



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE CLOROPROPANODIOLES Y GLICIDOL EN ALIMENTOS

Alumno: Parras Armenteros, Juan

Tutoras: María Luisa Fernández de Córdova
Lucía Molina García

Dpto.: Química Física y Analítica

Diciembre, 2017



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE CLOROPROPANODIOLES Y GLICIDOL EN ALIMENTOS

Esta memoria constituye el Trabajo Fin de Máster y se presenta a la Comisión Evaluadora en Jaén a 14 de Diciembre del año 2017.



Fdo.: Juan Parras Armenteros

MARÍA LUISA FERNÁNDEZ DE CORDOVA,
CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD, Y LUCÍA MOLINA
GARCÍA, DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS, DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA DE
LA UNIVERSIDAD DE JAÉN,

Como **TUTORAS** de D. Juan Parras Armenteros, en el
Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, durante el
curso 2016-2017

INFORMAN: Que el presente Trabajo Fin de Máster,
*Evaluación de los niveles de cloropropanoles y glicidol
en alimentos*, ha sido realizado en los Laboratorios de
Investigación de la Universidad de Jaén por el Graduado D.
Juan Parras Armenteros, para la obtención del Título de
Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva por la
Universidad de Jaén, bajo su dirección.

Jaén, Diciembre de 2017



Fdo.: M^a Luisa Fernández
De Córdoba



Fdo.: Lucía Molina
García

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Glicidol: características generales	3
2.2 Cloropropanoles: características generales	4
2.3 Concentración en alimentos y niveles de exposición a través de la dieta	9
2.4 Vías de formación	11
2.5 Reducción de los niveles de 3-MCPD y glicidol en alimentos	13
2.6 Métodos Analíticos para su determinación	15
2.6.1 Principales etapas de los métodos indirectos	18
2.6.2 Innovaciones en los diferentes métodos analíticos	20
2.7 Técnica Analítica: Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas en Tándem	24
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Materiales e instrumentación	29
4.2 Reactivos	31
4.2.1 Reactivos y disolventes	31
4.2.2 Disoluciones	31
4.3 Métodos analíticos	33
4.3.1 Método para la determinación de glicidol y 3-MCPD ligados en forma de ésteres en aceites y grasas	33
4.3.1.1 Ensayo A	33
4.3.1.2 Ensayo B	34
4.3.2 Método para la determinación de 3-MCPD ligado en forma de ésteres y contenido total en 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol ligados en forma de ésteres en productos de pescado.	34
4.3.2.1 Ensayo A	34
4.3.2.2 Ensayo B	35

4.3.3 Método para la determinación de 3-MCPD libre en productos de pescado.	35
4.3.4 Medida analítica	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 Determinación de glicidol y 3-MCPD ligados en forma de ésteres en aceites y grasas	38
5.1.1 Principio del método	38
5.1.2 Parámetros analíticos	39
5.1.2.1 Calibración	41
5.1.2.2 Cálculo del factor estequiométrico para la conversión del glicidol en 3-MCPD	42
5.1.2.3 Límite de cuantificación y de detección	43
5.1.2.4 Precisión	44
5.1.3 Aplicaciones analíticas	44
5.2 Determinación de 3-MCPD ligado en forma de ésteres y del contenido total en 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol ligados en forma de ésteres en productos de pescado.	46
5.2.1 Principio del método	46
5.2.2 Parámetros analíticos	48
5.2.2.1 Calibración	49
5.2.2.2 Límite de cuantificación y de detección	50
5.2.2.3 Precisión	50
5.2.3 Aplicaciones analíticas	51
5.3 Determinación de 3-MCPD libre en productos de pescado.	52
5.3.1 Principio del método	52
5.3.2 Parámetros analíticos	54
5.3.2.1 Calibración	54
5.3.2.2 Límite de cuantificación y de detección	55
5.3.2.3 Precisión	55
5.3.3 Aplicaciones analíticas	56
6. CONCLUSIONES	58
7. BIBLIOGRAFÍA	60

1. RESUMEN/ABSTRACT

En este Trabajo Fin de Máster se han evaluado, en diferentes tipos de alimentos, los niveles de concentración de *3-monocloropropanodiol* y *glicidol*, compuestos considerados como contaminantes importantes de los aceites comestibles utilizados como alimentos o como ingredientes alimentarios. El estudio de ambos compuestos es de gran interés debido a que están clasificados como agentes cancerígenos por la *Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer*. Inicialmente el *3-monocloropropanodiol* se detectó en proteína vegetal hidrolizada y el *glicidol* en aceite de palma. Posteriormente, estos contaminantes fueron encontrados en multitud de alimentos, encontrándose los mayores niveles en aceites y grasas vegetales, especialmente en los derivados de palma; por ello, en los últimos años el interés por su estudio ha ido aumentando progresivamente.

La problemática de la presencia de estos contaminantes en los alimentos ha desembocado en la emisión en 2014 de una *Recomendación* por parte de la Unión Europea para que sus Estados Miembros evalúen sus niveles de concentración en una serie de alimentos y desarrollen métodos apropiados para su análisis. Entre estos alimentos se incluyen los aceites y grasas vegetales y sus productos derivados, así como alimentos que los contengan como ingredientes. El objetivo que se persigue con ello es evaluar el grado de exposición a estos compuestos al que está sometida la población europea y establecer, en un futuro próximo, unos contenidos máximos en los alimentos, evitando así riesgos para la salud pública.

Con este Trabajo se ha pretendido contribuir al objetivo establecido por la Unión Europea anteriormente descrito. Para ello se ha partido del método desarrollado y validado previamente, en mi Trabajo Fin de Grado, para la evaluación del contenido en *3-monocloropropanodiol* y *glicidol* ligados en forma de ésteres en aceites vegetales y productos derivados, basado en la técnica Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas en Tándem con trampa iónica. Dicho método se ha aplicado aquí a la determinación de ambos contaminantes en aceites y grasas vegetales y productos derivados. Además, se ha llevado a cabo la validación de dos métodos para el análisis de (A) *3-monocloropropanodiol* y *glicidol* ligados en forma de ésteres y de (B) *3-monocloropropanodiol* libre en productos de pescado.

Ambos métodos han sido aplicados a la determinación de los dos compuestos en productos derivados del pescado (pescados ahumados o conteniendo entre sus ingredientes aceites refinados).

In this work, the concentration levels of *3-monochloropropanediol* and *glycidol*, compounds considered as important contaminants of edible oils used as food or as food ingredients, have been evaluated. The study of both compounds is of great interest because they are classified as carcinogens by the International Agency for Research on Cancer.

Firstly, *3-monochloropropanediol* was found in hydrolyzed vegetable protein and *glycidol* was found in palm oil. Nowadays they can be found in a wide range of foods, but the highest level is found in vegetable oils and fats. This is the reason why interest in these compounds has been increasing in recent years.

The presence of these contaminants has led to the Recommendation emitted by the European Union in 2014 with respect to the necessity of evaluating their levels of concentration in a number of foods. Moreover, the European Union recommends developing appropriate methods for their analysis. Within these foods, we can find very common vegetable oils and fats, derived products and other foodstuffs containing oils and fats among their ingredients. The objective is to know the levels of concentration of these contaminants to which the European population is exposed, in order to determine the maximum levels to establish in foods.

The aim of this research is to contribute to the goal established by the European Union. To this end, a method of analysis previously developed and validated in my End-of-Grade Work for evaluating the content of esters of *3-monochloropropanediol* and *glycidol* in vegetable oils and derived products, based on the technique Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Tandem with ionic trap, has been used. This method has been here applied to the determination of both contaminants in different oils and vegetable fats and derived products. In addition, two methods have been developed and validated for the analysis of (A) *3-monochloropropanediol* and *glycidol* esters and (B) free *3-monochloropropanediol* in fish products (smoked fish and fish products containing among their ingredients refined oils).

2. INTRODUCCIÓN

2.1 GLICIDOL: CARACTERÍSTICAS GENERALES

El glicidol es un líquido viscoso e inestable. Su estructura química contiene un anillo epóxido y un grupo hidroxilo (Figura 1). Este compuesto tiene multitud de usos en la industria debido a que posee un carácter bifuncional. Sin embargo la *Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC)* lo ha catalogado en el grupo 2A “probablemente carcinógeno para humanos” (IARC, 2000), los síntomas que causa este compuesto al ser humano son:

- Irritación de la piel, ojos, membranas mucosas y tracto respiratorio
- Daños en el sistema nervioso central
- Daños en el ADN
- Mutaciones y cáncer

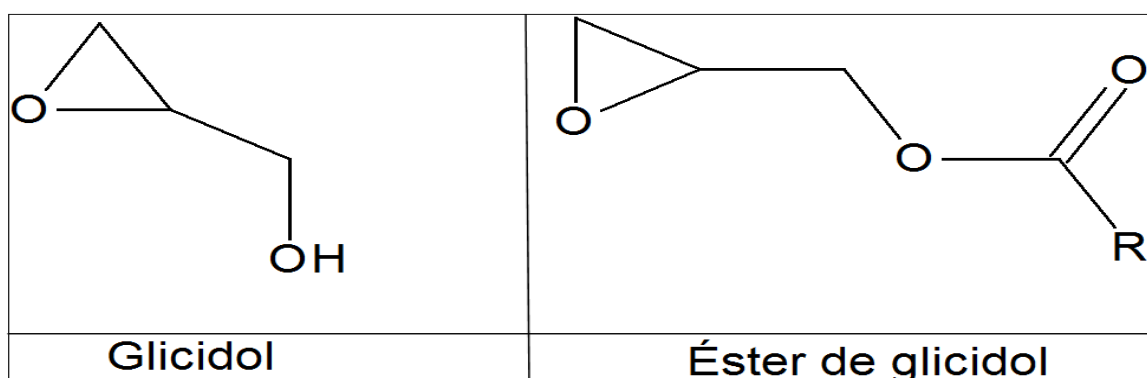


Figura 1: Forma libre y esterificada del glicidol (R= ácido graso)

En EEUU la *Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA)* estableció en 50 ppm el límite de exposición durante una jornada laboral (8 horas) (CDC, 1978). Posteriormente el límite recomendable fue fijado en 25 ppm por el *Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH)* (CDC, <https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0159.html>). Por último en España, el *Instituto Nacional para la Seguridad y Salud en el Trabajo (INSHT)* tiene fijado en la actualidad el Valor Límite Ambiental-Exposición Diaria (VLA-ED) para el glicidol en 2 ppm. Dicho límite representa las condiciones para que la mayoría de los trabajadores en jornadas de 40 horas semanales no sufran efectos adversos para la salud (INSHT, 2017).

El glicidol se encuentra en multitud de alimentos, siendo el aceite de palma el primero en el que se detectó (Weibhaar and Pertz, 2010). Las altas temperaturas necesarias para llevar a cabo el proceso de refinación (refinación física debido a la alta acidez del aceite crudo) y el elevado contenido en diglicéridos, (aproximadamente entre un 4% y 12%) hacen que su contenido en glicidol sea importante.

También ha sido detectado en menor concentración en otros tipos de aceites refinados (por ejemplo el aceite de girasol), en fórmulas infantiles y pescado (Zafra et al., 2017), por lo que su estudio ha despertado gran interés. En los aceites, el glicidol puede encontrarse en forma de libre o de éster (Figura 1), es decir unidos a los ácidos grasos libres presentes en el medio; para la formación del éster se requieren temperaturas muy altas (alrededor de 230°C).

Una vez ingerido por el ser humano, el glicidol esterificado sufre una liberación al tracto gastrointestinal, que tiene lugar mediante una reacción catalizada por lipasas gastrointestinales, liberándose el 100% del glicidol al organismo (EFSA, 2016).

2.2. CLOROPROPANOS: CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los cloropropanos son una familia de compuestos tóxicos que poseen átomos de cloro, grupos alcohol y una cadena de 3 átomos de carbono. Estos se distinguen por:

1. Número y posición de los átomos de cloro
2. Número y posición de los grupos hidroxilo

La primera vez que se detectaron estos compuestos fue en la proteína vegetal hidrolizada con ácido (PVH-ácido), y en salsa de soja, en la que se usa PVH-ácido como ingrediente. La PVH confiere a los productos alimenticios una mejora del sabor, obteniendo el producto un sabor intenso con un número menor de ingredientes. Su proceso de producción se realiza a altas temperaturas con el objetivo de obtener los aminoácidos que componen las proteínas vegetales. En la PVH se encontraron principalmente 5 cloropropanos (Figura 2), siendo éstos los que hasta ahora han aparecido habitualmente en alimentos. Están en mayor proporción el 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) y el 2-monocloropropano-1,3-diol (2-MCPD)

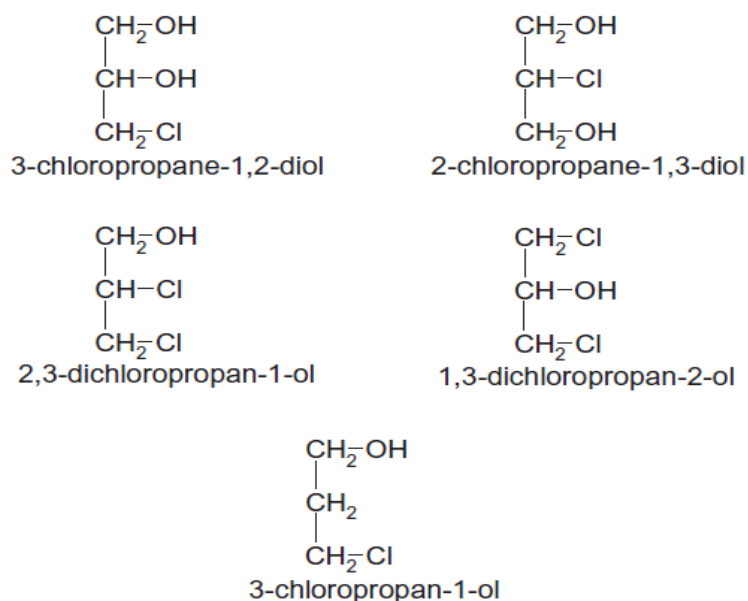


Figura 2: Cloropropanoles detectados en PVH

Fuente: (Hamlet, 2008)

Posteriormente, estos compuestos han sido detectados en multitud de alimentos, debido a que toda grasa o aceite animal y vegetal que haya sufrido un proceso de refinado los contiene en mayor o menor concentración y por lo tanto los alimentos producidos con dichos aceites o grasas también.

La formación de los cloropropanoles en las grasas se origina cuando se produce una hidrólisis de los triglicéridos, originando mono- y diglicéridos. Posteriormente estos sufren una reacción de sustitución con cloro, siempre y cuando la temperatura sea mayor a 140°C. Estas temperaturas se superan en la refinación y concretamente en la desodorización, donde se alcanzan entre 180°C y 270°C con el fin de eliminar los compuestos volátiles que confieren al aceite defectos organolépticos. Por lo tanto en aceites vegetales que no requieran una refinación estos compuestos no aparecen (Jedrkiewicz et al., 2016), como es el caso del aceite de oliva virgen.

