

Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en peces y sedimentos en la zona de Shushufindi, Sucumbios, Ecuador (primera parte)

Florinella Muñoz, Ramiro Barriga, María Cabrera, Edison Vera y Christian López

Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional

Instituto de Ciencias Biológicas de la Escuela Politécnica Nacional

florinella.munoz@epn.edu.ec, ramiro.barriga@epn.edu.ec

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son compuestos claves en la determinación de la contaminación petrolera. Muchos de ellos son tóxicos y cancerígenos para los organismos vivos. En los ecosistemas acuáticos los HAP's se incorporan a la biota del entorno y los peces resultan excelentes biomarcadores de su presencia. Las vías de exposición de HAP's en peces son: la respiración, la absorción dérmica y la ingestión de alimentos, partículas de sedimentos y detritos. En el Ecuador existe una vasta actividad petrolera, sobre todo en la región de la Amazonía, que implica una serie de problemas ambientales. Parte de su diagnóstico puede hacerse al medir la concentración de compuestos como los HAP's en peces. La presente investigación es una evaluación preliminar de la presencia, en vísceras y músculos de peces afectados por la actividad petrolera en Shushufindi; de 16 HAP's, considerados por la EPA como contaminantes prioritarios. Los HAP's fueron extraídos de su matriz, concentrados y luego purificados en una columna con florisil para luego ser analizados en un cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masas GC/MS. Los peces se seleccionaron de acuerdo con su hábitat y se realizaron muestreos en tres lugares de la zona. Adicionalmente, se obtuvieron muestras de sedimentos para establecer la relación entre los niveles de contaminación encontrados. En esta publicación se presentan los resultados parciales de esta investigación. También se realizaron entrevistas para determinar los hábitos alimenticios de la población y su percepción respecto al nivel de contaminación en la zona. Se logró identificar la presencia de algunos de estos HAP's en muestras tanto de vísceras, como de músculos y sedimentos.

Palabras claves: Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), peces, contaminación petrolera, contaminación de hidrocarburos, biomarcadores.

Abstract

Fish are visible members of aquatic communities that are vulnerable to contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Fish can have complicated life cycles and behavior. They can be exposed to PAH-contaminated sediments and water by a variety of routes, including respiration; ingestion of food, sediment, and detritus; and dermal absorption. This investigation involves a preliminary assessment of the sixteen PAHs issued by the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) that were identified in entrails and muscles of fish affected by the oil exploitation in Shushufindi, Sucumbios Province, Ecuador. The PAHs were extracted from the matrix, concentrated, purified by florisil column and analyzed using Gas Chromatography/Mass Spectrometry GC/MS. Three different sampling places were selected. Also, the collected fish were classified according to their feeding behavior. Additionally, the contents of PAHs in the sediments to establish a relation between the contamination level in fishes and their feeding behavior were analyzed. This information and the knowledge about the food habits of the population in Shushufindi can show the possible contamination of the people from this zone.

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Fish, Oil Contamination, Hydrocarbon contamination, Biomarkers

1 Introducción

El petróleo tiene una gran importancia en la sociedad moderna. Por un lado, petróleo equivale a energía, transporte y la calidad de vida actual de las personas. A su vez, el petróleo muestra varios aspectos negativos como la enorme dependencia económica mundial generada y, sobre todo, los problemas ambientales derivados de su explotación y uso. Su sola presencia en el ambiente implica una serie de problemas relacionados con la conta-

minación, la disminución de la calidad del agua, el suelo y de la vida de muchas plantas y animales; pudiendo afectar, finalmente, la calidad de vida de los seres humanos, que interactúan con los ecosistemas y cadenas alimenticias afectadas (San Sebastián, M. y Hurtig, AK, 2004). En zonas de alta actividad petrolera, la obtención de alimentos mediante prácticas como la pesca, puede constituir un riesgo para la salud humana por la presencia de compuestos tóxicos como los HAP's. Una exposición constante y prolongada de los seres humanos a los HAP's podría llevar al desarrollo de enfermedades como el cáncer (Vives et al. 2001).

