

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS**

INFORME DE MATERIA INTEGRADORA

“Determinación comparativa de niveles de HAP’s en albacora
y bagre como indicativos de contaminación en cuerpos de
agua”

Previo a la obtención del título de
INGENIERO QUÍMICO

Autores

**MAYRA ALEJANDRA CEPEDA LÓPEZ
MARÍA FERNANDA GONZÁLEZ QUIÑÓNEZ**

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO 2017

DEDICATORIA

Este proyecto se lo dedico de manera especial a mi abuelito Alfonso, por siempre creer en mí, yo sé que desde el cielo es el ángel que me protege y guía mis pasos.

A mi esposo José Alberto porque con su amor y comprensión me da la fortaleza para seguir adelante y lograr mis objetivos.

Mayra Alejandra Cepeda López

A la memoria de mi abuela Benita que con amor y bondad me enseñó que el servir al prójimo es servir a Dios.

María Fernanda González Quiñonez

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral por brindarme una educación de calidad. A mis profesores, en especial al PhD. Vicente Riofrío quien me inculcó el amor por la química y me inspiró a soñar en grande. A mi tutora de tesis, PhD. Olga González, quien con su guía hizo posible la estructuración de este proyecto. Al personal de LESPEC por su apoyo al enfrentar algunos de los obstáculos que surgían en el desarrollo de esta investigación.

A mis padres, por su constante sacrificio y entrega, por haber hecho de mí una mujer de bien. A mis hermanos y a mi esposo, quienes me han apoyado en todo momento y son pilares fundamentales en mi vida. A toda mi familia y amigos, gracias, sin ustedes nada de esto habría sido posible.

Mayra Alejandra Cepeda López

A mi madre por ser un pilar importante en mi vida. A la Escuela Superior Politécnica del Litoral y a sus profesores por la educación de calidad brindada. A mi tutora de tesis; PhD. Olga González y al personal de LESPEC por todo el apoyo brindado.

A mis queridos Hugo y Judith por la paciencia en estos últimos meses, a mi familia, a mis buenos amigos Laila, Inés, Henry, Even, Bryan, Steffy, Michael y a todos aquellos amigos que me acompañaron en esta aventura, sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

María Fernanda González Quiñonez

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido desarrollado en la presente propuesta de la materia integradora corresponde exclusivamente al equipo conformado por:

Mayra Alejandra Cepeda López

María Fernanda González Quiñónez

Y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”.

Mayra Alejandra Cepeda López

María Fernanda González Quiñónez

RESUMEN

El presente trabajo busca determinar la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) en muestras de peces de "albacora" y "bagre", afectados por la contaminación producida por la actividad industrial y petrolera, mediante la aplicación del método de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC). Las especies analizadas en esta investigación fueron seleccionadas debido a que son organismos con una alta demanda en su consumo por parte de los ecuatorianos.

El objeto de estudio fueron 15 de los 16 HAP's que son considerados como prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos debido a su interés toxicológico y cancerígeno.

Como puntos de muestreo se determinaron dos zonas con alta probabilidad de contaminación ambiental en Ecuador por la actividad petrolera de dichos sectores. La primera zona corresponde al noroeste de la playa Las Palmas en la ciudad de Esmeraldas, en donde se recolectaron las muestras de albacora provenientes de dicha costa. La segunda zona fue el sector 4 de Tres Bocas, Guayaquil, en donde se recolectaron las muestras de bagre con la ayuda de pescadores del sector.

Para la aplicación del método desarrollado, se utilizaron 15 muestras de hígado de cada especie recolectada, cuyo aceite fue extraído utilizando acetonitrilo como solvente, para finalmente ser inyectado en el equipo de cromatografía líquida de alta eficacia para su análisis.

De las muestras analizadas solo 3 muestras, que corresponden a la especie "bagre", mostraron presencia de 10 HAP's identificados como: naftaleno, acenafteno, fuoreno, antraceno, pireno, criseno, benzo (k) fluoranteno, dibenzo (a,h) antraceno, benzo (g,h,i) perileno, indeno (1,2,3-cd) pireno. Las demás muestras no registraron presencia de HAP's.

Palabras Claves: HAP's, peces, HPLC, QuEChERS, albacora, bagre, Las Palmas, Esmeraldas, Tres Bocas, Guayaquil, contaminación.

ABSTRACT

The present work seeks to determine the presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in fish samples of "albacore" and "catfish", affected by the contamination produced by industrial and oil activity; applying the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method.

The species analyzed in this research were selected because they are organisms with a high demand of consumption by Ecuadorians.

The object of study were 15 of the 16 PAH's that are considered as priorities by the Environmental Protection Agency of the United States due to their toxicological and carcinogenic interest.

Two zones with a high probability of environmental contamination in Ecuador were determined as sampling points due to oil activities of these sectors. The first zone corresponds to the northwest of Las Palmas beach in the city of Esmeraldas, where albacore samples from that coast were collected. The second zone was sector 4 of Tres Bocas, Guayaquil, where catfish samples were collected with the help of fishermen from the sector.

For the application of the developed method, 15 samples of livers of each species were used, whose oil was extracted using acetonitrile as a solvent, to finally be injected into the high efficiency liquid chromatography equipment for its analysis.

Of the analyzed samples, only 3 samples, corresponding to the species "catfish", showed the presence of 10 PAH's identified as: naphthalene, acenaphthene, fluorene, anthracene, pyrene, chrysene, benzo (k) fluoranthene, dibenzo (a,h) anthracene , benzo (g,h,i) perylene, indeno (1,2,3-cd) pyrene. The other samples did not register any trace of PAH's.

Key words: PAH's, fish, HPLC, QuEChERS, albacore, catfish, Las Palmas, Esmeraldas, Tres Bocas, Guayaquil, contamination.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Analito: Sustancia determinada sujeta a análisis en un ensayo o investigación.

Bioindicador: Organismo vivo que se utiliza para determinar y evaluar el índice de contaminación de un lugar, especialmente de la atmósfera o del agua.

Contaminación: Es la introducción de elementos extraños a un entorno que afectan su estabilidad y pone en riesgo su estado natural.

Cromatograma: Es un diagrama donde se muestran los resultados de la separación de los componentes de una mezcla. Establece la relación de una propiedad de la mezcla vs el tiempo de retención.

Extracto: Es la sustancia que se obtiene luego de realizar una extracción empleando un solvente determinado.

Muestreo: Es la técnica de selección de un conjunto de elementos que se consideran representativos del grupo al que pertenecen.

ABREVIATURAS

HAP's: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

EPA: Environmental Protection Agency

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

COP's: Compuestos orgánicos persistentes

DL50: Dosis letal para el 50% de la población expuesta

PM: Peso molecular

PF: Punto de fusión

PE: Punto de ebullición

S: Solubilidad en agua

PV: Presión de vapor

SIMBOLOGÍA

mg/L: Miligramos sobre litro

ppm: Partes por millón

g/mol: Gramos sobre mol

g/cm³: Gramos sobre centímetro cúbico

Pa: Pascales

°C: Grados Celsius

MgSO₄: Sulfato de magnesio

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO	II
DECLARACIÓN EXPRESA	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	VI
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
TABLA DE CONTENIDOS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Antecedentes	2
1.2. Problema.....	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos Específicos	4
1.4. Justificación	4
1.5. Hipótesis	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Definición	7
2.2. Clasificación.....	7
2.3. Propiedades.....	8
2.4. Fuentes de HAP's en el ambiente.....	9
2.5. Los HAP's como contaminantes	10

2.6.	Bioconcentración y Biomagnificación de HAP's	11
2.7.	Toxicidad de los HAP's y sus metabolitos en los seres acuáticos	11
2.8.	Metodología Analítica empleada en la determinación de HAP's	13
2.8.1.	Extracción por el método QuEChERS	14
2.8.2.	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	14
2.9.	Cálculo de las edades de los peces	15
2.9.1.	Método Directo	15
2.9.2.	Determinación de la edad en las escamas	16
2.9.3.	Determinación de la edad por reconocimiento de anillos o marcas ..	16
3.	METODOLOGÍA	19
3.1.	Determinación de las condiciones de operación del HPLC	19
3.1.1.	Condiciones ambientales	19
3.1.2.	Condiciones del equipo	19
3.1.3.	Programa del Detector	20
3.1.4.	Preparación de Estándares de Calibración	20
3.1.5.	Blanco de Muestra	21
3.1.6.	Blanco de Reactivo	21
3.1.7.	Muestra Control o Material de Referencia	21
3.1.8.	Determinación de límite de detección instrumental	21
3.2.	Obtención de las muestras	22
3.3.	Preparación de las muestras	23
3.4.	Extracción de HAP's por el Método QuEChERS	24
3.5.	Análisis de muestras por Cromatografía líquida de alta eficiencia	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1.	Optimización del Equipo y condiciones experimentales	28
4.2.	Construcción de las curvas de calibración de los HAP's	31

4.3. Comparación de los resultados obtenidos en relación a los límites permitido por la EPA.....	42
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
5.1. Conclusiones	47
5.2. Recomendaciones	49
6. REFERENCIAS	51
7. ANEXOS.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Propiedades físicas de los 16 HAP's clasificados por la U.S. EPA como contaminantes prioritarios	9
Tabla 2.2. Efectos tóxicos de algunos HAP's en función del DL50 para peces ...	12
Tabla 3.1. Condiciones del equipo.....	19
Tabla 3.2. Condiciones de funcionamiento	19
Tabla 3.3. Acondicionamiento del equipo	20
Tabla 3.4. Condiciones de programación del detector.....	20
Tabla 3.5. Preparación de cada uno de los estándares para el método HPLC a 4 concentraciones diferentes	21
Tabla 4.1. Tiempos de retención de cada componente expresados en min.....	21
Tabla 4.2. Valores de coeficientes de determinación R ² obtenidos para cada componente HAP	321
Tabla 4.3. Límite de detección instrumental de cada componente	21
Tabla 4.4. Límites de concentración de HAP's permitidos por la EPA s.....	43
Tabla 4.5. Clasificación de los resultados obtenidos de los análisis de muestras de "bagre" con presencia de HAP's según la Legislación EPA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Ejemplos de HAP's bencenoides	8
Figura 2.2. Ejemplo de HAP's no bencenoides	8
Figura 2.3. Representación esquemática de los dos modos de bioacumulación que opera en la materia biológica presente en un cuerpo de agua	191
Figura 2.4. Esquema representativo de las marcas dentro de un pez con la edad aproximada	21
Figura 3.1. Zona de muestreo de Bagre en el sector de Tres Bocas en la ciudad de Guayaquil	212
Figura 3.2. Zona de muestreo de Albacora en sector aledaño a playa Las Palmas, Esmeraldas	212
Figura 3.3. Medición de albacora, se mantuvo un promedio de 96 a 100 cm de longitud	213
Figura 3.4. Medición de bagre, se mantuvo un promedio de 35 a 42 cm de longitud	214
Figura 3.5. Colocación de la muestra en tubos de centrífuga de 50 ml.....	214
Figura 3.6. Adición de acetonitrilo al cartucho.....	215
Figura 3.7. Agitación de muestras en Vortex	215
Figura 4.1. Cromatograma del patrón de 0,02 mg/L.....	219
Figura 4.2. Cromatograma del patrón de 0,04 mg/L.....	219
Figura 4.3. Cromatograma del patrón de 0,1 mg/L.....	21
Figura 4.4. Cromatograma del patrón de 0,3 mg/L.....	21
Figura 4.5. Orden de elución de cada componente determinado en el presente análisis	2132
Figura 4.6. Curva de calibración del naftaleno obtenida mediante HPLC	2133
Figura 4.7. Curva de calibración del acenafteno obtenida mediante HPLC	2133
Figura 4.8. Curva de calibración del fluoreno obtenida mediante HPLC	2134
Figura 4.9. Curva de calibración del fenantreno obtenida mediante HPLC	2134
Figura 4.10. Curva de calibración del antraceno obtenida mediante HPLC	2135
Figura 4.11. Curva de calibración del fluoranteno obtenida mediante HPLC ...	2135
Figura 4.12. Curva de calibración del pireno obtenida mediante HPLC	2136

Figura 4.13. Curva de calibración del benzo (a)antraceno obtenida mediante HPLC	2136
Figura 4.14. Curva de calibración del criseno obtenida mediante HPLC	2137
Figura 4.15. Curva de calibración del benzo (b) fluoranteno obtenida mediante HPLC	2137
Figura 4.16. Curva de calibración del benzo (k) fluoranteno obtenida mediante HPLC	2138
Figura 4.17. Curva de calibración del benzo (a) pireno obtenida mediante HPLC	2138
Figura 4.18. Curva de calibración del dibenzo (a,h) antraceno obtenida mediante HPLC	2139
Figura 4.19. Curva de calibración del del benzo (g,h,i) perileno obtenida mediante HPLC	2139
Figura 4.20. Curva de calibración del indeno (1,2,3-cd) pireno obtenida mediante HPLC	2140
Figura 4.21. Diagrama comparativo de porcentajes promedio de HAP's en cada cuerpo de agua	2145

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El agua siempre ha sido el elemento vital de los seres humanos, no solo por su consumo directo sino por los beneficios secundarios que este nos aporta. Por ello, las grandes civilizaciones se han asentado en zonas con accesibilidad a lagos, ríos y mares, buscando estas fuentes de agua para obtener el mayor aprovechamiento de sus múltiples beneficios como riego, alimentación, transporte, entre otros.

Debido a las presiones generadas por la actividad humana, los procesos industriales, el crecimiento poblacional desmesurado, la deforestación, el mal manejo de desechos sólidos y las aguas residuales de uso doméstico e industrial, se ha producido un aumento en la contaminación de los ecosistemas acuáticos, afectando así la vida en estos medios.

Los ambientes acuáticos alrededor del mundo reciben descargas de contaminantes por medio de los desechos industriales y urbanos. Las composiciones de estos desechos contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), pesticidas, metales pesados, etc.; sustancias tóxicas para el medio acuático y, por ende, para el ser humano.