Además de en aceites y grasas refinadas, la gran variedad de alimentos en los que aparecen estos compuestos da una idea de la multitud de mecanismos por los que se pueden formar los cloropropanoles.

Estos han sido detectados en:

- Alimentos que contienen aceites refinados: la bollería industrial es producida normalmente con aceite de palma. Los snacks, chocolate, patatas fritas, galletas, etc, contienen normalmente aceite de girasol o aceite de oliva refinado (Kuhlmann, 2012).
 - Alimentos procesados a altas temperatura: el pan, el café, etc, necesitan altas temperaturas para ser producidos (Karl et al., 2016).
 - Alimentos procesados a baja temperatura: hay algunos alimentos que a pesar de no ser tratados a altas temperaturas contienen cloropropanoles. Un ejemplo es el salami y las salchichas que contienen 3-MCPD, debido a las resinas que se emplean en su producción y/o a la interacción sufrida entre la carne y la sal durante el proceso de fermentación (Haile, 2017).
 - Productos ahumados: contienen 3-MCPD que proviene del humo producido por la madera o también puede tener origen en el “humo líquido”, que es un aditivo que proporciona sabor ahumado (Hamlet, 2008).
 - Pescados: como posibles fuentes potenciales de exposición al 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol se han señalado los siguientes pescados, a través de un estudio realizado en el mercado alemán (BMEL, <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Lebensmittelbuch/LeitsaetzeFische.html>):
 - Pescados rebozados, fritos y palitos de pescado: se han encontrado a nivel de traza, 9-116 µg/kg para los ésteres del 2-MCPD y 45-377 µg/kg para los ésteres de 3-MCPD.
 - Pescados ahumados y/o conservados en aceites refinados: los pescados ahumados son los pescados que tienen un mayor contenido en 3-MCPD libre. Dependiendo del proceso que se lleve a cabo para su producción se han encontrado niveles que están entre 5 y 388 µg/kg (Karl et al., 2016).
- 3-MCPD y 2-MCPD

Dentro de los cloropropanoles el 3-MCPD y 2-MCPD, cómo se ha comentado anteriormente, son los dos compuestos que mayor relevancia tienen en alimentos, debido a las concentraciones en que aparecen y sus efectos nocivos para la salud humana. Ambos contienen 2 grupos hidroxilo y un átomo de cloro (Figura 2).

Se ha evaluado la toxicidad del 2-MCPD mediante diversos estudios con animales, aunque todavía en la actualidad no se ha comprobado su potencial toxicológico (Ermacora, 2014) ni evaluado por IARC. En uno de ellos se comprobó cómo afectaban a ratas diferentes dosis de 2-MCPD (2,16 y 30 mg/kg) suministradas durante un periodo de 28 días, comprobando que las dosis más altas afectaban gravemente a riñones, corazón, músculos estriados e hígado.

La IARC clasifica el 3-MCPD como “posible carcinógeno para humanos” en el grupo 2B (IARC, 2012). El 3-MCPD es el integrante de los cloropropanoles que mayor importancia tiene debido a que, cómo se ha comentado en el apartado anterior, está presente en concentraciones importantes en alimentos, habiendo sido detectado por primera vez en PVH en 1978 (Velisek, 1978).

Se han realizado diversos ensayos *in vivo* sobre ratas y ratones para evaluar su poder mutagénico, cancerígeno y tóxico, y se ha comprobado que los principales órganos afectados son el riñón (con ingestas menores de 1,1 mg/kg de peso corporal por día) y los testículos, causando una bajada de la actividad inmunológica e infertilidad, padeciendo cáncer en ambos órganos. Además de los ensayos anteriores realizados, se han realizado ensayos *in vitro* para evaluar la mutagenicidad del 3-MCPD en estas condiciones. Después de realizar varios ensayos sobre la médula ósea de ratas y una síntesis no programada de ADN en hígado de rata, se concluyó que la actividad mutagénica existente *in vivo* no se reconoce *in vitro* (Robjohns et al., 2003). Se puede afirmar por lo tanto que, los tumores producidos se deben a que se supera la concentración umbral de 3-MCPD.

Debido a la presencia de ácidos grasos libres, en grasas y aceites, ambos compuestos se van a encontrar fundamentalmente esterificados (Figura 3), aunque también se encuentran, en menor cantidad, sus formas libres.

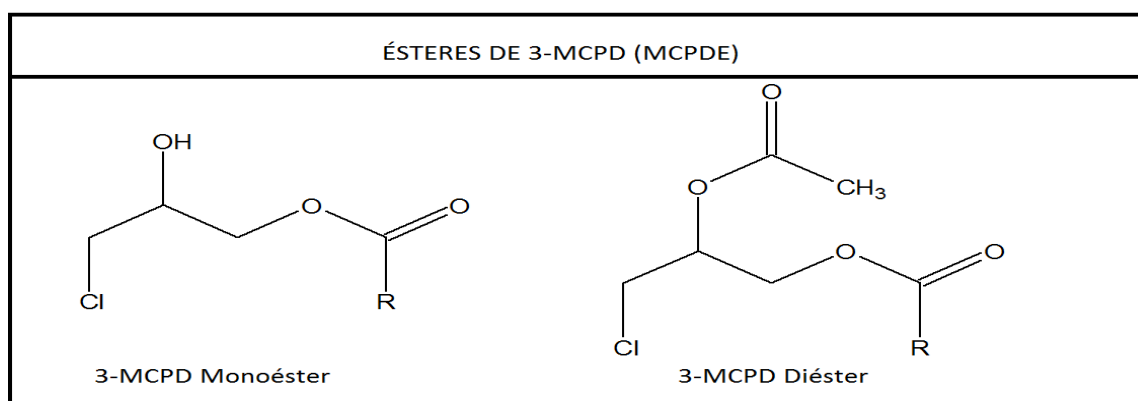


Figura 3: Formas esterificadas del 3-MCPD (R= ácido graso)

Los ésteres del 3- y 2-MCPD se encuentran habitualmente en aceites vegetales refinados y otros alimentos, cuyo proceso de elaboración requiere temperaturas elevadas, tienen poca concentración de agua, concentraciones elevadas de cloruro de sodio y están almacenados mucho tiempo (FAO, 2007). Por primera vez se detectaron los ésteres del 3-MCPD en muestras modelo que contenían concentraciones conocidas de ácido clorhídrico y triglicéridos, en fosfolípidos, aceites de soja y lípidos procedentes del gluten del trigo y de la harina de soja (Svejkovská et al., 2004). En el año 2016, se ha detectado ésteres de 2- y 3-MCPD también en los preparados infantiles para bebés (Jedrkiewicz et al., 2016).

El mecanismo por el que se forma los ésteres del 3- y 2-MCPD, en grasas o aceites vegetales refinados, es bastante similar a aquel por el que se forman los acilglicerolés a partir de ácidos grasos y glicerol. Hay multitud de ésteres de 3-MCPD, de modo que la formación de uno u otro depende del ácido graso que reaccione con él.

Los diferentes estudios realizados confirman que la concentración de ésteres del 3-MCPD encontrada en alimentos normalmente es mayor que la de su forma libre, como por ejemplo en pescado (Zafra et al., 2017).

Durante el año 2008 la Comisión Europea realizó una solicitud al *Panel Científico sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM)*, perteneciente a la *Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)*, a fin de que emitiera una “Opinión Científica” sobre los elevados niveles de ésteres 3-MCPD cuantificados en Alemania en Aceites vegetales refinados destinados para consumo humano, Aceites para freír, porción grasa de los preparados infantiles, margarina, pasta de avellana para consumo humano.

El objetivo de la solicitud era obtener ayuda para el posicionamiento de la Comisión Europea en la reunión del *Comité sobre Contaminantes de los Alimentos* que realizaría el Codex en Abril de 2008, respecto al problema que suponía la presencia de 3-MCPD en condimentos líquidos con PVH-ácido. El informe *CONTAM* afirmaba que existían las suficientes pruebas científicas de que los ésteres de 2- y 3-MCPD eran una fuente de ambos compuestos en su forma libre para humanos (FAO, 2008). Se basa en que durante la digestión se lleva a cabo una hidrólisis de los ésteres, catalizada por lipasas gastrointestinales, liberándose por lo tanto el 100% del MCPD al tracto gastrointestinal.

Por último la EFSA ha elaborado un nuevo informe, publicado en marzo de 2016, sobre los riesgos que tiene para la salud humana la presencia de estos compuestos en los alimentos (EFSA, 2016).

2.3. CONCENTRACIÓN EN ALIMENTOS Y NIVELES DE EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE LA DIETA.

El primer paso para establecer los límites de exposición e ingesta de los contaminantes en estudio se llevó a cabo en el año 2001, estableciéndose una ingesta diaria tolerable (TDI) de 2 µg/kg (peso corporal) para el 3-MCPD por el CONTAM.

En 2006 el *Instituto Internacional de Ciencias de la Salud* (ILSI) junto con la UE, establecieron una concentración máxima permitida de 3-MCPD en salsa de soja y PVH, siendo para ambos 20 µg/kg (UE, 2006) (ILSI, 2009). Al año siguiente el instituto alemán *Bundesinstitut Für Risikobewertung* (BFR) realizó varios estudios en base al TDI anterior, y confirmando que consumiendo 100 gramos de grasa vegetal se ingiere una concentración 5 veces superior al TDI. Algunos, afirmaron más tarde que los contenidos más altos de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol se encontraban en grasas y aceites vegetales, exceptuando el aceite de nuez (Weibhaar, 2011; Willits, 2013).

En 2013 la EFSA publicó un informe sobre la presencia de 3-MCPD en alimentos, evaluando los niveles de exposición de este contaminante a través de la dieta.

En el informe se reunieron datos de 1235 muestras de diferentes tipos de alimentos recogidos en diferentes países de la UE, el 2% fue aportado por España (AECOSAN, 2017), entre 2009 y 2011 (EFSA, 2013). Las concentraciones más altas se encontraron en grasas y aceites animales y vegetales. La exposición media al 3-MCPD calculada en este informe fue menor a 1 µg/kg de peso corporal al día en la mayoría de los grupos de población. Los principales grupos contribuyentes a la exposición dietética fueron la margarina y productos análogos, grasas y aceites vegetales (a excepción del aceite de nuez), productos de bollería fina, pan y bollos, y carne en conserva (ahumada).

En 2014 la UE publicó una recomendación, el 12 de noviembre, en la que incita a los países miembros a evaluar la presencia de cloropropanoles y glicidol en diferentes productos alimenticios.

Entre los alimentos que recomiendan incluyen aceites y grasas vegetales, productos derivados de los anteriores, productos alimenticios infantiles, pan y bollería fina, pescado y carne ahumada, etc. La UE concluyó con que los principales grupos de alimentos que contribuyen a la exposición del 3-MCPD son la margarina, y las grasas y aceites vegetales (UE, 2014).

En 2016 EFSA publicó una opinión científica, en la que evaluó los problemas para la salud humana relacionados con la presencia del 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol y sus ésteres en alimentos. En este estudio se analizaron 7.175 datos de presencia de estos contaminantes en alimentos, de los cuales la mitad procedían de grasas y aceites. EFSA llegó a las siguientes conclusiones (EFSA, 2016):

- Los aceites refinados tenían las concentraciones más altas, especialmente el aceite de palma.
- Los valores medios de exposición de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol fueron 0.2-1.5, 0.1-0.7 y 0.1-0.9 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal respectivamente.
- Estableció entonces en base a las evidencias científicas un nuevo TDI para el 3-MCPD (teniendo en cuenta los efectos acumulativos) de 0.8 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal por día, superado por varios grupos de población, lactantes y niños (Kuhlmann, 2017).
- Niños, bebés y adolescentes son los grupos de población más afectados
- Debido a efectos neoplásicos relacionados con el glicidol y sus ésteres, no es posible establecer el TDI. Por lo que se usó el Margen de Exposición (MOE), y no es posible descartar el riesgo para los consumidores.

En la Tabla 1 se encuentran los datos de exposición encontrados para el 3-MCPD en los diferentes grupos de población.

Por último a finales de 2016, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en aditivos alimentarios (JECFA) estableció una Ingesta Diaria Tolerable Máxima Provisional (PMTDI) para la suma del 3-MCPD y sus ésteres de 4 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal por día, siendo 5 veces mayor a la establecida por la EFSA. También evaluaron los MOEs para glicidol y sus ésteres, obteniendo valores muy bajos, indicando por tanto la preocupación para la salud humana de este compuesto. Debido a la diferencia que hay entre los valores establecidos para el 3-MCPD por la EFSA y el JECFA, la Autoridad Europea está realizando una revisión a la opinión científica del año 2016.

Tabla 1: Exposición mínima, media y máxima en $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal de 3-MCPD para diferentes grupos de población

Edad	Exposición Mínima ($\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal por día)	Exposición Media ($\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal por día)	Exposición Máxima ($\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal por día)
Infantes	1.5	1.7	2.5
Niños Pequeños	1.4	1.7	2.4
Otros niños	1.1	1.4	2.6
Adolescentes	0.5	0.9	1.3
Adultos	0.4	0.7	0.9
Ancianos	0.4	0.6	0.8
Muy Ancianos	0.3	0.7	0.9

Fuente: EFSA, 2016

2.4 VÍAS DE FORMACIÓN

El glicidol está relacionado con la concentración de diglicéridos que hay en el alimento a ingerir. Cuanto más contenido en mono- y diglicéridos mayor es el contenido en ésteres del glicidol. Fue en el aceite de palma donde se descubrió esta relación (Craft et al., 2012). Posteriormente se confirmó investigando otros frutos o semillas donde el contenido de diglicéridos era alto.

La formación de glicidol ocurre durante la desodorización, en el momento que la temperatura alcanza los 230°C o debido a un mecanismo de reorganización interna del mono/diglicérido, posterior a un tratamiento térmico, eliminándose posteriormente la molécula de ácido graso (Destailats et al., 2012).

En cuanto a las vías de formación del 3-MCPD y 2-MCPD, su origen se encuentra principalmente en cuatro fuentes (FAO, 2007):

1. Ésteres de ácidos grasos

Los cloropropanoles en forma de éster pueden ser liberados mediante una hidrólisis y esta reacción es posible debido a la presencia de unas enzimas denominadas lipasas. Tras varias investigaciones in vivo se ha comprobado que se libera el 100% del compuesto y en humanos se libera al tracto gastrointestinal.

Normalmente la hidrólisis se produce en el interior del ser humano concretamente en el intestino grueso donde se produce la descomposición de las grasas en sus elementos constituyentes, también puede producirse en el alimento. Esto ocurre en alimentos tratados con lipasas, como son algunos tipos de pan, en los cuales se han encontrado concentraciones de 3-MCPD libre bastante importantes. La hidrólisis del éster se produciría durante el horneado debido a las altas temperaturas.