La actividad petrolera en el Ecuador se remonta al año 1911, en la península de Santa Elena, con la explotación del primer pozo petrolero Ancón 1, pero solo hasta 1972, con el descubrimiento de petróleo en la Amazonía, inicia la era petrolera en el país (Dueñas, 2008).

Varias compañías petroleras operan en el Ecuador, entre ellas la estatal Petroecuador y otras empresas transnacionales (Bustamante y Jarrín, 2005; Amazonía por la Vida Org., 2007).

La principal zona de influencia de la actividad petrolera del Ecuador se encuentra en la Amazonía, principalmente en cuatro cantones, Nueva Loja (Lago Agrio), Orellana (El Coca), la Joya de los Sachas y Shushufindi. En esta zona se encuentran el 80 % de los pozos petroleros del país (Amazonía por la Vida Org., 2007).

La producción petrolera ha sido la principal fuente de ingresos para el Ecuador en los últimos 40 años, significando entre el 43 y el 46 % de las exportaciones totales del país en la década actual (Guaranda, 2009).

Los derrames de petróleo en las zonas de explotación en la Amazonía son comunes. Este problema ambiental representa un grave perjuicio para las plantas, animales y personas de esta región. La calidad del agua, los suelos y los alimentos; también se ven mermados con estos procesos de contaminación ambiental (Guaranda, 2009).

Si no se la realiza de una forma adecuada, la actividad petrolera en la Amazonía, puede representar una seria amenaza para el equilibrio ecológico presente y futuro de esta zona tan frágil y vulnerable del planeta.

Shushufindi es un cantón perteneciente a la provincia de Sucumbíos de la región amazónica del Ecuador, tiene una superficie de 2485 km² y una población de 19 000 habitantes. Se encuentra ubicado en una zona de bosque húmedo tropical con una temperatura promedio de 28°C.

Este cantón cuenta con la siguiente infraestructura petrolera:

- Cinco estaciones de almacenamiento (Shushufindi Centro, Norte, Sur, Suroeste y Aguatico)
- Una refinería
- Una planta procesadora de gas
- Un gasoducto
- Más de 100 piscinas de desechos

Los impactos negativos de la actividad petrolera en Shushufindi incluyen: contaminación ambiental, problemas de salud graves y niveles alarmantes de violencia (Amazonía por la Vida Org., 2007).

El medio ambiente en esta región se ve seriamente afectado por la industria petrolera y entre los contaminantes más importantes procedentes de esta actividad se encuentran los HAP's.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son compuestos orgánicos derivados del benceno, constituidos por dos o más anillos aromáticos fusionados entre sí. Se caracterizan por ser altamente lipofílicos y presentar baja solubilidad en agua, además de ser solubles en disolventes orgánicos. Se consideran compuestos orgánicos persistentes y muchos de ellos son tóxicos y cancerígenos para los organismos vivos (Rakoff y Rose, 1994; Vollhardt y Schore, 2007; Ortiz 2002).

La presencia de HAP's en el ambiente se debe a dos factores principales: la combustión incompleta de la materia orgánica (origen pirogénico) y la composición natural del petróleo (origen petrogénico). Por ello, se encuentran HAP's en los procesos de quema de madera, carbón, junto con las emisiones de automotores, el humo del tabaco, etc (Pointet y Milliet, 1999).

Las fuentes de generación más importantes de HAP's son las antropogénicas, entre las que se encuentran, los procesos industriales, la generación de energía y la quema de desechos sólidos. Las fuentes naturales de HAP's más destacadas son los incendios forestales y las emisiones volcánicas (Peña et al., 2003; Phillips et al., 2000).

