

Investigación y puesta a punto de la técnica de análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por HPLC-DAD-FLD en mieles en departamento Gualeguaychú, Entre Ríos

González, Paula B., González, Silvina N., Rivero Roy, Vallejos Omar A.

Autoras/es: Facultad de Bromatología. Universidad Nacional de Entre Ríos. Perón 1154. Gualeguaychú. Entre Ríos. R. Argentina.

Contacto: omar.vallejos@uner.edu.ar

DOI: <https://doi.org/10.33255/1621/2706>

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos generados principalmente durante procesos de combustión incompleta. Su relevancia toxicológica se debe a su potencial carcinogénico, mutagénico y genotóxico, lo que ha llevado a organismos internacionales y normativas alimentarias nacionales como el Código Alimentario Argentino (CAA), a establecer límites de tolerancia para su presencia en alimentos. Entre ellos, el benzo(a)pireno se emplea como compuesto de referencia por su elevada toxicidad y por estar clasificado como carcinógeno del Grupo 1 por la IARC. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar y validar un método cromatográfico por HPLC con detección por arreglo de diodos (DAD) y fluorescencia (FLD) para la determinación de HAPs en miel. Se empleó un estándar mixto de benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno, evaluándose parámetros de linealidad, exactitud, precisión, así como los límites de detección y cuantificación. Los resultados demostraron una separación adecuada de los analitos, con validación satisfactoria en términos de sensibilidad y confiabilidad. El uso complementario de DAD y FLD resultó ventajoso, mientras el primero permitió confirmar la identidad espectral de los compuestos, el segundo aportó sensibilidad en la cuantificación. El análisis de mieles de diferentes orígenes no mostró niveles detectables de los compuestos estudiados, confirmando que este alimento presenta un bajo riesgo de contaminación por HAPs en las condiciones evaluadas.

Palabras clave: HAPs, miel, ahumado, HPLC, DAD-FLD

Objetivos propuestos y cumplidos

Etapas	Cumplidas	No Cumplidas
Etapas I: Puesta a punto de metodología de análisis de HAPs. Se realizarán análisis con los estándares de HAPs, con el fin de obtener una técnica adaptada a los equipamientos de la Facultad de Bromatología, para la determinación en mieles. 1.1. Búsqueda bibliográfica. 1.2. Compra de estándares y reactivos. 1.3. Elección y selección de las técnicas a desarrollar.	x	
Etapas II: Muestreo y técnicas de extracción de HAPs en mieles. 1.4. Se realizarán muestreos de mieles a partir de la provisión de la Cooperativa Apícola de Gualaguaychú, en el marco de un convenio establecido entre ambas partes. 1.5. Las muestras recolectadas serán sometidas a procedimientos de extracción específicos para la determinación de HAPs en miel.	x	
Etapas III: Puesta a punto de la técnica analítica de HAPs. 1.6. A partir de la búsqueda bibliográfica de trabajos científicos, se utilizarán mezclas de solventes en diferentes concentraciones para la optimización de la técnica analítica de los estándares de HAPs en muestras de miel. 1.7. Análisis de soluciones estándares de HAPs para evaluación de linealidad, repetibilidad y exactitud. 1.8. Análisis estadístico de los parámetros. 1.9 Redacción del informe final.	x	

Marco teórico y metodológico

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) constituyen un grupo de contaminantes orgánicos persistentes formados durante procesos de combustión incompleta de materia orgánica. Su importancia radica en sus propiedades carcinogénicas, mutagénicas y genotóxicas, lo que ha motivado a organismos nacionales e internacionales a establecer límites de exposición. Entre ellos, el benzo(a)pireno (BaP) se utiliza como compuesto marcador por su elevada toxicidad y por su clasificación como carcinógeno del Grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) (Cerón Neculpan, 2012; Gotor Navarra, 2016). La presencia de HAPs en la cadena alimentaria constituye un riesgo para la salud pública, dado que se han detectado en diversos productos de consumo frecuente como carnes ahumadas, miel, aceites vegetales, frutas, mariscos, té, café, entre otros (Martín, 2012; Ciemniak, Witczak & Mocek, 2013; Corredera et al., 2014). La vía de incorporación puede estar asociada a la contaminación ambiental o al proceso de ahumado y/o secado directo. En el caso particular de la miel, puede contaminarse a través de diferentes mecanismos. Por un lado, factores ambientales como incendios forestales, quema de rastrojos o la instalación de colmenas en proximidad a zonas industriales favorecen la acumulación de HAPs

en el néctar recolectado por las abejas. Por otro lado, ciertas prácticas apícolas, especialmente el uso inadecuado del humo durante la extracción, constituyen una fuente adicional de contaminación (Corredera et al., 2014; Lambert et al., 2012; Perugini et al., 2009). Sin embargo, a pesar de estas posibles vías de incorporación, la información disponible sobre los niveles de HAPs en mieles producidas en Argentina resulta escasa, en particular en regiones de relevancia apícola como la provincia de Entre Ríos. Desde el punto de vista normativo, en Argentina, no se han establecido límites regulatorios específicos para HAPs en miel. El Código Alimentario Argentino (1971, modificado por el Decreto N° 35/2025) determina para los productos cárnicos ahumados un valor máximo de 1 ng/ml de BaP, el cual se empleó como referencia en este estudio.

La determinación analítica de HAPs plantea un desafío debido a su baja concentración y a la complejidad de las matrices. Tradicionalmente, la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) constituye una de las técnicas más utilizadas para el análisis de contaminantes ambientales (Wenzl et al., 2006). No obstante, su aplicación en matrices alimentarias resulta menos frecuente, principalmente por la complejidad de la preparación de muestra y la necesidad de etapas adicionales de extracción y derivatización (Ishizaki, 2010; Plaza Bolaños et al., 2010). En contraste, la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detección por fluorescencia (FLD) ha demostrado gran eficacia en la cuantificación de HAPs en matrices alimentarias. Ello se debe a las propiedades fluorescentes naturales de estos compuestos, que permiten alcanzar límites de detección bajos y adecuados a los niveles esperados en alimentos (Onopiuk et al., 2022). Numerosos trabajos reportan la aplicación de métodos HPLC-FLD validados en matrices alimentarias, evidenciando su eficacia para alcanzar límites de detección y cuantificación bajos, acordes con los niveles esperados en alimentos (Thea, 2016; Dorina et al., 2017; Onopiuk et al., 2022). Complementariamente, la detección mediante arreglo de diodos (DAD) constituye una herramienta de gran valor, ya que permite obtener espectros UV-Vis característicos de cada analito, confirmar la identidad de los picos cromatográficos y establecer los tiempos de retención previos a la cuantificación mediante FLD (Roseiro et al., 2011; Cerón Neculpan, 2012; Bernal Davis, 2012; Lipa Mamani, 2016). Esta estrategia combinada DAD-FLD garantiza tanto la confiabilidad en la identificación de los compuestos, como la sensibilidad necesaria para su cuantificación en matrices complejas como la miel.

En este contexto, la escasez de antecedentes sobre el estudio de HAPs en miel, sumada a la importancia estratégica de este producto en la economía regional, evidencia la necesidad de desarrollar y validar metodologías analíticas confiables para su monitoreo. El presente estudio se centró en la validación de un método cromatográfico por HPLC con detección DAD-FLD, con el objetivo de disponer de una herramienta analítica sensible, selectiva y adecuada para la determinación de HAPs en miel producida en la provincia de Entre Ríos.

Estándares y reactivos

El estándar adquirido está compuesto por una solución de dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en diclorometano (DCM), benzo(a)pireno (BaP) y dibenzo(a,h)antraceno (D(h,a)A) a una concentración de 500 µg/ml de cada uno (EPA 525 PAH Mix A, Supelco®, Sigma-Aldrich).

Todos los disolventes utilizados en el análisis cromatográfico (acetonitrilo y agua), así como el DCM, acetona y hexano para la extracción, fueron de calidad HPLC.

Obtención de materias primas

Se analizaron tres muestras de mieles de diferentes orígenes: eucalipto, pradera y cítrico del departamento Gualeguaychú. Dichas muestras fueron provistas por la Cooperativa Apícola de Gualeguaychú, en el marco de un convenio establecido entre ambas partes.

Extracción de HAPs en miel

Se siguió la metodología propuesta por Dorina et al. (2017), con modificaciones. Se pesaron 5 g de miel previamente homogeneizada y se extrajeron con 12,5 ml de hexano en baño ultrasónico durante 60 min. El extracto obtenido se purificó mediante un cartucho de fase sólida SPE C18, previamente acondicionado con 5 ml de metanol seguido de 5 ml de agua ultrapura. Posteriormente, se añadieron 5 ml de agua y 2 ml de hexano, continuando con la elución con DCM para favorecer la recuperación de los HAPs. El eluato se recolectó y se llevó a evaporación hasta sequedad en un baño termostatzado a 40°C. Finalmente, se reconstituyó con 1 ml de acetonitrilo para su análisis cromatográfico.

Otro procedimiento de extracción se llevó a cabo siguiendo la metodología de Gnon-soro et al. (2018), con modificaciones. Se pesaron 2,5 g de miel, a los que se adicionó sulfato de sodio anhidro y 10 ml de DCM. La mezcla se sometió a ultrasonido durante 30 min, con una amplitud del 70% y un pulso de 2 × 2. La fase líquida obtenida se evaporó hasta sequedad en un baño termostatzado a 40°C y posteriormente, se reconstituyó con 2,5 ml de acetonitrilo. Antes del análisis cromatográfico, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de 0,45 µm.

Por otro lado, se siguió la técnica descrita por Di Fiore et al. (2023), con modificaciones. Se pesaron 2,5 g de miel y se adicionaron 10 ml de una mezcla DCM/acetona (1:1, v/v). La solución se sometió a ultrasonido durante 30 min, con una amplitud del 50% y un pulso de 2 × 2. Posteriormente, se evaporó hasta sequedad en un baño termostatzado a 40°C. Luego se rediluyó en 2,5 ml de acetonitrilo y, de manera análoga al procedimiento anterior, las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm antes del análisis cromatográfico.

Condiciones cromatográficas

La separación y detección de los HAPs se realizó mediante HPLC con detección dual, empleando un sistema acoplado a detectores UV-Visible con arreglo de diodos (DAD) y de fluorescencia (FLD).

El sistema cromatográfico correspondió a un equipo HPLC marca Waters con bomba binaria (Waters 1525), desgasificador en línea, inyector automático (Waters 2507), detector de fluorescencia (Waters 2475) y detector de arreglo de diodos (Waters 2996).

