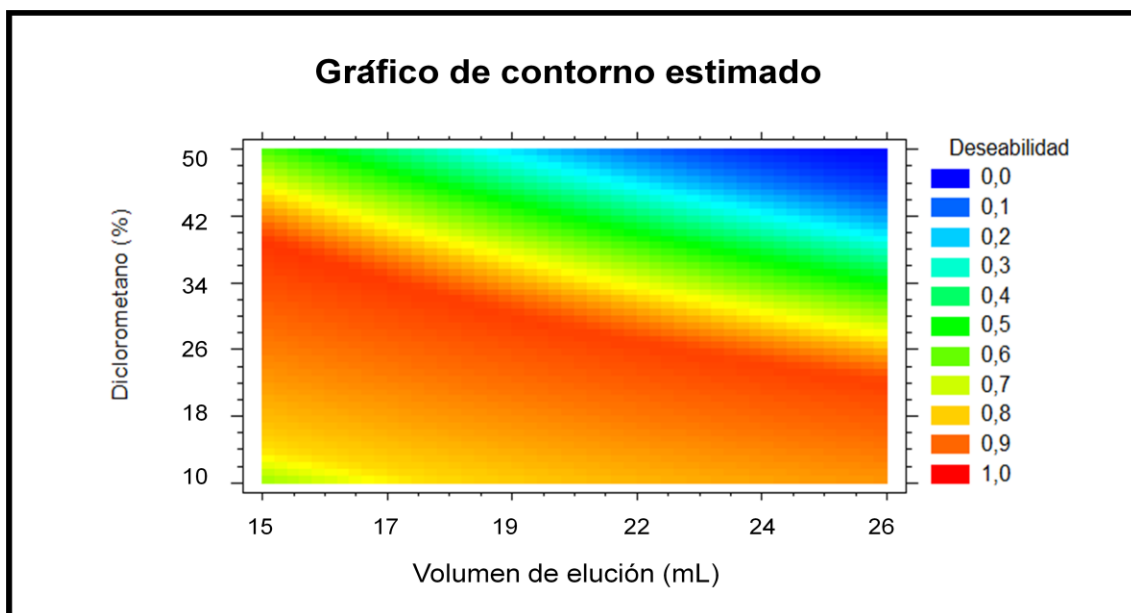


Figura 10. Gráfico de contorno obtenido para la optimización multi-respuesta (como deseabilidad de Derringer) de la recuperación de PAHs totales e intensidad de emisión del grupo de tocoferoles, en función del volumen de elución y el porcentaje de diclorometano.

Bajo estas condiciones la recuperación de PAHs totales fue mayor o igual al 94% para aceites OEV y MR. Las recuperaciones fueron obtenidas por comparación de la intensidad de emisión del extracto final con la de un extracto blanco fortificado al final de la etapa de “clean-up”, a la longitud de onda del máximo de emisión del conjunto de PAHs. Por otra parte, los extractos obtenidos por MAE y fortificados con cantidades crecientes de PAHs (Figura 6A) fueron también sometidos a la etapa de “clean-up” en columnas de sílica bajo las condiciones óptimas encontradas. Como resultado, se obtuvieron espectros de emisión característicos del conjunto de PAHs (Figura 6B), con

un aumento proporcional de la intensidad de emisión al incrementar la concentración. De esta forma, los espectros de emisión obtenidos luego del tratamiento de las muestras, fueron empleados para desarrollar un método de “screening” sobre la presencia de PAHs en aceites OEV y MR.

5.4. Cifras de mérito del método de “screening”

Con el objetivo de establecer las capacidades del método MAE-SPE con espectroscopía de fluorescencia como método de “screening” para determinar las concentraciones totales de los PAHs en aceites comestibles, se obtuvieron algunas cifras de mérito al aplicar calibración univariada y multivariada. Para construir los set de calibrados se utilizó un set de 7 muestras consistentes en extractos de aceite OEV fortificados con cantidades crecientes de los 7 PAHs ($3,0$ a $88 \mu\text{g kg}^{-1}$) al final de la etapa de MAE (Tabla 2). Para la calibración univariada fueron consideradas las intensidades a cuatro longitudes de onda, correspondientes a los máximos de emisión de la mezcla de PAHs, y sus valores promedio. La calibración multivariada de dos y tres vías fue realizada mediante mínimos cuadrados parciales (PLS) y mínimos cuadrados parciales desdoblados (U-PLS), respectivamente. En PLS se trabajó con el intervalo de longitudes de onda $380\text{-}590 \text{ nm}$ (λ_{ex} : 290 nm) y datos centrados, mientras que en U-PLS se utilizaron los intervalos $265\text{-}350 \text{ nm}$ y $392\text{-}480 \text{ nm}$ para excitación y emisión, respectivamente. Las matrices de excitación-emisión (MEE) para U-PLS ó los espectros de emisión para PLS fueron correlacionados con la concentración total de PAHs en el extracto. En el caso de la calibración multivariada las cifras de mérito fueron obtenidas de acuerdo con Olivieri y col. (2006). Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Cifras de mérito del método de “screening” MAE-SPE con espectroscopía de fluorescencia, para la determinación de la concentración de PAHs totales en aceites comestibles, obtenidas al aplicar calibración univariada y multivariada.

Calibración univariada						
Longitud de onda (nm)	Intervalo dinámico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r	S_b / b (%)	$S_{y/x} / b$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
403	8,0-58	0,9953	5,6	2,2	7,0	22
426	8,0-58	0,9967	4,6	1,9	6,1	19
455	8,0-58	0,9977	3,9	1,6	5,2	16
500	8,0-58	0,9972	4,6	1,7	5,7	17
Emisión promedio	8,0-58	0,9970	4,4	1,8	5,9	18
Calibración multivariada						
Longitud de onda (nm)	Intervalo dinámico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r	Número de factores	γ^{-1} ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ^b ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ^c ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
PLS 380-590	3,0-58	0,9940	1	0,76	2,6	7,6
U-PLS 265-350 excitación 392-480 emisión	3,0-58	0,9946	2	0,24	0,79	2,4

^a Inverso de la sensibilidad analítica (γ), estimado como $\gamma^{-1} = S_x / \text{SEN}_n$, donde S_x es el nivel de ruido espectral y SEN_n es la sensibilidad.

^b Estimado como $3,3(S_x / \text{SEN}_n)$

^c Estimado como $10(S_x / \text{SEN}_n)$

En la calibración univariada, se observó una respuesta lineal en el intervalo de 8,0-58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando tanto las emisiones individuales a las cuatro longitudes de onda como el promedio, con valores de coeficiente de correlación (r) entre 0,9953 y 0,9977. Además, la desviación estándar relativa de la pendiente (S_b/b ; donde S_b es la desviación estándar de la pendiente y b es la pendiente), que brinda una mejor representación de la linealidad de los datos analíticos, fue menor o igual al 5,6%. La sensibilidad analítica ($S_{y/x}/b$; donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la regresión), que indica la mínima diferencia en concentración que el método es capaz de detectar, estuvo entre 1,6 y 2,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron obtenidos desde los modelos de regresión como $3,3(S_{y/x}/b)$ y $10(S_{y/x}/b)$ y los valores estuvieron en el intervalo de 5,2-7,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 16-22 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. En la calibración multivariada los resultados fueron obtenidos, a partir de los modelos de regresión, después de realizar la validación cruzada. Como puede observarse en la Tabla 4, la calibración multivariada permite obtener LOD menores a los alcanzados con calibración univariada. La mejor sensibilidad analítica (0,24 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y el menor LOD (0,79 $\mu\text{g kg}^{-1}$) fue alcanzado aplicando U-PLS a los datos de tres vías.

Adicionalmente se analizaron muestras blanco de aceite OEV (BOEV) y MR (BMR) y muestras de aceite OEV fortificadas a niveles bajos de concentración de los 7 PAHs (Tabla 3). En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos.

Las concentraciones de PAHs totales predichas en todas las muestras blanco fueron iguales a cero ó menores o iguales al LOD, por lo que no se detectaron falsos positivos. Por otra parte, sólo utilizando el algoritmo U-PLS no se detectaron falsos negativos aun cuando la muestra contuviese un único PAH (BghiP en OEV3). Por consiguiente, el método puede detectar la presencia del grupo de PAHs seleccionados a niveles de concentración requeridos por las regulaciones internacionales (Wenzel y col 2006) y permite obtener resultados semi-cuantitativos.

Tabla 5. Concentraciones de PAHs totales predichas en aceites BOEV, BMR y OEV (fortificados a niveles bajos de concentración de PAHs), a través el método MAE-SPE con espectroscopía de fluorescencia utilizando calibración univariada (emisión promedio) y multivariada.