El estudio de los HAP's comenzó tras observarse la relación entre estas sustancias y la aparición de ciertos cánceres. Los HAP's desarrollan tumores en piel, pulmones, huesos, mamas y estómago. Aunque algunos HAP's, carecen de propiedades mutágenas y cancerígenas, tienen una función de co-cancerígenos cuando se aplican simultáneamente con sus homólogos cancerígenos (Rubio y Álvarez, 2006).

Estos hechos han generado gran interés en las instituciones gubernamentales y privadas del Ecuador, debido al impacto ambiental que produce este tipo de contaminantes.

1.2. Problema

La actividad industrial del país, sobre todo del sector petrolero, emite una carga considerable de HAP's al ambiente, afectando de manera directa a los ecosistemas acuáticos.

Los HAP's son compuestos semivolátiles que pueden incorporarse a los organismos por ingestión, inhalación o absorción dérmica, dando lugar a procesos de bioacumulación y biomagnificación (Baird y cann, 2005) ya que estos tienden a depositarse en los tejidos de los seres vivos.

Las investigaciones realizadas en el oriente (San Sebastian et al. 2001; Hurtig y San Sebastian 2002 y 2004), sobre la contaminación producida por la industria petrolera, demuestran altos riesgos para las especies animales y por lo tanto para el ser humano, debido a su exposición a dichos contaminantes. Las mutaciones, la aparición de tumores, cánceres, entre otros, muestran los efectos graves y nocivos del mal manejo ambiental. (Mastandrea et al., 2005).

En el sector de Tres Bocas en la ciudad de Guayaquil, se encuentra ubicada la Estación de Recepción de Combustibles de Petroecuador que es la encargada de recibir buques con derivados de hidrocarburos, descargarlos e inmediatamente transferirlos a los terminales de Pascuales a través de los poliductos. Dicha zona constituye además un área pesquera, en donde los moradores del sector realizan diariamente sus actividades de recolección de especies de río y manglar, que posteriormente comercializan y consumen.

La posible contaminación con HAP's en este punto es alta debido a la acumulación de estos componentes en las aguas y suelos a lo largo de los años, y por ende en las especies que habitan este medio. (Rodríguez, 2005)

Otro punto en Ecuador, afectado por la actividad petrolera es la playa de Las Palmas en la ciudad de Esmeraldas, cercano a este sector está ubicado el Terminal Marítimo de Balao, en donde ya se han producido derrames de crudo ocasionados por fallas en el bombeo de este elemento. El 26 de febrero de 2017 se registró un incidente en dicha playa ocasionado por la falla en una válvula de venteo de la estación de bombeo, mientras se bombeaba el hidrocarburo desde un buque tanque hasta los tanques de almacenamiento de Balao. (Superintendencia del Terminal Petrolero de Balao SUINBA, 2017).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar y analizar los niveles HAP's en peces de distintos cuerpos de agua en un rango de edades específico.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Definir las condiciones de operación del método de detección y cuantificación de los HAP's
- Elaborar la curva de calibración para cada analito de estudio
- Evaluar los niveles de concentración de HAP's presentes en las especies de peces bioindicadores
- Elaborar cuadros comparativos que expresen la relación porcentual entre niveles de los HAP's hallados en las especies de peces bioindicadores.

1.4. Justificación

Los estudios realizados sobre peces cuyo ecosistema se encuentra afectado por la actividad industrial, son relevantes ya que estos organismos están expuestos a una contaminación continua, lo cual

los convierte en adecuados bioindicadores de la contaminación en el agua (Falco et Al, 2003).

Se ha elegido realizar este estudio como una investigación base para futuros análisis sobre contaminantes HAP's, y a sus repercusiones sobre especies que habitan en los ecosistemas acuáticos expuestos a diferentes niveles de dichos compuestos químicos.

Todos aquellos avances en la vigilancia ambiental y la detección de efectos biológicos que permitan evaluar el riesgo de contraer trastornos biológicos, son útiles en cuanto se reduzca la producción y exposición a los contaminantes.

La importancia y actualidad del tema justifican la necesidad de profundizar las investigaciones científicas en este campo. A medida que se indaga en este tipo de investigaciones, surgen oportunidades para desarrollar un trabajo multidisciplinario, que permita un enfoque más versátil y completo para esta clase de estudios relacionados con el ambiente.

1.5. Hipótesis

Los niveles de concentraciones de HAP's presentes en las especies de peces de Albacora y Bagre recolectadas en el punto noroeste de playa Las Palmas y en la zona 4 de Tres Bocas respectivamente, exceden los límites permisibles para el consumo humano.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Definición

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se caracterizan por ser un grupo de compuestos orgánicos que poseen más de un anillo bencénico fusionado entre sí. Estas sustancias también conocidas como hidrocarburos aromáticos polinucleares, poliarenos o HAP's, constituyen una familia diversamente distribuida en el ambiente (Solomons, 1980; Vollhardt y Schore, 2007). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos considera a 16 de estos compuestos contaminantes de alta prioridad por su toxicidad alta y afectación al medio ambiente.

2.2. Clasificación

Hay formas diferentes de clasificación para los HAP's. La más útil es la que considera a la presencia o carencia de anillos bencénicos, dividiendo así a los HAP's en sistemas bencenoides y no bencenoides.

Los HAP's bencenoides son aquellos que muestran en su estructura únicamente anillos de benceno. Si los anillos bencénicos están unidos de manera lineal, el hidrocarburo es un aceno, por ejemplo, antraceno, naftaceno, tetraceno, etc. Su nombre finaliza en feno, cuando los anillos bencénicos están unidos de manera angular, como por ejemplo, pentafeno (Gottlieb et Al, 1983). Dos ejemplos representativos de los HAP's alternantes, se muestran en la Figura 2.1

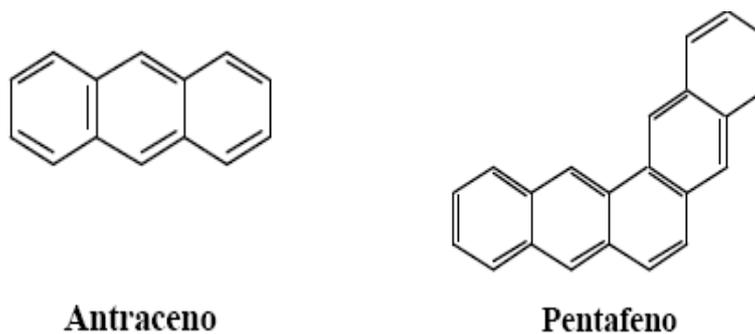


Figura 2.1 Ejemplos de HAP's bencenoides

Fuente: Obtenido de Gottlieb et Al (1983)

Según Gottlieb et Al (1983): Los HAP's también pueden contener anillos de cinco o siete carbonos, conocidos como HAP's no bencenoides. La principal característica radica en que poseen sus orbitales moleculares enlazantes y no enlazantes distribuidos asimétricamente con respecto al punto de energía, ver la Figura 2.2.

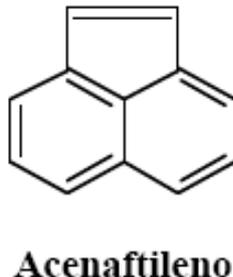


Figura 2.2. Ejemplo de HAP's no bencenoides

Fuente: Obtenido de Gottlieb et Al (1983)

2.3. Propiedades

La mayoría de los HAP's son lipofílicos y solubles en disolventes orgánicos porque son poco polares y presentan una baja solubilidad en agua. Poseen puntos de fusión y ebullición elevados, los cuales aumentan regularmente con el peso molecular.

Los HAP's se consideran compuestos orgánicos persistentes (COP's), ya que suelen permanecer en el ambiente durante largos periodos de tiempo, sin reducir sus propiedades tóxicas.

En la Tabla 2.1., se muestran algunas de las propiedades físicas de los HAP's clasificados como contaminantes prioritarios por la U.S. EPA.

Tabla 2.1. Propiedades físicas de los 16 HAP's clasificados por la U.S. EPA como contaminantes prioritarios

COMPUESTO	FÓRMULA QUÍMICA	P.M. [g/mol]	P.F. [°C]	P.E. [°C]	S. [g/m ³]	P.V. [Pa]
NAFTALENO	C ₈ H ₁₀	128,19	80,5	218,0	31,0x10 ⁻⁰	10,4x10 ⁻⁰
ACENAFTILENO	C ₁₂ H ₁₈	152,20	92,0	270,0	16,1x10 ⁻⁰	9,0x10 ⁻¹
ACENAFTENO	C ₁₂ H ₁₀	154,21	96,2	277,5	3,8x10 ⁻⁰	3,0x10 ⁻¹
FLUORENO	C ₁₃ H ₁₀	166,20	116,0	295,0	1,9x10 ⁻⁰	9,0x10 ⁻²
FENANTRENO	C ₁₄ H ₁₀	178,20	101,0	339,0	45,7x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻²
ANTRACENO	C ₁₄ H ₁₀	178,20	216,2	340,0	4,5x10 ⁻²	10,0x10 ⁻⁴
FLUORANTENO	C ₁₆ H ₁₀	202,26	111,0	375,0	2,6x10 ⁻¹	12,3x10 ⁻⁴
PIRENO	C ₁₆ H ₁₀	202,26	156,0	360,0	13,2x10 ⁻²	6,0x10 ⁻⁴
BENZO (a) ATRACENO	C ₁₈ H ₁₂	228,29	160,0	435,0	1,1x10 ⁻²	2,8x10 ⁻⁵
CRISENO	C ₁₈ H ₁₂	228,30	255,0	407,0	2,8x10 ⁻³	5,7x10 ⁻⁷
BENZO (b) FLUORATENO	C ₂₀ H ₁₂	252,30	168,0	481,0	1,5x10 ⁻³	3,0x10 ⁻⁹
BENZO (k) FLUORATENO	C ₂₀ H ₁₂	252,30	217,0	481,0	8,0x10 ⁻⁴	5,2x10 ⁻⁸
BENZO (a) PIRENO	C ₂₀ H ₁₂	252,30	175,0	495,0	3,8x10 ⁻³	7,0x10 ⁻⁷
INDENO (1,2,3-cd) PIRENO	C ₂₂ H ₁₂	276,30	164,0	530,0	6,2x10 ⁻²	1,3x10 ⁻⁸
DIBENZO (ah) ANTRACENO	C ₂₂ H ₁₄	278,35	267,0	524,0	6,0x10 ⁻⁴	3,7x10 ⁻¹⁰
BENZO (ghi) PERILENO	C ₂₀ H ₁₂	276,34	277,0	550,0	2,6x10 ⁻⁴	1,3x10 ⁻⁸

Nota:

P.M. = Peso molecular S. = Solubilidad en agua
P.F. = Punto de fusión P.V. = Presión de vapor
P.E. = Punto de ebullición

Fuente: Obtenido de Perry y Green (1999)

2.4. Fuentes de HAP's en el ambiente

A pesar de que el origen de los HAP's en el ambiente puede estar ocasionado por diversas fuentes, se pueden diferenciar, cuatro principales:

- Pirólisis de la materia orgánica a altas temperaturas
- Diagénesis de la materia orgánica sedimentada a bajas y moderadas temperaturas para formar los combustibles fósiles
- Origen petrogénico,

- Biosíntesis directa por microorganismos y plantas.

2.5. Los HAP's como contaminantes

A los HAP's se los puede encontrar casi en todas partes, en el aire, el agua y el suelo. El desarrollo de los HAP's en el ambiente depende del modo en que ingresan y se incorporan a este. Ingresan al aire a mediante fuentes antropogénicas como las actividades industriales, el humo de tabaco, las emisiones gaseosas vehiculares, y en menor cantidad a través de fuentes naturales como incendios forestales y erupciones volcánicas. (Boffetta, Jourenkova y Gustavsson, 1997).

Estos componentes pueden ingresar a las aguas superficiales por medio del aire y de las descargas de las actividades industriales especialmente petrolíferas. También como resultado de la migración directa de aguas superficiales contaminadas. En la mayoría de los casos, se puede hallar una relación entre las actividades industriales realizadas por el ser humano y los niveles de contaminación en ríos.

Algunos HAP's debido a sus propiedades fácilmente pueden evaporarse desde las aguas superficiales hasta la atmósfera y otros tienen la capacidad de adherirse a partículas que se depositan en el fondo de ríos o lagos a manera de sedimentos. En el suelo se produce una mejor adherencia de estos componentes a las partículas, por lo que puede producirse una mayor contaminación llegando a afectar aguas subterráneas. (Boffetta et Al, 1997).

Debido a su baja solubilidad en agua y una alta solubilidad en grasas y aceites, los HAP's tienden a acumularse en tejidos adiposos de organismos vivos, materia orgánica y sedimentos, durante períodos prolongados de tiempo generando una biodisponibilidad de estos componentes (Ruus et Al, 2005). La integración a la cadena alimenticia de estos componentes se ocasiona por la baja velocidad con que son degradados dentro de plantas, peces e invertebrados.

Los mamíferos también tienen la capacidad de absorber los HAP's por inhalación, contacto dérmico o por ingestión. En lo que se refiere al ser humano, los HAP's pueden incorporarse por ingestión, inhalación o absorción dérmica.

2.6. Bioconcentración y Biomagnificación de HAP's

Cuando los contaminantes se difunden selectivamente hacia los tejidos grasos de los peces y se vuelven más concentrados gracias al paso del agua a través de las agallas de los peces; se lo conoce como bioconcentración (Elm Nemr y Abd-Allah, 2003).

En cambio, si se presenta el caso de que la concentración de un componente aumenta a lo largo de la cadena alimenticia, se dice que ha sido biomagnificado. Es decir, la biomagnificación resulta de un proceso de bioacumulación que ocurre a medida que las especies se alimentan de otras (Elm Nemr y Abd-Allah, 2003).

La diferencia entre bioconcentración y biomagnificación es ilustrada en la Figura 2.3.