Se empleó una columna Agilent ZORBAX SB-C18 (4,6 mm × 250 mm, 5 µm). La fase móvil estuvo compuesta por acetonitrilo y agua, bajo un programa de gradiente: se inició con 60 % de acetonitrilo y 40 % de agua, aumentando linealmente hasta 100 % de acetonitrilo en 20 min; esta condición se mantuvo hasta los 25 min, retornando luego a la condición inicial a los 28 min. En la *Tabla 1* se puede observar un resumen de las condiciones cromatográficas con los detectores FLD y DAD para el análisis de los HAPs.

El caudal de elución se estableció en 1,0 ml/min, la temperatura de la columna en 35 ± 2 °C y el volumen de inyección en 40 µl. La detección por FLD se efectuó con longitudes de onda de excitación a 260 nm y emisión entre 300 nm y 500 nm.

Complementariamente, la confirmación de BaP y D(a,h)A, se llevó a cabo mediante un detector DAD. La identificación se sustentó en la coincidencia entre los tiempos de retención y los espectros de absorción, con máximos de absorbancia en 362,5 nm y 399,7 nm, respectivamente.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para el análisis de BaP y D(a,h)A

Condiciones cromatográficas			
Parámetros Instrumentales	Condiciones		
Columna	Agilent ZORBAX SB-C18 (4,6 mm × 250 mm, 5 µm)		
Temperatura de la columna	35 °C		
Fase móvil	A: Agua		
	B: Acetonitrilo		
Modo de elución	Gradiente		
	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	40	60
	5	40	60
	20	0	100
	28	40	60
Flujo de la Fase Móvil	1,0 ml/min		
Detector FLD	λ de emisión (nm): 300 - 500		
	λ de excitación (nm): 260		
Volumen de inyección	40 µl		

Parámetros evaluados para validación de la técnica analítica

A partir de la solución estándar se preparó una solución de trabajo mediante dilución en acetonitrilo con una concentración final de 100 ng/ml para BaP y D(a,h)A. Esta solución se envasó en un vial de vidrio color ámbar con cierre a rosca y se conservó bajo condiciones de refrigeración controlada (2-8 °C) a fin de preservar su estabilidad.

Para la obtención de las curvas de calibración, la solución de trabajo fue diluida en acetonitrilo, generando niveles de concentración de 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 ng/ml para cada analito. Estas concentraciones se ajustaron al Código Alimentario Argentino (CAA, 1971), donde establece que los productos ahumados no deben superar 1 ng/ml de HAPs.

Validación del método analítico

En el presente estudio, la validación del método propuesto para la determinación de HAPs se llevó a cabo siguiendo criterios internacionalmente aceptados para procedimientos cromatográficos. Los parámetros evaluados incluyeron: linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), exactitud (recuperación) y precisión (repetibilidad).

Linealidad

Para su evaluación se prepararon curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de la solución de trabajo, cubriendo un rango de 0,5 a 2,5 ng/ml para los 2 HAPs evaluados. Cada nivel de concentración fue analizado por triplicado. Se representó la respuesta instrumental (área bajo la curva) frente a la concentración, ajustándose

los datos mediante regresión lineal. La adecuación del modelo se verificó mediante el coeficiente de determinación (R^2), pruebas de normalidad de residuos (Shapiro-Wilk), homocedasticidad y significancia de la relación concentración–respuesta (ANOVA, $p < 0,05$). El intervalo de trabajo se estableció a partir de las concentraciones que cumplieron simultáneamente con los criterios de linealidad y precisión, considerando además que, según el Código Alimentario Argentino (CAA, 1971), los productos ahumados no deben superar 1 ng/ml de HAPs.

Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ)

Para determinar el LOD y LOQ se prepararon curvas de calibración a bajas concentraciones (0,1, 0,25 y 0,5 ng/ml). Los límites de detección (*Ecuación 1*) y cuantificación (*Ecuación 2*) se calcularon mediante los resultados obtenidos para la linealidad y los resultados de la curva de calibración a bajas concentraciones.

Ecuación 1. Cálculo del LOD.

$$LOD = \frac{|a| + 3Sa}{b \times \sqrt{n}}$$

Ecuación 2. Cálculo del LOQ.

$$LOQ = \frac{|a| + 10Sa}{b \times \sqrt{n}}$$

Dónde: S_a = desviación estándar del intercepto a bajas concentraciones, a = intercepto a bajas concentraciones, b = pendiente de la curva de calibración a altas concentraciones y n = niveles a los que se construyó la curva de calibración a bajas concentraciones.

Precisión

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad, expresada como el coeficiente de variación (CV%), *Ecuación 3*. Se realizaron análisis por sextuplicado de una concentración de 1 ng/ml, en un mismo día y bajo idénticas condiciones instrumentales. Los valores de CV % se compararon con los criterios de aceptación establecidos en la literatura para métodos cromatográficos (<15%) (AOAC, 2005).

Ecuación 3. Cálculo del CV%.

$$CV (\%) = \left(\frac{S_x}{\bar{x}} \right) \times 100$$

Donde: CV%= coeficiente de variación; S_x = desviación estándar; $\bar{x}$ = valor promedio.

Exactitud

La *exactitud* se evaluó mediante ensayos de recuperación, expresados como porcentaje de recuperación (R%) de cantidades conocidas de analito añadidas a las muestras.

Se emplearon muestras de miel como matriz de referencia, las cuales fueron extraídas sin ser sometidas a proceso de ahumado, considerando que contienen de manera natural muy baja o nula cantidad de HAPs. A estas muestras se le adicionaron los estándares de HAPs hasta alcanzar una concentración conocida de 1 ng/ml. Posteriormente, se sometieron a los procedimientos de extracción, purificación y análisis cromatográfico antes descrito. Cada ensayo se realizó por duplicado de manera independiente, y los resultados se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

Ecuación 4. Cálculo del porcentaje de recuperación (R%).

$$\%R = \frac{C_{\text{hallada}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100\%$$

Donde C_{hallada} representa la concentración determinada del analito y $C_{\text{teórica}}$ la cantidad conocida añadida a la muestra.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la validación se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XV (2009).

Resultados y discusión

La separación cromatográfica permitió la detección de los HAPs bajo las condiciones establecidas. La resolución de los analitos se optimizó con un programa de elución en gradiente. De acuerdo a ello se estableció el gradiente de elución presentado en la *Tabla 2* para la mezcla de HAPs.

Tabla 2. Programa en gradiente agua: acetonitrilo utilizado para la separación cromatográfica.

Modo de elución	Gradiente		
	Tiempo (min)	Agua (%)	Acetonitrilo (%)
	0	40	60
	5	40	60
	20	0	100
	28	40	60

En una primera instancia, se utilizó el detector de DAD para la identificación de los compuestos a partir de sus espectros de absorción. Los tiempos de retención registrados, 20,6 min para el BaP y 21,3 min para el D(a,h)A, evidencian una separación cromatográfica adecuada que permitió distinguir claramente ambos compuestos sin solapamiento, *Figura 1*. A partir de los espectros obtenidos para el BaP y el D(a,h)A,

Figura 2, bajo las condiciones de elución establecidas, se determinaron los máximos de absorbancia a 262,5 nm y 299,7 nm, respectivamente, coincidiendo con los valores reportados en la bibliografía (Cerón Neculpan, 2012).

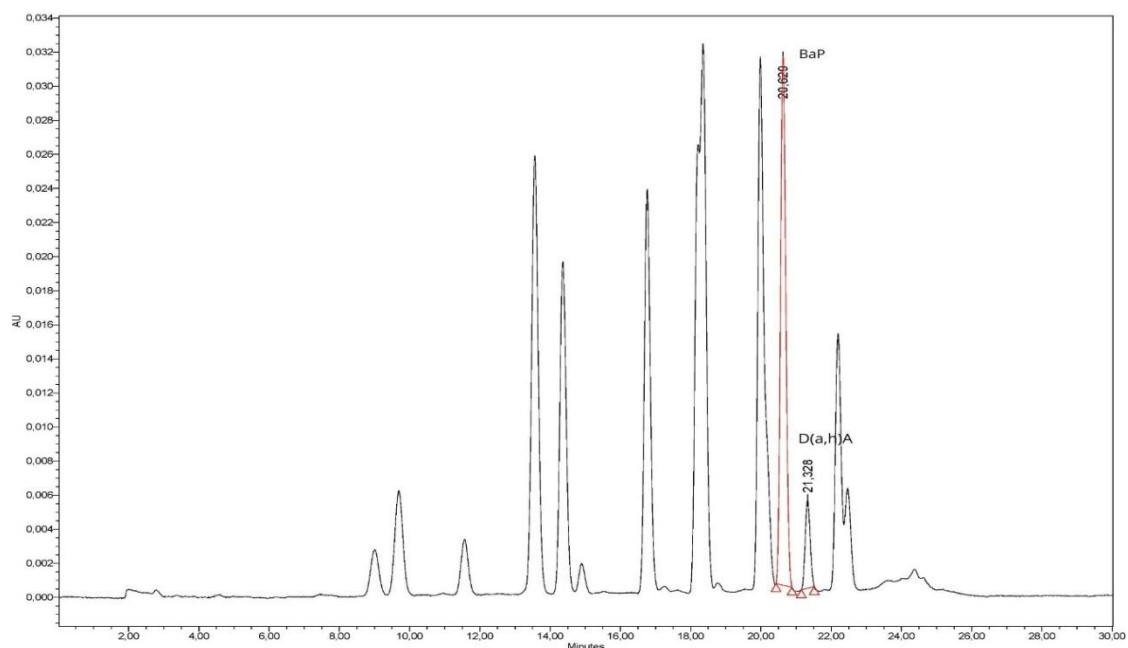


Figura 1. Cromatograma del estándar de BaP y D(a,h)A, a una concentración de 2.5 ng/ml, establecido con el detector UV-DAD.