Muestra	Concentración real ($\mu\text{g kg}^{-1}$)								Concentración predicha ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	Total	Univariada	PLS	U-PLS
BOEV1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,80
BOEV2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,60
BOEV3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	2,6	0,00
BMR1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00
BMR2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00
BMR3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,40
BMR4	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00
OEV1	4,0	0,25	1,0	0,25	0,25	0,25	5,0	11	6,1	3,6	12
OEV2	0,25	0,25	0,16	0,25	0,25	0,25	1,0	2,4	0,00	0,00	3,0
OEV3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,0	0,00	4,0	0,00	0,00	2,4
OEV4	0,40	0,40	0,10	0,40	0,40	0,40	0,80	3,0	1,6	0,80	3,0
LOD									5,9	2,6	0,80

5.5. Evaluación de la eficiencia de extracción del método MAE-SPE

Con la finalidad de evaluar la capacidad de extracción del método MAE-SPE, muestras de aceite OEV fortificadas con los 7 PAHs estudiados fueron extraídas mediante el método propuesto y analizadas por HPLC-FLD utilizando una curva de calibración externa preparada en isopropanol. Las recuperaciones obtenidas estuvieron entre el 62 y el 84%, con desviaciones estándar (SD) iguales o menores al 3%, excepto para BaA (Tabla 6). Al aplicar un test-t para datos pareados no se encontraron diferencias significativas entre estos valores y los obtenidos utilizando extracción líquido-líquido clásica (descrita en el punto 4.3.1) asociada a SPE en columnas de sílica (valor $p=0,27$ para un 95% de confianza). Por otra parte estos valores de recuperación son aceptables para el nivel de concentración de los analitos (60-120% para concentraciones entre 1,0 y 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y la complejidad de la matriz (AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods 2002). Además, en el proceso MAE no hay formación de emulsión, pueden ser extraídas hasta ocho muestras simultáneamente con menor intervención en el proceso y el consumo de solventes es similar al método de extracción clásico. Por lo tanto, MAE acopado a SPE en columnas de sílica es adecuado para la determinación de los PAHs estudiados en aceites comestibles a través de espectroscopía de fluorescencia. Las recuperaciones totales fueron predichas también por PLS y U-PLS, observándose sólo una diferencia significativa entre el valor predicho por U-PLS para MAE (88%) y el encontrado por HPLC-FDL (74%) (test-t para medias, $p=0,02$ para un 95% de confianza); equivalente a un error relativo de 19%.

Tabla 6. Recuperaciones individuales y totales (%) de los 7 PAHs en muestras de aceite OEV fortificadas sometidas al método MAE-SPE y líquido- líquido clásica-SPE (LL-SPE).

		BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	Total
Concentración real ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		4,0	4,0	1,6	4,0	4,0	4,0	10	31,6
HPLC-FLD	MAE-SPE	84 (7) ^a	78 (2)	83 (2)	67 (3)	72 (2)	62 (2)	72 (2)	74 (8)
	LL-SPE	88 (2)	81 (2)	78 (2)	77 (2)	75 (2)	67 (2)	77 (2)	78 (9)
PLS	MAE-SPE	-	-	-	-	-	-	-	70 (2)
	LL-SPE	-	-	-	-	-	-	-	90 (3)
U-PLS	MAE-SPE	-	-	-	-	-	-	-	88 (2)
	LL-SPE	-	-	-	-	-	-	-	79 (9)

^a Desviación estándar (n=3)

5.6. Método de cuantificación mediante calibración multivariada de segundo orden

Debido a la complejidad de la matriz y al solapamiento espectral de los PAHs se aplicó el análisis quimiométrico, mediante el uso de los algoritmos PARAFAC y U-PLS/RBL, a las matrices de excitación-emisión (MEE) obtenidas por fluorescencia total. El mejor algoritmo fue definido en la etapa de validación utilizando muestras de complejidad creciente. Como primera etapa, muestras de una marca de aceite OEV orgánico conteniendo los 7 PAHs seleccionados fueron evaluadas, luego muestras de diferentes tipos y marcas de aceites comestibles (oliva y maravilla) fortificadas con los mismos analitos fueron estudiadas. Finalmente, muestras de aceite OEV conteniendo los restante 9 PAHs de la US-EPA fueron analizadas.

5.6.1. Set de muestras de validación

Para construir los modelos de calibración de segundo orden, las MEE fueron obtenidas en un intervalo espectral amplio que incluyera los máximos de emisión de todos los analitos estudiados. PARAFAC fue aplicado a un arreglo de datos de tres vías construido al juntar las matrices de datos de cada muestra de validación con las del set de muestras de calibración. La selección del intervalo espectral óptimo y el número óptimo de factores fue realizado aplicando el criterio de similitud (coeficiente de correlación, r), el porcentaje de ajuste y la consistencia del núcleo (Bro 1997; Bro y Kiers 2003). En U-PLS/RBL, la selección fue realizada 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 $F(A) = \text{PRESS}(A < A^*) / \text{PRESS}(A)$, donde PRESS es la suma de errores cuadrados de predicción, definido como $\text{PRESS} = \sum_1^1 (y_{\text{nominal}} - y_{\text{predicted}})^2$, 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.

En la Tabla 7 se muestra el número de factores óptimos encontrados y el intervalo espectral seleccionado para cada analito, al aplicar PARAFAC y U-PLS/RBL. El intervalo espectral óptimo para cada analito fue similar para los algoritmos utilizados y el número de factores estimado en PARAFAC fue menor o igual a los obtenidos para U-PLS. Lo último se debe a que U-PLS entrega variable latentes (“loadings” y coeficientes de regresión abstractos) que no tienen interpretación física y sólo un adecuado ajuste de la señal de la muestra al modelo de calibración indica que el analito correcto está siendo cuantificado. Por el contrario, PARAFAC entrega perfiles físicamente interpretables y la identificación de los constituyentes químicos estudiados es realizada por comparación de los perfiles estimados con aquellos obtenidos de una solución estándar del analito de interés.

Tabla 7. Número de factores óptimos (A) e intervalos de excitación-emisión utilizados en PARAFAC y U-PLS.

	PARAFAC			U-PLS		
	A	Excitación (nm)	Emisión (nm)	A	Excitación (nm)	Emisión (nm)
BaA	6	260-325	374-444	6	260-325	374-444
BbF	5	300-345	376-500	6	300-345	376-500
BkF	4	260-340	370-470	5	260-340	370-450
BaP	6	270-350	378-482	7	270-350	378-482
DBahA	7	260-340	384-462	8	260-340	384-462
BghiP	8	250-330	370-498	8	250-330	370-498
IP	4	320-380	450-490	4	320-380	450-490

Una vez seleccionado el número óptimo de factores y el intervalo de longitudes de onda, PARAFAC y U-PLS/RBL fueron aplicados en las muestras de validación para predecir las concentraciones de los analitos. En este caso, RBL es requerido puesto que las muestras de validación contienen componentes inesperados debido a la presencia de la matriz oleosa. En las Figuras 11A y 11C se muestran los gráficos tridimensionales de las MEE de una muestra de calibración típica y una muestra de aceite OEV orgánico, respectivamente. El desafío es evidente cuando se observan estas Figuras y se comparan con la Figura 11B, que muestra la MEE para una muestra

de validación típica en donde los analitos se encuentran en presencia de la matriz oleosa. En consecuencia, cuando U-PLS/RBL fue aplicado a las muestras de validación, además de las variables latentes estimadas para cada analito (con el set de muestras de calibrado) fue necesario incluir el procedimiento RBL con un número adicional de factores correspondientes a los constituyentes inesperados propios del aceite. El número de factores RBL, estimado a través de consideraciones apropiadas de los residuos RBL (Bortolato y col. 2008), varió entre 1 y 4 dependiendo del PAH analizado y el intervalo espectral correspondiente.