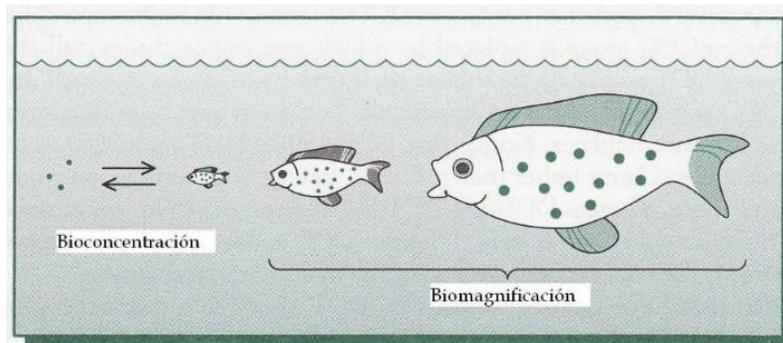


Figura 2.3. Representación esquemática de los dos modos de bioacumulación que opera en la materia biológica presente en un cuerpo de agua

Fuente: Obtenido de Elm Nemr y Abd-Allah (2003)

2.7. Toxicidad de los HAP's y sus metabolitos en los seres acuáticos

Como ya se sabe las especies acuáticas, en especial los peces, biotransforman y metabolizan los HAP's a compuestos

carcinogénicos que se almacenan en las moléculas de ADN del hígado y pasan por la bilis. Esto es producido gracias a que los peces presentan un sistema de oxidación mixta para biotransformar dichos componentes.

Los HAP's son metabolizados por los peces, y también por algunos moluscos y crustáceos, pero en cantidades menores (Estévez, 2002), ya que estos no cuentan con dicho sistema de oxidación mixta por lo tanto tienden a biotransformar los HAP's en una escala mucho menor.

Los efectos tóxicos en función del DL50 que tienen algunos HAP's sobre las especies acuáticas, se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Efectos tóxicos de algunos HAP's en función del DL50 para peces

HAP's	LD50 (mg/l)
Naftaleno	0,1-0,8
Acenafteno	0,6-3,0
Fenantreno	0,4-0,6

Fuente: Obtenido de Antón y Lizaso (2001)

Se ha comprobado que la toxicidad de los HAP's aumenta a medida que aumenta el peso molecular de dichos componentes al igual que su carácter lipofílico. Varias investigaciones han demostrado que existen efectos subletales en la exposición prolongada de organismos a concentraciones bajas de HAP's, que influyen en la afectación de la capacidad de los organismos marinos de reproducirse, crecer, alimentarse o desarrollar otras funciones (Ruus et Al, 2005).

Un estudio realizado por Juma et al. (2017), consistió en evaluar el potencial del pez gobio y el pez conejo como bioindicadores de la contaminación por HAP en las aguas costeras de Zanzíbar, mediante cromatografía de gases con detección espectrométrica de masas (GC /

MS). Los resultados mostraron que el pez gobio (*P. sobrinus*) podría ser un bioindicador de HAP's prometedor en las aguas costeras de las regiones tropicales, incluidas las islas de Zanzíbar. Este fue el primer estudio que aplicó metabolitos de HAP's biliares en especies de peces bioindicadores para rastrear la contaminación por HAP's realizada en la región del Océano Índico occidental. En otro estudio realizado (Essumang, Doodoo y Adjei; 2012) empleando la misma metodología pero direccionada a la investigación de muestras de pescado ahumado de sardinas de 12 comunidades pesqueras a lo largo de la franja costera de Ghana, se obtuvo una acumulación significativamente alta de HAP's en el pescado curado con humo en comparación con las muestras de control de pescado no curadas con humo.

Una de las investigaciones que empleó el método HPLC utilizado en el presente proyecto tuvo como objetivo analizar muestras de leche y alimentos para bebés basados en carne/pescado disponibles en el mercado italiano (Santonicola et al, 2017). Los niveles de marcadores de HAP's fueron superiores a los límites permisibles, las muestras a base de leche mostraron valores significativamente más altos de HAP's que los productos a base de carne/pescado. Otro estudio referente al tema fue realizado por Zachara A., Galkowska D. et al (2017) en donde se determinó el nivel de contaminación de diferentes tipos de carne y productos pesqueros ahumados comerciales del mercado polaco con HAP's. Los productos analizados ahumados por la técnica tradicional contenían significativamente más HAP's en comparación con los productos ahumados por la técnica industrial o producidos con aromas de humo.

2.8. Metodología Analítica empleada en la determinación de HAP's

En la actualidad existen diversos métodos analíticos para determinación de HAP's en muestras ambientales sólidas tales como sedimentos, suelos, partículas atmosféricas, especies animales, plantas, etc. (Peña et al., 2003). Dichos métodos de análisis de HAP's constan de dos etapas principales: la extracción de los HAP's de su

matriz y la determinación de estos componentes mediante un método de identificación adecuado.

A continuación, se presenta la metodología que se utilizó en el presente proyecto:

2.8.1. Extracción por el método QuEChERS

Es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva la cual implica dos etapas fundamentales, una primera etapa de extracción simple, seguida de una fase de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida por dispersión.

En la primera etapa, se realiza una extracción con acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son el sulfato de magnesio, el cloruro sódico, el citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato.

La segunda etapa de este procedimiento corresponde a una limpieza o “cleanup” del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva. Este paso facilita la eliminación del agua residual y de los compuestos presentes en la matriz que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos. La sal a emplear es sulfato de magnesio ($MgSO_4$).

2.8.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

En este tipo de cromatografía un líquido circula con un sólido u otro líquido en fase estacionaria. Se introduce una mezcla de sustancias denominados analitos en la fase móvil, y estos avanzarán con una velocidad diferente dependiente de su afinidad con cada una de las fases. Esto asegura que terminado el recorrido total por la columna cada una de estas fases se moverá en velocidades diferentes, es así que estas fases estarán separadas.

En la HPLC a través de la fase estacionaria pasa el compuesto por la columna cromatográfica mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar en pequeñas cantidades se introduce y se empieza a notar como las partículas empiezan a moverse de forma diferente dependiendo de las interacciones con la fase estacionaria.

2.9. Cálculo de las edades de los peces

Existen diversos métodos para determinar las edades de los peces, pero para la presente investigación hemos empleado el método Directo.

2.9.1. Método Directo

Permite determinar la edad de un pez mediante la interpretación de las marcas de crecimiento en partes duras y óseas de la especie.

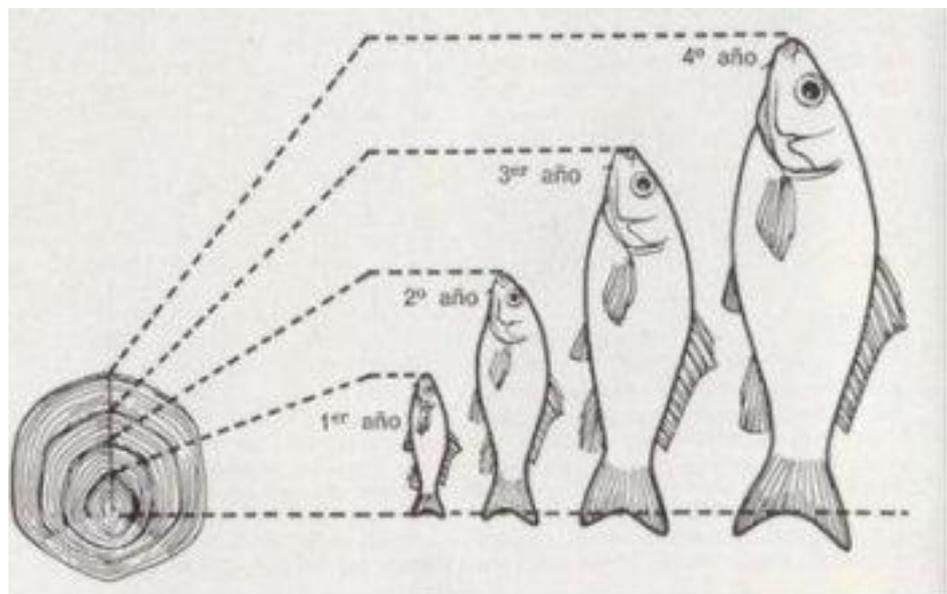


Figura 2.4. Esquema representativo de las marcas dentro de un pez con la edad aproximada.

Fuente: Obtenido de Elm Nemr y Abd-Allah (2003)

2.9.2. Determinación de la edad en las escamas

Las escamas son láminas delgadas que aumentan de tamaño por oposición de círculos de osificación, son muy resistentes y flexibles. Los cambios en el crecimiento se pueden denotar en los círculos dentro de las escamas. (Baitcasting et al. 2008)

2.9.3. Determinación de la edad por reconocimiento de anillos o marcas

Son marcas que se presentan en la parte lateral del pez, estas se muestran como círculos o anillos que crecen y aparecen de acuerdo a los años de la especie (Baitcasting et al. 2008). No es un método muy seguro ya que en algunas especies al alcanzar su madurez se detiene la aparición de anillos, por lo que el pez podría tener más edad de la que indican dichas marcas.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. Determinación de las condiciones de operación del HPLC

3.1.1. Condiciones ambientales

Los ensayos se realizaron en las siguientes condiciones ambientales:

Temperatura entre 15 y 25 °C

Humedad Relativa de 24 a 70%

Dichas condiciones pertenecen al procedimiento específico de ensayos dentro del laboratorio, de las instalaciones facilitadas para el presente estudio.

3.1.2. Condiciones del equipo

Las condiciones óptimas del equipo para la determinación están descritas en la Tabla 3.1 y 3.2

Tabla 3.1. Condiciones del equipo

HPLC	HP (Agilent technologies)
Detector	Detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity
Columna	LiChroCART 250-4 LiChrospher PAH (5µL)
Volumen de inyección	30 µL
Tiempo de corrida	35 minutos

Tabla 3.2. Condiciones de funcionamiento

Tiempo (min)	% Agua	% Acetonitrilo	Flujo mL/min
0	45	55	1,5
4	45	55	1,5
15	1	99	1,5
19	5	95	1,5
19,1	45	55	1,5
22	45	55	1,5

Tiempo de estabilización: 2,5 minutos

Previo al análisis es necesario acondicionar el equipo bajo las siguientes condiciones mostradas en la Tabla 3.3

Tabla 3.3. Acondicionamiento del equipo

Estado	Tiempo (min)	%Acetonitrilo	%Agua	Flujo mL/min
Al terminar el set de muestras y al inicio de cada jornada de trabajo	20 - 30	100	0	1,50
Antes de iniciar el set de análisis	15 - 20	45	55	1,50

3.1.3. Programa del Detector

Las condiciones de análisis fueron establecidas mediante la inyección de un estándar, los valores de configuración se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Condiciones de programación del detector

Tiempo (min)	Excitación (nm)	Emisión (nm)
0,00	220	340
5,50	266	350
8,00	266	370
10,50	270	420
12,50	270	430
21,00	280	430
25,00	290	498
35,00	290	498
Otros parámetros		
Range 1		10
Range 2		10
Rise time		2
Lamp Flash Rate		100
PMT Voltage		500

3.1.4. Preparación de Estándares de Calibración

Se prepararon soluciones estándar de calibración a partir del estándar certificado de 100 ppm utilizando acetonitrilo como solvente. El rango de concentraciones fue de 0,02; 0,04; 0,1; 0,3 ppm. Ver tabla 3.5.

Tabla 3.5. Preparación de cada uno de los estándares para el método HPLC a 4 concentraciones diferentes

Volumen a tomar de la concentración Inicial (mL)	Concentración Inicial (mg /L)	Volumen de aforo (mL)	Concentración Final (mg/L)
1	100	20	5
3	5	50	0,3
1	5	50	0,1
20	0,1	50	0,04
10	0,04	20	0,02

3.1.5. Blanco de Muestra

Para evitar una posible contaminación de reactivos utilizados en el método, se procesó y leyó un blanco de muestra consistente en agua HPLC, la cual fue sometida al mismo proceso de tratamiento previo de las demás muestras.

3.1.6. Blanco de Reactivo

Para controlar una posible contaminación cruzada se leyó un blanco de acetonitrilo después del análisis de muestras con alto contenido de HAP's.

3.1.7. Muestra Control o Material de Referencia

Para controlar la estabilidad del método se procesó y leyó una muestra control o material de referencia el cual fue preparado mediante fortificación de muestras reales en concentraciones comprendidas dentro del rango de trabajo.

3.1.8. Determinación de límite de detección instrumental

Siendo el límite de detección instrumental la concentración correspondiente a una señal:

$$Y_{LD} = Y_0 + 3S_B$$

Y_0 : Área mínima promedio

S_B : Desviación estándar

Ecuación 3.1

Se realizaron 10 mediciones independiente del blanco para cada analito con el fin de hallar la desviación estándar como se sugiere en “Introducción a la Metrología Química: Curvas de Calibración en los Métodos Analíticos” (Dosal y Villanueva, 2008)

3.2. Obtención de las muestras

Se determinaron primeramente dos zonas de actividad industrial con posibles afectaciones medioambientales ocasionadas por el sector petrolero.

El primer punto, correspondiente a agua de río, fue en el área situada cerca a la Estación de Recepción de Combustibles de Petroecuador en el sector “Tres Bocas” en la ciudad de Guayaquil como se puede observar en la Figura 3.1. Se tomaron 5 puntos de muestreo cada 5 metros en donde se colocaron mallas con flotadores. La pesca fue llevada a cabo a la madrugada y se contó con la ayuda de pescadores residentes de la zona. Las 45 muestras recolectadas correspondían a la especie “bagre”.

El segundo punto, correspondiente a agua de mar, situado en el punto $0^{\circ}59'30.2''N$ $79^{\circ}39'42.3''O$ de la playa de Las Palmas en la ciudad de Esmeraldas, cercano a este sector está ubicado el Terminal Marítimo de Balao como se puede observar en la Figura 3.2. Se tomaron 5 puntos de muestreo y con la ayuda de pescadores se pudieron recolectar 15 muestras de la especie “albacora”.