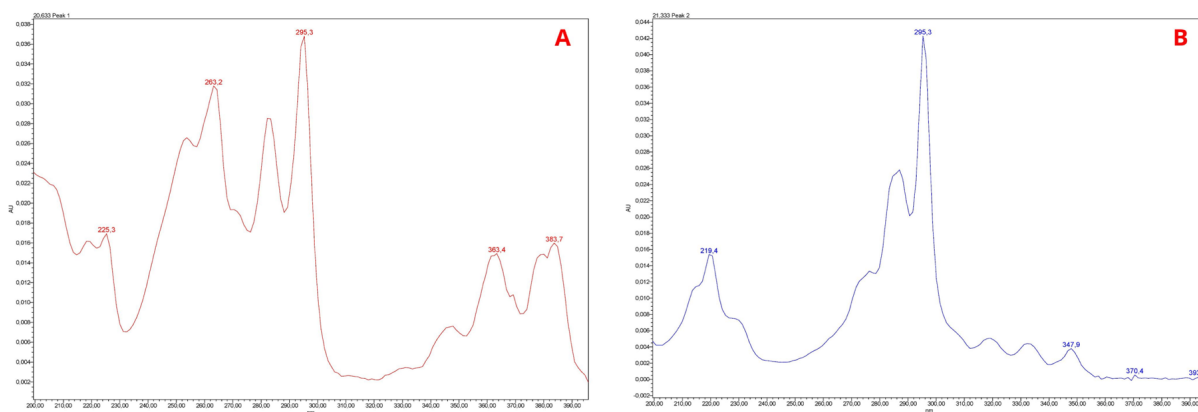


Figura 2. Espectros de absorbancias UV-vis característicos de BaP (A) y D(a,h)A (B)

Una vez confirmada la identidad mediante DAD, se procedió al análisis por FLD, técnica que ofrece mayor sensibilidad para la cuantificación de los HAPs. El BaP se detectó en un tiempo de retención de 20,6 min y el D(a,h)A en 21,3 min, coincidiendo con los tiempos previamente observados en DAD, como se observa en la Figura 3. Los máximos de emisión registrados fueron de 410 nm para BaP y 390 nm para D(a,h)A, consistentes con los datos bibliográficos (Gotor Navarra, 2016; Perugini et al., 2009).

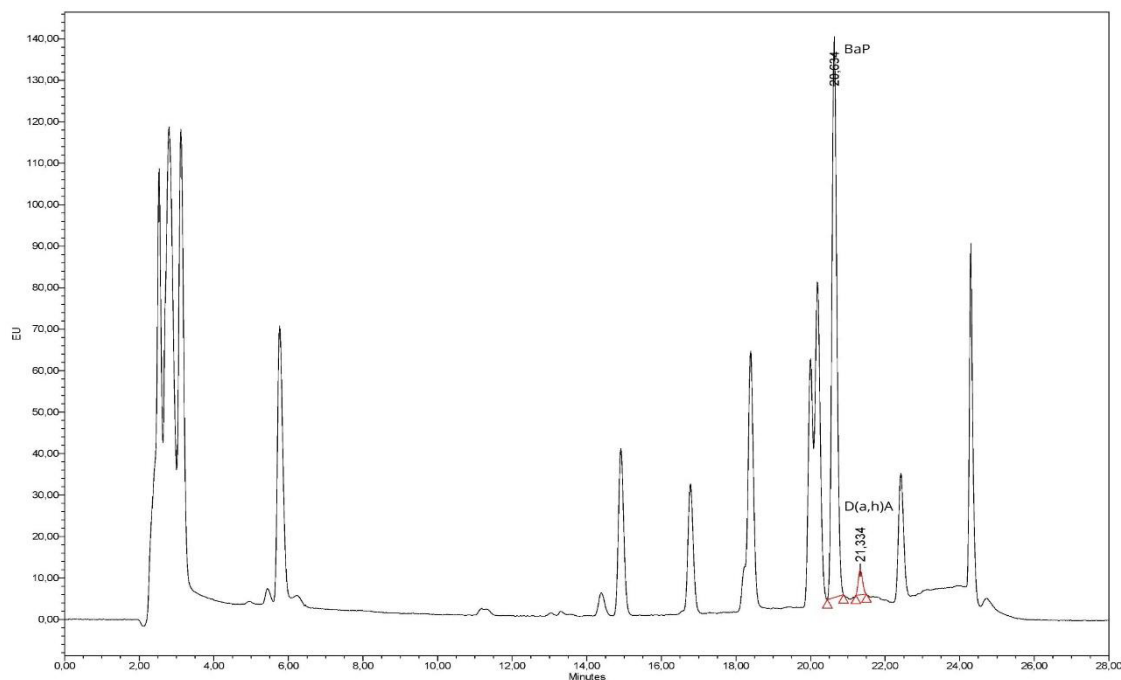


Figura 3. Cromatograma del estándar de BAP y D(a,h)A, a una concentración de 1 ng/mL, establecido con el detector FLD.

El hecho de que ambos compuestos presentan similares tiempos de retención en UV/DAD y FLD, sumado a la coincidencia de los espectros con los reportados en bibliografía, refuerza la identificación de los mismos. El empleo conjunto de DAD y FLD resultó ventajoso, mientras el primero proporcionó un criterio de identificación mediante el análisis espectral, el segundo aportó sensibilidad óptima para la detección y cuantificación de los HAPs.

Extracción de HAPs en miel

Se evaluaron tres procedimientos de extracción reportados previamente en la literatura, aplicados con modificaciones. En todos los casos, a las muestras se les adicionó una solución estándar de HAPs, de modo de alcanzar una concentración final de 1 ng/mL, con el fin de evaluar la recuperación de cada metodología.

En primer lugar, se implementó la metodología propuesta por Dorina et al. (2017). El procedimiento consistió en la extracción con hexano en baño ultrasónico y posterior purificación mediante un cartucho (SPE) de fase sólida C18, *Figura 4*. Sin embargo, bajo estas condiciones no se observó la recuperación de los compuestos de interés. Este resultado puede atribuirse a la baja afinidad del hexano frente a la matriz azucarada de la miel, lo cual dificulta la solubilización de los analitos.

Cabe destacar que, con la utilización de ultrasonidos, se buscó favorecer la dispersión del disolvente de extracción en la fase acuosa, promoviendo la emulsificación y acelerando la transferencia de masa entre fases inmiscibles, lo que en principio incrementaría la eficiencia de la extracción. No obstante, el tipo de equipo empleado influye de manera determinante en los resultados. En este caso se utilizó un baño ultrasónico, el cual presenta limitaciones tales como: (a) la falta de uniformidad en la transmisión de la energía ultrasónica y (b) la disminución progresiva de la potencia efectiva con el

uso, sin posibilidad de un control preciso. Estas restricciones reducen la eficacia de los baños para extraer analitos fuertemente asociados a la matriz o cuando se requiere una mezcla de grandes volúmenes de fases inmiscibles como ocurre en la miel. En tales escenarios, las ondas ultrasónicas suelen ser más eficientes, ya que irradian la energía directamente en el medio de extracción, asegurando una cavitación más intensa y uniforme (Luque de Castro y Priego Capote, 2007; Ozcan et al., 2012). En consecuencia, la limitada capacidad de cavitación del baño ultrasónico utilizado podría explicar, al menos en parte, la escasa recuperación observada con este método, como se observa en la Figura 5.

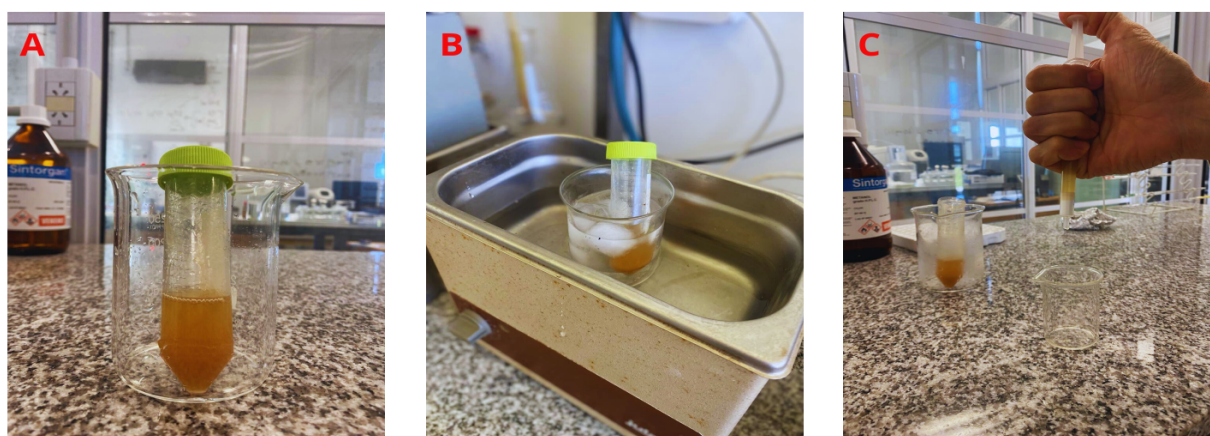


Figura 4. Preparación y extracción de muestras. A) Mezcla inicial de miel con hexano. B) Extracción en baño ultrasónico. C) Purificación mediante cartucho (SPE) de fase sólida C18.

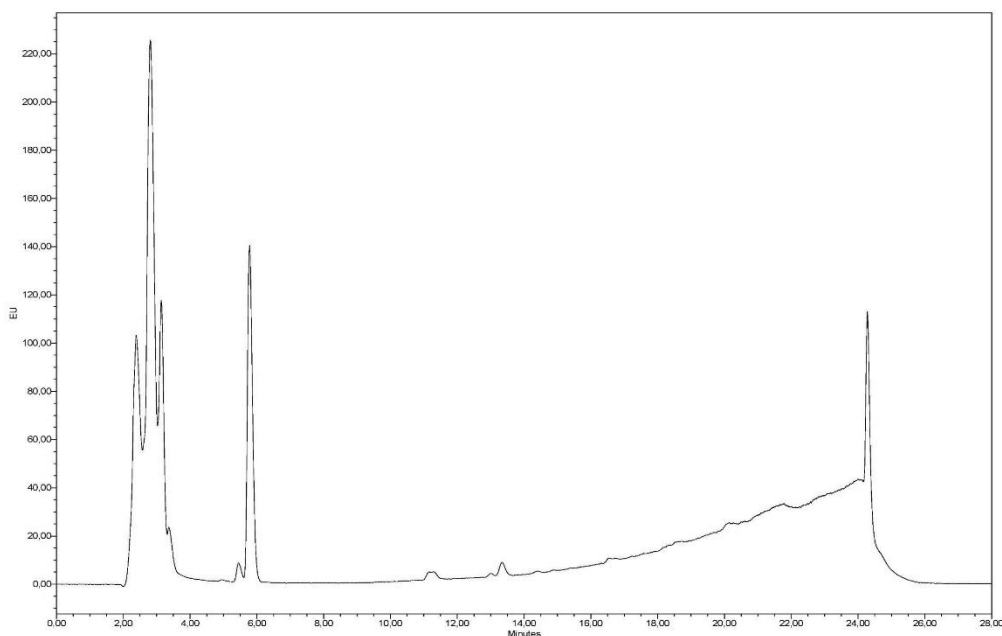


Figura 5. Cromatograma con detector FLD utilizando la técnica Dorina et al. (2017).