Algunos de estos compuestos presentan propiedades carcinogénicas y mutagénicas. El principal representante de los HAP's es el benzo (a) pireno (BaP), constituido por cinco anillos de benceno fusionados, su valor de log Kow (coeficiente de partición octanol/agua) es de 6,3 lo que implica un alto índice de bioacumulación en las cadenas alimenticias (Baird y Cann, 2005). Debido a sus propiedades, los HAP's pueden bioacumularse en tejidos grasos de organismos acuáticos. Han sido relacionados con el apareamiento de lesiones en el hígado y tumores en ciertos peces. Pueden persistir en los sedimentos del lecho acuático o ser transportados por partículas suspendidas en el agua, llegando así a incorporarse a los peces del ecosistema (Mastandrea et al., 2005).

En el presente estudio se analizaron los 16 HAP's considerados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) como contaminantes prioritarios. Estos 16 HAP's son: Acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo (a) antraceno, benzo (a) pireno, benzo (b) fluoranteno, benzo (g, h, i) perileno, benzo (k) fluoranteno, criseno, dibenzo (a, h) antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno (1,2,3-cd) pireno, naftaleno, fenantreno y pireno (U.S: EPA, 1988).

2 Materiales

Para la pesca se utilizaron anzuelos, red de arrastre, red de trasmallo y atarraya.

Las muestras se transportaron al laboratorio en termos con hielo a temperatura de 0°C.

Se utilizó para la extracción y el análisis diclorometano (Fisher Scientific) grado HPLC y florisil (Fluca). Las muestras se pesaron en balanza analítica (Acculab).

Las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción en un equipo Soxhlet (Selecta) y se concentraron en un rotavapor (RKV Büchi). El análisis de HAP's se realizó en un cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masa Clarus 500 de Perkin Elmer con programa informático turbo Mass versión 5.0 y librería de espectros de masas NIST T 2002. La columna utilizada para la separación fue una columna cromatográfica (Zebrón) ZB-5 ms de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno con una película de 0,25 µm de la fase estacionaria constituida por 5 % polisilarileno y 95 % polidimeilsiloxano.

3 Métodos

3.1 Selección de los puntos de muestreo

La recolección de muestras para este estudio se realizó en Shushufindi, provincia de Sucumbíos, Ecuador (figura 1). En este sector se seleccionaron tres lugares donde se recolectaron peces y sedimentos.

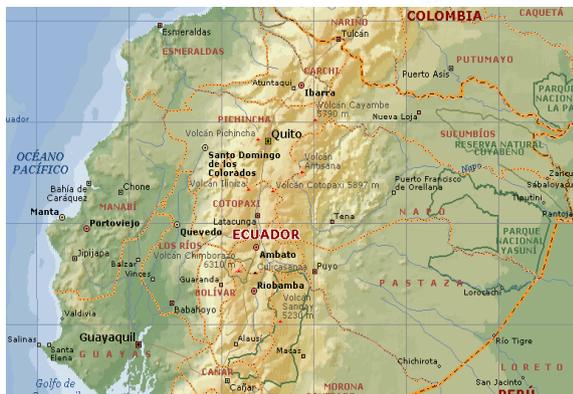


Figura 1. Ubicación de Shushufindi en el mapa

3.2 Técnicas de pesca

Para la recolección de los peces en cada uno de los sitios de muestreo seleccionados se emplearon las siguientes técnicas de muestreo:

1. Pesca con anzuelos
2. Pesca con atarraya
3. Pesca con red de trasmallo
4. Pesca con red de arrastre

Las especies de peces recolectadas para el análisis se clasificaron según el hábitat en que se desarrollan dentro del lecho acuático, es decir, peces que habitan en el fondo de los ecosistemas acuáticos (bentónicos o bentos) o peces que habitan en la parte superficial de los cuerpos de agua (pelágicos).

3.3 Recolección de sedimentos

Las muestras de sedimentos fueron recolectadas utilizando un barreno en los mismos lugares donde fueron recolectados los peces.

3.4 Preparación de muestras y extracción de HAP's en peces

Los peces recolectados fueron diseccionados para obtener las vísceras y los músculos de la parte dorsal, según el análisis. Para extraer los HAP's de estas matrices, se tomaron muestras de 50g, tanto de vísceras como de músculos, y se sometieron a una extracción sólido-líquido en tubo de Bood durante 16 horas usando diclorometano como solvente. Los productos obtenidos fueron concentrados en un rotavapor hasta un volumen aproximado de 2mL. Los extractos se purificaron en una columna de florisil y luego se volvieron a concentrar hasta un volumen de 1mL, para ser analizadas en un cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masas (GC/MS) (U.S. EPA, 2000).