Figura 3.1. Zona de muestreo de Bagre en el sector de Tres Bocas en la ciudad de Guayaquil

Fuente: Obtenido de Google Maps

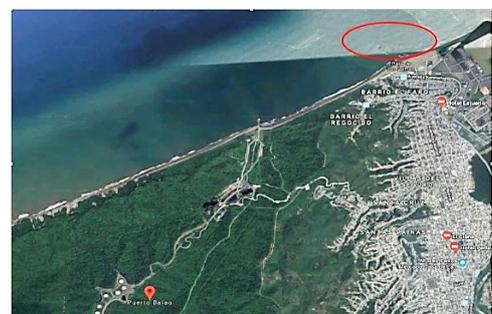


Figura 3.2. Zona de muestreo de Albacora en sector aledaño a playa Las Palmas, Esmeraldas

Fuente: Obtenido de Google Maps

3.3. Preparación de las muestras

Para la determinación de HAP's en las muestras de "albacora", se utilizaron los hígados de dicha especie recolectada en las costas de la playa de Las Palmas en la ciudad de Esmeraldas. Las albacoras fueron medidas previamente para asegurar un tamaño similar entre ellas y así realizar un muestreo más exacto como se observa en la Figura 3.3. El hígado de dichas especies fue extraído con ayuda de los pescadores.



Figura 3.3. Medición de albacora, se mantuvo un promedio de 96cm a 1 m de longitud

Los hígados adquiridos fueron envueltos en papel aluminio, congelados y transportados al laboratorio en una hielera. Una vez en el laboratorio, los hígados fueron descongelados y enjuagados con agua destilada con la finalidad de remover cualquier material extraño que se encontrase en la superficie.

Posteriormente cada uno de los hígados fue pesado y luego licuado para facilitar la homogenización de las muestras.

Para el caso de las muestras de "bagre", los especímenes de pescados recolectados en el área de Tres Bocas fueron almacenados en una hielera y posteriormente llevados al Laboratorio, en donde fueron medidos para determinar la longitud total del cuerpo como se puede apreciar en la Figura 3.4.



Figura 3.4. Medición de bagre, se mantuvo un promedio de 35 cm de longitud

Los pescados fueron inspeccionados previamente para asegurar que dicho espécimen se encontrara en condiciones adecuadas. Luego se procedió a abrir el pescado con bisturí para extraer el hígado.

Debido a los tamaños de las muestras fue necesario juntar 3 hígados para formar una muestra, dando un total de 15 muestras que fueron previamente enjuagadas con agua destilada para eliminar impurezas de la superficie. Luego fueron licuados para homogenizarlos y almacenados cuidadosamente en un refrigerador para su análisis posterior.

3.4. Extracción de HAP's por el Método QuEChERS

Primeramente, se pesó 2 gr de cada muestra homogenizada y se introdujo en tubos de centrifuga de 50 ml como se observa en la Figura 3.5.



Figura 3.5. Colocación de la muestra en tubos de centrifuga de 50 ml

Luego se procedió a añadir 10 ml de Acetonitrilo con un 1% de ácido acético y se agregó el contenido de los cartuchos CL2660 de 50 ml como se aprecia en la Figura 3.6., para posteriormente agitar en VORTEX durante 30 segundos como se puede observar en la Figura 3.7. con la finalidad de que el solvente se incorporara bien en la mezcla.



Figura 3.6. Adición de acetonitrilo al cartucho



Figura 3.7. Agitación de muestras en Vortex

Los tubos fueron llevados a centrifugar a 3.000 rpm durante 3 minutos para separar el material sólido.

Terminada la centrifugación, se extrajo una alícuota de 2 ml que fue introducida en los tubos de 2ml que contenían 150 mg de MgSO₄, 50 mg de PSA y 50 mg de C₁₈ para finalmente repetir una vez más el procedimiento de agitación y centrifugación.

3.5. Análisis de muestras por Cromatografía líquida de alta eficiencia

Los extractos procedentes de la segunda centrifugación fueron transferidos dentro de viales con ayuda de una pipeta Pasteur previa filtración mediante lana de vidrio.

Los viales que contenían las muestras fueron colocados en el equipo HPLC para identificar la presencia de HAP's. Se realizaron 3 réplicas de la extracción de cada muestra y se tomaron 3 lecturas de cada una de las réplicas para finalmente obtener un valor promedio de lectura.

El contenido de cada uno de los 15 compuestos HAPs en mg/L se calculó mediante relación en curvas de calibración.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del Equipo y condiciones experimentales

Los ensayos se realizaron entre 15 y 25 °C y una Humedad Relativa de 24 a 70 %. Dichas condiciones pertenecen al procedimiento específico de ensayos dentro del laboratorio, de las instalaciones facilitadas para el presente estudio.

Las condiciones de operación del equipo HPLC se establecieron en base a los cromatogramas obtenidos de las 4 concentraciones recomendadas por el método del mismo equipo.

Fijando así las siguientes condiciones instrumentales:

Flujo de fase móvil: 1 ml/min

Temperatura de la columna: 20,00 °C

Temperatura del automuestreador: 20,00 °C

Volumen de inyección: 30 µL

Detector UV/VIS: 254 nm

Detector fluorescencia:

- Excitación: 340 nm
- Emisión: 425 nm
- Ganancia: 1

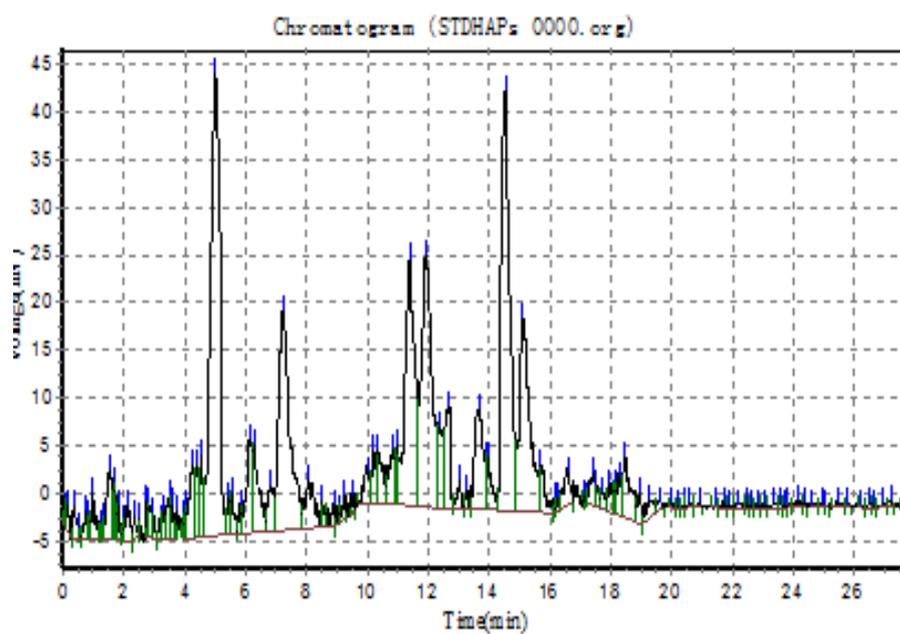


Figura 4.1. Cromatograma del patrón de 0,02 mg/L

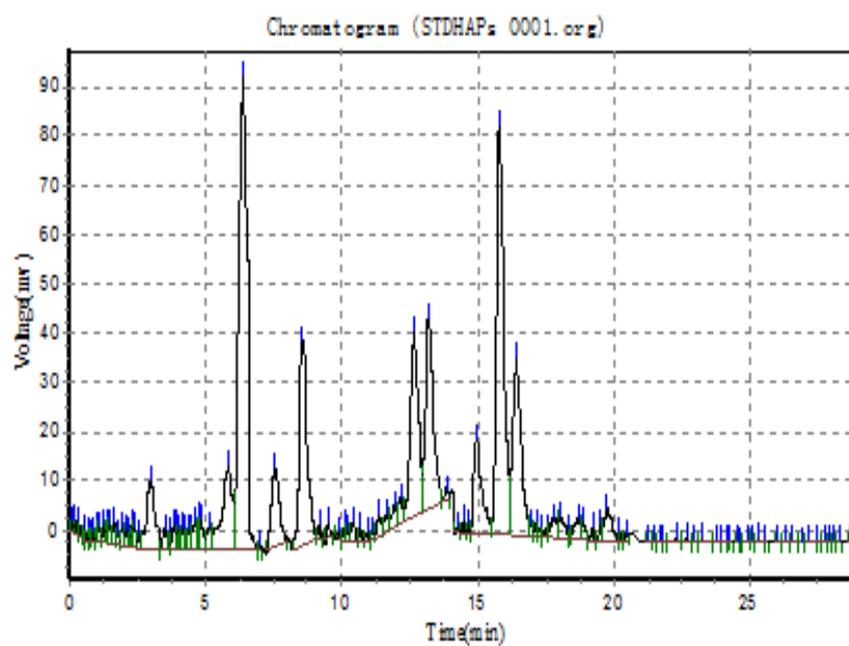


Figura 4.2. Cromatograma del patrón de 0,04 mg/L

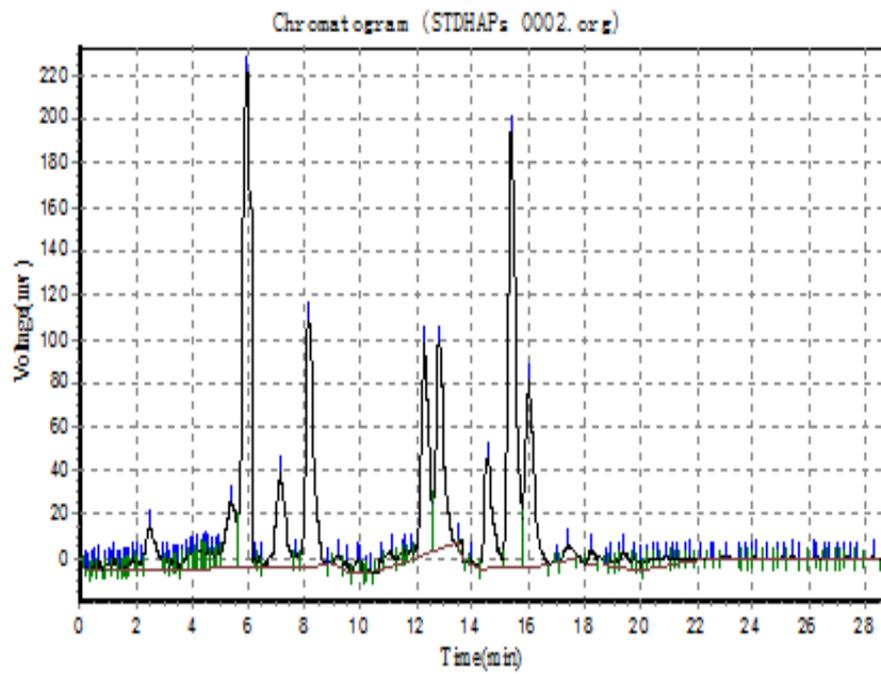


Figura 4.3. Cromatograma del patrón de 0,1 mg/L

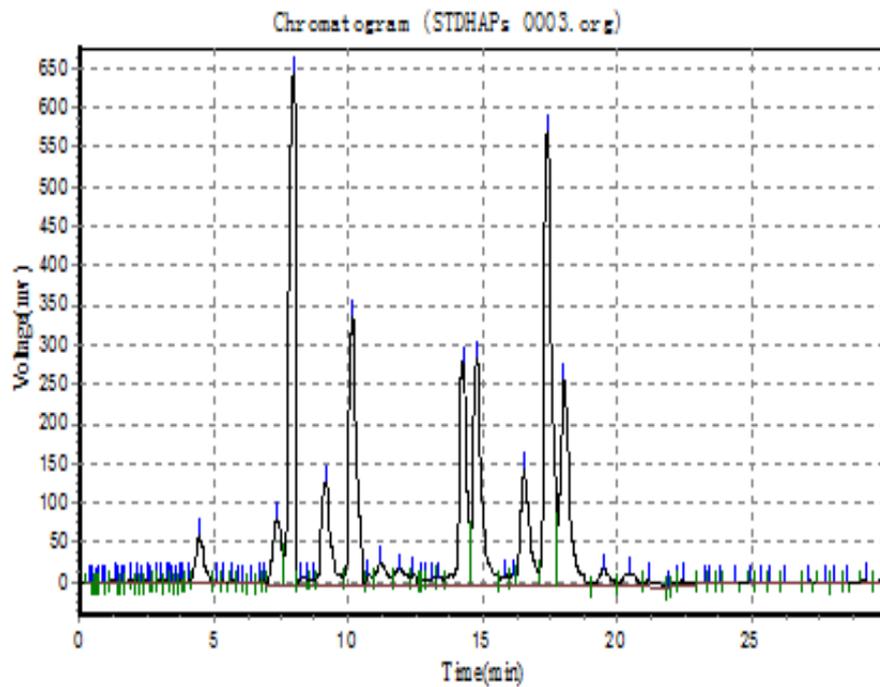


Figura 4.4. Cromatograma del patrón de 0,3 mg/L

4.2. Construcción de las curvas de calibración de los HAP's

Para la obtención de las curvas de calibración de los 15 HAP's estudiados se prepararon soluciones estándar de cuatro niveles de concentración tal como se detalla en el numeral 3.1.3. Los tiempos de retención de cada analito se encuentran detallados en la tabla 4.1

Tabla 4.1. Tiempos de retención de cada componente expresados en min.

ANALITO	Tiempo de retencion
NAFTALENO	7,5
ACENAFTENO	10,02
FUORENO	10,42
FENANTRENO	11,33
ANTRACENO	12,09
FLUORANTENO	12,97
PIRENO	13,56
BENZO(A) ANTRACENO	15,53
CRISENO	15,94
BENZO (B) FLUORANTENO	17,52
BENZO(K) FLUORANTENO	18,18
BENZO (A) PIRENO	18,78
DIBENZO (A,h) ANTRACENO	19,84
BENZO (G,H,I)PERILENO	20,7
INDENO (1,2,3-CD) PIRENO	21,3

En la Figura 4.5. se puede observar el orden de elución de los 15 HAP's analizados en el presente estudio.