Posteriormente, se evaluó la metodología de Gnonsoro et al. (2018), con modificaciones, basada en la adición de sulfato de sodio anhidro y DCM, empleando extracción

asistida por ultrasonido. Si bien el DCM posee reconocida eficacia en la recuperación de HAPs (Quijano et al., 2014), en este estudio se observó la evaporación completa del disolvente durante el proceso de extracción, *Figura 6*. Este fenómeno, sumado a la escasa solubilización de la matriz, probablemente ocasionó pérdidas e impidió la adecuada recuperación de los analitos. La posible explicación es que la elevada viscosidad y el alto contenido de azúcares de la miel interfieren con la eficiencia del procedimiento, favoreciendo la formación de una matriz sólida que dificulta la liberación de los HAPs hacia la fase orgánica. Dichos inconvenientes quedaron reflejados en las corridas cromatográficas obtenidas, tal como se ilustra en la *Figura 7*.

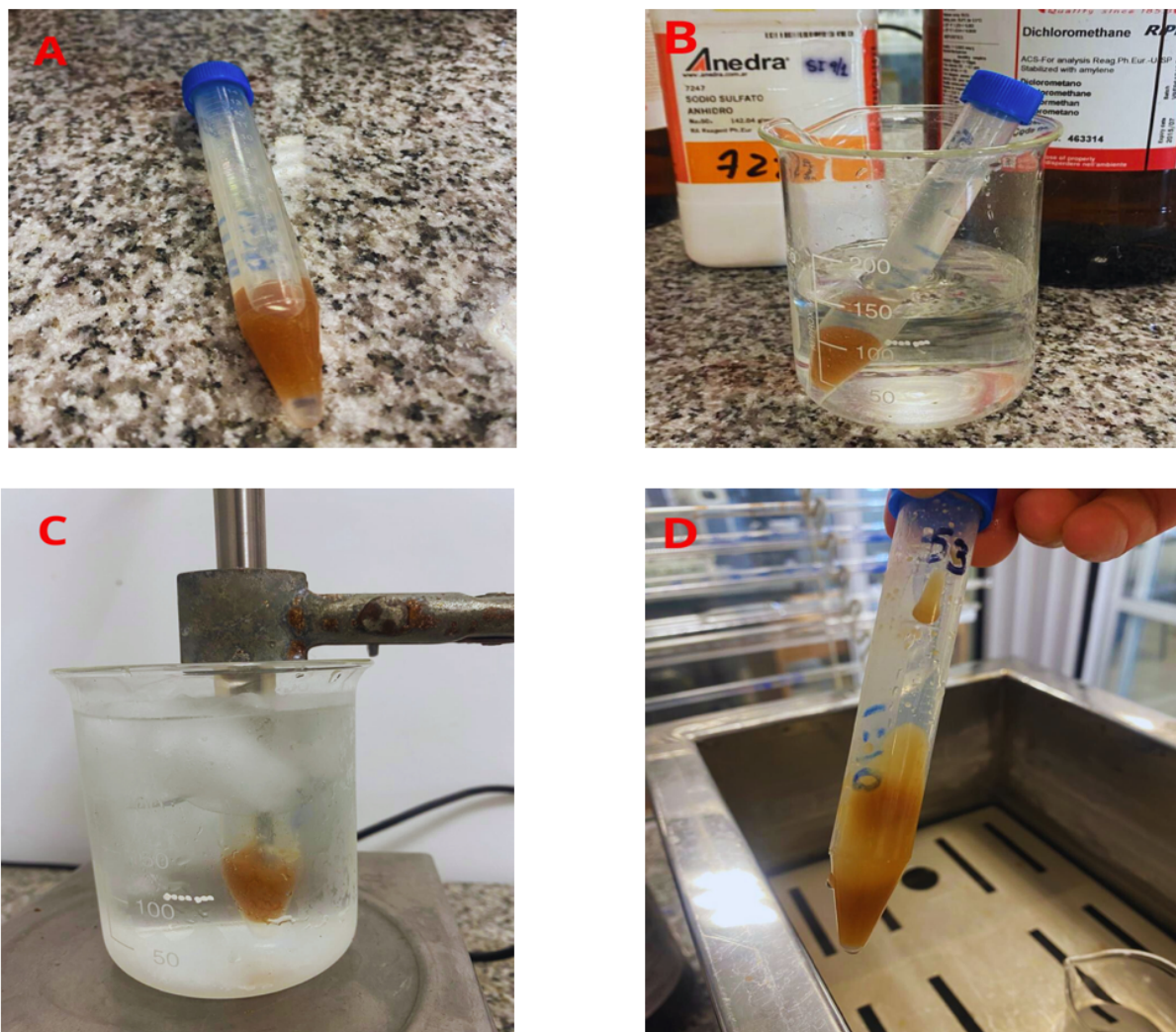


Figura 6. Preparación y extracción de muestras. A) Mezcla inicial de miel con DCM, donde se observa la falta de homogeneidad. B) Tubo sumergido en baño de agua previo a la adición de hielo para llevar a cabo el proceso de extracción. C) Extracción asistida por ultrasonido en baño de hielo para controlar la temperatura. D) Finalización del proceso, con evaporación del DCM.

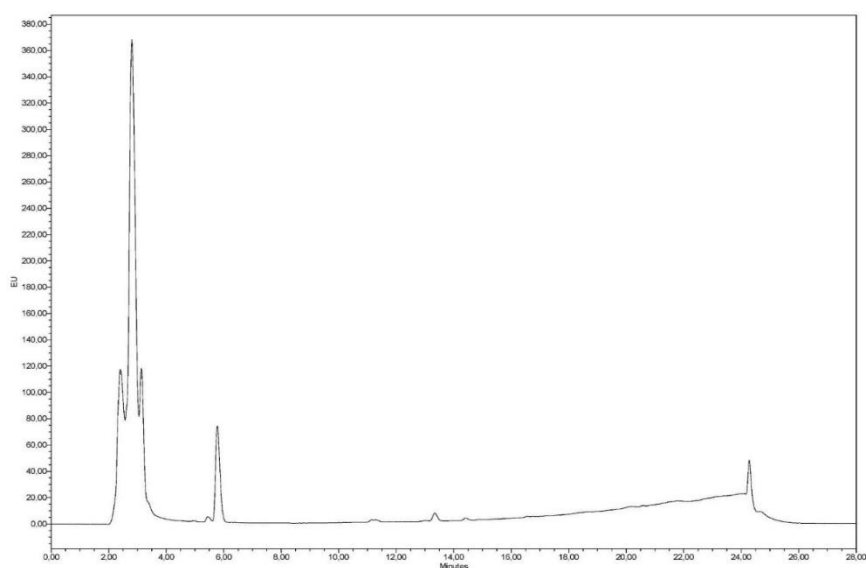


Figura 7. Cromatograma con detector FLD utilizando la técnica Gonsoro et al. (2018).

Finalmente, se aplicó la técnica descrita por Di Fiore et al. (2023), con modificaciones, utilizando una mezcla de DCM/acetona (1:1, v/v) sometida a ultrasonido durante 30 min, *Figura 8*. El empleo de esta combinación de solventes resultó ventajoso, ya que permitió una mayor solubilización de la miel en comparación con la técnica anterior. Este efecto podría atribuirse a la presencia de acetona, un disolvente polar que favorece la disolución de la matriz y la liberación de los analitos.

En relación con la metodología de Gonsoro et al. (2018), se disminuyó la amplitud de sonicación del 70% al 50%, lo que posiblemente contribuyó a una transferencia más eficiente de los HAPs hacia la fase orgánica y, por ende, a una mejor recuperación. Además, en este caso la mezcla de solventes no se evaporó durante la extracción y se alcanzó una recuperación aceptable, tal como se observa en el cromatograma de la *Figura 9*.

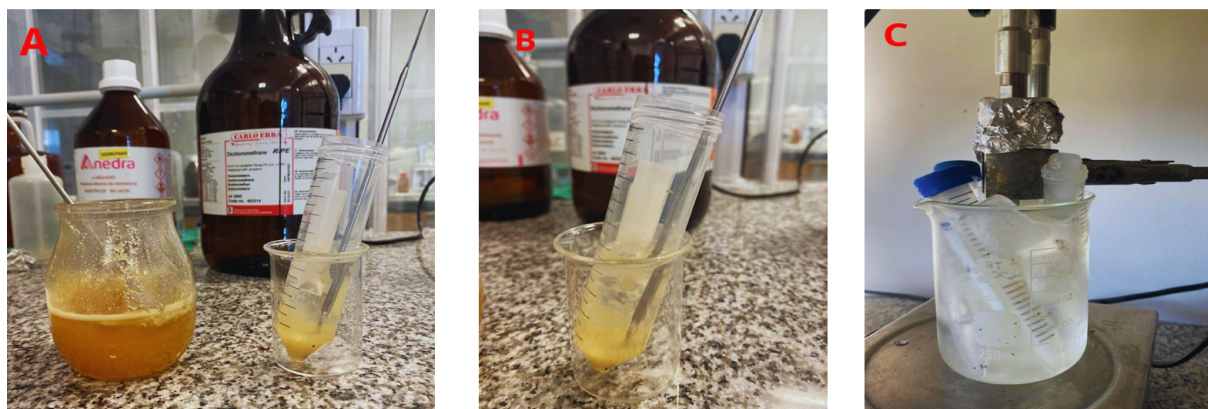


Figura 8. Preparación y extracción de muestras. A) Mezcla inicial de miel. B) Tubo con la muestra de miel con DCM/acetona (1:1, v/v). C) Extracción asistida por ultrasonido en baño de hielo para controlar la temperatura.