2. Resinas

Existen alimentos que van conservados en ciertos tipos de resinas resistentes a la humedad, las cuales están constituidas por epiclorhidrina. Estas son usadas por ejemplo en bolsas de té. A pesar de las buenas propiedades que tiene para la conservación de los alimentos envasados, este compuesto es un precursor del 3-MCPD.

En el año 2011, la UE establece un límite máximo de migración específica en los materiales plásticos que están en contacto con alimentos. Este límite está fijado en 1 mg/kg para la epiclorhidrina (UE, 2011).

3. Procesos térmicos durante la producción de alimentos

La existencia en el medio de lípidos y cloruro sódico hace que se forme 3-MCPD y 2-MCPD (en menor proporción) durante la producción de los alimentos o el cocinado, y la temperatura y el pH son los factores que afectan principalmente a la formación de estos contaminantes (Zafra et al, 2017). Se necesitan temperaturas superiores a 170 °C y un pH superior a 6 (Parras, 2016).

Hay algunos compuestos como el bicarbonato sódico que disminuye la formación de 3-MCPD, e incrementa la velocidad de degradación del 3-MCPD si ya está formado.

También hay algunos factores específicos que afectan a la concentración de estos contaminantes:

- En el caso de productos de panadería y el pan, los principales precursores son los fosfolípidos y el glicerol.
- En alimentos con una humedad inferior al 15% el glicerol es el principal precursor y en alimentos con humedad superior al 15% el principal precursor es la lecitina.

La cantidad de glicerol disponible para convertirse en cloropropanoles depende de los ingredientes utilizados para la fabricación del alimento. En el caso del pan la composición de la cebada o el trigo, el reposo de la masa, incluso el tostado del pan son factores que afectan a la concentración de estos contaminantes en este alimento, ya que provocan la hidrólisis de triglicéridos y glicerol, siendo precursores por lo tanto del 3-MCPD y del 2-MCPD.

4. Proteínas vegetales hidrolizada (PVH-ácido)

Durante el proceso de elaboración de PVH los precursores del 3-MCPD, glicidol y 2-MCPD son el ácido clorhídrico, fosfolípidos, triglicéridos y glicerol.

El proceso de producción de la PVH a nivel industrial se basa en una hidrólisis ácida de proteínas vegetales, llevándola a cabo con ácido clorhídrico (4-6 M), durante 4-24 horas y a 100-130 °C. Realizando por último una neutralización con una base, normalmente hidróxido sódico. El problema surge del aceite residual que queda del vegetal ya que este reacciona con el ácido clorhídrico formando 3-MCPD y en menor medida 2-MCPD. Algunas materias primas vegetales donde puede ocurrir son: Trigo, harina y grano de soja, patatas, etc.

2.5. REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE 3-MCPD Y GLICIDOL EN ALIMENTOS

En primer lugar para reducir los niveles de los cloropropanoles y el glicidol en alimentos hay que tener en cuenta qué relación hay entre la aparición de dichos compuestos y los componentes del alimento.

Las estrategias para reducir las concentraciones se basan en realizar cambios en los procesos de producción, eliminar los precursores existentes en la materia prima y realizar la hidrólisis de los ésteres el producto ya preparado.

Un ejemplo es el caso de la bollería industrial, en la cual se ha reducido el 3-MCPD libre subiendo el pH de la materia prima, el problema es que se genera otro contaminante llamado acrilamida (ILSI, 2009).

En la mayoría de los alimentos una de las causas por las que contienen estos compuestos es por usar aceites refinados en el proceso de elaboración, por lo que optimizar el refinado, en concreto la desodorización, es un punto clave para reducir los niveles de estos contaminantes.

Principalmente en el refinado afecta (Parras, 2016):

- Precursores: Mono, di y triglicéridos, iones cloruro y glicerol (Figura 4)
- Temperatura
- Tiempo

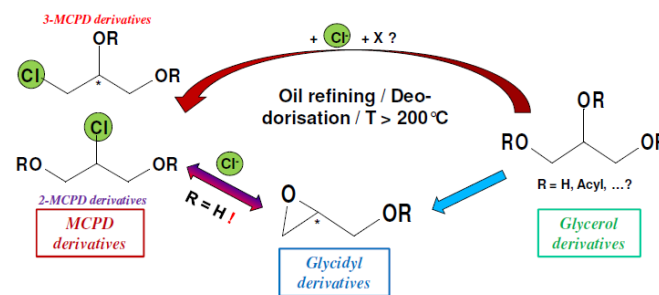


Figura 4: Formación e interconversión de MCPD y glicidol a partir de glicerol

Fuente: Kuhlmann, 2011b

Algunas de las estrategias expuestas por el “*International Life Sciences Insitute*” para la mitigación de éster de 3-MCPD y glicidol en aceites refinados son:

1. Disminuir la concentración de diglicéridos en los aceites crudos, siendo esto posible modificando la recolección de la materia prima. Está experimentalmente comprobado que la relación entre la concentración de diglicéridos en el aceite y la formación de estos contaminantes es lineal, produciéndose un aumento considerable del contenido de ésteres de 3-MCPD y glicidol cuando la concentración de diglicéridos es superior al 4% (ILSI, 2009).
2. Eliminar los iones cloruros mediante lavados de los aceites crudos.
3. Si es posible, llevar a cabo una refinación química en lugar de física. Debido a que en la desodorización a altas temperaturas se produce un aumento de los ésteres de glicidol y 3-MCPD, se ha recomendado el uso de un refinado químico en lugar de físico a fin de poder reducir la temperatura de esta etapa (ILSI, 2011).

Además, parece que el hidróxido sódico utilizado en la refinación química para neutralizar el aceite remueve en gran medida los iones cloruro presentes.

4. Uso de tierras decolorantes neutras. El uso de tierras decolorantes activadas con ácido puede hacer que parte del ácido clorhídrico que actúa en la formación de estos contaminantes tenga origen en estas tierras. Por lo tanto se reduce la formación de ésteres de 3-MCPD.
5. Uso de adsorbentes para eliminar ésteres de 3-MCPD y glicidol en aceites refinados. Por ejemplo se puede usar zeolita durante la desodorización, pero es necesario una gran cantidad para que sea efectivo la eliminación de dichos ésteres. También es efectivo el uso de silicato de magnesio, aunque solo se ha usado en sistemas modelo (ILSI, 2011).

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SU DETERMINACIÓN

Las principales dificultades encontradas en los ensayos realizados para cuantificar el 3-MCPD son su elevado punto de ebullición, bajo peso molecular y la inexistencia de un cromóforo adecuado para su análisis (Hamlet et al., 2002). Esto ha hecho que técnicas como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con detector UV o de fluorescencia hayan sido descartadas para su análisis (Hamlet and Sadd, 2002).

Otra técnica descartada ha sido la Cromatografía de Gases (GC) con ausencia de derivatización, debido a la baja volatilidad y alta polaridad de los analitos objeto de estudio, que da como resultado una baja sensibilidad (Kissa, 1992; Boden et al., 1997).

La electroforesis capilar con detector electroquímico, tampoco es apta debido a que la sensibilidad alcanzada en el análisis del 3-MCPD en alimentos no es suficiente (Xing y Cao, 2007).

La *Sociedad Americana de Químicos de Aceites (AOCS)* adoptó en el año 2013 tres métodos analíticos (AOCS, 2013a, 2013b, 2013c) para la cuantificación del 3-MCPD, 2-MCPD, glicidol y sus ésteres en aceites y grasas aptas para el consumo humano, como resultado de un estudio colaborativo. En la Tabla 2 se muestra las ventajas y los inconvenientes de cada uno de los métodos de la AOCS método.

Tabla 2: Pros y contras de los métodos validados por la AOCS

Método oficial	Tiempo de reacción	Analitos Cuantificados	Comentarios
AOCS Cd 29a-2013	16 Horas	Ésteres de 2-, 3-MCPD y ésteres de glicidol	- Método sencillo y eficaz con aceites y grasas - Sobrestimación del glicidol en algunos tipos de aceites y grasas (Extraídos o envejecidos), debido al aumento de monogliceridos - Sobrestimación del 3-MCPD cuando se encuentra cloruro en el medio durante la conversión de los ésteres de glicidol.
AOCS Cd 29b-2013 ``SGS 3 en 1``	16 Horas	Ésteres de 2-, 3-MCPD y ésteres de glicidol. 2-,3-MCPDs libres	- Método robusto. Funciona bien para todo tipo de aceites, grasas y margarinas. Es aplicable a emulsionantes, y diferentes tipos de alimentos sin extracción de grasa. -El método consta de dos ensayos, durante la preparación de la muestra - Funciona bien para todo tipo de aceites, grasas y margarinas. Es aplicable a emulsionantes, y diferentes tipos de alimentos - Se cuantifican los analitos en forma libre y esterificada, aunque no se distingue entre ellos y se expresa como la suma total.
AOCS Cd 29c-2013 ``DGF``	3.5-5.5 Min	Ésteres de 3-MCPD y 3-MCPD libre. Ésteres de glicidol	- Método rápido. Puede servir para controlar la producción - Es poco preciso para la cuantificación del glicidol. -El método se compone de dos ensayos, y no esta validado para el 2-MCPD. - Es el método menos sensible. - Se cuantifican los analitos en forma libre y esterificada, aunque no se distingue entre ellos y se expresa como la suma total.

Fuente: Kuhlmann, 2017

Estos tres métodos se basan en la GC acoplada a Espectrometría de Masas (MS), (GC/MS). En los tres métodos es necesario un control estricto de las condiciones en la que se lleva a cabo el análisis debido a la inestabilidad de los analitos, que da lugar a errores por exceso y por defecto, como es el caso de la conversión de MCPD en glicidol durante la etapa de transesterificación. El problema de reproducibilidad que tenían los métodos encontrados hasta el momento, debido a la inestabilidad del 3-MCPD durante el tratamiento de muestra fue solucionado por estos tres métodos de la AOCS.

Los métodos cromatográficos para la cuantificación de cloropropanoles y glicidol se pueden clasificar en directos e indirecto, siendo los métodos más usados los indirectos. Los métodos recomendados por la UE son los tres métodos validados por la AOCS (Tabla 2), que son indirectos (UE, 2014). La UE establece que el límite de cuantificación (LOQ) de los métodos de análisis de estos contaminantes en grasas y aceites para consumo humano no debe ser superior a 100 µg/kg. En la Tabla 3 se resumen las principales características de los métodos directos e indirectos.

Tabla 3: Tipo de métodos analíticos para la determinación de cloropropanoles y glicidol

	OBJETIVO	TÉCNICA ANALÍTICA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
MÉTODOS DIRECTOS	Cuantificar cada éster del 3-MCPD y glicidol de forma individual	HPLC-MS (Aislamiento previo con Extracción en Fase Sólida (SPE))	- La preparación de muestra requiere muy pocos pasos, debido a que no es necesario: (1) transesterificación, (2) Derivatización, reduciendo el error en la cuantificación.	- Uso de un elevado número de patrones debido a la gran cantidad de ésteres de cada analito (Zafra et al., 2017). - No proporciona el contenido total de los analitos en la muestra. - Límite de detección mayor que en los métodos indirectos.
MÉTODOS INDIRECTOS	Cuantificar el contenido total de 3-MCPD y glicidol (no diferencia entre los ésteres de cada analito)	GC/MS	- Se lleva a cabo una hidrólisis de los ésteres, cuantificando el contenido total del analito una vez en forma libre. Esto hace posible alcanzar límites de detección muy bajos. - Requiere el uso de pocos estándares internos.	- La mayoría son diferenciales, llevándose a cabo dos ensayos (1) ensayo A (cuantifica 3-MCPD y glicidol), ensayo B (cuantifica solo 3-MCPD). Por diferencia se determina el glicidol, aunque hay excepciones como el "SGS 3 en 1". - Preparación de muestra muy compleja.

2.6.1. Principales etapas de los métodos indirectos

Los métodos indirectos tienen principalmente 5 etapas:

Preparación de muestra: Se le añade el patrón interno, que es necesario para la posterior cuantificación. El patrón que se usa es deuterado, ya que mejora la reproducibilidad del método.

Transesterificación: Está etapa tiene como objetivo la hidrólisis de los ésteres (ruptura del enlace éster), obteniendo el analito en su forma libre.

La transesterificación se puede llevar a cabo con metanol en medio básico o ácido. En la Tabla 4 se muestra las ventajas e inconvenientes de cada tipo de hidrólisis.

Tabla 4. Comparación de la Transesterificación en medio ácido y básico.

	Transesterificación Ácida	Transesterificación Básica
Ventajas	- El 2-MCPD y 3-MCPD no se degradan en medio ácido.	- Rápida (poco tiempo de reacción)
Inconvenientes	- Sustituciones nucleofílicas favorecidas. Formación de 3- y 2-MCPD si hay cloruro en el medio (Error por exceso).	- 3-MCPD y 2-MCPD inestables en medio básico convirtiéndose en glicidol tras sufrir una decoloración (Kuhlmann, 2011a; Hrnčířík and Zelinkova, 2011).
Soluciones	- Extracción líquido-líquido para eliminar los cloruros del medio (Ermacora and Hrnčířík, 2012).	- Minimizar el tiempo de reacción y control estricto del mismo - Usar un patrón diésterpentadeuterado del 3-MCPD (aumenta la reproducibilidad y reduce la degradación a glicidol) - Transesterificación en condiciones suaves. Se ha desarrollado un método en el cuál se lleva la reacción a -22°C, reduciendo la degradación del 3-MCPD (Kuhlmann, 2011a)

Neutralización y salting-out: Una vez realizada la transesterificación, la reacción finaliza mediante una neutralización. Dependiendo de que la transesterificación sea ácida o básica, se usa para ello una base como el bicarbonato sódico o un ácido como el sulfúrico, respectivamente.

Además de la neutralización se lleva a cabo, simultáneamente, un proceso de *salting-out*, que es clave para favorecer una mejor separación y eliminación de los compuestos lipofílicos que contiene la matriz.

Se puede emplear para ello una sal clorada que produzca la conversión del glicidol en 3-MCPD (mayoritariamente, favorecido por regioselectividad) y 2-MCPD, por medio de una adición nucleofílica al anillo epóxido. El pH juega un papel fundamental en esta etapa debido a que éste marca la pauta en cuanto al rendimiento de la reacción (Kaze, et al., 2011). Si la sal clorada se sustituye luego por una sal no clorada, se evita la conversión del glicidol en 3-MCPD, cuantificando solo el 3-MCPD; el glicidol puede ser entonces cuantificado por diferencia. Esta fue la base del método diferencial propuesto inicialmente por el ``*Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft*`` (DGF) (DGF, 2009).