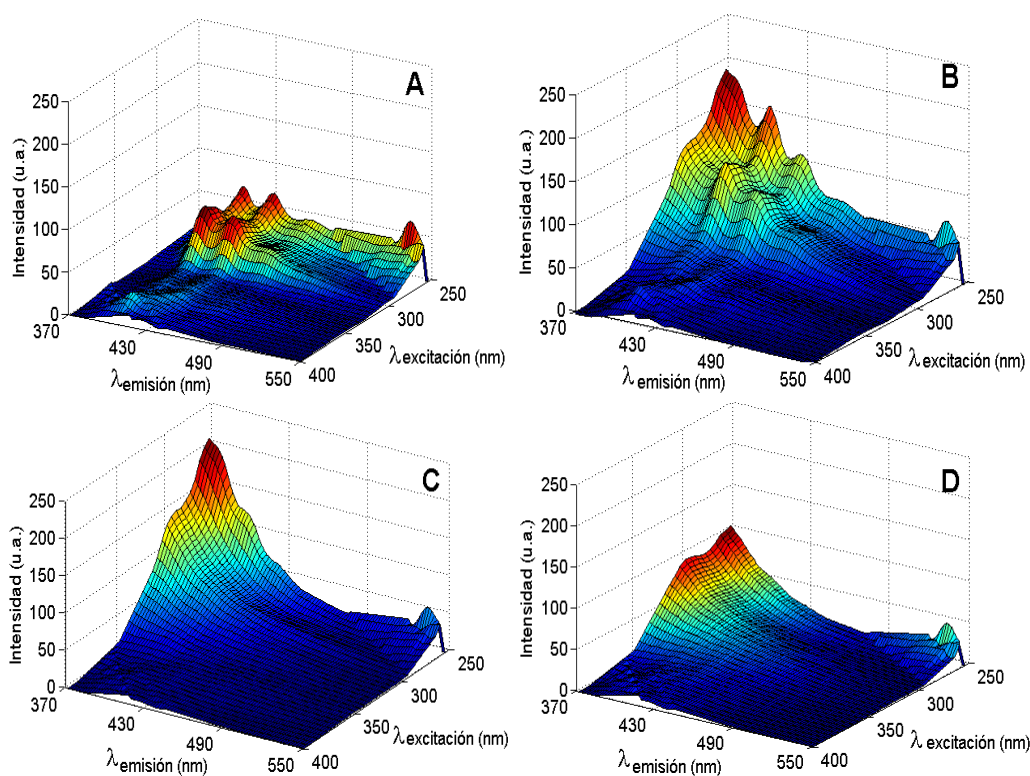


Figura 11. Gráficos tridimensionales de las matrices de excitación-emisión correspondientes a: (A) una muestra de calibración conteniendo $1,06 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaA, BbF, BaP, DBahA y BghiP, $0,290 \mu\text{g L}^{-1}$ de BkF y $2,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de IP, (B) una muestra de validación conteniendo los 7 PAHs al mismo nivel de concentración, (C) una muestra de aceite OEV orgánico y (D) una muestra de aceite MR.

Los resultados estadísticos de la determinación de los 7 PAHs estudiados en las muestras de validación utilizando PARAFAC y U-PLS/RBL se muestran en la Tabla 8. U-PLS/RBL logró buenas predicciones de las concentraciones de los PAHs con errores

relativos (REP) iguales o menores al 15%, excepto en el caso de BghiP donde el REP alcanzó el 25%. Sin embargo, considerando la complejidad del sistema, este último valor puede ser aceptado. Por el contrario, cuando PARAFAC fue aplicado se observó una pobre predicción, con REPs sobre el 20%, siendo BghiP e IP los analitos peor predichos. En efecto, PARAFAC no fue capaz de predecir las concentraciones de BghiP en las muestras de validación. Estas dificultades podrían atribuirse a la baja intensidad de fluorescencia y al alto solapamiento espectral de estos analitos (BghiP e IP) con la matriz lo que conlleva a una mala descomposición de los datos de segundo orden.

En Chile y España el nivel de concentración máximo permitido para 8 PAHs pesados en aceites comestibles es de $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para cada PAH, incluyendo BaA, BbF, BkF, BaP, BeP, DBahA, BghiP e IP, y $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el contenido total del grupo de PAHs. En este sentido, los límites de detección (LOD) obtenidos con U-PLS/RBL fueron menores a $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, excepto para BghiP e IP ($1,8$ y $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Pese a que los LOD para estos analitos fueron cercanos a $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, estos valores son aceptables para su determinación en muestras potencialmente contaminadas. Además, los LOD obtenidos por U-PLS/RBL fueron del orden de los informados para métodos que involucran una detección por HPLC-FLD (Weißhaar 2002; Barranco y col. 2003; Lage y col. 2005; Martínez y col. 2005; Teixeira y col. 2007). Aunque los LOD obtenidos con PARAFAC fueron menores a $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para BaA, BbF, BkF y DBahA, resultaron ser 2 a 3 veces más altos que los obtenidos por U-PLS/RBL. Los mayores LOD fueron observados para BaP e IP ($4,6$ y $4,8 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente), excediendo los límites regulatorios establecidos para cada PAH. Los pobres resultados obtenidos con PARAFAC pueden ser atribuidos a su incapacidad para modelar sistemas donde los perfiles espectroscópicos de los analitos son similares entre sí y con los componentes de la matriz. De esta forma, sólo U-PLS/RBL fue aplicado para la predicción de las concentraciones de los PAHs en las muestras de aceite comestible.

Tabla 8. Resultados estadísticos de la determinación de PAHs en las muestras de validación.

	PARAFAC							U-PLS/RBL						
	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP
RMSEP ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^a	0,62	1,2	0,25	1,1	0,59	-	3,4	0,24	0,43	0,09	0,35	0,26	0,89	0,52
REP (%) ^b	25	42	37	46	24	-	98	10	15	13	15	11	25	15
γ^{-1} ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^c	0,27	0,34	0,07	1,4	0,38	-	1,5	0,16	0,13	0,02	0,11	0,16	0,54	0,61
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^d	0,91	1,1	0,24	4,6	1,3	-	4,8	0,51	0,43	0,07	0,35	0,53	1,8	2,0

^a Error cuadrado medio de predicción, $\text{RMSEP} = \left[\frac{1}{I} \sum_1^I (C_{\text{nominal}} - C_{\text{predicho}})^2 \right]^{1/2}$, donde I es el número de muestras predichas y C_{nominal} y C_{predicho} son las concentraciones nominales y predichas, respectivamente.

^b Error relativo de predicción, $\text{REP} = 100 * \text{RMSEP} / \bar{c}$, donde \bar{c} es la concentración de calibración promedio.

^c Inverso de la sensibilidad analítica (γ), $\gamma^{-1} = s_x / \text{SEN}_n$, donde s_x es el ruido instrumental y SEN_n es la sensibilidad (Olivieri y Faber 2005). Los valores de s_x y SEN_n son un promedio de los valores correspondientes a las 11 muestras de validación.

^d Limite de detección, $\text{LOD} = 3,3 * \gamma^{-1}$ (Boqué y col. 1999).

5.6.2. Set de muestras prueba

La capacidad predictiva del modelo de calibración utilizando U-PLS/RBL fue evaluada con muestras de aceites comestibles de diferentes marcas y tipos. Un total de 25 muestras de aceites comestibles fortificados fueron analizados: 17 muestras incluyendo 4 marcas distintas de aceites OEV y 8 muestras incluyendo 2 marcas de aceite MR. En las Figuras 11C y 11D (sección 5.6.1) se muestran los espectros de fluorescencia total de muestras (sin fortificar) de aceite OEV orgánico y MR, respectivamente. A pesar de las diferencias aparentes en intensidad de emisión, los perfiles de excitación-emisión son similares entre las muestras. En consecuencia, no se requirió un número adicional de componentes RBL (que los estimados para las muestras de validación) para la predicción de las concentraciones de los analitos con U-PLS/RBL.

En la Tabla 9 se informan las recuperaciones promedio y los resultados de capacidad predictiva obtenidos para la determinación de los 7 PAHs en estas muestras. Como se observa, las recuperaciones obtenidas con U-PLS/RBL estuvieron en el intervalo de 64 a 81%, coincidente con los valores informados en el punto 5.5. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones predichas por U-PLS/RBL y las obtenidas por HPLC-FLD y el punto teórico (1,0) estuvo dentro o cercano al borde de las regiones elípticas de confianza. En la Figura 12 se muestran los gráficos de concentraciones predichas por U-PLS/RBL en función de las obtenidas por HPLC-FLD y las correspondientes regiones elípticas de confianza (para un 95% de nivel de confianza) para BaA y BaP (como representativos del grupo de compuestos estudiados), respectivamente. Adicionalmente, las recuperaciones promedio (en porcentaje) para las 25 muestras fueron calculadas y comparadas mediante un test-t para datos pareados, sin observarse diferencias significativas entre los métodos (valor $p=0,80$ para un 95% de confianza). Por lo tanto, en base a estos resultados, el método MAE-SPE con espectroscopía de fluorescencia total asociada a U-PLS/RBL es comparable con el método HPLC-FLD de referencia en términos de cuantificación de los analitos y resulta ser menos costoso, más rápido y menos contaminante en términos de consumo de solventes que el método cromatográfico de referencia (ver propiedades analíticas complementarias en el Anexo).

Tabla 9. Parte A. Estudio de recuperación y capacidad predictiva de los 7 PAHs seleccionados en muestras fortificadas de diferentes tipos y marcas de aceites comestibles utilizando U-PLS/RBL (A) y HPLC-FLD (B) como método de referencia.