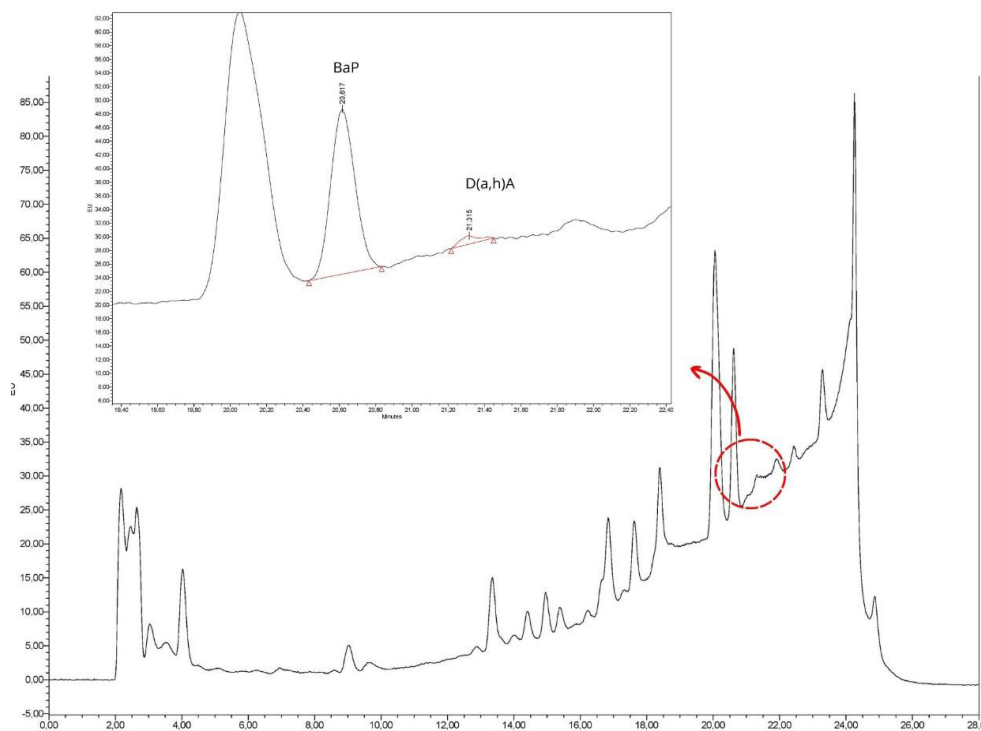


Figura 9. Cromatograma con detector FLD utilizando la técnica de Di Fiore et al. (2023).

Preparación de soluciones de trabajo

De la solución estándar de 500 µg/ml se preparó una solución de trabajo de 100 ng/ml para BaP y D(a,h)A. Para su elaboración, se tomó una alícuota de 2 µl con micropipeta y se transfirió a un matraz aforado de 10 ml, completando el volumen con acetonitrilo. La solución obtenida se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar con tapa a rosca, bajo refrigeración controlada (2–8 °C), lo que permitió preservar su estabilidad durante el período de análisis.

A partir de la solución de trabajo se prepararon las diluciones necesarias para la construcción de la curva de calibración. Tal como se muestra en la *Tabla 3*, se tomaron alícuotas de la solución de trabajo mediante el uso de micropipetas, las cuales se transfirieron a matraces aforados de 5 ml. Posteriormente, cada matraz fue enrasado con acetonitrilo hasta el volumen final, obteniéndose así las distintas concentraciones requeridas, *Figura 10*.

Tabla 3. Preparación de diluciones para la construcción de la curva de calibración.

Concentración final	Volumen solución de trabajo	Volumen final
0,5 ng/ml	25 µl	5 ml
0,75 ng/ml	37,5 µl	5 ml
1 ng/ml	50 µl	5 ml
1,5 ng/ml	75 µl	5 ml
2 ng/ml	100 µl	5 ml
2,5 ng/ml	125 µl	5 ml



Figura 10. Preparación de soluciones de trabajo para la curva de calibración.

Validación del método analítico

Linealidad

La linealidad se evaluó a partir de diluciones seriadas de la solución de trabajo, cubriendo un rango de 0,5 a 2,5 ng/ml para los 2 HAPs estudiados. Cada nivel de concentración fue analizado por triplicado. Los resultados se muestran en la *Tabla 4* para el BaP y en la *Tabla 5* para el D(a,h)A.

Tabla 4. Respuesta cromatográfica del BaP en la curva de calibración.

Conc BaP ng/ml	Área bajo la curva (unidad de área)
1	5.757.542
0,5	2.943.517
0,75	4.585.172
2	12.342.760
1,5	8.785.147
0,5	2.997.858
2,5	15.765.114
0,75	4.556.943
2	12.014.123
2,5	15.838.078
0,75	4.539.300
1	5.725.453
1,5	8.488.945
2,5	15.912.550
0,5	2.994.509
1,5	8.832.090
1	5.549.194
2	12.320.547

Tabla 5. Respuesta cromatográfica del D(a,h)A en la curva de calibración.

Conc DaA ng/ml	Área bajo la curva (Unidad de Área)
1,5	512.183
1	383.767
2,5	754.186
0,75	296.977
1,5	515.941
2	651.925
0,75	293.401
2,5	754.080
0,5	223.099
2	661.980
1	387.686
2,5	761.973
0,5	220.467
0,75	297.604
0,5	226.722
2	662.713
1	385.664
1,5	509.740

Con el fin de validar la aplicación del modelo de regresión lineal entre la concentración de HAPs y el área bajo la curva, se verificaron los supuestos estadísticos asociados a los residuos.

» Para el caso de BaP:

Normalidad

Tabla 6. Estadístico de W de Shapiro-Wilk para analizar la normalidad del BaP.

Prueba	Estadístico	Valor - P
Estadístico W de Shapiro - Wilk	0,899681	0,0570095

Como se observa en la *Tabla 6*, el valor-p (0,057) es mayor a 0,05, por lo tanto se puede considerar que los residuos se distribuyen normalmente con un nivel de confianza del 95%.

Esto confirma que el supuesto de normalidad de los residuos de la regresión se cumple, lo cual es un requisito importante para validar el modelo lineal.

Homocedasticidad

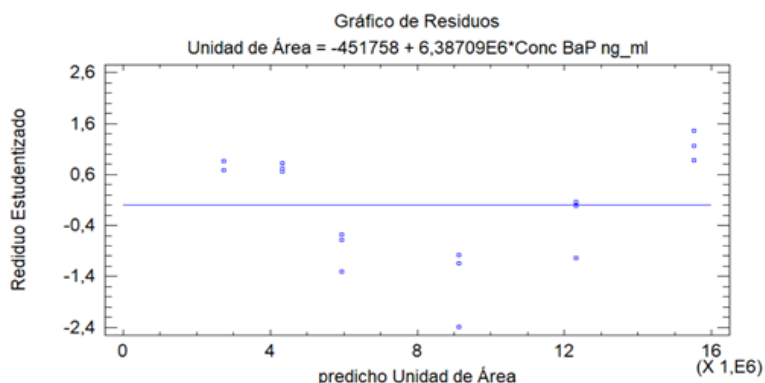


Figura 11. Residuos estudentizado vs predichos para analizar la homocedasticidad del BaP.

Como se observa en la *Figura 11*, los residuos se ubican alrededor de cero. La dispersión es relativamente uniforme en todo el rango de valores predichos. Esto sugiere que se cumple la homocedasticidad, es decir, la varianza de los residuos se mantiene aproximadamente constante.

Independencia:

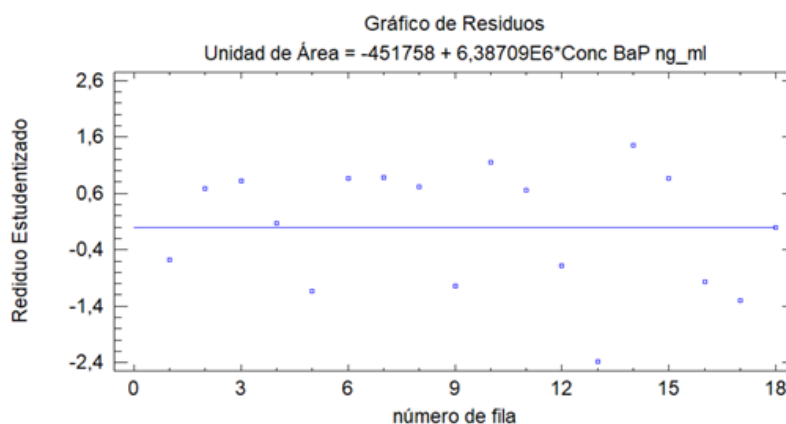


Figura 12. Residuos estudentizado vs número de fila para analizar la independencia del BaP.

Como se puede observar en la *Figura 12*, los residuos parecen distribuidos de manera aleatoria, sin tendencia ni patrón sistemático (ni ascendente, ni descendente, ni cíclico). El estadístico Durbin-Watson (DW) arrojó un valor de 2,08255 ($p = 0,5999$). En este caso, $DW \approx 2,08$ confirmando la independencia de los residuos.

En conclusión: los resultados obtenidos confirman que los residuos cumplen con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia, validando la adecuación del modelo de regresión lineal aplicado para describir la relación entre la concentración de BaP y la respuesta cromatográfica.

» Para el caso de D(a,h)A: Normalidad

Tabla 7. Estadístico de W de Shapiro-Wilk para analizar la normalidad del D(a,h)A.

Prueba	Estadístico	Valor - P
Estadístico W de Shapiro - Wilk	0,927795	0,181648

Como se observa en la *Tabla 7*, el valor-p (0,1816) es mayor a 0,05, por lo tanto se puede considerar que los residuos se distribuyen normalmente con un nivel de confianza del 95%. Esto confirma que el supuesto de normalidad de los residuos de la regresión se cumple, lo cual es un requisito importante para validar el modelo lineal.

Homocedasticidad

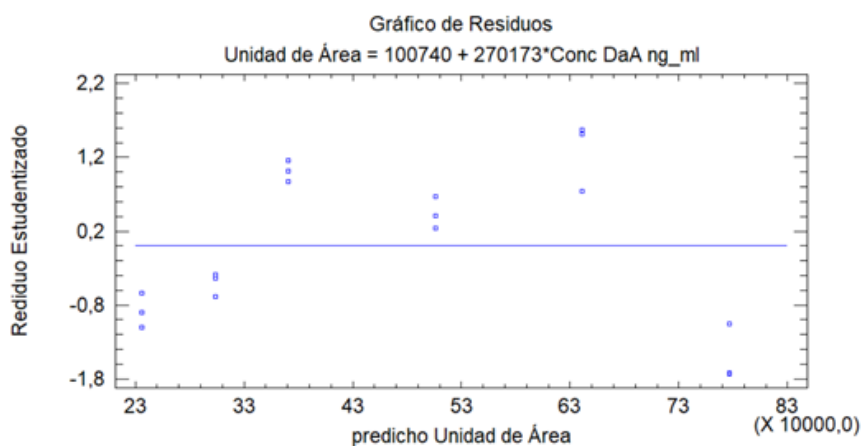


Figura 13. Residuos estudentizado vs predichos para analizar la homocedasticidad del D(a,h)A.

Como se observa en la *Figura 13*, los residuos se ubican alrededor de cero. La dispersión es relativamente uniforme en todo el rango de valores predichos. Esto sugiere que se cumple la homocedasticidad, es decir, la varianza de los residuos se mantiene aproximadamente constante.