3.5 Preparación de muestras y extracción de HAP's en sedimentos

Los sedimentos obtenidos fueron secados a condiciones atmosféricas en la ciudad de Quito (20°C y 540mmHg). Las muestras secas fueron tamizadas y pesadas, para luego ser almacenadas en frascos, protegiéndolas de la luz con papel aluminio.

Muestras de 30 g fueron sometidas a una extracción Soxhlet por 16 horas con diclorometano. El procedimiento posterior fue similar al de las muestras de peces en cuanto a la purificación, concentración y análisis en el GC/MS (US EPA, 1996).

3.6 Análisis de HAP's

El equipo donde se analizaron las muestras fue un cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masa (GC/MS) Clarus 500, equipado con una columna ZB-5 ms de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno con una película de 0,25 µm de espesor. El volumen de inyección fue de 1 mL, usando Helio como gas portador. La temperatura de inyección de las muestras fue de 270 °C. La temperatura de la línea de transferencia fue 280 °C y la temperatura de la fuente de iones fue de 200 °C.

3.7 Identificación de los HAP's

La identificación de los HAP's se realizó mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos, con la base de datos de la librería de espectros de masas NIST T 2002 del programa informático turbo Mass versión 5.0.

4 Resultados y análisis

4.1 Ubicación de los puntos de muestreo seleccionados.

Se seleccionaron los siguientes lugares en la zona de Shushufindi como puntos de muestreo:

Laguna: cuerpo de agua dulce (Laguna) ubicada dentro del Complejo Industrial Shushufindi de Petroindustrial en el cantón

Estación Norte: pequeño afluente del Río Eno, s/n, cercano a la estación de bombeo y captación de gas norte de Petroindustrial, al norte de la cabecera cantonal de Shushufindi.

Estación Sur: río La Sur, próximo a la estación de bombeo y captación de gas sur de Petroindustrial, al sur de la cabecera cantonal del cantón Shushufindi. Por la dificultad de pesca en este río se establecieron dos puntos de muestreo en esta misma estación.

Las coordenadas de los puntos de muestro seleccionados se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Ubicación del punto de muestreo “Estación Norte” perteneciente a un pequeño afluente s/n del río “Eno”

	Ubicación	Dirección
Latitud	0°9'7"	Sur
longitud	76°38'48"	Oeste
Altitud	256 msnm	

Tabla 2. Ubicación del punto de muestreo “Laguna” ubicado dentro del complejo industrial Shushufindi.

	Ubicación	Dirección
Latitud	0°12'9"	Sur
longitud	76°39'10"	Oeste
Altitud	250 msnm	

Tabla 3. Ubicación del punto de muestreo “Estación Sur” perteneciente al río “La Sur”

Punto 1		
	Ubicación	Dirección
Latitud	0°14'47"	Sur
longitud	76°38'54"	Oeste
Altitud	244 msnm	
Punto 2		
	Ubicación	Dirección
Latitud	0°15'7"	Sur
longitud	76°39'5"	Oeste
Altitud	259 msnm	

4.2 Peces recolectados:

Los peces recolectados en cada uno de los puntos de muestreo se detallan en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4. Peces recolectados en al “Estación Norte”

Nombre científico	Nombre común	Hábitat
Aequidens tetramerus	Vieja	Pelágico
Crenichhla johanna	Chuti	Pelágico
Leporinus friderici	Sardina	Pelágico
Astyanax maximus	Sardina	Pelágico
Hoplios molabrieus	Guanchiche	Bentónico
Ancistrus algoe	Carachama	Bentónico
Rineloricaria lanceolata	Carachama	Bentónico
Pimelodella grisea	Barbuda	Bentónico
Squamata emarginatus	Carachama	Bentónico
Pterigoplichtg gibbieeps	Carachama	Bentónico