Al usar estándares que contenían a los 15 HAP's la variable dependiente fue el área, ubicándose en intervalo promedio de 13299 a 49306131, como se puede observar en (ANEXO).

Los tiempos de retención promedio para cada analito permitieron diferenciar las áreas correspondientes a cada uno, para luego con la ayuda de las curvas de calibración relacionar con las concentraciones pertenecientes.

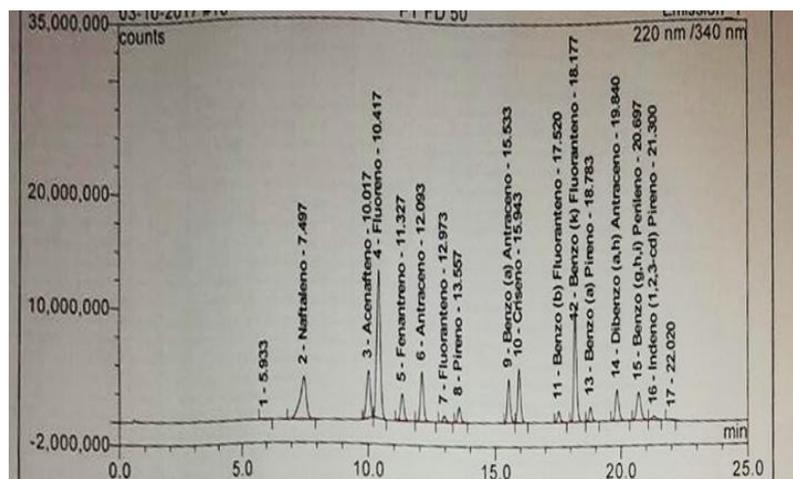


Figura 4.5. Orden de elución de cada componente determinado en el presente análisis

Para observar la correlación lineal entre los valores de las variables “concentración del HAP” vs “área del pico” en el rango de concentraciones estudiado, se analizaron los valores de los coeficientes de determinación R^2 obtenidos de las Figuras 4.6 hasta 4.20, expresados en la Tabla 4.2:

Tabla 4.2. Valores de coeficientes de determinación R^2 obtenidos para cada componente HAP

HAP'S	Coficiente de correlación lineal
NAFTALENO	0,992
ACENAFTENO	0,999
FUORENO	0,997
FENANTRENO	0,991
ANTRACENO	0,999
FLUORANTENO	0,993
PIRENO	0,997
BENZO(A) ANTRACENO	0,998
CRISENO	0,998
BENZO (B) FLUORANTENO	0,983
BENZO(K) FLUORANTENO	0,998
BENZO (A) PIRENO	0,989
DIBENZO (A,H) ANTRACENO	0,995
BENZO (G,H,I)PERILENO	0,991
INDENO (1,2,3-CD) PIRENO	0,998