Aceite	Marca	Muestra	BaA			BbF			BkF			BaP		
			Nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
OEV	A	1	5,4	3,1	3,4	4,8	4,2	3,0	1,2	1,0	0,85	4,5	1,7	2,3
		2	0,60	<LOD	0,56	5,7	3,7	3,7	0,60	0,27	0,31	4,8	2,5	2,7
		3	5,4	3,6	3,9	3,9	2,8	2,9	1,2	0,79	0,89	1,2	0,83	0,79
		4	3,9	2,8	3,1	5,1	3,4	3,8	0,30	0,28	0,27	3,0	1,8	2,0
	B	5	0,60	0,87	0,67	5,7	4,2	4,0	0,40	0,38	0,36	2,7	1,8	1,6
		6	1,5	1,7	1,4	3,9	3,4	3,1	1,2	1,3	0,97	3,9	2,9	2,5
		7	3,0	2,5	2,5	4,5	3,4	3,3	0,90	0,80	0,63	4,2	2,9	2,4
		8	5,7	4,1	5,2	2,4	2,0	2,1	0,90	0,70	0,76	4,5	3,1	3,2
	C	9	5,7	4,2	4,8	0,9	1,0	0,80	1,2	0,98	1,1	1,5	0,85	1,3
		10	0,90	0,7	0,76	4,2	2,9	3,0	0,60	0,34	0,45	3,9	2,3	2,6
		11	5,7	4,2	4,5	1,5	1,6	1,3	0,60	0,52	0,53	3,9	2,3	2,6
		12	5,7	4,3	4,3	0,6	0,68	0,59	1,8	1,3	1,4	0,90	0,41	0,68
		13	2,7	1,9	2,2	4,8	3,7	3,6	0,2	0,22	0,28	0,60	0,84	0,56
	D	14	4,8	3,8	3,7	1,8	2,1	1,4	0,9	0,66	0,70	3,0	2,3	2,1
		15	0,90	0,96	1,0	5,7	4,5	4,9	1,5	1,1	1,3	5,7	4,2	4,0
		16	2,4	2,0	2,0	2,4	2,0	2,0	0,3	0,28	0,31	2,1	1,4	1,5
		17	5,4	3,4	3,9	2,1	1,4	1,6	0,6	0,29	0,45	3,6	2,2	2,1
MR	E	18	6,0	3,3	4,6	11	7,5	7,6	2,4	1,5	1,8	9,6	5,8	5,9
		19	11	6,7	7,3	6,0	4,3	3,7	1,8	1,2	1,4	9,0	5,5	5,9
		20	11	6,0	7,4	9,0	6,1	6,2	1,2	0,72	0,90	7,2	4,6	4,5
	F	21	7,8	5,0	5,6	10	6,1	6,2	0,6	0,42	0,54	6,0	3,4	3,1
		22	6,0	7,2	6,7	11	8,4	10	2,4	1,4	1,6	9,6	6,0	7,2
		23	11	7,1	7,8	6,0	4,6	4,8	1,8	1,2	1,7	9,0	5,3	6,1
		24	11	9,5	7,3	9,0	7,1	6,4	1,2	0,93	1,1	7,2	4,7	4,7
		25	7,8	5,4	5,9	10	7,0	7,1	0,6	0,54	0,60	6,0	3,9	4,0
Recuperación promedio (n=25)				78	82		80	76		76	83		65	66

Tabla 9. Parte B.

Aceite	Marca	Muestra	DBahA			BghiP			IP		
			Nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
EVOO	A	1	1,2	0,95	0,75	1,2	<LOD	0,87	2,4	0,8	1,6
		2	4,5	3,0	2,2	7,5	4,3	3,7	5,7	4,0	3,3
		3	1,5	2,1	1,1	5,7	5,4	3,3	2,1	2,5	1,7
		4	3,0	2,5	2,0	4,2	3,0	2,6	3,9	1,9	2,4
	B	5	4,2	3,0	2,6	9,9	4,0	5,6	1,8	<LOD	1,7
		6	5,4	4,4	3,6	6,9	3,6	4,3	4,5	4,2	3,3
		7	5,7	3,0	3,6	6,3	4,0	3,6	1,8	<LOD	1,4
		8	3,0	3,3	2,4	11	6,1	6,3	4,8	4,1	3,8
	C	9	0,90	1,0	0,64	3,3	2,4	2,4	5,1	4,8	3,9
		10	0,90	1,2	0,64	9,0	6,0	5,0	5,7	3,5	3,9
		11	1,5	1,4	1,1	9,0	6,2	5,3	3,3	2,4	2,3
		12	5,1	3,1	3,4	4,5	4,3	2,4	6,9	5,4	4,7
		13	1,5	1,4	1,2	6,9	5,0	4,2	6,0	2,8	4,3
	D	14	4,8	3,6	3,4	0,9	<LOD	0,64	3,9	3,0	2,9
		15	1,2	1,2	1,2	0,6	<LOD	0,65	7,5	5,2	5,3
		16	5,4	3,8	4,0	1,5	<LOD	1,2	2,7	1,2	1,9
		17	2,1	1,4	1,5	6,6	1,9	3,6	7,2	3,2	4,6
SO	E	18	9,0	5,9	5,9	15	8,8	8,9	11	6,8	7,4
		19	6,0	3,2	4,6	22	13	16	13	6,8	8,9
		20	7,8	4,7	5,5	17	9,4	11	14	8,2	9,5
	F	21	7,2	4,4	4,9	23	12	13	12	5,5	7,7
		22	9,0	6,6	7,0	15	11	13	11	6,5	11
		23	6,0	5,8	4,9	22	13	15	13	8,6	9,4
		24	7,8	5,2	5,5	17	13	11	14	8,3	9,4
		25	7,2	5,1	5,3	23	12	15	12	5,7	8,3
Recuperación promedio (n=25)				81	71		64	65		66	71

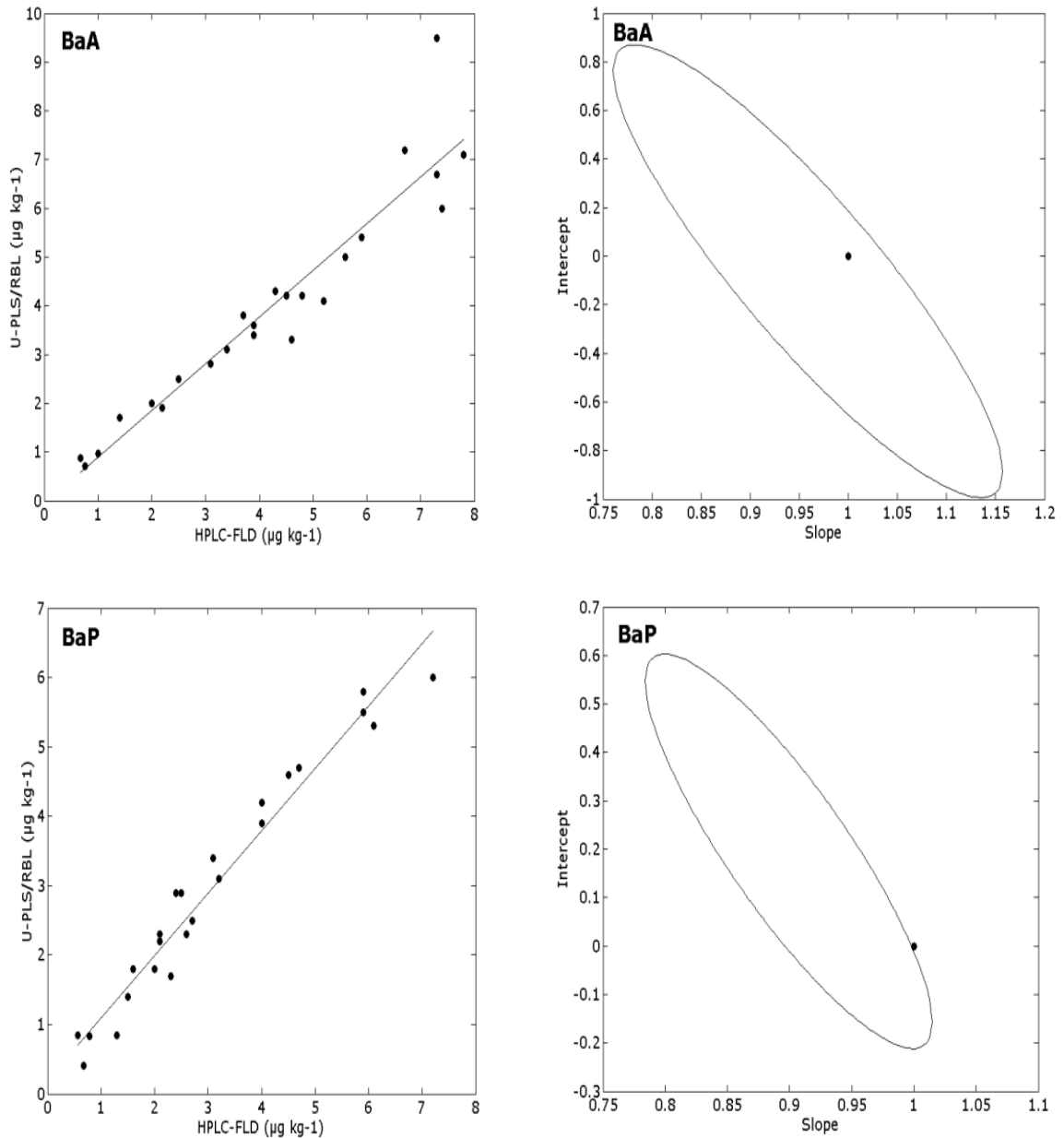


Figura 12. Gráficos de concentraciones predichas por U-PLS/RBL en función de los valores obtenidos por HPLC-FLD para BaA y BaP y las correspondientes regiones elípticas de confianza (95% confianza). El círculo negro en la elipse indica el punto teórico (1,0) de pendiente e intercepto.