Tabla 5. Peces recolectados en la “Estación Sur”

Nombre científico	Nombre común	Hábitat
Aequidens tetramerus	Vieja	Pelágico
Crenichhla lucius	Chuti	Pelágico
Squamata emarginatus	Carachama	Bentónico
Pterigoplichthys punctatus	Carachama	Bentónico
Ancistrus occidentalis	Carachama	Bentónico
Pterigoplichthys stibario	Carachama	Bentónico
Rineloricaria lanceolata	Carachama	Bentónico

Tabla 6. Peces recolectados en la “Estación Sur”

Nombre científico	Nombre común	Hábitat
Aequidens tetramerus	Vieja	Pelágico
Hoplios molabrieus	Guanchiche	Bentónico

4.3 Identificación de HAP's en muestras de peces recolectados

La identificación de HAP's en las vísceras y el tejido muscular de los peces recolectados únicamente es cualitativa. Estos resultados se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados cualitativos de contaminación por HAP's en muestras de peces de la zona de Shushufindi.

Ubicación	Hábitat	Parte analizada	HAP encontrado	Muestras
Laguna de Petroindustrial	Pelágico	Vísceras	Antraceno	1
Laguna de Petroindustrial	Bentónico	Vísceras	Naftaleno	1
Laguna de Petroindustrial	Bentónico	Vísceras	Fenantreno	1
Laguna de Petroindustrial	Bentónico	Músculos	Antraceno	4
Estación Norte	Pelágico	Músculos	Antraceno	2
Estación Sur	Pelágico	Músculos	Antraceno	1
Estación Sur	Bentónico	Músculos	Antraceno	1

Los resultados obtenidos evidencian la presencia de HAP's en músculos de peces, lo que podría representar un grave problema para la seguridad alimentaria de la población de Shushufindi.

En un estudio realizado por COIRCO, 2006 en el río colorado (Mendoza, Argentina) se reportó la presencia de antraceno, además de naftaleno y fenantreno; en el músculo dorsal de peces de varias especies existentes en el sector. En dicho estudio se utilizó una metodología de análisis similar a la aplicada el presente trabajo. La tabla 8 muestra los HAP's encontrados por COIRCO, 2006 para cada especie de pez.

En otro estudio, Pointet y Milliet, 1999, detectaron la presencia de naftaleno, fluoranteno, fenantreno y pireno en hígados de algunas especies de peces existentes en la reserva natural de Camargue (Francia), un ecosistema expuesto a las descargas atmosféricas de la industria petroquímica.

Tabla 8. HAP's encontrados por COIRCO, 2006 para cada especie de pez

HAP encontrado	Especie en la que se encontró
Naftaleno	Bagre de torrentes, Bagre otuno, Perca bocona, Pejerrey bonaerense, Carpa, Perca bocona
Antraceno	Carpa
Fenantreno	Pejerrey bonaerense

Los resultados cualitativos reportados en muestras de sedimentos se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados cualitativos de contaminación por HAP's en muestras de sedimentos de la zona de Shushufindi.

Ubicación	HAP encontrado	Muestra
Laguna de Petroindustrial	Antraceno	1
Laguna de Petroindustrial	Fenantreno	1
Estación Norte	Benzo(k) fluoranteno	1
Estación Sur	Benzo(b) fluoranteno	1

Únicamente en la laguna de Petroindustrial se encontraron los mismos HAP's en peces y sedimentos.

El mecanismo de metabolización de los HAP's en peces es muy complejo por lo que no se observa una correlación directa entre la contaminación presente en los sedimentos y la contaminación presente en vísceras y músculos de peces. En el hígado de los peces los HAP's generalmente son transformados en otras sustancias, normalmente derivados oxidados. La probabilidad de encontrar contaminación de HAP's en los peces pelágicos y bentónicos es prácticamente la misma porque las formas de contaminación son según estos resultados igualmente importantes (HCPEC, 2010).