Derivatización: El objetivo de esta etapa es convertir los analitos objeto de estudio en compuestos volátiles. Se realiza en condiciones anhidras. Para la derivatización se usa habitualmente el ácido fenilborónico (PBA) y el N-heptafluorobutirilimidazol (HFBI). En la figura 5 se muestra el proceso que sufre el 3-MCPD cuando se usa PBA para su derivatización.

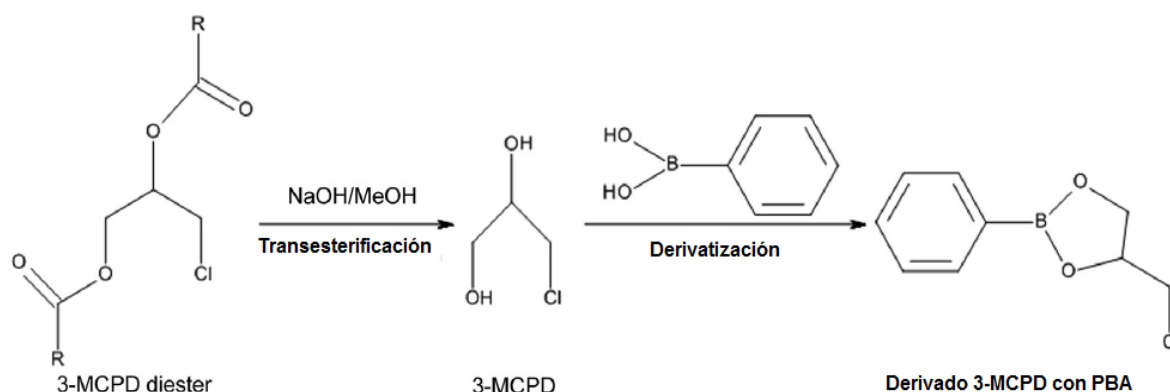


Figura 5: Proceso llevado a cabo con el 3-MCPD en el método indirecto.

Cuantificación mediante GC-MS: Se cuantifica el área del pico correspondiente al ión m/z 147 para el 3-MCPD y al ión m/z 150 para el patrón interno deuterado.

2.6.2. Innovaciones en los diferentes métodos analíticos

En los últimos años se han producido diversas modificaciones de los métodos analíticos desarrollados y la inclusión de nuevos métodos para el análisis de estos contaminantes en aceites y grasas.

En el año 2011, Kuhlmann ayudó a desarrollar el método Cd 29b-2013 ``SGS 3 en 1``, validado por la AOCS (Kuhlmann, 2011a). Se trata de un método indirecto que introduce novedades en el tratamiento de muestra.

Las principales novedades son:

- Reacción de transesterificación durante 16 horas y a -22°C. Estas condiciones de hidrólisis suaves previenen la indeseable transformación del 3-MPCD liberado en glicidol, que se observaba en métodos anteriores cuando se llevaba a cabo la transesterificación a temperatura ambiente.
- Reacción del glicidol liberado, con una sal bromada (normalmente NaBr) para transformarlo en 3-MBPD. Esto permite que se puedan cuantificar de forma paralela el glicidol, el 3-MCPD y el 2-MCPD.

Al igual que en los otros métodos indirectos, principalmente se usa el PBA como agente derivatizante. El límite de detección (LOD) para el glicidol es de 0,025 mg/kg y para el 2- y 3-MCPD es 0,05 mg/kg. El LOQ es 0,1 mg/kg para todos los compuestos cumpliendo así con lo aconsejado por la UE.

Posteriormente en 2016, Jedrkiewicz realizó un estudio de estos contaminantes en margarinas, aceites y diferentes fracciones lipídicas en el mercado polaco. Para ello, aplicó el método ``SGS 3 en 1`` (AOCS, 2013b) concretamente en margarinas, aceites refinados y aceites de pescado. Disminuyó la temperatura con respecto al anterior llevando a cabo la transesterificación a -25°C. Obtuvo un LOD de 0,01 mg/kg y un LOQ de 0,03 mg/kg para todos los compuestos (Jedrkiewicz et al, 2016).

En 2016 también se validó un nuevo método para el análisis de 3-MCPD, glicidol y sus ésteres en aceites refinados (Koyama et al., 2016). Este es un método enzimático que se basa en la hidrólisis de los ésteres de estos contaminantes con lipasa, y la bromación del glicidol para convertirlo en 3-MBPD con NaBr, derivatizando posteriormente con PBA y cuantificándolo mediante GC/MS. Este es un método que ya estaba desarrollado por Miyazaki (Miyazaki et al., 2012) y mejorado por la *Japan Oil Chemists Society* (JOCS). Este método es más rápido que los anteriores, llevando a cabo la hidrólisis de los ésteres en 30 min a temperatura ambiente, además tiene otra ventaja y es que no requiere de los estándares en forma de éster. Los LOQ obtenidos con este método son 0,14 mg/kg para el 2- y 3-MCPD y 0,06 mg/kg para el glicidol.

En 2017 se ha desarrollado un nuevo método para el análisis de grasas y aceites. Se trata de un método indirecto modificado a partir del método SGS 3 en 1 (AOCS, 2013b).

Las novedades en el tratamiento de muestra es que excluye el *clean up* con hexano, la extracción líquido-líquido y la pre-concentración de la fase orgánica con nitrógeno. De esta forma se consigue ahorrar más de 60 min con respecto al método original (Jedrkiewicz et al., 2017). El tratamiento de muestra queda como se muestra en la Figura 6.

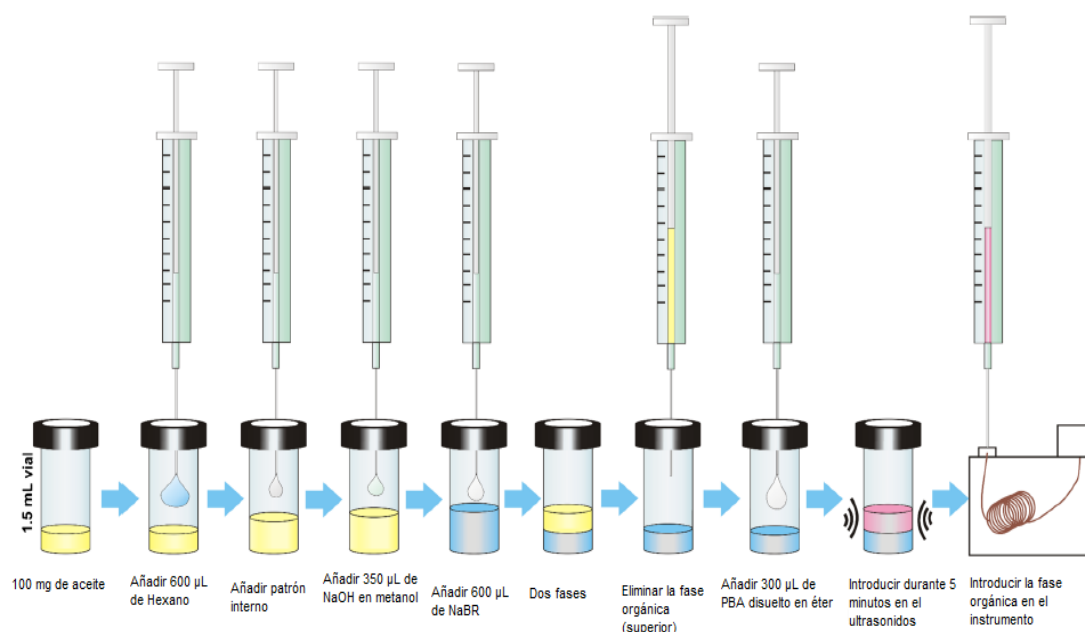


Figura 6: Tratamiento de Muestra

Fuente: Jedrkiewicz et al., 2017

Este método permite ser utilizado también en muestras sólidas usando la extracción acelerada por disolventes (ASE) para extraer los contaminantes. En la Tabla 5 se puede observar una comparación de los LOD y los LOQ obtenidos tanto para 3-MCPD como para 2-MCPD usando el método original SGS “3 en 1” y el método modificado:

Tabla 5: Comparación LOQ y LOD método nuevo y método original para el 2- y el 3-MCPD

		SGS 3 en 1	Método Nuevo
3- MCPD	LOD (mg/kg)	0,034	0,014
	LOQ (mg/kg)	0,1	0,043
2-MCPD	LOD (mg/kg)	0,0084	0,017
	LOQ (mg/kg)	0,025	0,052

Fuente: Jedrkiewicz et al., 2017

Por otro lado, también se han desarrollado y modificado métodos para analizar 3-MCPD y glicidol en otro tipo de matrices.

En 2016 se llevó a cabo un estudio realizando diferentes ensayos con algunos de los métodos analíticos existentes con el fin de aplicarlos para la determinación de estos contaminantes en pescado puesto que no existe en la actualidad ningún método oficial validado para este tipo de matriz (Karl et al., 2016). En este estudio se validaron tres métodos para pescados, los cuáles se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Métodos analíticos modificados para pescados

Método	Generalidades	Tratamiento de Muestra	LOD(mg/kg)
Método para cuantificar los ésteres de 3-MCPD y la suma total de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol	Se compone de los métodos DGF C-VI-18 (DGF, 2011) y C-VI-17, éstos son una adaptación para pescado del método de la AOCS Cd 29c-13-2013 (AOCS, 2013c). Se compone de dos ensayos A y otro B.	Transesterificación con NaOH en metanol Se detiene la reacción en el ensayo A con NaCl y en el ensayo B con NaBr, Posteriormente se lleva a cabo el <i>clean-up</i> con Hexano, se derivatiza con PBA y se realiza una extracción con Hexano con previo calentamiento.	<0,02
Método para cuantificar 3-MCPD Libre	Desarrollado con anterioridad (Jira, 2010; Küsters, 2011) y modificado en este estudio. Método validado para determinar el 3-MCPD libre.	Añadir el patrón interno y NaCl, filtrar, calentar, extraer con Hexano y por último llevar a cabo la derivatización con PBA	0,01
Método SGS 3 en 1 para pescados	Es el método SGS 3 en 1 (AOCS, 2013b) modificado para pescado. Sirve para cuantificar los ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol	Este método se diferencia del primero en dos cosas: a) la transesterificación se lleva a cabo a -22°C y durante 16 horas; b) Es necesaria una preconcentración de la muestra previa a la derivatización del PBA	< 0,02

Fuente: Karl et al., 2016

De los resultados obtenidos se concluía que con el método SGS 3 en 1 se obtenía un LOD más bajo y un porcentaje de recuperación del 3-MCPD más alto que el método modificado del DGF.

En 2017, se ha desarrollado un nuevo método para el análisis de 3-MCPD, glicidol y sus ésteres en aceite de pescado basado en una transesterificación alcalina (Zafra et al., 2017). Las principales novedades en el tratamiento de muestra son: a) La transesterificación se realiza con NaBr a temperatura ambiente; b) La derivatización se lleva a cabo a 90°C con PBA ; c) el método permite el análisis simultáneo de estos contaminantes sin necesidad de hacer varios ensayos; d) Solo se usa un patrón interno (3-MCPD-d5). La desventaja de este método es la interconversión del 3-MCPD en glicidol, esto se corrige diseñando una fórmula matemática, que permita calcular el coeficiente de conversión para poder conocer el glicidol nativo. Los LOQ para el 3-MCPD y el glicidol obtenidos son 0,2 mg/kg y 0,07 mg/kg y los LOD son 0,05 mg/kg y 0,02 mg/kg respectivamente.

2.7. TÉCNICA ANALÍTICA: CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM.

GC/MS es la técnica usada durante este Trabajo de Fin de Máster (TFM) para la evaluación del nivel de cloropropanoles y glicidol en alimentos. Esta técnica combina una técnica separativa, GC y una técnica que se basa en la fragmentación de los analitos, MS.

La GC es una técnica analítica que destaca por su sensibilidad (permite detectar algunos analitos a nivel de trazas), versatilidad y el gran número de posibilidades para la automatización (Rouessac, 2009).

La separación de los diferentes componentes de una muestra se lleva a cabo en una columna, aunque previamente la muestra debe estar en forma de gas, por lo que si la muestra es sólida o líquida se someten a una vaporización (Gutiérrez, 2002). Por lo tanto, la mayor desventaja que tiene esta técnica es la dificultad de que algunos analitos poco volátiles pasen a estado gaseoso. Para conseguir que compuestos pocos volátiles lo sean se puede llevar a cabo una derivatización.

Las principales partes de las que se compone el cromatógrafo de gases son (Figura 7) el inyector, la columna cromatográfica y el detector.

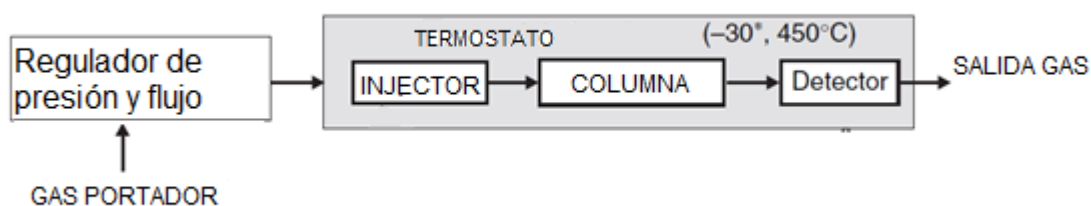


Figura 7: Cromatógrafo de gases

Fuente: Rouessac, 2007

Todas las partes del cromatógrafo están adjuntas a un horno, el cual tiene como objetivo alcanzar la temperatura deseada en la columna.

El uso del instrumento es sencillo, en primer lugar se inyecta la muestra, posteriormente se produce la vaporización de los analitos en el inyector y éstos pasan a la fase móvil. Esta fase móvil (gas portador) fluye a través de la columna, que contiene la fase estacionaria, y llega al detector, obteniéndose para cada compuesto de la muestra un tiempo de retención diferente

En la fase estacionaria, quedan retenidos los analitos, y la fase móvil transporta la muestra. La diferente afinidad de los compuestos por la fase estacionaria es lo que va a hacer que los diferentes compuestos de una muestra o matriz se separen, y lleguen al detector antes o después. Los compuestos menos afines a la fase estacionaria serán los que tengan un tiempo de retención más bajo y por tanto serán los que primero lleguen al MS, que es el detector usado en este TFM

En el espectrómetro de masas en primer lugar tiene lugar una vaporización de la muestra, posteriormente se generan iones a partir de la muestra en fase gaseosa, se separan los iones según su m/z y por último los iones llegan al detector. Cada analito o compuesto va a tener una relación masa/carga (m/z) característica y esto permite identificar un compuesto específico por su patrón de fragmentación. GC/MS es sensible y selectiva, sin embargo es destructiva a pesar de necesitar poco volumen de muestra.

Este instrumento se compone de (Sparkman, 2011):

- Sistema de introducción de muestras: Limita la técnica, debido a que no tiene tanta capacidad de vaporización de las muestras. La muestra se puede inyectar directamente o indirectamente (desde un instrumento acoplado).