5.6.3. Set de muestras prueba conteniendo PAHs inesperados

Con el propósito de evaluar la capacidad predictiva del modelo U-PLS/RBL para resolver muestras que contengan PAHs adicionales a los 7 PAHs seleccionados, se prepararon 4 muestras de aceite OEV orgánico fortificadas con los 7 analitos estudiados y los restantes 9 PAHs de la US-EPA. En este caso, U-PLS/RBL no requirió componentes RBL adicionales a los utilizados en las muestras de validación para estos nuevos interferentes. Lo anterior se atribuye a que los restantes 9 PAHs de la US-EPA poseen perfiles de emisión que no se solapan significativamente con los perfiles de los analitos estudiados. En la Tabla 10 se muestran las concentraciones predichas al aplicar U-PLS/RBL y los valores obtenidos por HPLC-FLD. La comparación entre los métodos fue realizada para cada PAH aplicando un test-t de comparación de promedios (para un 98% de confianza) sobre el set de muestras de aceite OEV preparado (Miller y Miller 2002). Para todos los PAHs estudiados, no se observaron diferencias significativas sugiriendo que los valores de concentración obtenidos al aplicar U-PLS/RBL son estadísticamente comparables con los obtenidos por HPLC-FLD. Por otra parte estos resultados indican que los restantes PAHs de la US-EPA, que podrían estar presentes en los aceites comestibles, no producen una interferencia significativa en el método de análisis propuesto.

Tabla 10. Parte A. Concentraciones de los 7 PAHs estudiados, determinadas en presencia de los restantes 9 PAHs de la US-EPA, en muestras de aceite OEV orgánico utilizando U-PLS/RBL (A) y HPLC-FLD (B) como método de referencia.

	BaA		t^b	BbF		t^b	BkF		t^b	BaP		t^b
	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
Muestra 1	3,0	3,2		2,9	2,6		1,5	1,5		2,4	2,2	
Muestra 2	3,8	3,5		3,3	3,0		1,6	1,7		2,6	2,6	
Muestra 3	2,8	3,5		3,3	2,8		1,9	1,7		2,9	2,5	
Muestra 4	2,5	3,5		3,3	2,9		1,8	1,7		2,6	2,6	
Concentración promedio (n=4)	3,0	3,4	1,39	3,2	2,8	2,85	1,7	1,7	0,48	2,6	2,5	1,07

^a Concentración de los restantes 9 PAHs de la US-EPA= $3 \mu\text{g kg}^{-1}$

^b t de student calculado para el test-t de comparación de promedios. El valor crítico de t para $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad y un 98% de confianza es $t_{\text{crit}(0,02;2)} = 3,14$ (Miller y Miller 2002).

Tabla 10. Parte B.

	DBahA			BghiP			IP		
	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	t^b	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	t^b	A ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	B ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	t^b
Muestra 1	2,7	2,6		2,9	2,8		3,4	3,5	
Muestra 2	2,5	2,9		2,9	3,3		3,9	3,8	
Muestra 3	3,1	2,8		2,7	3,2		5,4	3,8	
Muestra 4	2,8	2,8		1,7	3,3		4,7	4,0	
Concentración promedio (n=4)	2,8	2,8	0,00	2,6	3,2	1,93	4,4	3,8	1,27

^a Concentración de los restantes 9 PAHs de la US-EPA= $3 \mu\text{g kg}^{-1}$

^b t de student calculado para el test-t de comparación de promedios. El valor crítico de t para $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad y un 98% de confianza es $t_{\text{crit}(0,02;2)} = 3,14$ (Miller y Miller 2002).

5.6.4. Precisión del método

Un estudio de precisión intra-día (n=4) e inter-día (n=4) fue realizado utilizando un aceite OEV orgánico fortificado con los 7 PAHs estudiados. Los resultados se informan en la Tabla 11. La desviación estándar relativa (RSD) para la precisión intra-día fue menor o igual al 8%, mientras que la precisión inter-día fue menor o igual al 13%. La principal fuente de error fue la etapa de SPE, asociado al empaquetamiento irregular de los sorbentes en las columnas. Sin embargo, estos valores fueron satisfactorios considerando la complejidad de la matriz y el bajo nivel de concentración de los analitos.

Tabla 11. Precisión intra-día (n=4) e inter-día (n=4) de muestras de aceite OEV orgánico utilizando U-PLS/RBL.

	Concentración nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Precisión intra-día		Precisión inter-día	
		SD	RSD	SD	RSD
BaA	3,00	0,23	8	0,09	3
BbF	3,00	0,15	7	0,25	13
BkF	0,75	0,02	4	0,05	8
BaP	3,00	0,20	8	0,29	11
DBahA	3,00	0,14	5	0,27	11
BghiP	6,00	0,45	7	0,65	11
IP	6,00	0,38	6	0,55	9

5.6.5. Aplicación en muestras reales

Un set de 21 muestras reales de aceites comestibles (14 marcas de aceite OEV, una de aceite de oliva puro, 5 de aceite MR y una de aceite de MR utilizado para preparar pescado frito) fueron analizadas por el método propuesto, HPLC-FLD como método de referencia y GC-MS como método confirmatorio. Los resultados obtenidos por U-PLS/RBL, HPLC-FLD y GC-MS, así como los LOD de cada método, se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentraciones de PAHs obtenidas por U-PLS/RBL, HPLC-FLD y GC-MS en muestras reales de aceites comestibles de oliva extra-virgen (OEV), oliva puro (OP) y maravilla refinado (MR).

LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		U-PLS/RBL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							HPLC-FLD ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							GC-MS ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
		BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP
		0,51	0,43	0,07	0,35	0,53	1,8	2,0	0,27	0,04	0,15	0,34	0,33	0,12	1,1	2,0	2,0	2,0	6,0	6,0	8,0	6,0
Aceite	Muestra	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	BaA	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP
OEV	1	- ^b	-	0,09	-	-	-	-	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	0,24	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OP	15	-	-	0,48	-	0,66	-	-	1,5	0,90	0,60	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR fritura	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Los LOD fueron calculados a partir del análisis de la regresión de la curva de calibrado externo como $\text{LOD} = 3,3\text{EE}/b$, donde EE es el error estimado y b es la pendiente de la recta.

^b Valores bajo el LOD.

Como se observa, los límites de detección alcanzados por GC-MS fueron muy superiores a los obtenidos con U-PLS/RBL y HPLC-FLD por lo que este método no fue útil para confirmar la presencia de los analitos en aquellas muestras que resultaron positivas a PAHs por U-PLS/RBL. De las 21 muestras reales, sólo cuatro dieron positivo a la presencia de analitos. Sin embargo, ninguna de ellas sobrepasó los límites fijados por las regulaciones internacionales y nacionales ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la presencia de un solo PAH y $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el grupo de 8 PAHs pesados). Ninguna de las muestras de aceite MR contenía PAHs a niveles detectables y de las 14 muestras de aceite OEV tres dieron positivo a la presencia de BkF. Las concentraciones de BkF predichas por U-PLS/RBL en estas 3 muestras fueron comparadas con las obtenidas por HPLC-FLD mediante un test-t para muestras pareados, sin observarse diferencias significativas entre los métodos (valor $p=0,81$ para un 95% de confianza). Sólo en la muestra de aceite de oliva puro (OP) fue posible detectar 4 analitos (BaA, BbF, BkF y DBahA). De acuerdo al Consejo Internacional de Aceite de Oliva (IOOC), el aceite de oliva puro es una mezcla de aceite de oliva refinado obtenido a partir de aceites vírgenes mediante técnicas de refinado que no modifiquen la estructura glicéridica inicial (acidez libre máxima: 0,3%) y oliva virgen apto para el consumo humano (acidez libre máxima: 2%) (Guimet y col. 2004; Marcos y col. 2002; Gandul y col. 2000). Por lo tanto la probabilidad de contaminación del aceite puro con PAHs es mayor que en un aceite extra virgen puesto que puede deberse a la contaminación de la materia prima del aceite virgen así como también a la producida en el proceso de refinado presente en el aceite homónimo. Las concentraciones de BkF y DBahA predichas por U-PLS/RBL en la muestra OP fueron comparables a las obtenidas por HPLC-FLD. Sin embargo, U-PLS/RBL no fue capaz de predecir las concentraciones de BaA y BbF determinadas por HPLC-FLD. Esto puede atribuirse a que el perfil de excitación-emisión de la muestra OP (Figura 13) fue diferente a los perfiles de las muestras de aceite OEV y MR, presentando un máximo saturado a λ_{ex} : 250-400 y λ_{em} : 370-490 nm correspondiente a tocoferoles y compuestos de oxidación (Guimet y col. 2004; Kyriakidis y col. 2000). Lo anterior constituye una dificultad principalmente en la predicción de BaA cuyo primer máximo de emisión se ubica en 388 nm. Pese a esto y considerando que la muestra OP sobre-exigió al modelo, los valores predichos por el

método propuesto (para el set de muestras reales) son comparables con los obtenidos por el método de referencia.