Independencia:

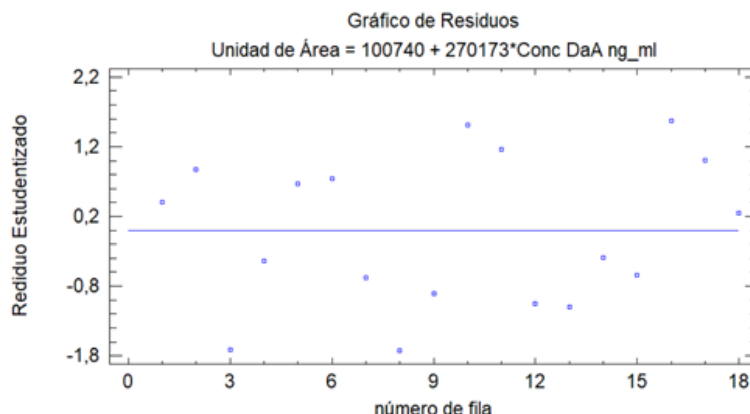


Figura 14. Residuos estudentizado vs número de fila para analizar la independencia del D(a,h)A.

En la *Figura 14* los residuos parecen distribuidos de manera aleatoria, sin tendencia ni patrón sistemático (ni ascendente, ni descendente, ni cíclico).

Estadístico Durbin-Watson (DW): 1,57215 ($p = 0,2164$). En este caso, el p-valor = 0,2164 es mayor a 0,05, por lo que no hay evidencia estadísticamente significativa de autocorrelación en los residuos, y el modelo de regresión lineal cumple con el supuesto de independencia.

En conclusión: los resultados obtenidos confirman que los residuos cumplen con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia, validando la adecuación del modelo de regresión lineal aplicado para describir la relación entre la concentración de D(a,h)A y la respuesta cromatográfica.

» **Análisis del modelo de regresión para B(a)P**

Gráfico modelo ajustado del B(a)P

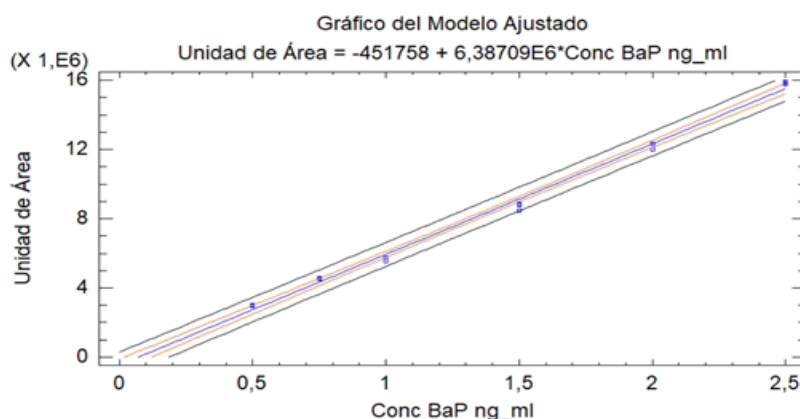


Figura 15. Modelo ajustado para la curva de calibración del BaP. Se observa la relación lineal entre la concentración (ng/ml) y la respuesta cromatográfica (área del pico). La recta representa el modelo ajustado, mientras que las bandas corresponden a los intervalos de confianza (95%) y de predicción. Los puntos experimentales se encuentran próximos a la recta, lo que evidencia un buen ajuste y confirma la linealidad del método en el rango evaluado.

Puntos influyentes:

La evaluación de puntos influyentes se realizó a partir del análisis de influencia de cada observación en el modelo de regresión. El valor de influencia media calculado fue de 0,111, considerando como criterio de exclusión valores superiores a tres veces dicha media ($\approx 0,333$). Ninguna de las observaciones superó este umbral, por lo que se descartó la presencia de puntos influyentes que pudieran afectar la estimación de los coeficientes del modelo. Estos resultados respaldan la robustez de la relación lineal establecida entre la concentración de BaP y el área bajo la curva.

Regresión Simple - Unidad de Área vs. Conc BaP ng/ml

Variable dependiente: Unidad de Área

Variable independiente: Conc BaP ng/ml

Lineal: $Y = a + b.X$

Tabla 8. Coeficientes de la regresión lineal para la curva de calibración.

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-451758,	162529,	-2,77955	0,0134
Pendiente	6,38709E6	105232,	60,6952	0,0000

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) de la regresión lineal.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3,6333E14	1	3,6333E14	3683,90	0,0000
Residuo	1,57802E12	16	9,86264E10		
Total (Corr.)	3,64908E14	17			

Coefficiente de Correlación = 0,997835

R-cuadrada = 99,5676 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,5405 %

Error estándar del est. = 314048,

Error absoluto medio = 262715,

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0,0512914

La relación entre la concentración de BaP y la respuesta cromatográfica (unidad de área) fue evaluada mediante regresión lineal simple, considerando la concentración (ng/ml) como variable independiente y la señal instrumental como variable dependiente.

El modelo ajustado se expresó como:

$$\text{Unidad de Área} = -451758 + 6,38709 \times 10^6 \cdot \text{Conc BaP}$$

La pendiente obtenida fue significativa ($t = 60,70$; $p < 0,0001$), confirmando una asociación lineal positiva entre ambas variables. El intercepto resultó distinto de cero ($p = 0,0134$); sin embargo, este valor debe interpretarse como un efecto estadístico derivado del ajuste, sin relevancia analítica dentro del rango experimental empleado, como se observa en la Tabla 8.

El coeficiente de determinación ($R^2 = 99,57\%$; R^2 ajustado = $99,54\%$) indica que prácticamente toda la variabilidad de la señal instrumental es explicada por la concentración de BaP. De manera consistente, el coeficiente de correlación ($r = 0,9978$) reflejó una relación lineal entre las variables. El análisis de varianza mostró un valor de $F = 3683,9$ ($p < 0,0001$), lo que respalda la significancia del modelo frente a la variabilidad residual, indicado en la *Tabla 9*.

En términos de precisión predictiva, tanto el error estándar de estimación (314.048) como el error absoluto medio (262.715) fueron bajos en relación con la magnitud de la señal, evidenciando una dispersión residual reducida.

En conclusión, estos resultados respaldan la idoneidad del modelo lineal para describir la relación entre la concentración de BaP y la respuesta instrumental, mostrando una buena linealidad, un ajuste estadísticamente sólido y un comportamiento de residuos acorde con los supuestos del análisis. De esta manera, la curva de calibración obtenida constituye una herramienta confiable para la cuantificación del analito en el rango de concentraciones evaluado.

» Análisis del modelo de regresión para D(a,h)A

Gráfico modelo ajustado:

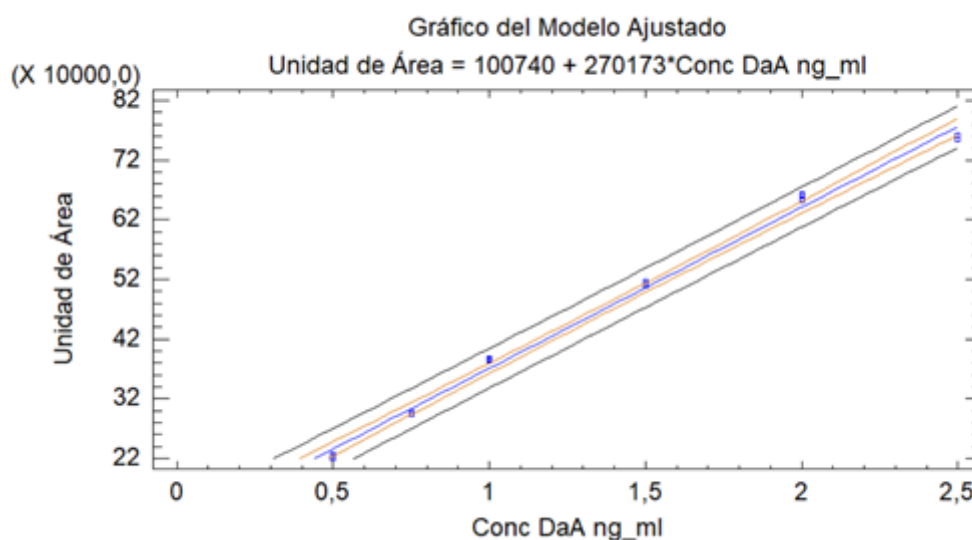


Figura 16. Modelo ajustado para la curva de calibración del D(a,h)A. Se observa la relación lineal entre la concentración (ng/mL) y la respuesta cromatográfica (área del pico). La recta representa el modelo ajustado, mientras que las bandas corresponden a los intervalos de confianza (95%) y de predicción. Los puntos experimentales se encuentran próximos a la recta, lo que evidencia un buen ajuste y confirma la linealidad del método en el rango evaluado.

Puntos influyentes

La evaluación de puntos influyentes se realizó a partir del análisis de influencia de cada observación en el modelo de regresión. Al igual que para el análisis del BaP, el valor de influencia media calculado fue de 0,111, considerando como criterio de exclusión valores superiores a tres veces dicha media ($\approx 0,333$). Ninguna de las observaciones superó este umbral, por lo que se descartó la presencia de puntos influyentes que pudieran afectar la estimación de los coeficientes del modelo. Estos resultados respaldan

la robustez de la relación lineal establecida entre la concentración de D(a,h)A y el área bajo la curva.

Regresión Simple - Unidad de Área vs. Conc D(a,h)A ng/ml

Variable dependiente: Unidad de Área

Variable independiente: Conc D(a,h)A ng/ml

Lineal: $Y = a + b.X$

Tabla 10. Coeficientes de la regresión lineal para la curva de calibración.

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	100740,	7832,04	12,8626	0,0000
Pendiente	270173,	5070,99	53,2782	0,0000

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) de la regresión lineal.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	6,50098E11	1	6,50098E11	2838,57	0,0000
Residuo	3,66437E9	16	2,29023E8		
Total (Corr.)	6,53762E11	17			

Coefficiente de Correlación = 0,997194

R-cuadrada = 99,4395 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,4045 %

Error estándar del est. = 15133,5

Error absoluto medio = 13066,7

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,206801

La relación entre la concentración de D(a,h)A (ng/ml) y la respuesta instrumental (Unidad de Área) se evaluó mediante una regresión lineal simple. El modelo obtenido se describe con la siguiente ecuación:

$$\text{Unidad de Área} = 100740 + 270173 \cdot \text{Conc D(a,h)A}$$

Tanto el intercepto como la pendiente resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,0001$), como se observa en la Tabla 10, lo que confirma la validez de los parámetros estimados.

El análisis de varianza (ANOVA) mostró que el modelo es significativo ($F = 2838,57$; $p < 0,0001$), indicado en la *Tabla 11*. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,997, con un R^2 de 99,44 % y un R^2 ajustado de 99,40 %, evidenciando un ajuste lineal en el rango de concentraciones estudiado. El error estándar de la estimación (15.133,5) y el error absoluto medio (13.066,7) se mantuvieron en niveles bajos, lo que refleja una buena precisión del modelo.