- Fuente de iones: Aquí se lleva a cabo la ionización de la muestra, una vez que está vaporizada. Hay muchos tipos de ionización:
 - a) *Impacto electrónico* (EI): es la más usada, debido a que se obtienen iones moleculares (M^+) de gran energía. Los iones se generan debido al impacto con electrones acelerados. Por último los iones se aceleran usando un conjunto de lentes que aumenta su energía cinética.
 - b) *Ionización química* (CI);
 - c) *Ionización negativa de captura electrónica* (ECNI);
 - d) *Ionización de campo* (FI);
 - f) *Ionización química a presión atmosférica* (APCI): Su uso es menos frecuente.
- Analizador: Es la parte del instrumento, donde se lleva a cabo la separación de los iones. Existen cuatro analizadores que se pueden usar en el GC/MS, estos son:
 - a) Analizador de sector magnético
 - b) Analizador de cuadrupolo
 - c) Analizador de tiempo de vuelo
 - d) Analizador de trampa de iones

En este TFM se ha usado el analizador de trampa de iones. Los iones pueden ser formados y que estén durante períodos largos de tiempo atrapados, gracias a campos eléctricos y/o magnéticos. Existen modelos creados de este analizador que son parecidos al cuadrupolo y hacen posible que se pueda realizar MS/MS.

El analizador está formado por un electrodo anular y dos electrodos colectores (Figura 8). El funcionamiento de éste se basa en aplicar un voltaje de radiofrecuencia entre los dos electrodos colectores (inferior y superior), al mismo tiempo que se aplica otro potencial diferente en el electrodo central o anular. Debido a esto se crea un campo electromagnético, en el cual están confinados los iones con una trayectoria determinada.

Cada ión tiene un movimiento determinado, y éste está determinado por los voltajes que se han aplicado y su m/z

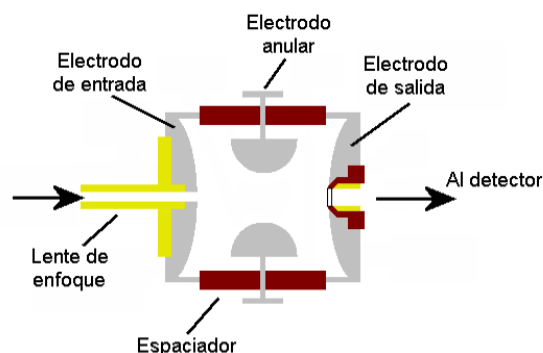


Figura 8: Esquema del Analizador de trampa de iones

Fuente: CSIC, http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf

Los iones que tienen un m/z apropiado para las condiciones usadas, circulan una órbita estable, en el interior de una cavidad que rodea el anillo (Parras, 2016). Si el potencial se aumenta, se estabilizan los iones más pesados en detrimento de los ligeros colisionando con las paredes del electrodo central.

La gran ventaja que nos da este analizador es la posibilidad de seleccionar los iones que queremos y desechar los que no. Otra ventaja es la posibilidad de hacer MS/MS y obtener un límite de detección más bajo. Pero también presenta desventajas como un poder de resolución limitado y reacciones indeseables entre los iones que pueden tener lugar cuando la concentración de los mismos es alta

- Detector: Es el último componente del instrumento, y su mayor ventaja es la gran sensibilidad y eficacia obtenidos en el análisis de mezcla de analitos o matrices muy complejas.

Si usamos la configuración tandem MS/MS (utilizada durante este TFM), esto permite realizar análisis más selectivos y sensibles, permitiendo analizar a nivel de trazas analitos en muestras extremadamente complejas. Esta configuración también permite ver los patrones de fragmentación, la estructuras químicas, etc.

Durante la cromatografía de gases se separan los compuestos y en la espectrometría de masas se identifican y cuantifican.

3. OBJETIVOS

El TFM tiene como objetivo evaluar, en diferentes tipos de alimentos (en concreto aceites y grasas vegetales, productos derivados y pescado), los niveles de 3-MCPD y glicidol. Con este estudio se podría contribuir por un lado, a conocer los niveles de exposición de los seres humanos, según el tipo de dieta llevada a cabo, y por otro lado, al establecimiento de unos límites máximos en cada tipo de alimento,

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

- Espectrómetro de masas trampa iónica–cromatógrafo de gases (Figura 9): El instrumento consta de dos partes, el espectrómetro de masas (Thermo), modelo Polaris Q, y el cromatógrafo de gases (Thermo), modelo Focus. El analizador del MS es de trampa de iones y la fuente de iones utilizada es de impacto electrónico.

El analizador tiene una velocidad máxima de barrido de 550 uma/s y un rango de masas de 10-1000 uma. La trampa iónica permite realizar ensayos MS-MS.

El cromatógrafo de gases tiene un automuestreador con capacidad de automatizar inyecciones simples, en espacio de cabeza y microextracción en fase sólida, un puerto de inyección, split/splitless. La columna usada para GC (Sigma-Aldrich) es el modelo SPB-5, con 30 m de longitud, 0,25 μm de espesor y 0,25 mm de diámetro interno.

- Agitador magnético con calefacción (Selecta), modelo Agimatic-E (Figura 10): El volumen máximo de agitación es de hasta 10 Litros. Contiene regulación de velocidad y de temperatura desde 50 °C hasta 350 °C.
- Balanza analítica (Satorius), modelo CPA2250 (Figura 11): balanza con 5 decimales con un peso máximo de 220 gramos.



Figura 9: Instrumento GC-MS



Figura 10: Agitador magnético con calefacción



Figura 11: Balanza Analítica

- Centrífuga 1 (Selecta), modelo S-240 (Figura 12): Tiene una velocidad máxima de 5000 revoluciones por min (r.p.m). Se pueden usar recipientes con capacidad máxima de 16 mL.

- Centrífuga 2 (Selecta), modelo Mixtasel BTL (Figura 13): Tiene una velocidad máxima de 5000 r.p.m. Se pueden usar recipientes con capacidad máxima de 400 mL.
- Baño de Ultrasonidos (Bandelin), modelo Sonorex Digital 10p (Figura 14): Tiene una memoria interna para guardar el programa de trabajo. Es posible seleccionar el tiempo, la temperatura (20°C-80°C) y la potencia (10-100%).
- Evaporador (Supelco), modelo Mini-Vap (Figura 15): Se compone de una válvula de control, una tubería de plástico de 0,9 m y de 6 agujas de acero inoxidable.



*Figura 12:
Centrífuga 1*



*Figura 13: Centrífuga
2*



*Figura 14: Baño de
Ultrasonidos*



*Figura 15:
Evaporador*

- Ultra Turrax (IKA), modelo T-18 basic (Figura 16): Tiene un rango de velocidad de 3000-25000 r.p.m. Se pueden usar para volúmenes de 1-1500 mL.
- Regulador electrónico de Temperatura (Selecta) (Figura 17): Regulador de temperatura para el agitador magnético con calefacción.
- Microcentrífuga (Sigma), modelo 1-14K (Figura 18): Tiene una velocidad máxima de 15000 r.p.m. Solo se pueden usar recipientes con capacidad máxima de 2 mL.



Figura 16: Ultra Turrax



*Figura 17: Regulador
electrónico de Temperatura*



Figura 18: Microcentrífuga

- Micropipetas (Sinerlab): Uso de micropipetas de 10-100 μL , 1-5 mL y 1-1000 μL .
- Pipetas Pasteur de Vidrio
- Tubos Eppendorf
- Tubos Falcon (Sarstedt): Volumen máximo 50 mL.
- Vaso de precipitados de 2 Litros
- Viales topacios de 4 mL
- Vortex (Heidolph), modelo Reax Top 541-10000-01-1: Velocidad máxima 2500 r.p.m.

4.2 REACTIVOS

4.2.1 Reactivos y disolventes

- Acetato de etilo, TraceSELECT, (Análisis de residuos), 2.5 L (Fluka)
- Ácido Fenilborónico (PBA) (HPLC), puro, 10 g (Fluka)
- Ácido Sulfúrico (98%), 1 L (Merk)
- Bromuro sódico Bioultra, 1 Kg (Sigma)
- Cloruro sódico, 500 g (granular) (Panreac)
- Éter etílico (Estabilizado con etanol), 1 L (Panreac)
- Hexano Chormasolv (HPLC) (97%, GS) 100 mL (Sigma-Adrich)
- Metanol LC-MS Ultra Chromasolv (UHPLC-MS), 1 L (Fluka)
- Métoxido sódico (25% p/v en metanol), 1 L (Sigma)
- Sulfato sódico anhidro($\geq 99\%$), 500 g (granular) (Sigma)
- Tert-butil-metil éter (MTBE), (análisis de residuos, GS), 1L (Fluka)
- 2-Metilpentano/Isohexano ($\geq 95\%$, GS), 100 mL (Aldrich Chemistry)
- 2,2,4-Trimetilpentano/Isooctano Chromasolv Plus ($\geq 99,5\%$) (HPLC), 1L (Sigma-Adrich)

4.2.2 Disoluciones

Las diferentes disoluciones de estándares internos están reflejadas en la Tabla 7. A partir de estas disoluciones, se han realizado diluciones para trabajar con las concentraciones deseadas en el transcurso del TFM.

Tabla 7: Disoluciones estándar

Éstandar	Cantidad soluto	mL Disolvente	Concentración
3-MCPD (Fluka)	100 mg	100 mL Metanol	1000 ppm
3-MCPD Diéster (Toronto Research Chemicals)	25 mg (1,2-bis-palmitoil-3-cloropropanodiol)	50 mL Acetato de etilo	500 ppm
Éster de glicidilo (TCI Europe N.V)	100 mg (estearato de glicidilo)	50 mL Acetato de etilo	2000 ppm
3-MCPD-d5 diéster (Toronto Research Chemicals)	2,5 mg (1,2-bis-palmitoil-3-cloropropanodiol-d5)	50 mL Acetato de Etilo	50 ppm
3-MCPD-d5 (Toronto Research Chemicals)	25 mg	50 mL de Metanol	500 ppm

Además de las disoluciones estándar anteriores se han usado las siguientes:

- Disolución de ácido fenilborónico (PBA) saturada: Para preparar 5 mL de disolución, añadir PBA hasta saturación en 5 mL de éter etílico. La disolución está saturada cuando el PBA precipita.
- Disolución bromuro sódico (600 g/L) acidificada: Disolver 60 g NaBr en 100 mL de agua destilada. Añadir 0,89 mL de ácido sulfúrico (98%) a la disolución. 600 µL de esta disolución tienen que neutralizar 200 µL de la disolución de metóxido sódico (2,5%), ajustando el pH a rango ácido.
- Disolución cloruro sódico (20% p/v): Disolver 20 g NaCl en 100 mL de agua destilada.
- Disolución cloruro sódico (200 g/L) acidificada: Disolver 20 g NaCl en 100 mL de agua destilada. Añadir 0,89 mL de ácido sulfúrico (98%) a la disolución. 600µL de esta disolución tienen que neutralizar 200 µL de la disolución de metóxido sódico (2,5%), ajustando el pH a rango ácido.
- Disolución metóxido sódico (2,5%, p/v): Dilución 1:10 de la disolución de metóxido sódico (25%,p/v).
- Mezcla 6:4 (v:v) éter etílico:acetato de etilo: Añadir 600 mL de éter etílico y 400 ml de acetato de etilo para preparar 1L de disolución.
- Mezcla 8:2 (v:v) MTBE:acetato de etilo: Añadir 8 mL de MTBE y 2 mL de acetato de etilo para preparar 10 mL de disolución.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Método para la determinación de glicidol y 3-MCPD ligados en forma de ésteres en aceites y grasas

Este método analítico validado está confeccionado a partir del método ISO/DIS 18363-1 (ISO, 2014) adoptado por la AOCS como método oficial Cd 29c-13 (AOCS, 2013c). El método fue optimizado y validado durante el Trabajo de Fin de Grado (Parras, 2016), donde se estudiaron variables como la influencia de la concentración de PBA, la naturaleza de la sal no clorada, el tiempo de sonicación y el disolvente utilizado en la etapa de *clean-up*.

El tratamiento de muestra consta de dos ensayos, A y B.

4.3.1.1 Ensayo A

Se pesan 100 mg de muestra, en el caso de que sea sólida y no tenga mucha cantidad de agua, y se calienta en baño de agua a 80°C para fundirla. Si la muestra es sólida y contiene mucha agua no es necesario fundirla, sino que directamente se lleva a cabo una separación de la fracción grasa mediante una extracción líquido-líquido. Se añaden luego 250 µL de una disolución de 3-MCPD-d5 diéster (patrón interno) de 5 ppm, se disuelve en 100 µL de MTBE y se agita. Se añaden a continuación 200 µL de una disolución de metóxido sódico al 2,5% (p/v), se agita durante 10 s en baño de ultrasonidos y se deja reposar durante 4 min exactos. Acto seguido se añaden 600 µL de la disolución de NaCl acidificada y se agita 20 s en el baño de ultrasonidos.

El siguiente paso es realizar el *clean-up*. Para ello se añaden 600 µL de isohexano, se agita durante 10 s en baño de ultrasonidos y se deja reposar durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se recoge la fase orgánica (fase superior) con una pipeta Pasteur de vidrio y se desecha. Se realiza el *clean-up* dos veces más.

Una vez realizado el paso anterior y con el fin de llevar a cabo la extracción del 3-MCPD, se añaden 600 µL de la mezcla éter etílico/acetato de etilo 6:4 (v/v), se agita 10 s en el baño de ultrasonidos y se deja reposar 5 min a temperatura ambiente. Se recoge la fase orgánica (fase superior) con una pipeta Pasteur de vidrio y se lleva a otro vial. Esto se realiza 3 veces, recogiendo los 3 extractos en el mismo vial.

A este vial se le añade sulfato sódico anhidro para eliminar los restos de humedad que pueda contener el extracto y se adicionan 30 μ L de la disolución saturada de PBA, para llevar a cabo la derivatización del 3-MCPD. Se agita durante 5 min en el baño de ultrasonidos y se evapora hasta sequedad con nitrógeno. Para finalizar se re-disuelve el residuo en 500 μ L de iso-octano, se centrifuga y por último se encapsula el extracto. Para ello, se recoge el extracto con una jeringa y se pasa por un filtro de 0,45 μ m, depositándolo en un vial con microinserto.

4.3.1.2 Ensayo B

Este ensayo es similar al ensayo A y tan solo hay una variación con respecto al anterior. Una vez transcurrido los 4 min después de añadir el metóxido sódico, se añade 600 μ L de una disolución de NaBr acidificada (en lugar de NaCl), y se agita 20 segundos en el baño de ultrasonidos.

4.3.2 Método para la determinación de 3-MCPD ligado en forma de ésteres y contenido total en 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol ligados en forma de ésteres en pescado.