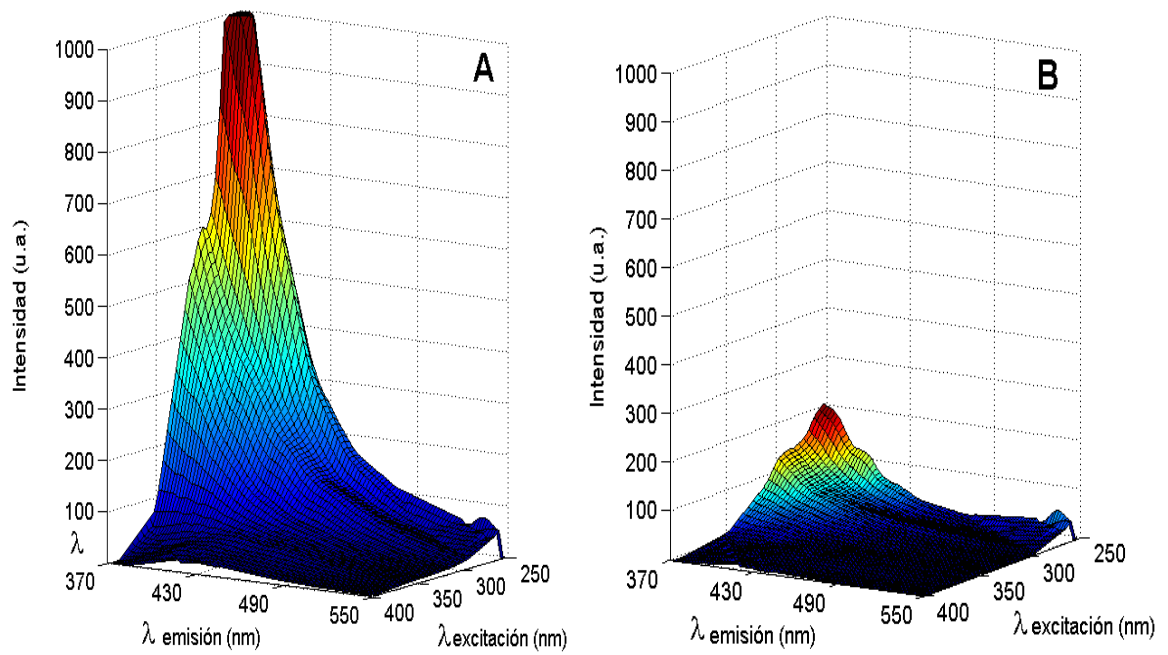


Figura 13. Gráficos tridimensionales de las matrices de excitación-emisión correspondientes a: (A) una muestra de aceite de oliva puro y (B) una muestra de aceite OEV.

6. CONCLUSIONES

La extracción líquido-líquido asistida por microondas con posterior extracción en fase sólida sobre columnas de sílica (MAE-SPE), asociada a espectroscopía de fluorescencia con análisis univariado o multivariado de datos, puede ser utilizado como un método rápido y fácil para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos pesados (PAHs) en aceites de oliva extra-virgen y maravilla refinado.

La combinación de extracción L-L con SPE sobre columnas de sílica y fluorescencia permitió extraer a los analitos, eliminar las principales interferencias en la detección de PAHs (grupo de tocoferoles y clorofila-feofitina), y alcanzar una buena sensibilidad analítica. Además, las recuperaciones individuales de los PAHs, obtenidas por HPLC-FLD, estuvieron entre 62 y 84% y fueron comparables con las obtenidas por fluorescencia asociada a análisis quimiométrico.

El método de “screening” fue capaz de detectar la presencia de los analitos a niveles de concentración tan bajos como los fijados por las regulaciones internacionales, y permitió obtener resultados semi-cuantitativos. Los límites de detección (LOD) obtenidos dependieron del uso de datos espectrales de una, dos o tres vías y estuvieron en el intervalo de 0,79 a 7,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. La menor tasa de falsos positivos en las muestras fueron obtenidos utilizando los datos espectrales de tres vías. Lo anterior dejó en evidencia la posibilidad y potencialidad de combinar el método propuesto con calibración multivariada de segundo orden para determinar PAHs en aceites comestibles.

Las matrices de excitación-emisión (MEE), asociadas al análisis multivariado de segundo orden mediante U-PLS/RBL demostraron ser una herramienta poderosa para resolver la mezcla de PAHs pesados en presencia de una matriz tan compleja como los aceites comestibles. La capacidad del método fue puesta a prueba, evaluando la calidad de predicción de los PAHs pesados en diferentes marcas y tipos de aceites comestibles, y en presencia de los restantes PAHs de la US-EPA. Las concentraciones predichas por U-PLS/RBL para cada analito fueron comparadas con los valores

obtenidos por HPLC-FLD, sin observarse diferencias significativas entre ellos. Además, los LOD obtenidos fueron comparables a los informados para HPLC-FLD. De este modo, el método propuesto utilizando MAE-SPE con espectroscopía de fluorescencia total asociada a U-PLS/RBL es comparable y constituye una alternativa adecuada al método cromatográfico.

Las muestras reales de aceites de oliva extra-virgen y maravilla refinados analizadas por el método de segundo orden no presentaron PAHs a niveles de concentración sobre las regulaciones. La muestra de aceite de oliva puro fue la única que presentó más de un analito y provocó mayor dificultad en la predicción de los PAHs, principalmente de aquellos que fluorescen a longitudes de onda más cortas; bajo las condiciones propuestas, el análisis de este tipo de aceite sobre-exige al modelo generando predicciones erróneas. Así, un nuevo desafío queda planteado para futuras investigaciones en aceites puros de oliva, dada la dificultad de predicción y la potencial presencia de los analitos en estos aceites.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Alomirah, H.; Al-Zenki, S.; Al-Hooti, S.; Zaghloul, S.; Sawaya, W.; Ahmed, N.; Kannan, K., "Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods", *Food Control*, **2011**, 22: 2028-2035.
- ❖ AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, **2002**.
- ❖ Arrebola, F. J.; Frenich, A. G.; Rodríguez, M. J. G.; Bolaños, P. P.; Vidal, J. L. M., "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil by a completely automated headspace technique coupled to gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry*, **2006**, 41: 822-829.
- ❖ Ballesteros, E.; Sánchez, A. G.; Martos, N. R., "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. M. A.; Bakkali, A.; Berrueta, L. A.; 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.
- ❖ Bogusz, M.; El Haj, S.; Ehaideb, Z.; Hassan, H.; Al-Tufail M., "Rapid determination of benzo(a)pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1026: 1-7.

- ❖ Boletín Oficial del Estado, "ORDEN de 25 de julio de 2001 por la que se establecen límites de determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceite de orujo de oliva", España, **2001**, N° 178: 27398.
- ❖ Booksh, K. S.; Muroski, A. R.; Myrick, M. L., "Single-Measurement Excitation/Emission Matrix Spectrofluorometer for Determination of Hydrocarbons in Ocean Water. 2. Calibration and Quantitation of Naphthalene and Styrene", *Analytical Chemistry*, **1996**, 68: 3539-3544.
- ❖ Boque, R.; Larrechi, M. S.; Rius, F. X., "Multivariate detection limits with fixed probabilities of error", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **1999**, 45: 397–408.
- ❖ Bortolato, S. A; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M., "Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences", *Analytical Chemistry*, **2008**, 80:8276–8286.
- ❖ Boskou, D., "Olive Oil Chemistry and Technology", AOCS, 2^a edition, **2006**.
- ❖ Brereton, R. G., "Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry", *The Analyst Tutorial Review*, **2000**, 125: 2125-2154.
- ❖ Bro, R., "PARAFAC. Tutorial and applications", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **1997**, 38: 149–171.
- ❖ Bro, R., "Multivariate calibration What is in chemometrics for the analytical chemist?" *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 500: 185-194.
- ❖ Bro, R; Kiers, H, "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models", *Journal of Chemometrics*, **2003**, 17: 274–286.