4.4 Comportamiento de la población

En este trabajo de investigación se realizó, entre la población aledaña a los puntos de muestreo, una encuesta con diez preguntas, para establecer los hábitos de consumo de los habitantes con respecto a los peces existentes en los ríos de la zona. Cincuenta personas fueron entrevistadas. Del análisis de los datos obtenidos en esta encuesta, se pudo establecer lo siguiente:

1. Existe un alto consumo, por parte de la población, de las especies de peces existentes en los ríos y lagos de la zona de Shushufindi. Los pobladores prefieren mayoritariamente este tipo de peces a los peces del mar, principalmente porque los consideran productos frescos y por tanto más saludables, por su disponibilidad y por su bajo costo
2. La pesca en los ríos de la zona se da de forma regular durante todo el año pero es en el la temporada seca (verano) cuando las condiciones para esta mejoran por el bajo caudal de los ríos.
3. La población es consiente que la abundancia de peces y la diversidad han disminuido en los últimos años pero relacionan este problema a malas prácticas de pesca y no a las actividades de explotación petrolera.

5 Conclusiones

1. Este estudio confirma la presencia de HAP's en vísceras y músculos de los peces recolectados en cuerpos de agua dulce que se encuentran afectados por la actividad petrolera en Shushufindi, Sucumbíos, Ecuador. Además se determinó la presencia de HAP's en sedimentos directamente relacionados con estos cuerpos de agua.
2. El HAP con mayor presencia en las muestras analizadas fue el antraceno.
3. La presencia de HAP's en muestras de músculos de peces es un hecho preocupante, que amenaza la seguridad alimentaria de poblaciones aledañas, las cuales, culturalmente mantienen un alto consumo de peces de la región

4. Este trabajo evidencia que la actividad petrolera en Shushufindi afecta el equilibrio del ecosistema y puede generar problemas de salud en la población.
5. Si se pretende mantener el frágil ecosistema de la Amazonía, es necesario mejorar las técnicas y métodos de explotación petrolera y generar una conciencia de responsabilidad ambiental.

6 Trabajo futuro

1. Concluir la cuantificación de los HAP's identificados en muestras de vísceras y músculos de peces y muestras de sedimentos analizados en este estudio.
2. Realizar análisis de metabolitos en las vísceras de los peces afectados por la actividad petrolera, puesto que los HAP's son transformados en el hígado. El análisis de metabolitos permite evaluar de una forma más objetiva el impacto ambiental de la actividad petrolera en el ecosistema y en estos seres vivos.
3. Realizar estudios multidisciplinarios que permitan evaluar los riesgos en la salud de la población, que incluyan análisis de sangre y orina para la evaluación de la presencia de HAP's en seres humanos.

Agradecimientos

1. Escuela Politécnica Nacional por los Fondos otorgados para el Proyecto Semilla PIS-024.
2. Petroindustrial por el apoyo en el área de investigación.
3. Ing. Castellanos por brindar su valiosa ayuda siempre que es requerida.