Como se ha indicado en la introducción aún no hay métodos oficiales para el análisis de estos contaminantes en pescados, por lo que nos hemos basado en el método validado en un estudio científico (Karl et al., 2016) realizado por varios autores a partir de los métodos DGF C-VI-18 y C-VI-17 (DGF, 2011) y que están basados en el método de la AOCS Cd 29c-13-2013 (AOCS, 2013c).

El tratamiento de muestra consta de dos ensayos, A y B.

4.3.2.1 Ensayo A

Antes de comenzar el tratamiento de muestra, se homogeneiza la muestra con el ultra turrax, y posteriormente se pesan 10 g de muestra homogeneizada (corresponden a 200 mg de grasa aproximadamente) en un tubo Falcon. Se añade 400 μ L de una disolución de 3-MCPD-d5 diéster (patrón interno) de 5 ppm, se adiciona 25 mL de NaCl 20% (p/v), se disuelve en 10 mL de la mezcla 8:2 (v/v) de MTBE/acetato de etilo y se agita durante 2 min.

A continuación se centrifuga 15 min a 3900 r.p.m. En el caso de que sea pescado ahumado con gran cantidad de 3-MPCD libre hay que separar la fase orgánica y extraerla con otros 20 mL de NaCl 20 % (p/v), y se coge una alícuota de 5 mL de la fase orgánica (fase superior).

Se añade 400 µL de una disolución de metóxido sódico al 2,5% (p/v), se agita durante 1 min en el vórtex y se deja reposar durante 4,5 min exactos. Acto seguido añadir 3 mL de NaCl acidificada y agitar 1 min en el vortex. Posteriormente, se añade 3 mL de hexano, se agita durante 1 min en el vortex y se deja reposar. Eliminar la fase orgánica y volver a repetir el proceso una vez más. La fase acuosa es la que vamos a utilizar a continuación para llevar a cabo la derivatización.

Añadir 300 µL de disolución saturada de PBA al extracto, agitar 1 min en el vortex y calentar durante 30 min a 90°C en un baño de agua. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente, se añade 2,5 mL de *n*-hexano y se agita 1 min en el vortex. Se coge 1 mL de la fase orgánica (fase superior) y se evapora con nitrógeno hasta sequedad.

Para finalizar se re-disuelve en 300 µL de iso-octano, se centrifuga y por último se encapsula el extracto en un vial con microinserto. Para ello, se recoge el extracto con una jeringa y se pasa por un filtro de 0,45 µm, depositándolo en un vial con microinserto.

4.3.2.2 Ensayo B

Este ensayo es similar al ensayo A, tan solo hay una variación con respecto al anterior. Una vez transcurrido los 4,5min después de añadir el metóxido sódico, se añade 3 mL de una disolución de NaBr acidificada (en lugar de NaCl), y se agita 1 min en el vortex

4.3.3 Método para la determinación de 3-MCPD libre en pescado

El método para la determinación del 3-MCPD libre está basado en un método validado y modificado (Karl et al., 2016) a partir de un método desarrollado anteriormente durante varios estudios científicos (Jira, 2010; Küsters, 2011).

Este método solo consta de un ensayo, antes de comenzar el tratamiento de muestra es necesario homogeneizar la muestra con el ultra turrax.

Una vez hecho esto se pesan en un tubo Falcon 10 gramos de muestra, que corresponden a 200 mg de grasa aproximadamente, y se le añaden 200 μ L de una disolución de 3-MCPD-d5 (patrón interno) en NaCl (20% p/v) de 5 ppm.

Después se añade 30 mL de NaCl al 20% (p/v), se homogeniza la muestra mediante agitación manual y se introduce en un baño de agua caliente a 90°C durante 15 min. Transcurrido este tiempo se saca del baño y se deja enfriar a temperatura ambiente, y por último se centrifuga durante 15 min a 3900 r.p.m.

Posteriormente se filtra la fase acuosa, quedando en el recipiente anterior y en el filtro los restos de la matriz, y se adiciona 4 mL al extracto filtrado. Se desecha la fase orgánica, eliminando los residuos grasos que contiene el extracto. Se coge una alícuota de 8 mL de la fase acuosa, se le añaden 300 μ L de PBA, se agita durante 1 min en el vortex para llevar a cabo correctamente la derivatización y se introduce de nuevo en el baño de agua a 90°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se enfría a temperatura ambiente y se adiciona 2,5 mL de hexano, se agita 1 min en el vortex y se deja reposar. Se cogen 2 mL de la fase orgánica (fase superior en forma de gel), se vierten en un tubo eppendorf y se le adiciona una pequeña cantidad de sulfato sódico. Debido a que la alícuota que hemos cogido está en forma de gel, se centrifuga en la microcentrífuga a 14000 r.p.m durante 5 min. Se recoge en un vial todo el sobrenadante, se evapora hasta sequedad con nitrógeno y se redissuelve en 300 μ L de iso-octano.

Por último se encapsula en un vial con microinserto, para ello se recoge el extracto con una jeringa y se pasa por un filtro de 0,45 μ m, depositándolo en un vial con microinserto.

4.3.4 Medida analítica

Para los tres métodos las muestras tienen las mismas condiciones cromatográficas, éstas son las siguientes:

- Volumen de muestra inyectada: 1 μ L
- Gas portador: Helio 99,999% puro y un flujo constante (1-1,2 mL/min)
- Programa de temperaturas del horno: la temperatura inicial es de 80°C, esta se mantiene constante 1 min y aumenta 10°/min hasta alcanzar 170°C.

Se vuelve a producir una subida de temperatura hasta los 200°C a 3°C/min y una vez alcanzada esta temperatura aumenta hasta los 280°C a 15°C/min. Por último se mantiene la temperatura durante 10 min constante.

- Inyector en modo splitless: Se produce la inyección a una temperatura de 250°C. La muestra inyectada se lleva a la columna, con una temperatura constante inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra (270°C). A continuación la muestra condensa en la cabeza de la columna, llevándose a cabo el efecto solvente, es cuando el disolvente condensado actúa como una trampa donde se concentran los componentes que vamos a analizar. Por último se purga el inyector cuando ha transcurrido dos min para eliminar el disolvente vaporizado a la atmósfera.

En el caso del espectrómetro de masas, también se han usado las mismas condiciones para los tres métodos llevados a cabo. El voltaje usado es de 70 eV, con un flujo de gas de 0,3 mL/min y un rango de masas comprendido entre 50.00 y 500.00. Para realizar el análisis de las muestras se han filtrado los iones característicos, para el 3-MCPD el m/z 147 y para el 3-MCPD-d5 (patrón interno) el m/z 150. Como se ha trabajado en modo MS/MS, a partir de los anteriores se obtuvo el m/z 91 para el 3-MCPD (tiempo de retención= 9,92) y el m/z 93 para el 3-MCPD-d5 (tiempo de retención = 9,88). Por último los iones m/z 196 y 198 para el 3-MCPD y m/z 201 y 203 para el 3-MCPD-d5, se usaron para identificar los compuestos.

El contenido en ésteres de 3-MCPD y de glicidol se calculan a través de la ratio del área del pico cromatográfico del 3-MCPD/área del pico cromatográfico del patrón interno en todos los casos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DETERMINACIÓN DE GLICIDOL Y 3-MCPD LIGADOS EN FORMA DE ÉSTERES EN ACEITES Y GRASAS

5.1.1 Principio del método

En este método se va a cuantificar tanto el glicidol y el 3-MCPD que se encuentra en forma de ésteres como en forma libre, aunque estén en pequeña cantidad. Aunque se cuantifique en ambas formas, el resultado expresado no diferencia entre la forma libre y la forma éster sino que se expresa como el contenido total del glicidol y contenido total del 3-MCPD.

El método (Figura 19) consta de dos ensayos. El ensayo A es el primero de ellos y en éste se cuantifica tanto el 3-MCPD como el glicidol. El patrón interno (3-MCPD-d5 diéster) que se añade a la muestra antes de empezar, tiene un comportamiento similar a los ésteres del analito objeto de estudio, lo que permite que el método sea reproducible. Posteriormente se lleva a cabo la transesterificación de los ésteres de ambos contaminantes con metóxido sódico en metanol, siendo el fin de esta reacción hidrolizar el enlace éster obteniendo el 3-MCPD y el glicidol en su forma libre. Es un paso crítico en el tratamiento de la muestra, debido a que el tiempo debe estar comprendido entre 3,5-5 min. Si el tiempo es menor no se produce la hidrólisis completamente y si el tiempo transcurrido es mayor tenemos riesgo de que parte del 3-MCPD pase a ser glicidol debido a que es inestable en medio básico. Para detener la reacción en el tiempo justo se adiciona una disolución de NaCl acidificada y debido a que en este punto del procedimiento el medio es ácido, el cloro reacciona con el glicidol transformándolo en 3-MCPD. Además esta sal hace que se produzca un efecto llamado *salting-out* que mejora el proceso de extracción que se lleva a cabo después, debido a que aumenta la fuerza iónica y hace menos miscibles los disolventes entre ellos.

Acto seguido se lleva a cabo el *clean-up* con isohexano, eliminándose los compuestos no polares de la matriz, principalmente los ésteres metílicos. El penúltimo paso de este tratamiento de muestra es extraer los compuestos que nos interesan, en este caso el 3-MCPD libre y el glicidol libre, que al ser muy polares se usa la mezcla de éter etílico y acetato de etilo.

Y por último se lleva a cabo la derivatización con PBA transformando los analitos objeto de estudio en compuestos volátiles para poder ser cuantificados a través del GC/MS.

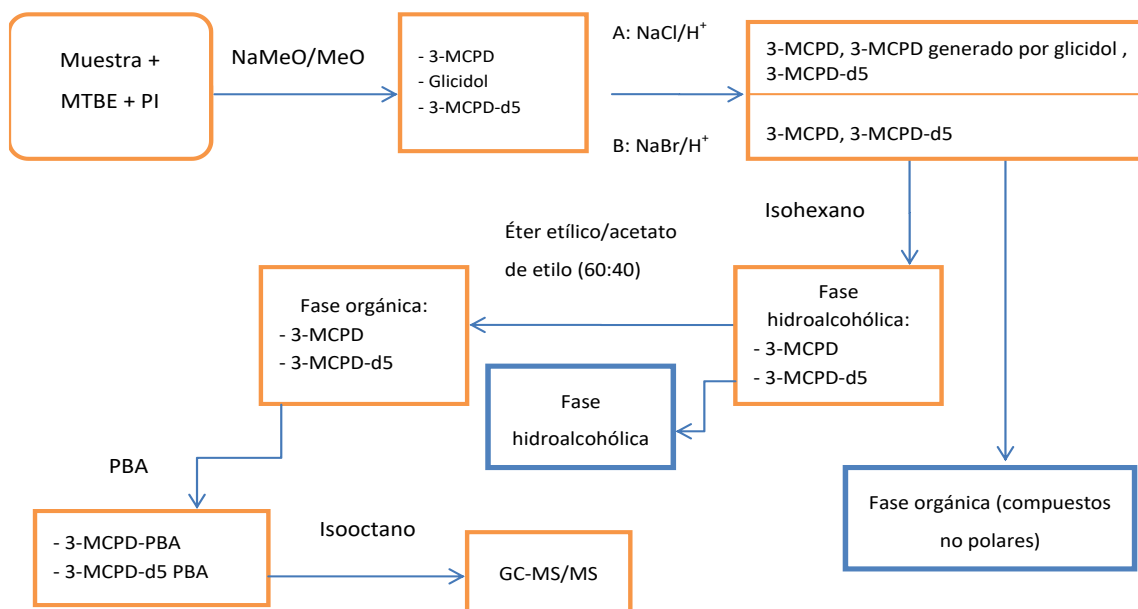


Figura 19: Esquema general del método analítico (ensayos A y B)(PI: patrón interno)

Fuente: Parras, 2016

En el ensayo B, se va a cuantificar solo el 3-MCPD y sus ésteres. Para ello se sustituye la disolución de NaCl por una sal no clorada, en este caso NaBr, que hace que el glicidol se transforme en un producto diferente al 3-MCPD que no se cuantifica.

El contenido total de los compuestos del glicidol se va a calcular por diferencia entre el contenido total del 3-MCPD obtenido en el ensayo A y B, y multiplicado por un factor estequiométrico que nos dice la cantidad de glicidol que se convierte en 3-MCPD.

5.1.2 Parámetros analíticos

Como se ha dicho en el apartado 4.3.4, se ha trabajado en modo MS/MS, debido a que la sensibilidad es mayor y el ruido de fondo menor.

Para el 3-MCPD fenilboronato se ha seleccionado el ión m/z 91(Figura 21), el cual proviene del m/z 147. Y para el 3-MCPD-d5 fenilboronato se ha seleccionado el ión m/z 93), el cual proviene del m/z 150 (Figura 20).

El blanco que se ha usado para los ensayos ha sido un aceite de oliva virgen extra que fue seleccionado durante el trabajo de fin de grado (Parras, 2016), y se ha comprobado que está libre de los compuestos objeto de estudio, coincidiendo con la bibliografía en que los aceites no refinados no contiene estos compuestos.