En conjunto, estos resultados demuestran que el modelo de regresión lineal simple se ajusta adecuadamente a los datos experimentales. Por lo tanto, la curva de calibración obtenida puede considerarse confiable para la cuantificación de D(a,h)A en las condiciones analíticas empleadas.

Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ)

Para la determinación del LOD y del LOQ del BaP, se construyó una curva de calibración a bajas concentraciones (0,1; 0,25 y 0,5 ng/ml). Los resultados experimentales obtenidos para cada nivel de concentración se muestran en la *Tabla 12*.

Tabla 12. Respuesta cromatográfica del BaP a bajas concentraciones.

Concentración BaP (ng/ml)	Área bajo la curva (unidad de área)
0,1	1.776.129
0,1	1.789.419
0,1	1.746.318
0,25	2.347.100
0,25	2.332.272
0,25	2.393.895
0,5	2.997.858
0,5	2.943.517
0,5	2.994.509

A partir de la regresión lineal de estos datos se obtuvo un intercepto (a) de 1.528.843 y una desviación estándar del intercepto (S_a) de 50.164. La pendiente (b) considerada para el cálculo, correspondiente a la curva de calibración a altas concentraciones, fue de $6,38709 \times 10^6$.

La aplicación de estos parámetros en las ecuaciones propuestas arrojó un LOD de 0,152 ng/ml y un LOQ de 0,184 ng/ml. Estos resultados confirman que el método presenta una sensibilidad adecuada para la detección y cuantificación de BaP en niveles traza, con capacidad para identificar concentraciones inferiores a 1 ng/ml.

Para el caso del D(a,h)A se procedió de igual manera que para el BaP. Los resultados experimentales obtenidos para cada nivel de concentración se muestran en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Respuesta cromatográfica del D(a,h)A a bajas concentraciones.

Conc D(a,h)A ng/ml	Área bajo la curva (unidad de área)
0,1	175.851
0,1	178.064
0,1	176.164
0,25	202.408
0,25	202.717
0,25	204.785
0,5	220.467
0,5	226.722
0,5	223.099

A partir de la curva de calibración se ajustó una regresión lineal que permitió estimar el intercepto y su error asociado. El valor del intercepto obtenido fue de 169.087,54, con una desviación estándar de 3.429,28. La pendiente de la curva de calibración utilizada para el cálculo correspondió a la obtenida en un rango más amplio de concentraciones ($b = 270.173$), mientras que el número de niveles incluidos en el ajuste fue $n = 3$.

Con estos parámetros, se calcularon el LOD y el LOQ mediante las ecuaciones propuestas. Los valores resultantes fueron de 0,383 ng/ml para el LOD y 0,435 ng/ml para el LOQ. Estos resultados indican que el método desarrollado presenta una sensibilidad adecuada para la detección y cuantificación del D(a,h)A en concentraciones bajas.

Precisión

La precisión del método propuesto para la determinación de BaP y D(a,h)A se evaluó mediante repetibilidad, expresada como coeficiente de variación (CV%). Se realizaron análisis por sextuplicados de una concentración conocida de 1 ng/ml bajo condiciones instrumentales idénticas en el mismo día.

» Para el BaP

Los datos de concentración de BaP (1 ng/ml) y área bajo la curva se observan en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores de área bajo la curva obtenidos para una concentración de BaP de 1 ng/ml.

Conc BaP (ng/ml)	Área bajo la curva (Unidad de Área)
1	5.549.194
1	5.725.453
1	5.757.542
1	5.682.415
1	5.695.432
1	5.732.874

La media arrojó un valor de $\rightarrow \bar{x} = 5.690.485$

Para obtener S_x utilizamos la fórmula de la Ecuación 5.

Ecuación 5. Cálculo de la desviación estándar (S_x).

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde: x_i = cada dato de la muestra; $\bar{x}$ = media de la muestra; n = tamaño de la muestra

$$S_x = 74.088$$

Ecuación 6. Cálculo del Coeficiente de Variación (%CV)

$$CV (\%) = \left(\frac{74088}{5690485} \right) \times 100 = 1,30$$

El valor promedio de la señal obtenida fue de 5.690.485 unidades de área, con una desviación estándar de 74.088 unidades, lo que corresponde a un CV% de 1,3%, Ecuación 6. Este valor se encuentra significativamente por debajo del límite establecido para métodos cromatográficos (<15%) según AOAC (2016), indicando que el método presenta una alta repetibilidad y consistencia en la medición.

Estos resultados sugieren que el método es adecuado para la cuantificación precisa de BaP en miel, mostrando un bajo grado de variabilidad intraensayo.

» Para el D(a,h)A

Tabla 15. Valores de área bajo la curva obtenidos para una concentración de D(a,h)A de 1 ng/ml.

Conc D(a,h)A ng/ml	Área bajo la curva (Unidad de Área)
1	385.664
1	387.686
1	383.767
1	388.989
1	387.184
1	381.265

Procediendo de manera análoga a lo realizado para el BaP, en el caso del D(a,h)A se obtuvieron los siguientes resultados:

$$\bar{x} = 385.759,17$$

$$S_x = 2.840,77$$

$$CV \% = 0,74 \%$$

Este resultado también se encuentra dentro de los criterios de aceptación y demuestra una variabilidad intraensayo baja, confirmando la precisión del sistema cromatográfico en las condiciones empleadas.

En conclusión, los valores de CV% obtenidos para ambos analitos se sitúan por debajo del valor de referencia, lo que valida la adecuada precisión del método.

Exactitud

Se utilizó el método de Di Fiore et al. (2023) para la extracción y purificación, dado que fue el que permitió obtener los mejores resultados experimentales. A partir de los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de recuperación (%R), el cual arrojó un valor de 72 % lo que indica que, si bien no se acerca al 100 %, la técnica presenta una recuperación aceptable.

No obstante, sería recomendable continuar trabajando sobre la metodología, optimizando los parámetros de extracción con el fin de lograr un valor más cercano al valor verdadero del analito en la matriz estudiada.

Análisis de muestras de mieles

Se analizaron tres muestras de mieles de diferentes orígenes: eucalipto, pradera y cítrico, *Figura 17*. Todas las muestras fueron sometidas a extracción, purificación y análisis cromatográfico según lo descrito anteriormente. En los tres tipos de miel, no se hallaron niveles detectables de BaP y D(a,h)A.

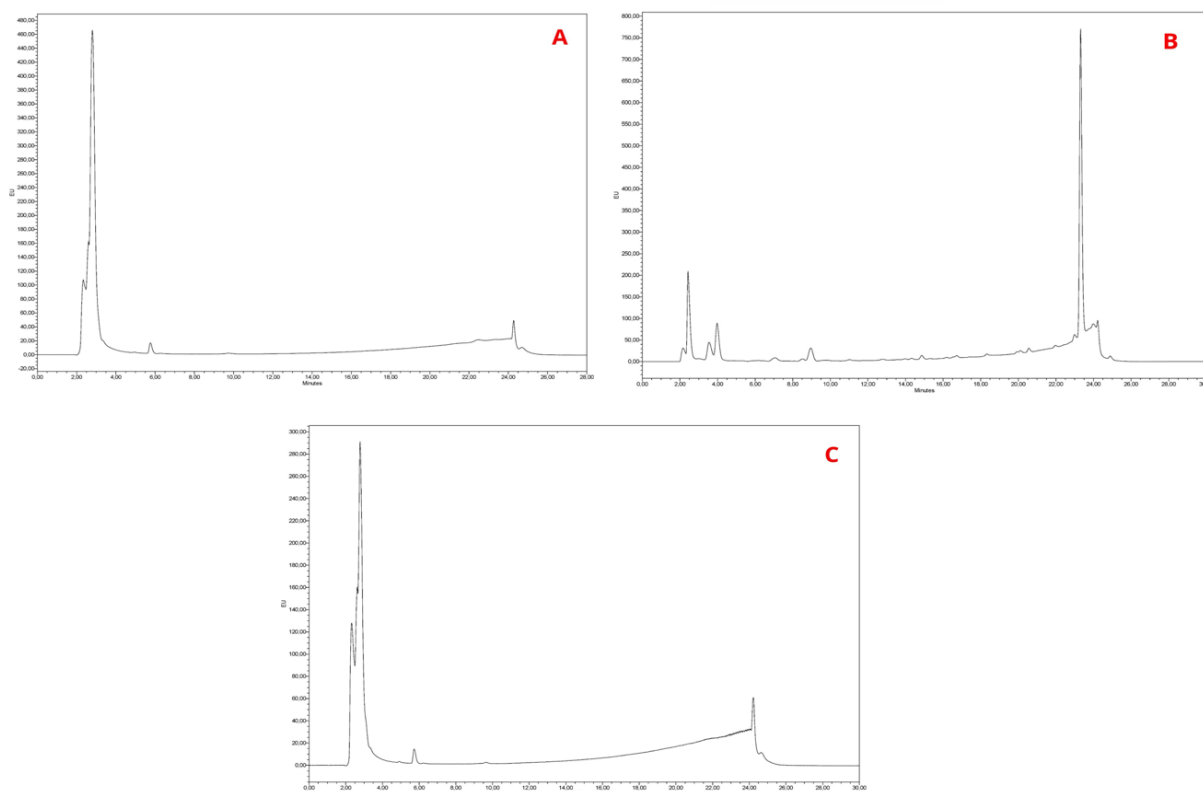


Figura 17. Cromatograma de muestras de mieles. A) Eucalipto. B) Pradera. C) Citrus.

Estos resultados coinciden con estudios previos que indican que la miel generalmente contiene niveles muy bajos o nulos de HAPs. Por ejemplo, Martín (2012) no encontró HAPs detectables en muestras de miel y cera de distintos orígenes. De manera similar, Ciemniak et al. (2013) reportaron que la miel suele contener pequeñas cantidades de los HAPs menos tóxicos, siendo el criseno el compuesto carcinogénico más frecuente, mientras que otros HAPs carcinogénicos, incluido el BaP, no se detectan. Corredera et al. (2014) tampoco encontraron niveles detectables de los 15 HAPs analizados en 30 muestras de miel, y Gnonsoro et al. (2018) señalaron que las muestras de miel estudiadas estaban libres de contaminación real por HAPs.