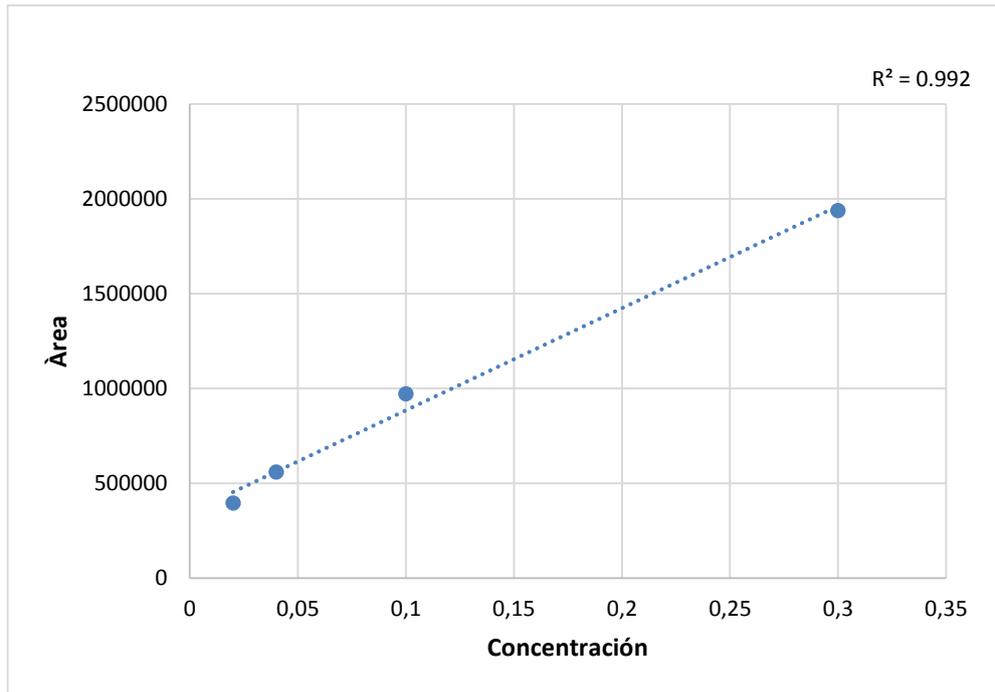


Figura 4.6. Curva de calibración del naftaleno obtenida mediante HPLC

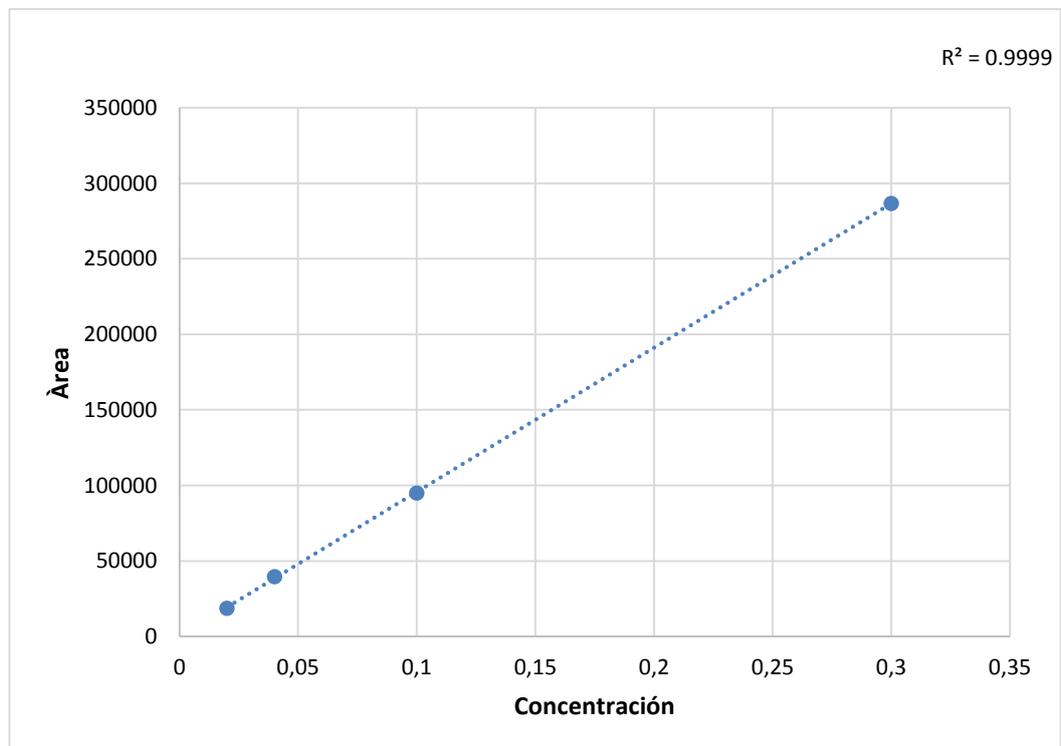


Figura 4.7. Curva de calibración del acenafteño obtenida mediante HPLC

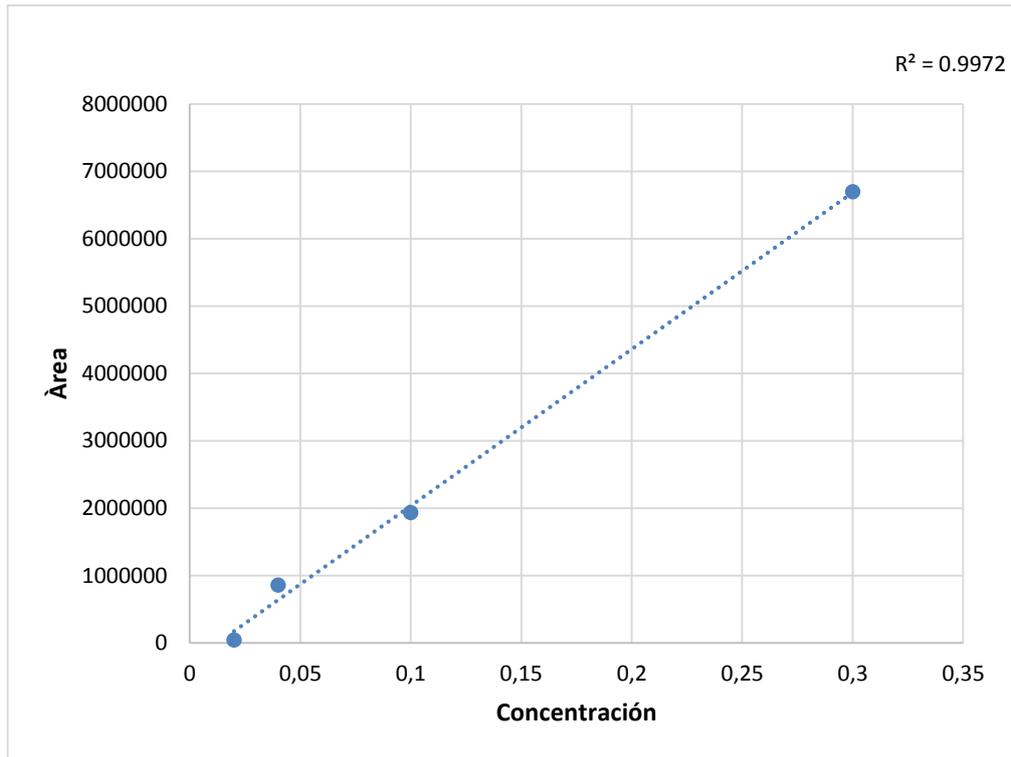


Figura 4.8. Curva de calibración del fluoreno obtenida mediante HPLC

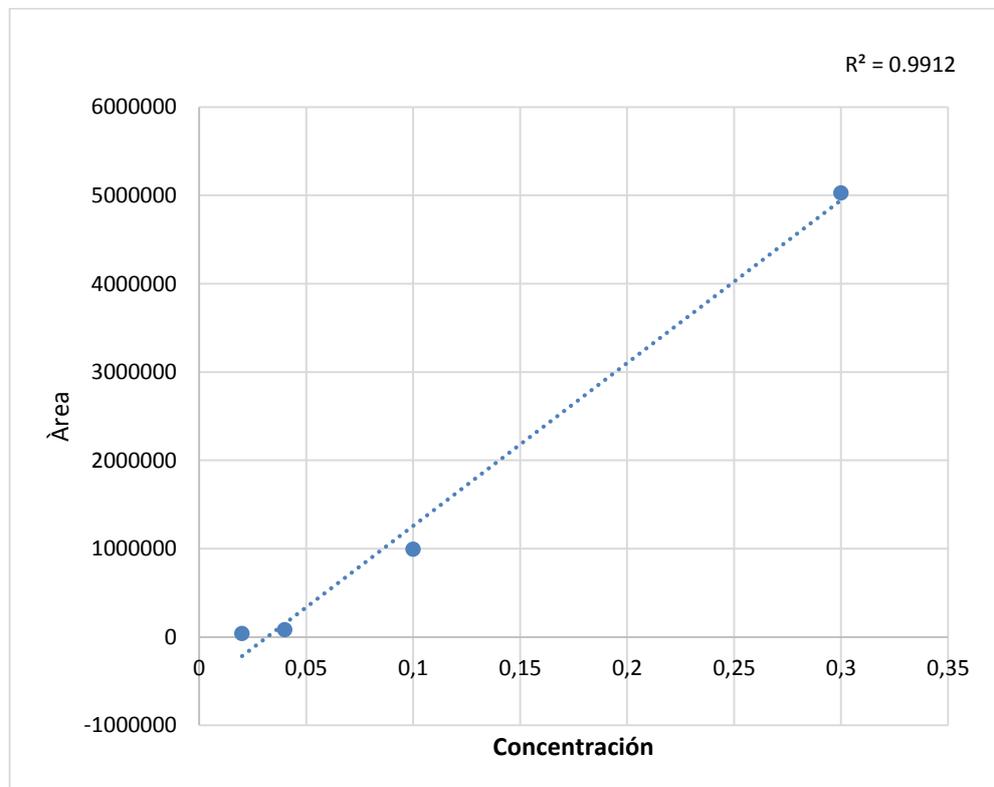


Figura 4.9. Curva de calibración del fenantreno obtenida mediante HPLC

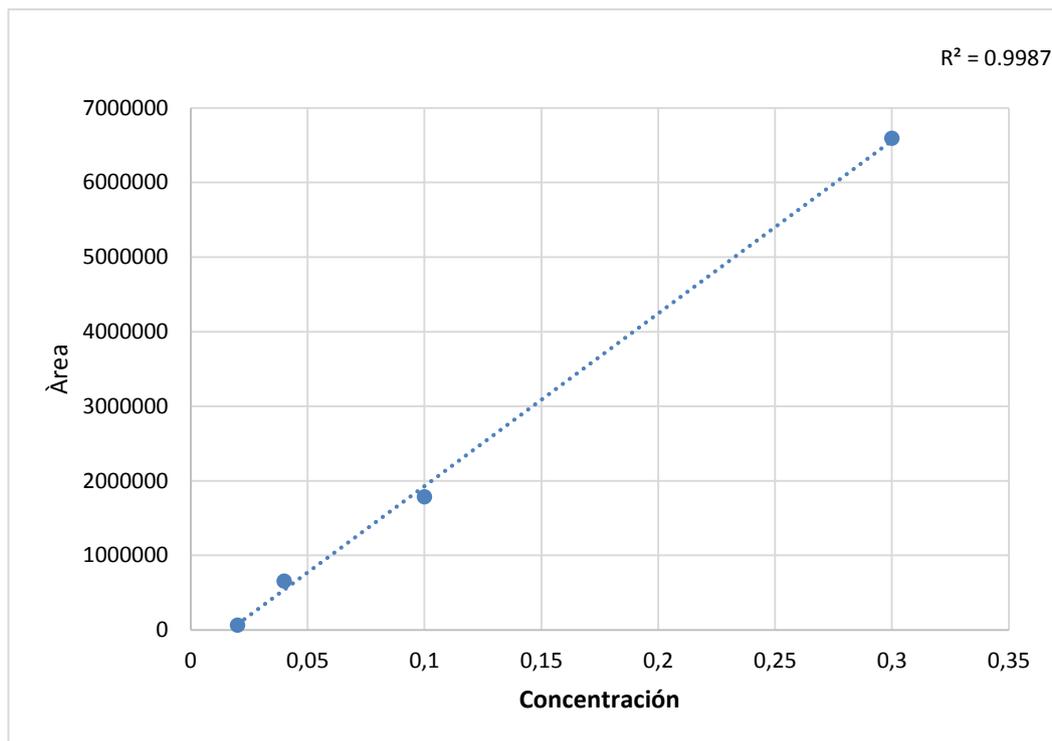


Figura 4.10. Curva de calibración del antraceno obtenida mediante HPLC

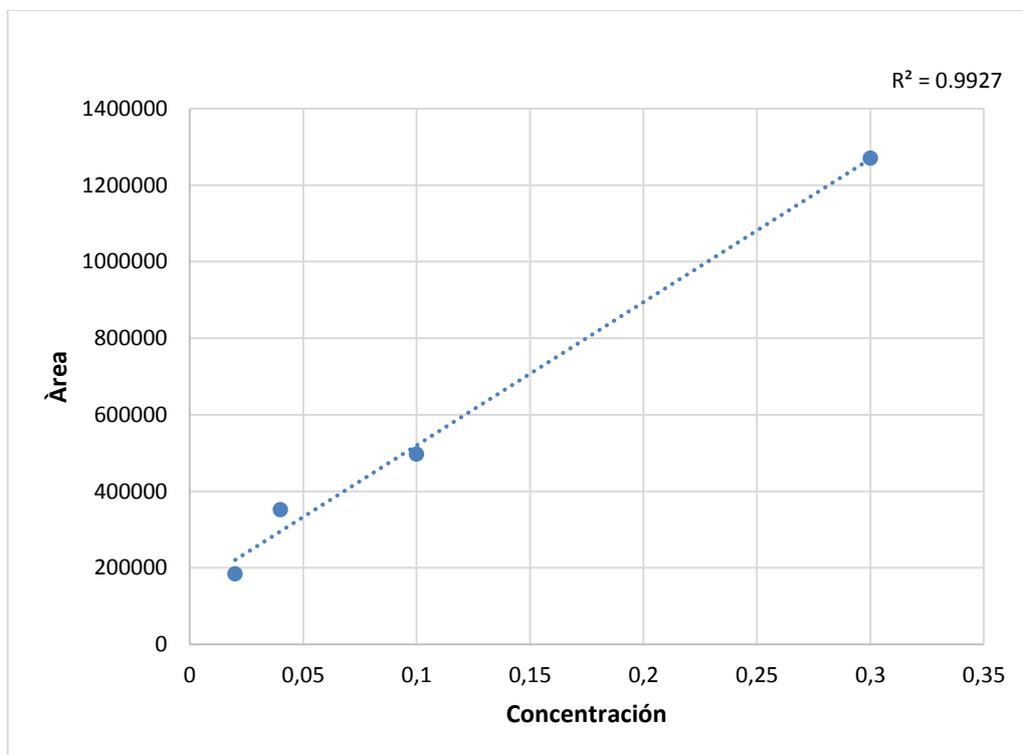


Figura 4.11. Curva de calibración del fluoranteno obtenida mediante HPLC

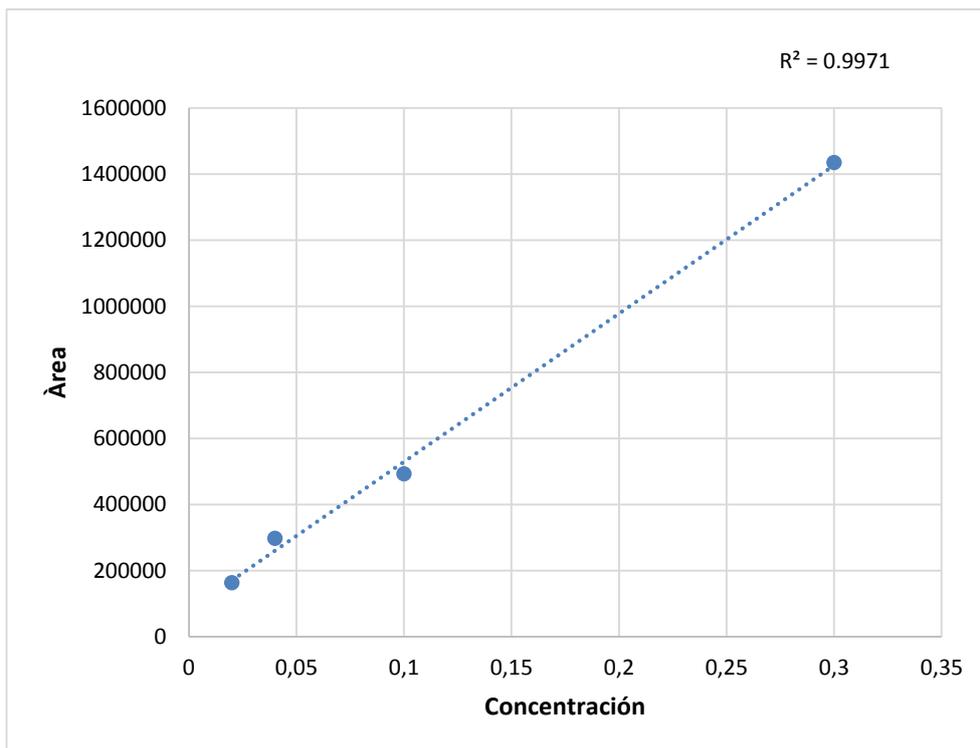


Figura 4.12. Curva de calibración del pireno obtenida mediante HPLC

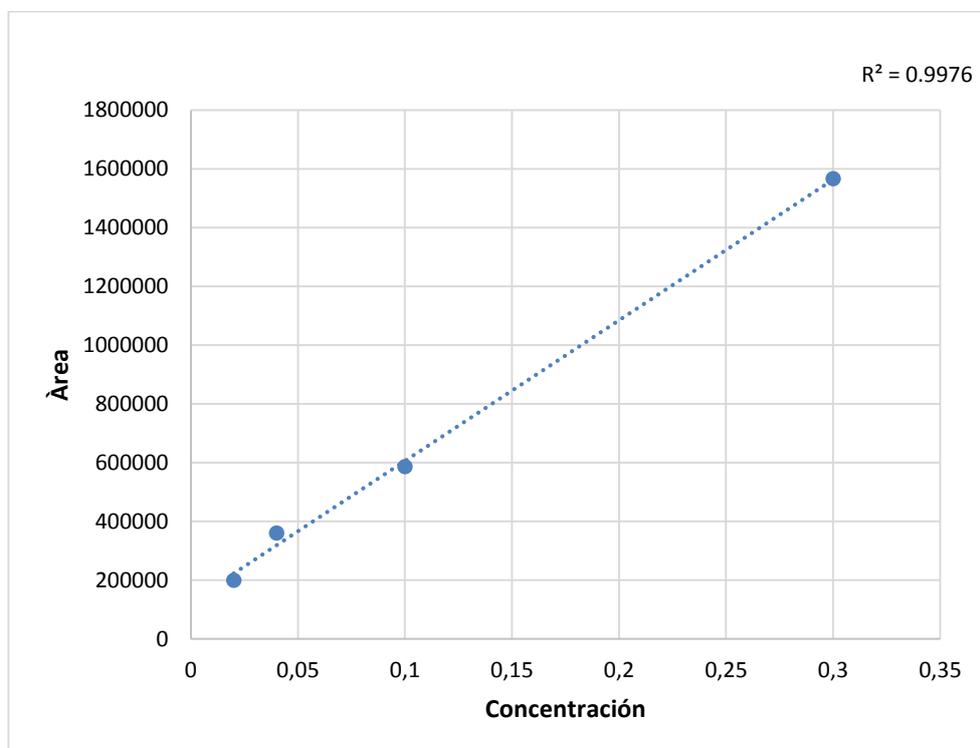


Figura 4.13. Curva de calibración del benzo (a) antraceno obtenida mediante HPLC

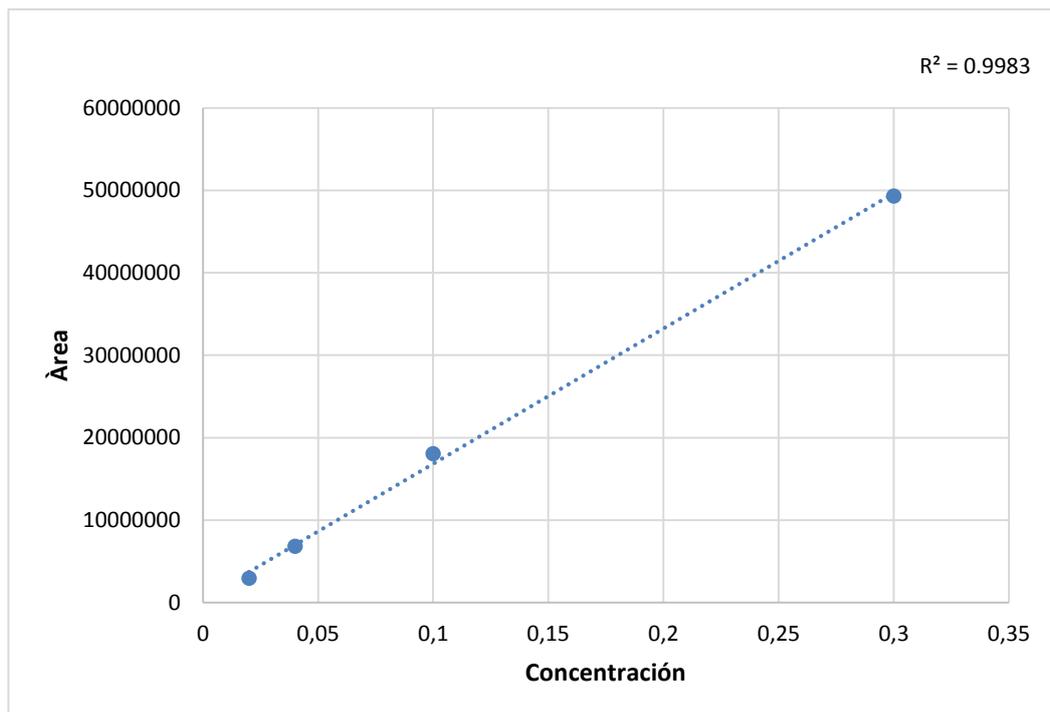


Figura 4.14. Curva de calibración del criseno obtenida mediante HPLC

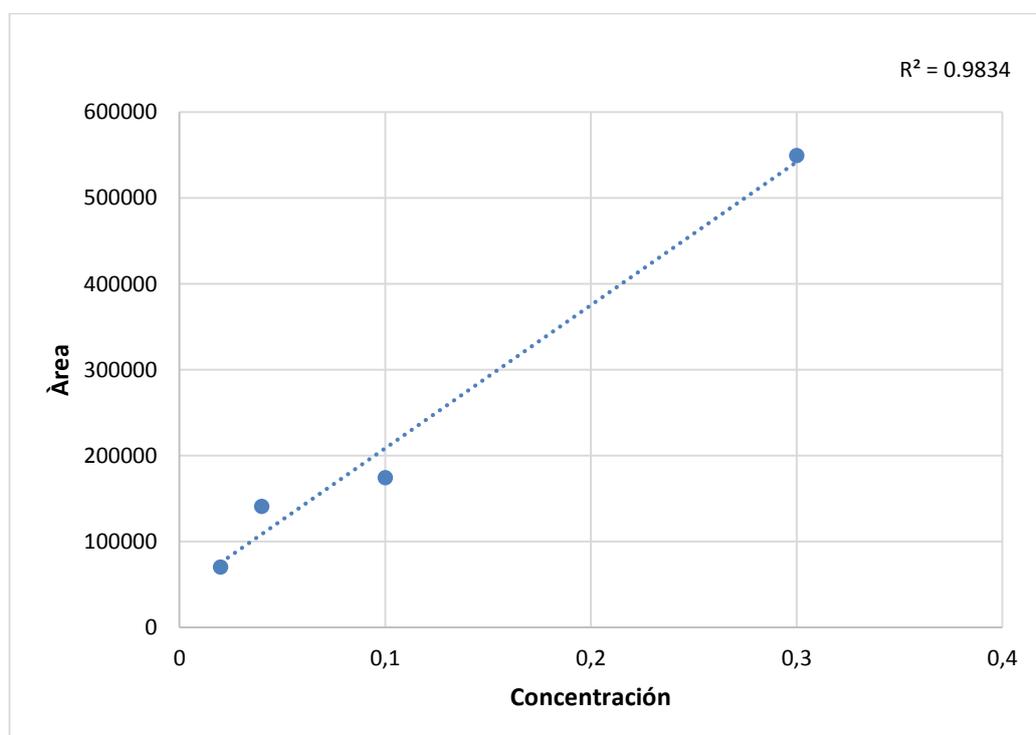


Figura 4.15. Curva de calibración del benzo (b) fluoranteno obtenida mediante HPLC