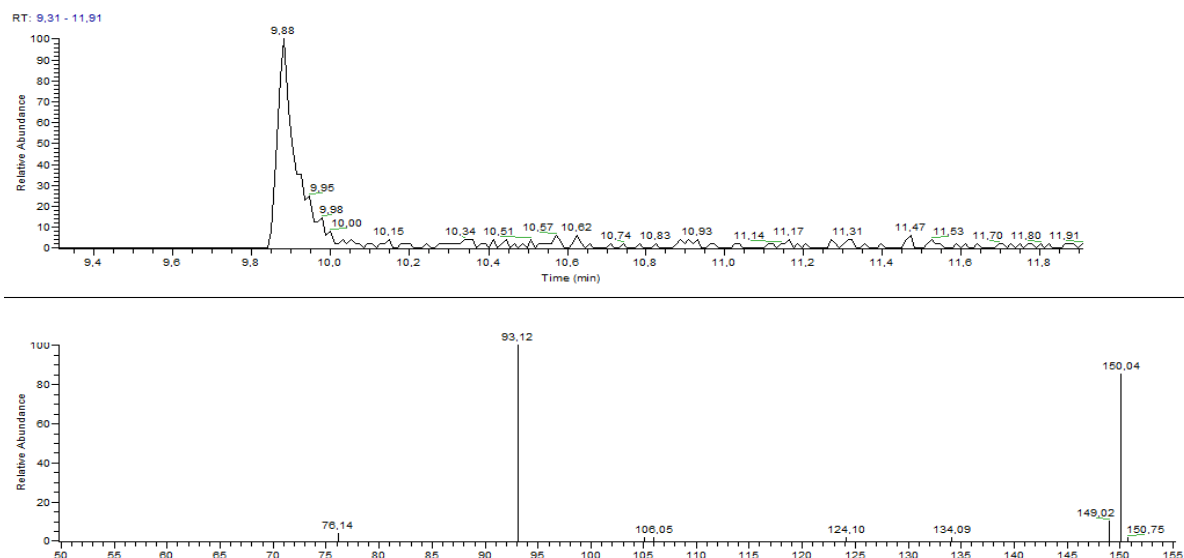


Figura 20: Cromatograma (superior) y espectro de masas (inferior) en modo MS/MS para el ión extraído m/z 150- $\rightarrow$ 93 (3-MCPD-d5fenilboronato). Blanco fortificado con 3-MCPD-d5 (50 ppm)

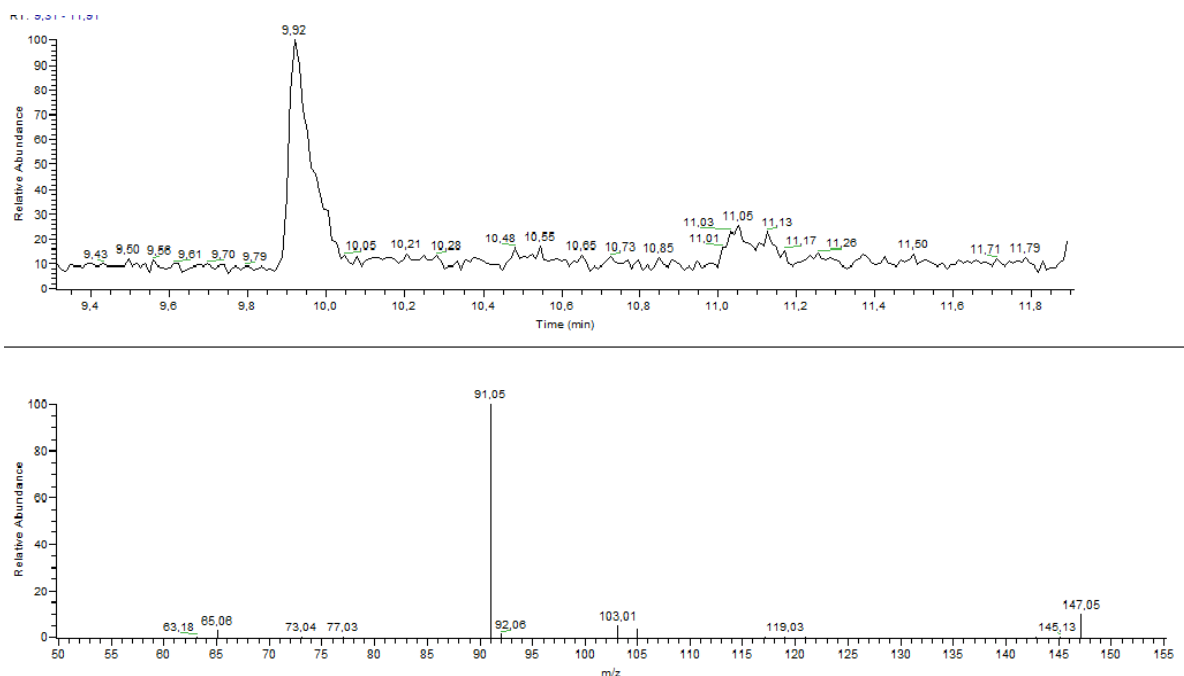


Figura 21: Cromatograma (superior) y espectro de masas (inferior) en modo MS/MS para el ión extraído m/z 147- $\rightarrow$ 91 (3-MCPDfenilboronato). Blanco fortificado con 3-MCPD-d5 (50 ppm)

5.1.2.1 Calibración

La calibración se tiene que hacer tanto para el ensayo A como para el ensayo B. En primer lugar se realizó para el ensayo A, para ello se prepararon ocho muestras (100 mg de aceite de oliva virgen extra) que se fortificaron con 250 μL de disolución de 3-MCPD-d5 diéster (patrón interno) de 5 ppm y con diferentes volúmenes (15-645 μL) de disolución de 3-MCPD diéster de 5 ppm (equivale a 0,94 ppm de 3-MCPD), realizando cada muestra por duplicado. La recta de calibrado obtenida se muestra en la Figura 22.

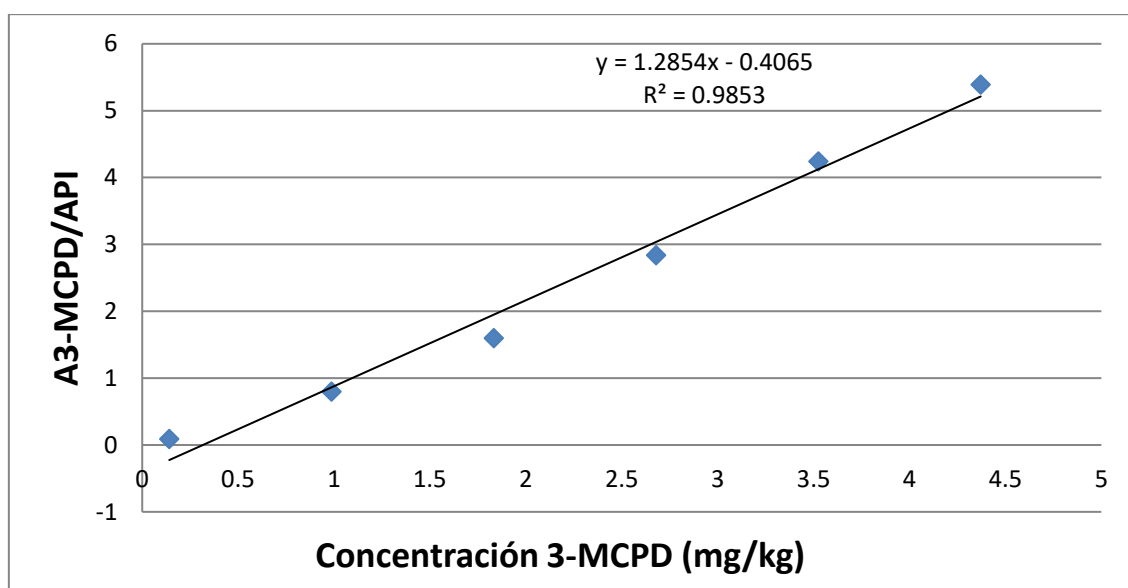


Figura 22: Recta de calibrado, ensayo A.

De las ocho muestras realizadas, dos de ellas se eliminaron de la recta de calibrado debido a que la linealidad se pierde en esas concentraciones. El rango lineal para este ensayo es de 0,100- 4,37 mg/kg de 3-MCPD.

Para el ensayo B, se prepararon ocho muestras (100 mg de aceite de oliva virgen extra) fortificadas con 250 μL de disolución de 3-MCPD-d5 diéster (patrón interno) de 5 ppm y con diferentes volúmenes (20-545 μL) de disolución de 3-MCPD diéster de 5 ppm, realizando cada muestra por duplicado. La recta de calibrado obtenida se muestra en la Figura 23. Ninguna de las ocho muestras ha tenido que ser eliminada. El rango lineal para este ensayo es de 0,099- 5,123, mg/kg de 3-MCPD.

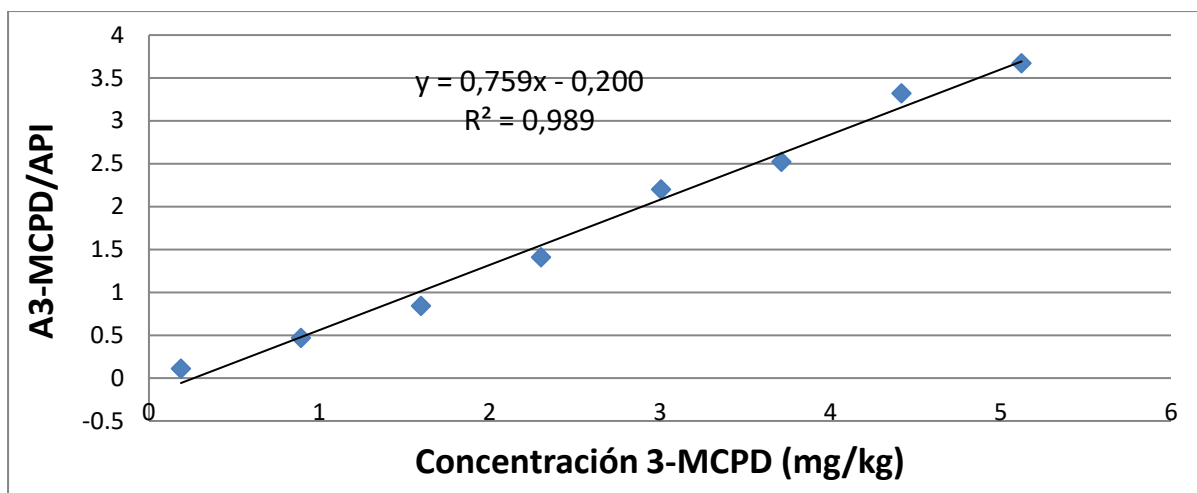


Figura 23: Recta de calibrado, ensayo B.

5.1.2.2 Cálculo del factor de estequiométrico para la conversión del glicidol en 3-MCPD.

Para poder cuantificar el glicidol, hay que calcular un factor estequiométrico, también llamado factor de conversión (t), que nos permita saber qué cantidad de 3-MCPD se obtiene a partir de una cantidad determinada de glicidol. Se han realizado ocho muestras por duplicado a través del ensayo A (en el que se cuantifica el glicidol). Éstas se prepararon fortificando 100 mg de aceite de oliva virgen extra con 250 μ L de disolución de 3-MCPD-d5 diéster (patrón interno) de 5 ppm y con diferentes volúmenes (10-580 μ L) de disolución de éster de glicidilo de 5 ppm.

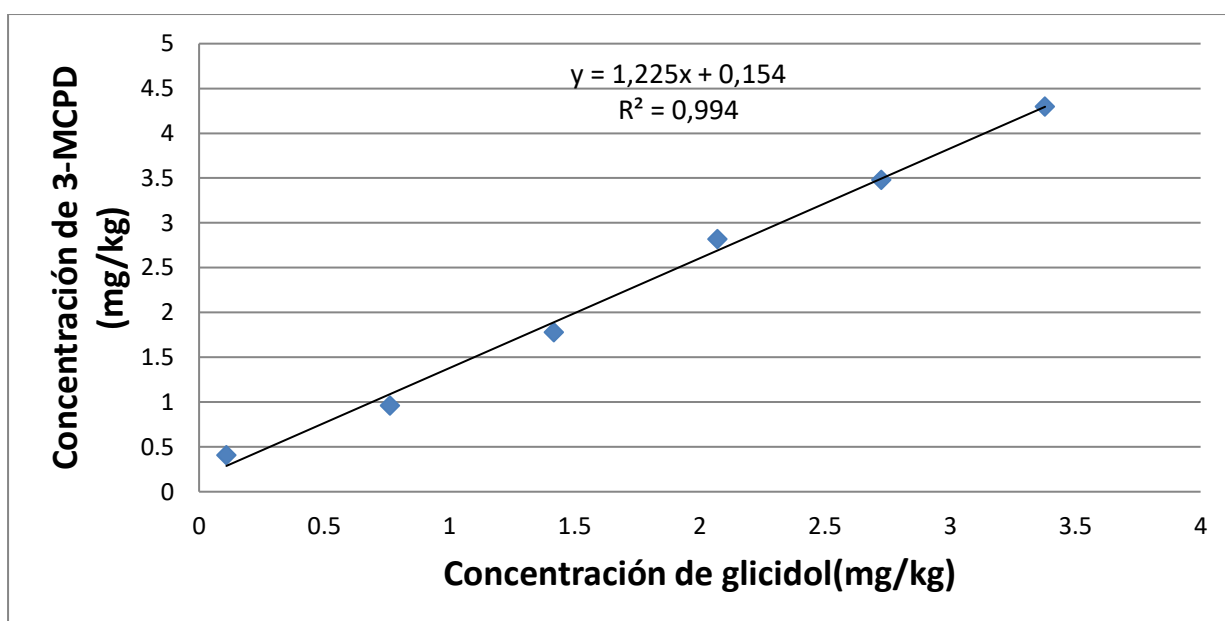


Figura 24: Recta de calibrado para el cálculo del factor de conversión del glicidol.

Para construir la recta de calibrado es necesario conocer la masa de 3-MCPD que se obtiene a partir de la masa de glicidol puesta y para ello se interpola en la recta de calibrado del ensayo A el ratio entre el área del 3-MCPD y el área del patrón interno (A3-MCPD/API). De los ocho puntos, dos de ellos se han eliminado debido a que se pierde la linealidad de la recta. La recta de calibrado obtenida se muestra en la Figura 24.

Una vez obtenida la recta de calibrado, el glicidol se puede calcular mediante la siguiente expresión:

$$\frac{mg}{kg} de glicidol = \left[\left(\frac{mg}{kg} MCPD_A \right) - \left(\frac{mg}{kg} MCPD_B \right) - 0,154 \right] * 0,816$$

La ecuación está compuesta por un primer término que es la concentración que contiene la muestra en el ensayo A, el segundo es la concentración de la muestra en el ensayo B y a esta diferencia se le resta la ordenada en el origen de la recta de calibrado (Figura 24). Por último se multiplica todo el término anterior por la inversa de la pendiente de la recta de calibrado.

5.1.2.3 Límite de cuantificación y de detección.

El LOQ corresponde a la concentración de 3-MCPD cuya señal/ruido es igual a 10, y el LOD es aquella concentración cuya señal/ruido es igual a 3. Para el cálculo de estos límites se han preparado diluciones de los puntos con menor concentración de la recta de calibrado, tanto para el ensayo A como para el B. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: LOD y LOQ del método

Ensayo A	LOD (mg/kg)	0,034
	LOQ (mg/kg)	0,100
Ensayo B	LOD (mg/kg)	0,030
	LOQ (mg/kg)	0,099

5.1.2.4 Precisión.

Se hizo una evaluación de la precisión del método para los ensayos A y B. Para ello se prepararon diez muestras (100 mg de aceite de oliva virgen extra) fortificadas con 250 µL de una disolución de 3-MCPD-d5 diéster de 5 ppm y con 250 µL de una disolución de 3-MCPD diéster de 5 ppm, para ambos ensayos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Los coeficientes de variación (CV) obtenidos para ambos ensayos, muestran que el método es reproducible, ya que son menores al 5%.