- ❖ Caponio, F.; Bilancia, M.; Pasqualone, A.; Sikorska, E.; Gomes, T., "Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage", *European Food Research and Technology*, **2005**, 221:92–98.
- ❖ Cejpek, K.; Hajšlová, J.; Kocourek, V.; Tomaniová, M.; Cmolik, J., "Changes in PAH levels during production of rapeseed oil", *Food Additives and Contaminants*, **1998**, 15: 563-574.
- ❖ Cerretani, L.; Motilva, M.J.; Romero, M.P.; Bendini, A.; Lercker G., "Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different Italian cultivars", *European Food Research and Technology*, **2008**, 226:1251–1258.
- ❖ Chemometry Consultancy, <http://www.chemometry.com>, última visita 26 de Julio de 2012.
- ❖ Cheung, K.C.; Leung, H.M.; Kong, K.Y.; Wong, M.H., "Residual levels of DDTs and PAHs in freshwater and marine fish from Hong Kong markets and their health risk assessment", *Chemosphere*, **2007**, 66: 460-468.
- ❖ Chile Oliva, Asociación de productores de aceite de oliva, "Informe Anual del Mercado Nacional de Aceite de Oliva-2010", Chile, **2010**, 1-19.
- ❖ Chile Oliva, Asociación de productores de aceite de oliva, "Noticia Exportación 2011 ", Chile, **2011**.
- ❖ Christensen, J.; Nørgaard, L.; Bro, R.; Engelsen, S. B., "Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems", *Chemicals Reviews*, **2006**, 106: 1979-1994.
- ❖ Cichelli, A.; Pertesana, G.P., "High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification", *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1046: 141–146.

- ❖ Ciecierska, M.; Obiedzinski, M.W., "Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from unconventional sources", *Food Control*, **2013**, 30: 556-562.

- ❖ Commission of the European Communities, "Commission Regulation (EU) N° 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) N° 188/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs", *Official Journal of the European Union*, **2011**, L 215/4: 1-5.

- ❖ Dabestani, R.; Ivanov I. N., "Invited Review A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons", *Photochemistry and Photobiology*, **1999**, 70(1): 10-34.

- ❖ De la Torre, K., "Efecto del consumo del aceite de oliva sobre la composición de las lipoproteínas de baja densidad en individuos de diferentes países europeos", *Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición y Bromatología*, **2007**, 9-20.

- ❖ Derringer, G.; Suich, R., "Simultaneous optimization of several response variables", *Journal of Quality Technology*, **1980**, vol. 12, N° 4:214-219.

- ❖ Devos, O.; Fanget, B.; Saber, A.-I.; Paturel, L.; Naffrechoux, E.; Jarosz, J., "Use of a Plackett–Burman Design with Multivariate Calibration for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Micellar Media by Synchronous Fluorescence", *Analytical Chemistry*, **2002**, 74: 678-683.

- ❖ Díaz, T. G.; Merás, I. D.; Correa, C. A.; Roldán, B.; Cáceres, M. I., "Simultaneous Fluorometric Determination of Chlorophylls a and b and Pheophytins a and b in Olive Oil by Partial Least-Squares Calibration", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51: 6934-6940.

- ❖ 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.
- ❖ European Food Safety Authority, EFSA, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain adopted on june 2008", *The EFSA Journal*, **2008**, 724: 1-114.
- ❖ European Commission, "Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food", **2002**, 1-84.
- ❖ 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.
- ❖ Fuentes, E.; Báez, M.; Díaz, J., "Microwave-Assisted Extraction at Atmospheric Pressure coupled to different clean-up Methods for the Determination of Organophosphorous Pesticides in Olive and Avocado Oil", *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216: 8859–8866.
- ❖ Galeano, T.; Durn I.; Correa C.A.; Roldn B.; Rodríguez M.I., "Simultaneous Fluorometric Determination of Chlorophylls a and b and Pheophytins a and b in Olive Oil by Partial Least-Squares Calibration", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51: 6934-6940.
- ❖ Gandul, B.; Roca, M.; Mínguez, M., "Use of Chlorophyll and Carotenoid Pigment Composition to Determine Authenticity of Virgin Olive Oil", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2000**, 77: 853-858.

- ❖ Giamarchi, P.; Stephan, L.; Salomon, S.; Bihan, A. L., "Multicomponent Determination of a Polyaromatic Hydrocarbon Mixture by Direct Fluorescence Measurements", *Journal of Fluorescence*, **2000**, 10: 393-402.

- ❖ Grova, N.; Laurent, C.; Feidt, C.; Rychen, G.; Laurent, F.; Lichtfouse, E., "Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms", **2000**, *European Journal of Mass Spectrometry*, 6: 457-460.

- ❖ Grova, N.; Rychen, G.; Monteau, F.; LeBizec, F.; Feidt, C., "Effect of oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on goat's milk contamination", *Agronomy for sustainable Development*, **2006**, 26:195-199.

- ❖ Guillén, M.; Sopelana, P.; Palencia, G., "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Olive Pomace Oil", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52: 2123-2132.

- ❖ Guimet, F.; Ferré, J.; Boqué, R.; Xavier, F., "Application of unfold principal component analysis and parallel factor analysis to the exploratory analysis of olive oils by means of excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy", *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 515: 75-85.

- ❖ 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.

- ❖ Harwood, J.; Aparicio, R., "Handbook of Olive Oil Analysis and Properties", Aspen Publication, **2000**.

- ❖ Hernández, J. A.; Cladera, A.; Estela, J. M.; López de Alba, P. L.; Cerdá V., "Resolution of a multicomponent polycyclic aromatic hydrocarbon system in micellar media by linear variable angle fluorescence applying distinct chemometric techniques", *The Analyst*, **1998**, 123: 2235-2241.
- ❖ Hewavitharana, A. K., "Simple solutions to problems encountered in quantitative analysis of tocopherols and tocotrienols using sílica columns", *Analytical Biochemistry*, **2003**, 313: 342-344.
- ❖ <http://www.models.kvl.dk/algorithms>, última visita 26 de Julio de 2012.
- ❖ International Programme on Chemical Safety and the Commission of the European Communities, IPCS-CEC, "Naphthalene", **1999**, ICSC: 0667.
- ❖ Kyriakidis, N.; Skarkalis, P., "Fluorescence spectra measurement of olive oil and other vegetable oils", *Journal of AOAC International*, **2000**, 83: 1435-1439.
- ❖ Lage, M. A.; Cortizo, J. L., "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.
- ❖ Lee, C. K.; Ko, E. J.; Kim, K. W.; Kim, Y. J., "Partial Least Square Regression Method for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Soil Environment using Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy", *Water, Air, and Soil Pollution*, **2004**, 158: 261-275.
- ❖ Liu, Y. N.; Tao, S.; Dou, H.; Zhang, T. W.; Zhang, X. L.; Dawson, R., "Exposure of traffic police to Polycyclic aromatic hydrocarbons in Beijing, China", *Chemosphere*, **2007**, 66: 1922-1928.
- ❖ Luch, A.; Baird W.M., "The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons", Imperial College, **2005**, Chapter 2: 19-60.

- ❖ Marcos, I; Pérez, J.; Fernández, M.; García, C.; Moreno, B., "Detection of adulterants in olive oil by headspace–mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, **2002**, 945: 221-230.

- ❖ Martí, R.; Llobet, J.; Castell V.; Domingo, J., "Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain", *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46: 3163-3171.

- ❖ 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.

- ❖ Miller, J. N.; Miller, J. C., "Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry", Fourth Ed., Pearson Education S.A., Madrid, Spain, **2002**, p. 263.

- ❖ Minguez, M.I.; Gandul, B.; Gallardo, M.L., "Rapid Method of Quantification of Chlorophylls and Carotenoids in Virgin Olive Oil by High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **1992**, 40: 60-63.

- ❖ Ministerio de Salud Republica de Chile, "Reglamento Sanitario de los Alimentos DTO N°977/96 Modificación Dto 115/03 Minsal", **2009**, Artículo 249: 97-98.