Referencias

- [1] AESAN (Agencia española de seguridad alimentaria), 2002, "Repercusiones del vertido del Prestige en la seguridad alimentaria", http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/seguridad/PRESTIGE0ctubre20031.pdf, (Enero, 2009).
- [2] Amazonia por la vida Org., 2007, "Impactos previsibles de la actividad petrolera dentro del Yasuní", <http://www.amazoniaporlavida.org/es/Parque-nacional-Yasuni/Impactos-previsibles-de-la-actividad-petrolera-dentro-del-Yasuni.html>, (Julio, 2009).
- [3] AOAC, 2002, "Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals", http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf, (Enero, 2009).
- [4] Baird, C. y Cann, M., 2005, "Environmental Chemistry", 3ra edición, Editorial W.H. Freeman and Company, New York, Estados Unidos, pp. 318-322, 393-402.
- [5] Bustamante, T., Jarrín, M., 2005, "Impactos sociales de la actividad petrolera en Ecuador: un análisis de los indicadores", <http://www.flacso.org.ec/docs/i21bustamante.pdf>, (Octubre, 2009).
- [6] COIRCO (Comité Interjurisdiccional del río Colorado, Argentina), 2006, "Programa integral de calidad de aguas del río Colorado. Años 2004 - 2005. Subprograma calidad del medio acuático", <http://www.coirco.com.ar/programas/2005/librocoirco2005.pdf>, (Diciembre, 2007).
- [7] Dueñas, J., "Síntesis evolutiva de la actividad petrolera en el Ecuador", http://www.miradorpetrolero.com/index/Documentos/Sintesis_de_la_actividad_petrolera_en_Ecuador.zip, (Noviembre, 2009).
- [8] Franco, A., Soriano J. y Viñas, L., 2003, "Niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) en especies de interés pesquero en relación con la seguridad alimentaria", <http://www.ieo.es/prestige/pdfs/Informe%20IEO%2005.pdf>, (Marzo, 2010).
- [9] Guaranda, W., "Apuntes sobre la explotación petrolera en el Ecuador", http://www.inredh.org/index.php?option=com_content&view=article&id=288:explotacion-petrolera-en-el-ecuador&catid=61:boletines&Itemid=126, (Diciembre, 2009).
- [10] HCPEC (Health and Consumer Protection European Commission), 2002 "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons - Occurrence in foods, dietary exposure and health effects", http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154_en.pdf, (Marzo, 2010).
- [11] Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H. y Gutiérrez, A., 2005, "Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos", <http://www.scielo.org.ar/scielo>, (Marzo, 2009).
- [12] Ortiz, R., 2000, "Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos", <http://es.geocities.com/ecored2000/haps.html>, (Enero, 2009).
- [13] Peña, A., Morales, J., Labastida, C. y Capella, S., 2003, "Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: Aplicación a organismos marinos", <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=37019102>, (Enero, 2008).

- [14] Phillips, J., Strozak, V. y Wistrom, C., 2000, "Química: Conceptos y Aplicaciones", 1ra Edición, McGraw-Hill Interamericana Publishers, México D.F., México, pp. 637-639.
- [15] Pointet, K. y Milliet, A., 1999, "PAH's analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS", <http://www.sciencedirect.com/science>, (Octubre, 2009).
- [16] Rakoff, H. y Rose, N., 1994, "Química Orgánica Fundamental", Editorial Limusa S.A., México D.F., México, pp. 172-177,179.
- [17] Romero, R., Fernández, J., Plaza, P., Garrido, A. y Martínez, J., 2007, "Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria", <http://scielo.isciii.es/scielo>, (Octubre, 2009).
- [18] San Sebastián, M. y Hurtig, A. K., "Oil exploitation in the Amazon basin of Ecuador: a public health emergency", *Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health* 15(3), 2004, in [http://www.texacotoxico.org/eng/sites/default/files/Public_Health_Emergency_RPSP%20\(ENG\).pdf](http://www.texacotoxico.org/eng/sites/default/files/Public_Health_Emergency_RPSP%20(ENG).pdf), (Diciembre, 2009).
- [19] U.S. EPA (1988), "Second Supplement to the Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air", EPA-600/4-89-018. pp TO-13 to TO-97 (Febrero, 2008).
- [20] U.S. EPA, 2000, "Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories: Volume 1 - Fish Sampling and Analysis - Third Edition", <http://www.epa.gov/waterscience/fish/advice/volume1/index.html>, (Febrero, 2008).
- [21] U.S. EPA, 1996, "Method 3540C Soxhlet Extraction", <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf> (Junio, 2009)
- [22] Vives, I., Grimalt, J. y Guitart, R., 2001, "Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y la Salud Humana", <http://webs2002.uab.es/tox/WPUB/PAHacte.pdf>, (Febrero, 2010).
- [23] Vollhardt, K. y Schore, N., 2007, "Organic Chemistry: structure and function", 5th Edition, Editorial W.H. Freeman and Company, New York, Estados Unidos, pp. 101-103, 679-685, 747-750.