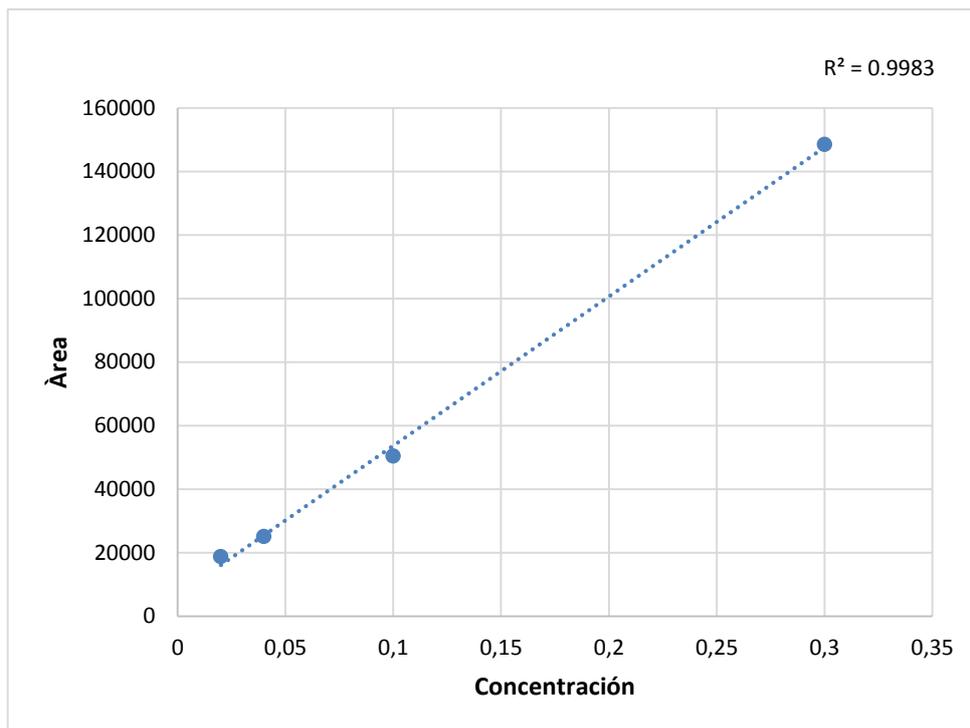


Figura 4.16. Curva de calibración del benzo (k) fluoranteno obtenida mediante HPLC

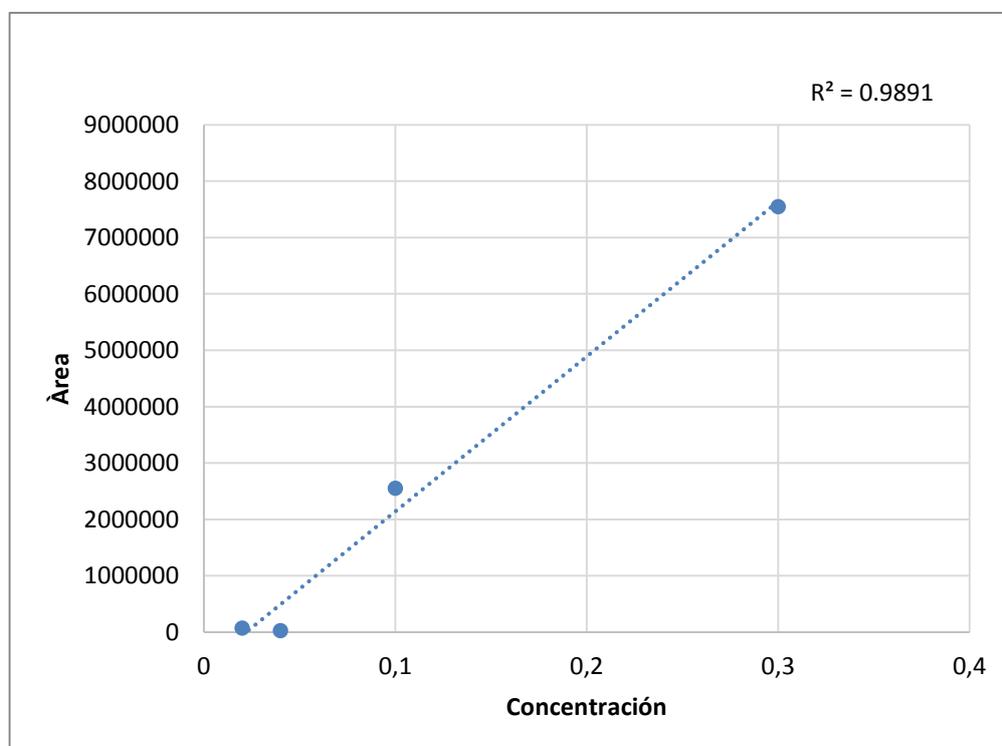


Figura 4.17. Curva de calibración del benzo (a) pireno obtenida mediante HPLC

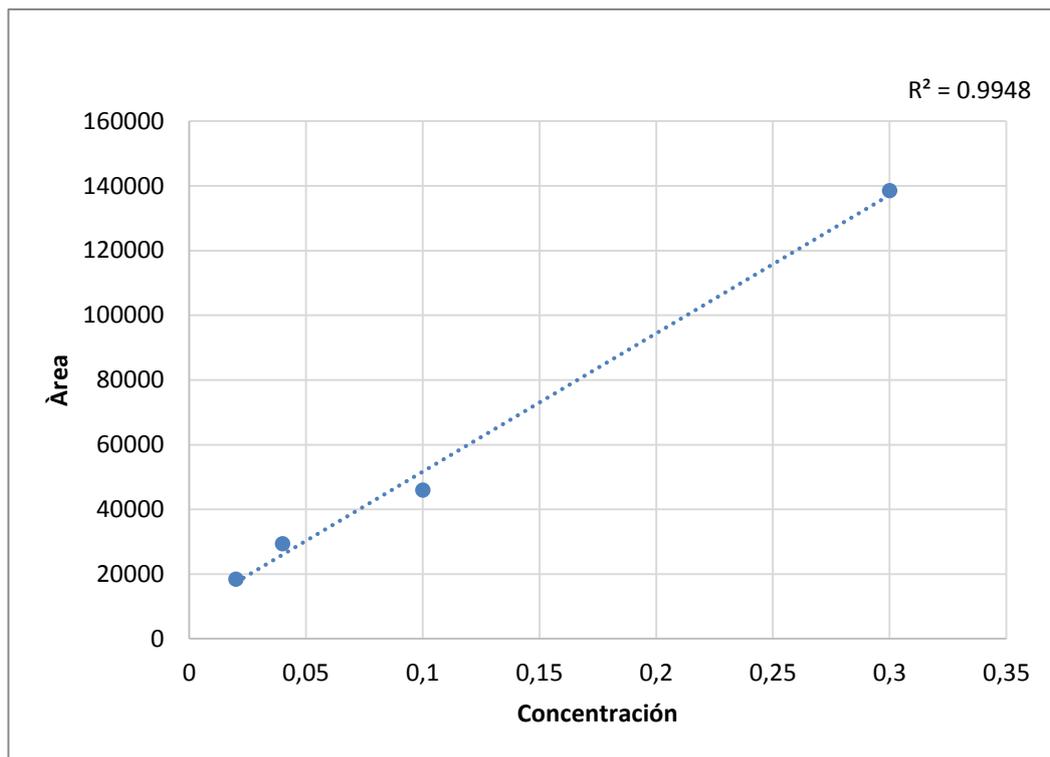


Figura 4.18. Curva de calibración del dibenzo (a,h) antraceno obtenida mediante HPLC

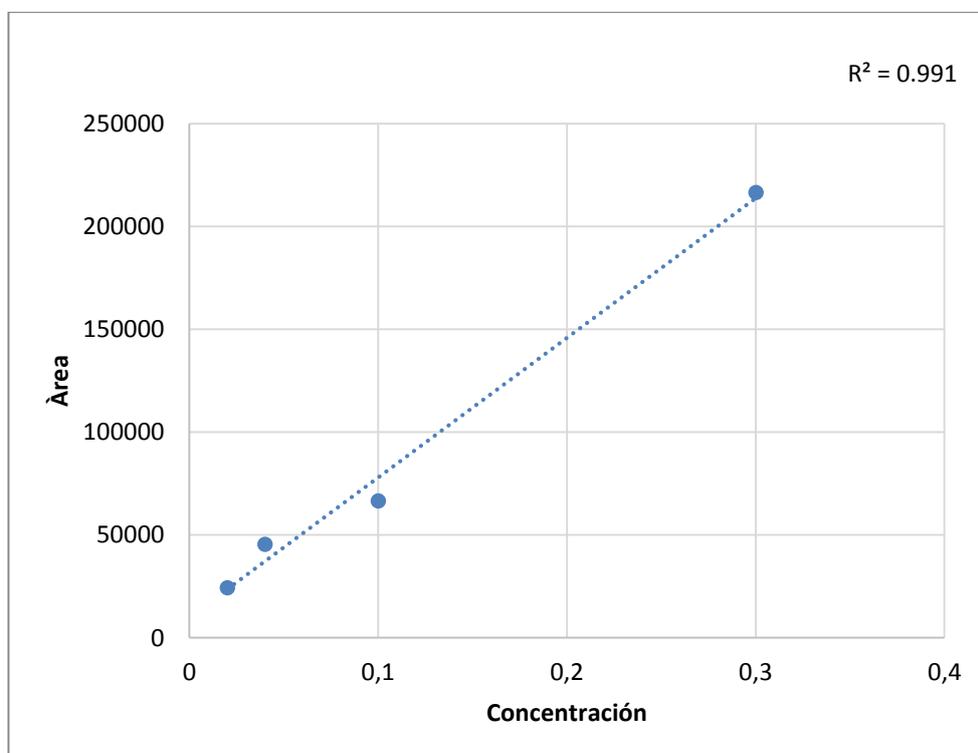


Figura 4.19. Curva de calibración del benzo (g,h,i) perileno obtenida mediante HPLC

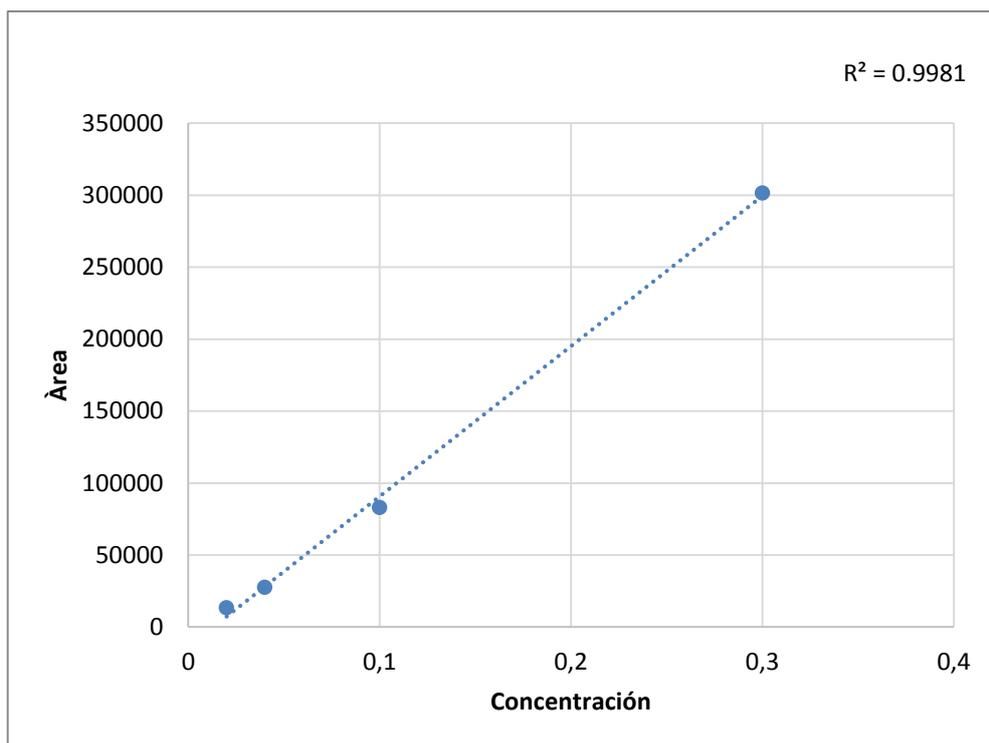


Figura 4.20. Curva de calibración del indeno (1,2,3-cd) pireno obtenida mediante HPLC

Se pudo evidenciar que el mínimo valor de R^2 es 0,983 correspondiente al benzo (b) fluoranteno, mientras que el valor mayor de R^2 es 0,999 para el acenafteno y para el antraceno. Se recomienda un R^2 superior a 0,990 como evidencia de una correlación lineal apropiada entre los valores de las variables (Spiegel, 1991; AOAC, 2002).

Se aprecia que los HAP's con valores de R^2 superiores a 0,990 son: acenafteno, antraceno, fluoranteno, criseno, dibenzo (a,h) antraceno, naftaleno, fluoreno, fenantreno, pireno, benzo (a) antraceno, benzo (k) fluoranteno, benzo (g,h,i) perileno e indeno (1,2,3-cd) pireno, los cuales se pueden considerar que tiene una relación lineal apropiada.

El resto de HAP's fueron: benzo (b) fluoranteno y benzo (a) pireno. Estos compuestos presentaron valores menores a 0,990 que fueron de 0,9834 y 0,9891 respectivamente. Si bien estos analitos presentaron valores de R^2 menores al límite recomendado (0,999)

fueron considerados aceptables porque se acercan por mucho a dicha cota inferior.