- ❖ Moreda, W.; Rodríguez, R.; Pérez, M. d. C.; 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. S., "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. S., "Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from canned foods", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2005**, 107: 488-496.
- ❖ Moyano, M.J.; Heredia, F.; Meléndez, A., "The Color of Olive Oils: The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of Analysis", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2010**, 9: 278-291.
- ❖ Mueller, K.; Shann, J., "PAH dissipation in spiked soil: Impacts of bioavailability, microbial activity, and trees", *Chemosphere*, **2006**, 64:1006-1014.
- ❖ Muller, P., "Potential for Occupational and Environmental Exposure to Ten Carcinogens in Toronto", *Tox Probe Inc.*, **2002**, B: 78-95.
- ❖ Nagpal N. K., "Ambient Water Quality Criteria for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)", Ministry of Environment, Lands and Parks Province of British Columbia, **1993**.
- ❖ Nahorniak, M. L.; Booksh, K. S., "Excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy in conjunction with multiway analysis for PAH detection in complex matrices", *The Analyst*, **2006**, 131: 1308-1315.
- ❖ Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile, "Mercados Agropecuarios", **2010**, 213: 8-13.
- ❖ Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile, "Balanza Comercial de Productos Silvoagropecuarios, Avance Mensual Enero-Diciembre 2011", **2011**, 1-26.
- ❖ Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile, "Aceite de Oliva", **2012**, 1-23.

- ❖ Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S., "Residual bilinearization. Part 2: Application to HPLC—diode array data and comparison with rank annihilation factor analysis ", *Journal of Chemometrics*, **1990**, 4: 135-146.

- ❖ Olivieri, A. C., " 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.

- ❖ Olivieri, A. C., "Analytical Advantages of Multivariate Data Processing. One, Two, Three, Infinity?", *Analytical Chemistry*, **2008**, 80: 5713-5720.

- ❖ Olivieri, A.; Faber, N.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J.; Mark, H., "Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration", *Pure Appl. Chem.*, **2006**, 78: 633–661.

- ❖ Olivieri, A.; Faber, N., "A closed-form expression for computing the sensitivity in second-order bilinear calibration", *Journal of Chemometrics*, **2005**, 19: 583–592.

- ❖ Purcaro, G.; Moret, S.; Conte, L. S., "Rapid SPE–HPLC determination of the 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils", *Journal of Separation Science*, **2008**, 31: 3936-3944.

- ❖ Purcaro, G.; Moret, S.; Conte, L. S., "Rapid validated method for the analysis of benzo[a]pyrene in vegetable oils by using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass sepectrometry", *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1176: 231-235.

- ❖ Rodríguez, R.; Pérez, M.; Cert, A.; Moreda, W., "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Spanish Olive Oils: Relationship between Benzo(a)pyrene and Total Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56: 10428-10432.

- ❖ Rose, M.; White, S.; Macarthur, R.; Petch, R. G.; Holland, J.; Damant, A. P., "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.
- ❖ Shen, Y.; Hu, Y.; Huang, K.; Yin, S.; Chen, B.; Yao, S., "Solidphase extraction of carotenoids", *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216: 5763–5768.
- ❖ Sikorska, E.; Romaniuk, A.; Khmelinskii, I. V.; Herance, R.; Bourdelande, J. L.; Sikorski, M.; Koziol, J., "Characterization of Edible Oils Using Total Luminescence Spectroscopy ", *Journal of Fluorescence*, **2004**, 14: 25-34.
- ❖ Sikorska, E.; Górecki, T.; Khmelinskii, I. V.; Sikorski, M.; Koziol, J., "Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy", *Food Chemistry*, **2005**, 89: 217-225.
- ❖ Sikorska, E.; Gliszczynä, A.; Khmelinskii, I.; Sikorski, M., "Synchronous Fluorescence Spectroscopy of Edible Vegetable Oils. Quantification of Tocopherols", *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **2005**, 53: 6988-6994.
- ❖ Sikorska, E.; Khmelinskii, I.; Sikorski, M.; Caponio, F.; Bilancia, M.; Pasqualone, A.; Gomes, T., "Fluorescence spectroscopy in monitoring of extra virgin olive oil during storage", *International Journal of Food Science and Technology*, **2008**, 43: 52–61.
- ❖ Simon, R.; Ruiz, J. A. G.; VonHolst, C.; Wenzl, T.; Anklam, E., "Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391: 1397-1408.
- ❖ Srogi, R., "Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review", *Environmental Chemistry Letters*, **2007**, 5: 169-195.

- ❖ Straif, K.; Baan, R.; Grosse, Y.; Secretan, B.; Ghissassi, F. E.; Coglianò, V., "Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons", *The Lancet Oncology*, **2005**, 6: 931-932.

- ❖ Teixeira, V. H.; Casal, S.; Oliveira, M. B., "PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process", *Food Chemistry*, **2007**, 104: 106-112.

- ❖ The Commission Of The European Communities Official Journal of the European Union, "Commission Regulation (EC) No 208/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons", **2005**, 3-5.

- ❖ The Free Chemical Data Base, ChemSpider, <http://www.chemspider.com>, última visita 26 de Julio de 2012.

- ❖ Vichi, S.; Pizzale, L.; Conte, L. S.; 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.

- ❖ Viguli, J.; Verde, J.; Irabien A., "Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain", *Chemosphere*, **2002**, 48: 157-165.

- ❖ Warner, K.; Vick, B.; Kleingartner, L.; Isaak, R.; Doroff, K., "Compositions of Sunflower, Nunsun (Mid-Oleic Sunflower) and High-Oleic Sunflower Oils", *National Sunflower Association, Quality*, **2003**.

- ❖ Weißhaar, R., "Rapid determination of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils", *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2002**, 104: 282–285.

- ❖ Wenzl, T.; Simon, R.; Kleiner, J.; Anklam, E., "Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union", *Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, 25: 716-725.
- ❖ Wu, S.; Yu, W., "Liquid–liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils from China", *Food Chemistry*, **2012**, 134: 597-601.
- ❖ Zandomeneghi, M.; Carbonaro, L.; Caffarata, C., "Fluorescence of Vegetable Oils: Olive Oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53: 759-766.
- ❖ 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

Propiedades analíticas complementarias del método MAE-SPE asociado a espectroscopía de fluorescencia total junto con U-PLS/RBL.

Con el objetivo de tener una visión general de las ventajas comparativas del método desarrollado frente al método de referencia utilizando HPLC-FLD, se realizó un análisis económico para determinar las propiedades analíticas complementarias de ambos métodos. La etapa de preparación de muestra incluyendo MAE-SPE no fue considerada en el cálculo puesto que en ambos casos (fluorescencia total y HPLC-FLD) los tiempos e insumos requeridos son los mismos. Las propiedades analíticas complementarias obtenidas se informan en la Tabla A.

El método de referencia requiere de un mayor consumo de solventes y tiempo de análisis de las muestras que el método propuesto. Además su costo de implementación es considerablemente superior al método espectroscópico (valores de equipos: \$ 36.998.000 y \$ 20.188.000 para HPLC-FLD y fluorescencia total, respectivamente); sólo en términos de equipamiento la técnica cromatográfica es 1,8 veces más costosa que ésta técnica espectroscópica. El costo de análisis (para 10 muestras) es 7,8 veces superior por el método cromatográfico. En consecuencia, el método propuesto utilizando MAE-SPE asociada a fluorescencia total junto con U-PLS/RBL es menos costoso, más rápido y menos contaminante en términos de consumo de solventes que el método cromatográfico de referencia.

Tabla A. Propiedades analíticas complementarias del método propuesto MAE-SPE/Fluorescencia Total-U-PLS/RBL y del método de referencia MAE-SPE/HPLC-FLD, expresadas para 10 muestras.

	Fluorescencia Total	HPLC-FLD
Consumo de reactivos		
Volumen de solvente para contener la muestra	20 mL n-hexano	10 mL 2-propanol
Volumen de fase móvil	-	500 mL acetonitrilo 50 mL agua
Helio ultra puro	-	200 mL/min
Rapidez		
Tiempo de análisis	1,55 h	6,33 h
Costos (en moneda nacional)		
n-hexano ^a	190	-
Acetonitrilo ^a	-	4.375
2-propanol ^a	-	55
Helio ^b	-	2.283
Equipamiento ^c	236	1.205
Detector FLD ^d	-	557
Columna HPLC ^e	-	12.700
Celda de fluorescencia ^f	7	-
Analista encargado ^g	4.844	19.792
Total costos (10 muestras)	5.277	40.967

^a Considerando la compra de botellas de 4 L de solvente con un costo de \$ 38.000, \$ 35.000 y \$ 22.000 para n-hexano, acetonitrilo y 2-propanol, respectivamente.

^b Considerando duración de 6 meses para el análisis de 20 muestras diarias, con un costo de \$ 137.000 por cilindro.

^{c,d} Depreciación lineal a 15 años con un costo inicial de \$ 25.000.000, \$11.550.000 y \$ 20.000.000 para HPLC, detector de fluorescencia y espectrómetro de luminiscencia, respectivamente.

^e Considerando una vida útil de 200 muestras, con un costo inicial de \$ 254.000.

^f Considerando una vida útil de 2 años, con un costo inicial de \$ 75.000.

^g Considerando un salario de \$500.000 líquido al mes para una jornada de 8 horas diarias (equivalente en horas hombre a \$ 3.125).