En contraste, algunos estudios muestran que los niveles de HAPs pueden depender del grado de contaminación ambiental. Perugini et al. (2009) indicaron que, aunque bajos, los HAPs presentes en la miel estaban asociados con el entorno, y que en algunos casos podrían ingresar a la miel a través del humo utilizado por los apicultores durante la recolección. Pocas muestras estuvieron completamente libres de HAPs, pero la mayoría presentaba niveles bajos, con valores máximos que no superaban los 3 ng/g de peso fresco, y el BaP nunca fue detectado. Dobrinas et al. (2008) reportaron la presencia de BaP en concentraciones de 0,5 a 141 pg/kg y de otros 13 HAPs en concentraciones de hasta 665 pg/kg, observando mayores niveles en zonas urbanas que rurales o de montaña. Di Fiore et al. (2023) encontraron que las muestras de miel muestreadas en 2017 presentaban los niveles más altos de contaminación, con una concentración media de 4,2 µg/kg, lo que evidencia que, incluso en condiciones de mayor exposición ambiental, la miel mantiene concentraciones relativamente bajas de HAPs.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en la validación del método aplicado a mieles, demostraron que los parámetros evaluados fueron adecuados, lo que permitió alcanzar el objetivo central de este trabajo. En particular, los criterios de linealidad, precisión, LOD y LOQ, se encontraron dentro de los rangos establecidos por la normativa vigente del Código Alimentario Argentino (CAA), lo que respalda la confiabilidad del procedimiento analítico. En cuanto a la exactitud, expresada como porcentaje de recuperación del analito, se obtuvo un valor en el orden del 72%, lo cual sugiere que, en matrices complejas como la miel, pueden presentarse interferencias derivadas de compuestos propios del alimento como la alta concentración de azúcares, que dificultan el proceso de extracción de los HAPs.

A partir de estos resultados, se plantea la necesidad de continuar con el desarrollo y validación de la metodología en otras matrices de interés, particularmente en productos cárnicos sometidos a procesos de ahumado, con el propósito de ampliar su alcance y evaluar la presencia de HAPs en una gama más diversa de alimentos. Asimismo, resulta pertinente profundizar en el mejoramiento de los procedimientos de extracción en mieles, con el fin de optimizar los porcentajes de recuperación y reforzar la confiabilidad de la técnica frente a la complejidad de esta matriz.

En conclusión, el consumo de miel estudiada no representa riesgo en cuanto al contenido de HAPs. A pesar de que no se han establecido límites legales específicos para HAPs en miel, la mayoría de los estudios indican que sus niveles suelen estar por debajo de los límites permitidos por el CAA. La ausencia de BaP en la mayoría de los análisis refuerza la seguridad del consumo de miel y respalda su uso habitual en la alimentación humana.

Indicadores de producción

CONVENIOS. En el marco del presente trabajo se realizó un convenio de colaboración entre la Facultad de Bromatología de la Universidad Nacional de Entre Ríos y la Cooperativa Apícola Gualaguaychú Limitada, con el fin de tener acceso a las muestras de miel de distintos orígenes necesarias para el desarrollo de la investigación y promover acciones conjuntas orientadas al análisis de contaminantes en productos apícolas.

ACTIVIDADES DE EXTENSIÓN REALIZADAS

"Investigación y puesta a punto de la técnica de análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPS) por HPLC-DAD en mieles y productos cárnicos ahumados en forma directa, en Departamento Gualaguaychú, provincia de Entre Ríos" con los autores Vallejos Omar A., González Paula, Rivero Roy, Seling Giuliana, Resquín Juan Carlos, Cámara Nancy, en la "Jornada de Estudiantes en Acción", Res. CD N°185/24, organizada por las Secretarías de Investigación, Académica y Extensión Universitaria y Cultura de la Facultad de Bromatología de la Universidad Nacional de Entre Ríos; realizada el 23 de octubre de 2024 en Gualaguaychú, Entre Ríos.

Bibliografía

- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., & Tadeo, J. L. (2003). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 86(3), 576–582. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.3.576>
- AOAC Official Method (2005) Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg.
- Bernal Davis, C. M. (2012). *Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas, por extracción en fase sólida (SPE), empleando HPLC asociado a detector UV-visible y fluorescencia en línea* [Tesis de licenciatura, Universidad de Chile]. Repositorio Universidad de Chile.
- Cerón Neculpan, M. S. (2012). *Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por medio de extracción homogénea líquido-líquido y cromatografía líquida de alta eficiencia en muestras acuosas prístinas* [Tesis de licenciatura, Universidad de Chile]. Repositorio Universidad de Chile.
- Ciemniak, A., Witczak, A., & Mocek, K. (2013). Assessment of honey contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(11), 993–998. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.816609>
- Corredera, L., Bayarri, S., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Molino, F., & Herrera, A. (2014). Evaluation of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in honeys from different origins. *Journal of food protection*, 77(3), 504–509. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-223>
- De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2007). Ultrasound assistance to liquid-liquid extraction: A debatable analytical tool. *Analytica Chimica Acta*, 583(1), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.039>
- Di Fiore, C., De Cristofaro, A., Nuzzo, A., Notardonato, I., Ganassi, S., Iafigliola, L., Sardella, G., Ciccone, M., Nuges, D., Passarella, S., Torino, V., Petrarca, S., Di Criscio, D., Ievoli, R., & Avino, P. (2023). Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons, heavy metals,

- and plasticizers residues: role of bees and honey as bioindicators of environmental contamination. *Environmental science and pollution research international*, 30(15), 44234–44250. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25339-4>
- Dobrinas, S., Birghila, S., & Coatu, V. (2008). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(1), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.07.003>
- Dorina, S., Becze, A., Cadar, O., Roman, M., & Tanaselia, C. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals contamination in honey from Cluj County, Romania. *Agriculture - Science and Practice*, (1–2), 101–102. <https://doi.org/10.15835/AGRISP.V1i101.12699>
- Gnonsoro, U. P., Kouassi, N. L. B., Kouakou, K. J. M., Dembele, A., & Trokourey, A. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins (B1, B2, G1 & G2) contamination in honey from Korhogo, Côte d'Ivoire. *Revue Ivoirienne des Sciences et Technologies*, 31, 55–65.
- Gotor Navarra, G. (2016). *Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs): Estudio de métodos cromatográficos. Aplicación a muestras de aire ambiente y alimentos* [Tesis doctoral, Universitat Ramon Llull]. Tesis en Xarxa.
- Ishizaki, A., Saito, K., Hanioka, N., Narimatsu, S., & Kataoka, H. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217(35), 5555–5563. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.068>
- Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., & Pouliquen, H. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere*, 86(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.035>
- Lipa Mamani, L. M. (2016). *Monitoreo de benzo[a]pireno por HPLC en productos cárnicos ahumados de la ciudad de Arequipa, 2016* [Tesis de maestría, Universidad Católica de Santa María]. Repositorio CONCYTEC.
- Martín, L. C. (2012). *Estudio de la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales pesados en productos de la colmena* [Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza]. Repositorio Institucional Universidad de Zaragoza
- Murcia-Morales, M., Tzanetou, E. N., García-Gallego, G., Kasiotis, K. M., Vejsnaes, F., Brodschneider, R., Hatjina, F., Machera, K., & Van der Steen, J. J. M. (2023). Environmental assessment of PAHs through honey bee colonies - A matrix selection study. *Heliyon*, 10(1), e23564. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23564>
- Onopiuk, A., Kołodziejczak, K., Marcinkowska-Lesiak, M., & Poltorak, A. (2022). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using different extraction methods and HPLC-FLD detection in smoked and grilled meat products. *Food Chemistry*, 373, 131506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131506>
- Ozcan, S., Tor, A., & Aydin, M. E. (2012). 14 Ultrasound Application in Analyses of Organic Pollutants in Environment. *Handbook on Applications of*, 345.
- Perugini, M., Di Serafino, G., Giacomelli, A., Medrzycki, P., Sabatini, A. G., Persano Oddo, L., & Amorena, M. (2009). Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees (*Apis mellifera*) and honey in urban areas and wildlife reserves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7440–7444. . <https://doi.org/10.1021/jf9011054>

- Plaza Bolaños, P., Garrido Frenich, A., & Martínez Vidal, J. L. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages: Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography A*, 1217(40), 6303–6326. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.079>
- Quijano, M. J., Quijano, A., & Meléndez, I. (2014). Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en el PM2.5 del aire de Pamplona-Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 17(1), 25–33. <https://doi.org/10.31910/rudca.v17.n1.2014.937>
- República Argentina. (1971). Código Alimentario Argentino (Decreto N° 2126/1971, modificado por Decreto N.° 35/2025). Boletín Oficial de la República Argentina. <https://www.boletinoficial.gob.ar>
- Roseiro, L. C., Gomes, A., & Santos, C. (2011). Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(6), 1340–1345. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.017>
- Smith Fuentes, F. I. (2024). Validación del método de microextracción líquido-líquido dispersivo asistido por ultrasonidos (UA-DLLME) para análisis de cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos fluviales [Tesis para optar al título de Químico Ambiental, Universidad de Chile]. Repositorio Universidad de Chile
- Tames, M. F., Tavera Busso, I., & Carreras, H. A. (2019). Método optimizado para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos asociados a partículas atmosféricas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(2), 387–395. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.02.10>
- Thea, A. E. (2016). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) de origen argentino: Influencia del procesamiento y contenido en las diferentes formas de consumo [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Misiones]. Biblioteca Digital de la UNaM.
- United States Pharmacopeial Convention. (2009). Validation of compendial procedures <1225>. In *United States Pharmacopeia 32-National Formulary 27* (pp. 733–736). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
- Vera, L. E., Cázares, E. A., Covarrubias, R., & Camacho, E. (2002). Metodología en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares en agua al nivel de ultratrazas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 18(1), 5–16.
- Wenzl, T., Simon, R., Kleiner, J., & Anklam, E. (2006). 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*, 25(7), 716–725. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.010>

PID 9170

Denominación del Proyecto:

Investigación y puesta a punto de la técnica de análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) por HPLC-DAD-FLD en mieles y productos cárnicos ahumados en forma directa, en departamento Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos

Unidad de ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Bromatología

Cátedra, Área o disciplina científica

Departamento de Bromatología y Materias Aplicadas. Cátedra de Bromatología III y Cátedra de Conservación de Alimentos. Laboratorio de Investigaciones y Servicios de Productos Apícolas.

Instituciones intervinientes

Cooperativa Apícola Gualeguaychú Limitada. Convenio marco de colaboración

Contacto: omar.vallejos@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Director

Mgtr. Omar A. Vallejos

Integrantes internos/docentes UNER:

González, Paula B.; Rivero, Roy C.; Brelis, Lucía Elizabet
Becarios de investigación: González, Silvina N.

Fecha de inicio y finalización efectivas

01-03-2024 y 31-08-25

Aprobación del Informe Final mediante resolución CS N° 058/26 (31-03-2026)