Se pudo determinar el límite de detección instrumental mediante la Ecuación 3.1 con los datos de desviación estándar y el valor promedio de los blancos. Los valores de límites de detección instrumentales correspondientes a cada analito se encuentran descritos en la Tabla 4.3

Tabla 4.3. Límite de detección instrumental de cada componente

ANALITO	LÍMITE DE DETECCIÓN INSTRUMENTAL
NAFTALENO	0,070
ACENAFTENO	0,013
FUORENO	0,015
FENANTRENO	0,015
ANTRACENO	0,020
FLUORANTENO	0,037
PIRENO	0,003
BENZO(A) ANTRACENO	0,026
CRISENO	0,002
BENZO (B) FLUORANTENO	0,023
BENZO(K) FLUORANTENO	0,021
BENZO (A) PIRENO	0,021
DIBENZO (A,h) ANTRACENO	0,028
BENZO (G,H,I)PERILENO	0,020
INDENO (1,2,3-CD) PIRENO	0,026

Los límites obtenidos se ubican por encima de los niveles permitidos por la EPA (véase Tabla 4.4) por lo que no se garantiza que los HAP's no detectados o los que se ubicaran por debajo del límite de detección también se encuentren por debajo del margen máximo según EPA

4.3. Comparación de los resultados obtenidos en relación a los límites permitido por la EPA

De las 30 muestras analizadas entre las dos especies con edades de entre 2 y 4 años en la presente investigación, solamente 3 muestras correspondientes a la especie “bagre” mostraron presencia de HAP's.

En nuestro país en el ámbito alimenticio direccionado al pescado encontramos “NORMA PARA EL PESCADO AHUMADO, PESCADO CON SABOR A HUMO Y PESCADO SECADO CON HUMO (CODEX STAN 311-2013, MOD)” NTE INEN 2846, la cual presenta un límite máximo de Benzo (a) pireno de 5,0 µg/kg en pescado procesado y la norma técnica Ecuatoriana “REQUISITOS PARA AGUA POTABLE DE CONSUMO” NTE INEN 1108 en la que se indica un límite máximo de concentración para Benzo (a) pireno de 0,0007 mg/L, más no obstante, no existe norma que fije límites para: acenafteno, antraceno, fluoranteno, criseno, dibenzo (a,h) antraceno, naftaleno, fluoreno, fenantreno, pireno, benzo (a) antraceno, benzo (k) fluoranteno, benzo (g,h,i) perileno e indeno (1,2,3-cd) pireno y benzo (b) fluoranteno. Mucho menos existe una norma que fije parámetros medioambientales de control para concentración máxima de los HAP's analizados en este estudio por lo que se hará uso de las normas regidas por la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)

La legislación que rige a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos establece los límites permisibles de concentración de HAP's para alimentos de consumo humano de la siguiente manera (*ver Tabla 4.4.*):

Tabla 4.4. Límites de concentración de HAP's permitidos por la EPA

Entidad	Nivel (mg/L)	Compuesto
	0,0001	Benzo (a) antraceno
U.S. Environmental Protection Agency	0,0002	Benzo(a) pireno, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, criseno
	0.0003	Dibenzo (a,h) antraceno
	0.0004	Indeno (1,2,3-cd) pireno y otros HAP's

Fuente: U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 2015.

Basándose en esta legislación se pudieron determinar si los valores obtenidos en los análisis estaban dentro de los límites permitidos como se puede apreciar en la Tabla 4.5.

El contenido de cada uno de los componentes de los 15 compuestos HAPs en mg/L se calculó mediante la Ecuación 4.1:

$$HAP's \text{ (cada compuesto)} = \frac{\text{Área del pico} * FD * VE}{FR * Vol. \text{ muestra (ml)}}$$

A = Área total del pico corregida la señal del blanco.

FD = Factor de dilución o concentración

VE = Volumen de solvente de extracción usado en el tubo 1 (ml)

Ecuación 4.1.

Tabla 4.5. Clasificación de los resultados obtenidos de los análisis de muestras de “bagre” con presencia de HAP’s según la Legislación EPA

HAP's	MUESTRA 16	MUESTRA 19	MUESTRA 20
NAFTALENO	<LD	<LD	<LD
ACENAFTENO	MLP	MLP	MLP
FUORENO	MLP	MLP	MLP
FENANTRENO	<LD	<LD	<LD
ANTRACENO	MLP	MLP	MLP
FLUORANTENO	<LD	<LD	<LD
PIRENO	MLP	MLP	MLP
BENZO(A) ANTRACENO	<LD	<LD	<LD
CRISENO	<LD	<LD	<LD
BENZO (B) FLUORANTENO	<LD	<LD	<LD
BENZO(K) FLUORANTENO	MLP	MLP	MLP
BENZO (A) PIRENO	<LD	<LD	<LD
DIBENZO (A,h) ANTRACENO	MLP	MLP	MLP
BENZO (G,H,I) PERILENO	<LD	<LD	<LD
INDENO (1,2,3- CD) PIRENO	MLP	MLP	MLP

LD (límite de detección); MLP(mayor al límite de concentración permitido, ver Tabla 4.16.)

De las 3 muestras que mostraron presencia de HAP's se pudo determinar que los siguientes componentes exceden los límites de concentración permitidos para el consumo humano: acenafteno, fuoreno, antraceno, pireno, benzo (k) fluoranteno, dibenzo (a,h)

antraceno, indeno (1,2,3-cd) pireno y benzo (g,h,i) perileno para las muestras 19 y 20.

Los componentes que presentaron concentraciones menores al límite de detección del método fueron: naftaleno, criseno y benzo (g,h,i) perileno para la muestra 16.

Se pudo observar que varios peces correspondientes a los puntos que mostraron presencia de HAP's presentaban malformaciones en aletas y coloraciones de tejido interno naranjas en comparación con peces que no presentaron contaminación y poseían color rosa. (véase anexo 3)

Finalmente, los componentes que no se encontraban presentes en las muestras fueron: fenantreno, fluoranteno, benzo (a) antraceno, benzo (b) fluoranteno y benzo (a) pireno.

Siendo los de mayor porcentaje de concentración acenafteno, fuoreno y benzo (g,h,i)perileno comprendidos entre 13 y 22% como se puede observar en el diagrama comparativo de la figura 4.21.



Figura 4.21. Diagrama comparativo de porcentajes promedio de HAP's en cada cuerpo de agua

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El método desarrollado en el equipo de HPLC, para el análisis de HAP's, permitió la identificación y cuantificación de los compuestos presentes en las muestras de solución estándar, dichos HAP's fueron: naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a) antraceno, criseno, benzo(b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, benzo (a) pireno indeno (1,2,3-c,d) pireno, dibenzeno(a,h) antraceno y benzo (g,h,i)perileno.

Al observar la repetibilidad de los picos en los correspondientes tiempos de retención permitió establecer parámetros instrumentales para el análisis y determinar las correspondientes curvas de calibración y límites de detección

2. El presente estudio confirmó la presencia de HAP's en muestras de hígados de pescados de la especie Ictaluridae recolectadas en el río Guayas. Se detectaron 10 HAP's que fueron: naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno, pireno, criseno, benzo (k) fluoranteno, indeno (1,2,3-c,d) pireno, dibenzeno(a,h) antraceno y benzo (g,h,i)perileno., se obtuvieron concentraciones que se ubican por sobre los límites de concentración de HAP's permitidos por U.S. Environmental Protection Agency (EPA), siendo estos: acenafteno, fuoreno, antraceno, pireno, benzo(k) fluoranteno, dibenzo (a,h) antraceno e indeno (1,2,3-cd) pireno, encontrándose en mayor abundancia acenafteno, fuoreno y benzo (g,h,i)perileno

3. El análisis efectuado en hígados de peces de la especie Thunnus recolectada a las afueras de la playa de Las Palmas en la ciudad de Esmeraldas, cercano al Terminal Marítimo de Balao, no presentaron niveles de HAP's.

4. Con respecto a los límites de detección instrumentales que se ubicaron por encima de los márgenes permitidos por EPA, se puede concluir que este se fija como limitación en el momento de analizar concentraciones que si bien son mayores al margen fijado se encuentren por debajo de dicho límite de detección. Razón por la cual se no puede garantizar con la absoluta certeza que lo HAP's no detectados por el método se encuentren en concentraciones menores a las que sugiere EPA

5. Al observar el cuadro comparativo de porcentajes de cada HAP's por bioindicador (Véase Figura 4.21) se puede concluir que aunque en el mar (en este caso, la zona cercana a la playa Las Palmas de Esmeraldas) se presente más contaminaciones, que en zonas de río, debido probablemente a su extensa área y a su flujo no existe magnificación de los niveles de contaminación. Por otro lado tanto el área como el flujo en zonas de río es menor permitiendo una posible magnificación de los contaminantes.

El análisis de HAP's en los hígados de las especies bioindicadores, demuestro que los organismos que habitan en del río Guayas en zonas de actividad industrial como es Tres Bocas, que sirven de alimento para los habitantes de zonas cercanas, se ven afectados por derivados hidrocarburíferos; por lo que se justifica la realización de estudios más amplios referentes a HAP's en dicha Zona.

Esta investigación conduce a revelar la importancia que tienen los estudios de impacto ambiental para verificar y exigir la calidad de los recursos alimenticios que son de consumo local.

5.2. Recomendaciones

- Profundizar en estudios de HAP's en peces, para establecer correlaciones entre parámetros biológicos de cada especie analizada y el grado de concentración alcanzado; pudiendo ser este estado reproductivo, índices biométricos, etc.
- Investigar a mayor detalle cómo influye las estaciones climáticas a la bioacumulación de HAP's en peces
- Solicitar apoyo de parte de entidades gubernamentales como no gubernamentales hacia este campo de investigación debido al impacto ambiental que presenta este tipo de contaminantes.
- Establecer reglamentos ambientales referentes a los HAP's en recursos alimenticios de consumo local.

CAPÍTULO 6
REFERENCIAS

CAPÍTULO 6

6. REFERENCIAS

- A. Rubio, C.; Álvarez, R.; Hardisson de la Torre A. (2006) Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en productos de la pesca: revisión. *Rev. Toxicol* 23: 1-6
- B. Vives, I; Grimalt J.O.; Gritart, R. (2001). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología* 3: 45-51.
- C. Falco G, Domingo JL, Llobet JM, Teixido A, Casas C, Muller L. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J Food Protect* 66(12): 2325-2331
- D. Scientific Committee on Food (SCF) Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. (Brussels: Scientific Committee on Food (SCF); 2002.
- E. Bories G. (1990). Toxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y de los productos de pirólisis. En: *Toxicología y Seguridad de los Alimentos*. J. Derache. Ed. Omega, Barcelona. Capítulo 14, pp 295- 318.
- F. Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Cause Control* 8(3): 444-472.
- G. Ruus A, Schaanning M, Oxnevad S, Hylland K. (2005). Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments. *Aquat Toxicol* 72: 273- 292
- H. El Nemr A, Abd-Allah AMA. (2003). Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in microlayer and surface waters along Alexandria coast, Egypt. *Chemosphere* 52: 1711-1716.
- I. Harris, D., (1992). *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ª Edición, Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F., México, pp. 604-605.
- J. Hicks, J., (1982). *Comprehensive Chemistry*. 3ª Edición, Editorial MacMillan Publishers Ltd, Londres, Inglaterra, pp. 770-772.
- K. IARC (International Agency for Research on Cancer), (2007). About the IARC Monographs. Obtenido de <http://www.iarc.fr/en/Media-Centre/IARC-Press->

Releases/Recent-Releases/IARC-Monographs-Programme-finds-cancer-hazards-associated-with-shiftwork-painting-and-firefighting, (Abril, 2008).

L. United States Environmental Protection Agency (EPA) 2013 (cited October 19. Available from <http://www.epa.gov/>

M. European Union . Commission Regulation (EC) No 2065/2003 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of European Union L309/1 2065/2003. 2003.

CAPÍTULO 7

ANEXOS

CAPÍTULO 7

7. ANEXOS

ANEXO 1

Ubicación del sitio de muestreo de los pescados



Figura A1. Ubicación de los dos puntos de muestreo correspondientes a playa Las Palmas (Esmeraldas) y Tres Bocas (Guayaquil) en el mapa de Ecuador

ANEXO 2

Comparación de características de las vísceras de Bagre



Figura A2. Vísceras correspondientes a las muestras de bagre con presencia de HAP's



Figura A3. Vísceras correspondientes a una muestra de bagre que no indicó presencia de HAP's

ANEXO 3

Información de las muestras de hígado de los pescados previo a su análisis

Tabla A1. Pesos de las muestras homogenizadas de hígados de albacora que se tomaron para la extracción, expresados en mg.

MUESTRA	PESO
1	2147
2	2090
3	1929
4	1868
5	1917
6	2006
7	2200
8	1969
9	2168
10	2209
11	1980
12	2163
13	1892
14	2200
15	1954

Tabla A2. Pesos de las muestras homogenizadas de hígados de bagre que se tomaron para la extracción, expresados en mg.

MUESTRA	PESO
16	2158
17	1833
18	2147
19	1868
20	1912
21	1938
22	2132
23	1934
24	2028
25	2149
26	1991
27	2076
28	1945
29	2101
30	1970

ANEXO 4

Datos obtenidos del análisis de las muestras de Bagre mediante HPLC que registraron presencia de HAP's

Tabla A3. Valores de concentración promedio (aplicando ANOVA) de las muestras de bagre que mostraron presencia de HAP's, expresados en mg/L

HAP's	MUESTRA 16	MUESTRA 19	MUESTRA 20
NAFTALENO	mld	mld	mld
ACENAFTENO	0.048	0.016	0.050
FUORENO	0.033	0.037	0.064
FENANTRENO	-	-	-
ANTRACENO	0.022	0.028	0.025
FLUORANTENO	-	-	-
PIRENO	0.005	0.005	0.007
BENZO(A) ANTRACENO	-	-	-
CRISENO	mld	mld	mld
BENZO (B) FLUORANTENO	-	-	-
BENZO(K) FLUORANTENO	0.038	0.038	0.043
BENZO (A) PIRENO	-	-	-
DIBENZO (A,H) ANTRACENO	0.097	0.055	0.035
BENZO (G,H,I) PERILENO	mld	0.029	0.094
INDENO (1,2,3-CD) PIRENO	0.051	0.063	0.032