Tabla 9: Precisión del método

Punto	ENSAYO A		ENSAYO B	
	A3-MCPD/API	Concentración 3-MCPD (mg/Kg)	A3-MCPD/API	Concentración de 3-MCPD (mg/Kg)
1	1,65	1,60	0,96	1,52
2	1,61	1,57	1,01	1,59
3	1,63	1,58	0,96	1,53
4	1,63	1,59	1,02	1,61
5	1,65	1,60	0,98	1,55
6	1,64	1,59	0,98	1,56
7	1,55	1,52	0,96	1,53
8	1,62	1,57	0,98	1,56
9	1,65	1,60	0,98	1,55
10	1,66	1,61	0,99	1,57
CV (%)	1,6		1,7	

5.1.3 Aplicaciones analíticas

El método validado ha sido aplicado a diferentes tipos de aceites y productos derivados. En concreto se aplicó a dos tipos de margarina, varios tipos de aceites refinados y un aceite de oliva virgen.

En la Tabla 10 podemos ver los resultados obtenidos para las muestras analizadas. Cada muestra se analizó por el ensayo A y B tres veces, y el resultado expresado es la media de las tres repeticiones.

Como era de esperar, el aceite de palma es el que tiene mayor concentración de 3-MCPD y también una alta concentración de glicidol. El aceite de orujo de oliva también contiene concentraciones muy altas de ambos contaminantes.

El aceite de maíz, girasol y oliva contienen una menor cantidad de estos contaminantes pero no menos importante. En el caso del aceite de Oliva la primera muestra que se realizó se podían detectar los picos pero no cuantificarlos, en las otras dos se cuantificó solo el 3-MCPD obteniendo valores importantes de este contaminante. En el caso del aceite de girasol también se analizaron tres muestras en dos de ellas no se pudo cuantificar el glicidol aunque si se podía detectar, y el 3-MCPD se encuentra en concentraciones parecidas en las 3. Por último el aceite de maíz se analizó solo una muestra en la que se obtuvo valores parecidos a los dos anteriores para el 3-MCPD y se pudo cuantificar a su vez el glicidol.

En el aceite de soja los niveles encontrados están por debajo del LOQ. Por último se corrobora que el aceite de oliva virgen no tiene nada al igual que el aceite de oliva virgen extra (usado como blanco).

Tabla 10: Aplicaciones analíticas

TIPO DE ACEITE	3-MCPD (mg/kg)	GLICIDOL (mg/kg)
Aceite de Maíz	0,44	0,32
Aceite de Orujo de Oliva 1	1,51	0,24
Aceite de Orujo de Oliva 2	0,95	0,71
Aceite de Orujo de Oliva 3	1,44	0,36
Aceite de Girasol 1	0,43	<LQ
Aceite de Girasol 2	0,46	<LQ
Aceite de Girasol 3	0,58	0,20
Preparado para Frituras (compuesto de aceite de girasol alto oleico, y maíz)	0,46	< LQ
Aceite de Oliva 1	<LQ	<LQ
Aceite de Oliva 2	0,41	< LQ
Aceite de Oliva 3	0,64	< LQ
Aceite de Soja	< LQ	< LQ
Aceite de Palma	3,31	0,21
Aceite de Oliva Virgen	No se detecta	No se detecta
Margarina 1 (compuesta de aceite de girasol, linaza, soja y palma)	0,43	0,01
Margarina 2 (compuesta de aceite de maíz, coco y palma)	0,91	0,35
Aceite de Oliva Virgen Extra	No se detecta	No se detecta

En la Figura 25 se muestran los cromatogramas correspondientes al ión m/z 91 (3-MCPD fenilboronato), comparando el aceite de oliva virgen, que no contiene nada, el aceite de palma y el aceite de orujo de oliva.

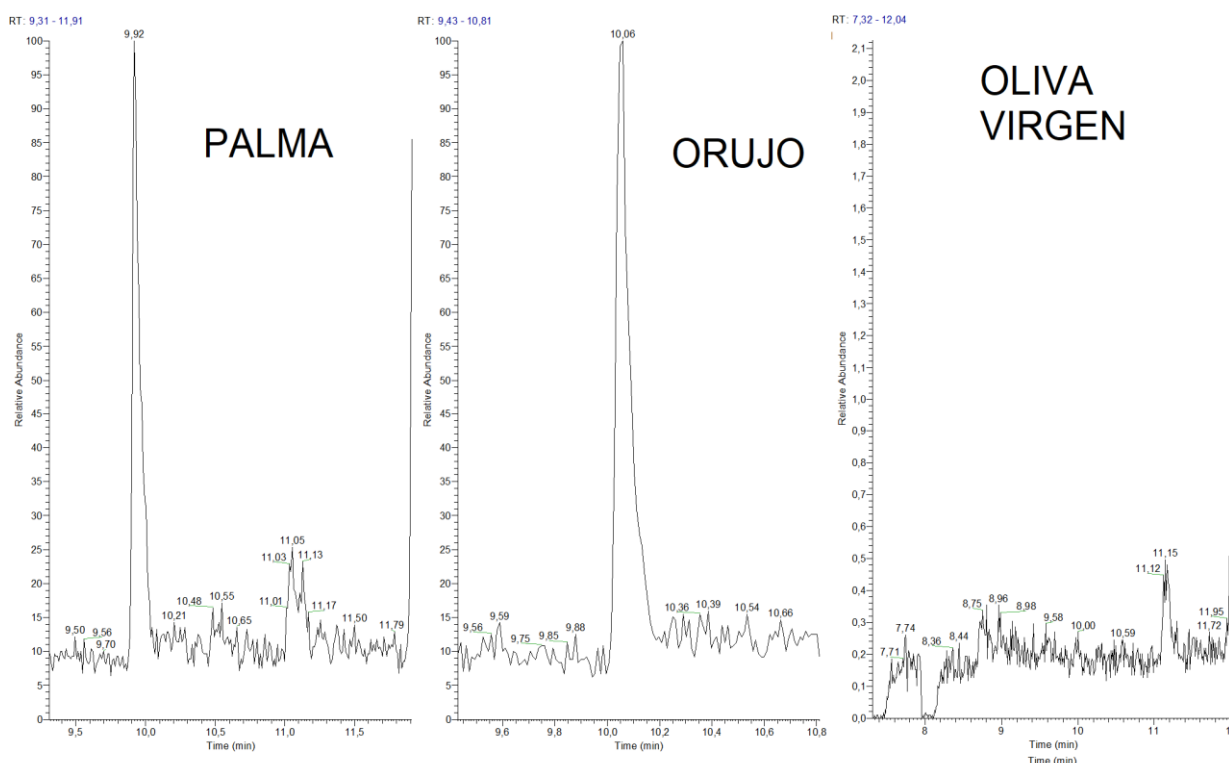


Figura 25: Comparación de los cromatogramas del aceite de palma, aceite de oliva virgen y aceite de orujo para el ión m/z 91

Las concentraciones en las margarinas varían bastante, dependiendo de la composición. En nuestro caso la que más concentración tiene de ambos contaminantes es la margarina 2 debido en gran parte a que contiene aceite de palma, en mayor concentración, y de coco.

5.2 DETERMINACIÓN DE 3-MCPD LIGADO EN FORMA DE ÉSTERES Y CONTENIDO TOTAL EN 3-MCPD, 2-MCPD Y GLICIDOL LIGADOS EN FORMA DE ÉSTERES EN PRODUCTOS DE PESCADO.

5.2.1 Principio del método

En este método se van a cuantificar los ésteres de 3-MCPD y el contenido total de los ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol (Karl et. al, 2016).

El método (Figura 27) se compone de dos ensayos. El primero que se lleva a cabo es el A, en el que se cuantifican los ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol sin diferenciar entre ellos.



Figura 26: Muestra antes (izquierda) y después de la homogenización (derecha)

El patrón interno (3-MCPD-d5 diéster), que se añade a la muestra homogeneizada (Figura 26) antes de empezar, tiene un comportamiento similar a los ésteres del analito objeto de estudio, lo que permite que el método sea reproducible. También se añade la mezcla MTBE/Ac. etilo, una disolución de NaCl al 20% (p/v) y se centrifuga para poder separar las fases y recoger la fase orgánica. En la fase acuosa, la cual se desecha, se elimina el 3-MCPD libre, debido a que en pescado la cantidad de estos compuestos es más significativa que en otras matrices. Posteriormente se realiza la transesterificación en el extracto de la fase orgánica, al igual que en el método anterior para aceites y grasas es un paso crítico y el tiempo tiene que estar estrictamente controlado. En este ensayo la reacción se detiene con una disolución de NaCl acidificada, para pasar el glicidol a 3-MCPD y poder cuantificarlo. Posteriormente se realiza el *clean-up* con hexano, eliminando los compuestos no polares de la matriz que no nos interesan

La fase acuosa se derivatiza con PBA, transformando los compuestos en volátiles para que sea posible su cuantificación en la instrumentación usada. Hecho esto se calienta a 90°C, se deja enfriar y se adiciona hexano para extraer los compuestos derivatizados y llevarlos a la fase orgánica. Por último esta fase orgánica es la que se evapora, redisuelve en iso-octano y se encapsula.

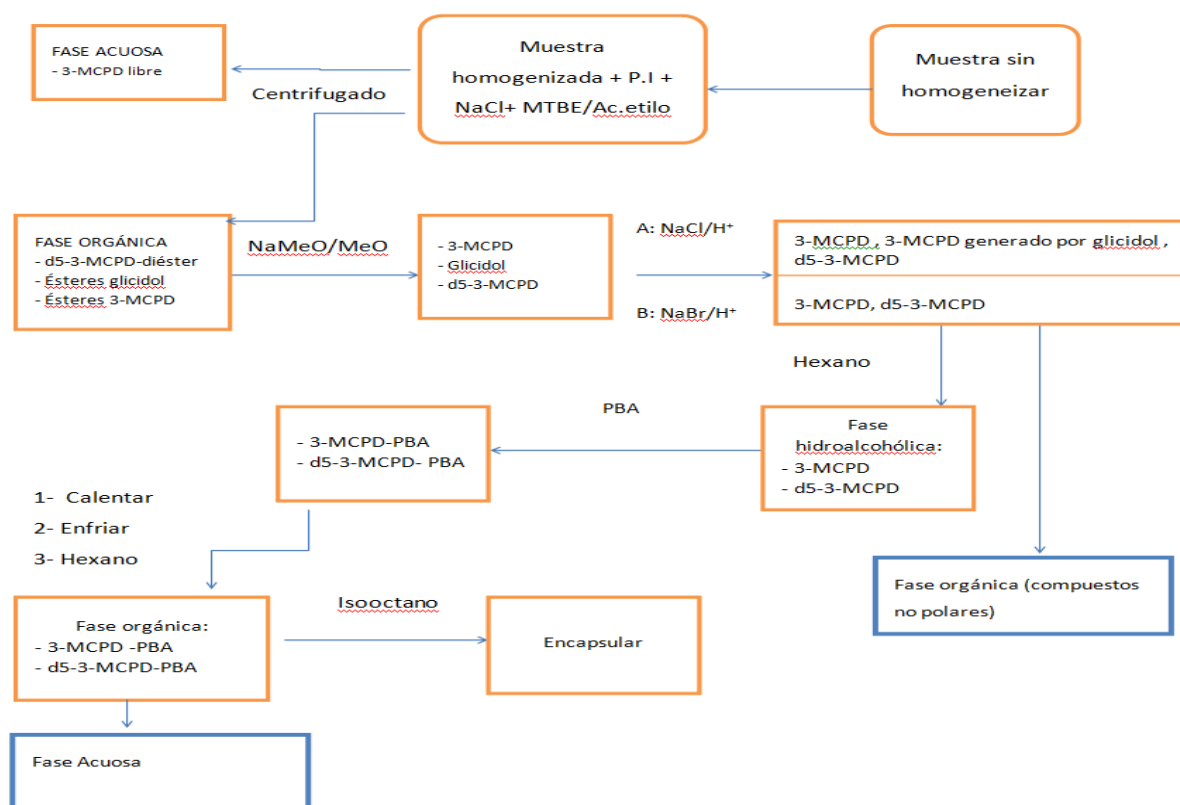


Figura 27: Esquema general del método analítico (ensayos A y B)(PI: patrón interno)

En el ensayo B, se va a cuantificar solo los ésteres del 3-MCPD. Para ello se sustituye la disolución de NaCl por una sal no clorada, en este caso NaBr, que hace que el glicidol se transforme en un producto diferente al 3-MCPD que no se cuantifica.

5.2.2 Parámetros analíticos

Al igual que en el método anterior, se ha trabajado en modo MS/MS, debido a que la sensibilidad es mayor y el ruido de fondo menor.

También se usa los mismos iones para el 3-MCPD fenilboronato (m/z 91) y para el 3-MCPD-d5 fenilboronato (m/z 93). El blanco que se ha usado para los posteriores ensayos ha sido la especie bacaladilla (*Micromesistius poutassou*).

Aunque en la bibliografía consultada (Karl et al., 2016) el pescado crudo no contiene estos contaminantes, antes de usar la bacaladilla como blanco se analizó para comprobar que no contenía ninguno de estos contaminantes, como se muestra en la Figura 28, el cromatograma para el ión m/z 91 sale limpio, por lo que se puede usar como blanco.

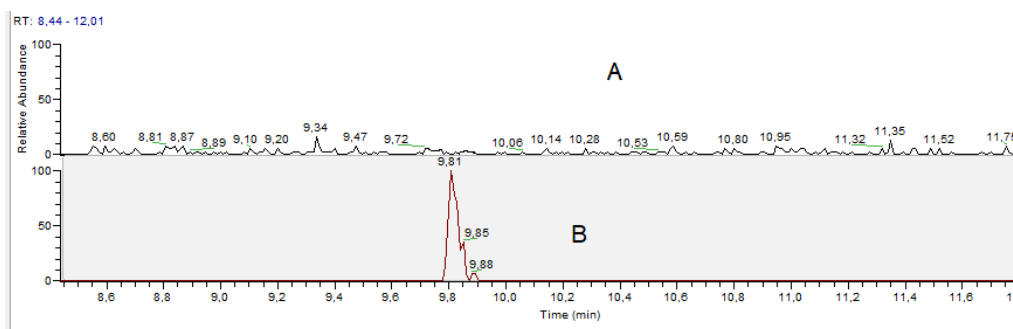


Figura 28: Cromatogramas GC-MS/MS obtenidos de la bacaladilla, en modo MS/MS: A) Ión extraído m/z 147-> 91 y B) ión extraído m/z 150->93.

5.2.2.1 Calibración

La calibración, al igual que para aceites, se tiene hace el ensayo A y para el ensayo B. Para el ensayo A y B, se prepararon siete muestras (10 g de bacaladilla) que se fortificaron con 400 μL de disolución de 3-MCPD-d5 diéster (patrón interno) de 5 ppm y con diferentes volúmenes (5-6400 μL) de disolución de 3-MCPD diéster de 5 ppm (equivale a 0,94 ppm de 3-MCPD), realizando cada muestra por duplicado.

La recta de calibrado obtenida para el ensayo A se muestra en la Figura 29 y el rango lineal para este ensayo es de 0,5-600 $\mu\text{g/Kg}$ de 3-MCPD.

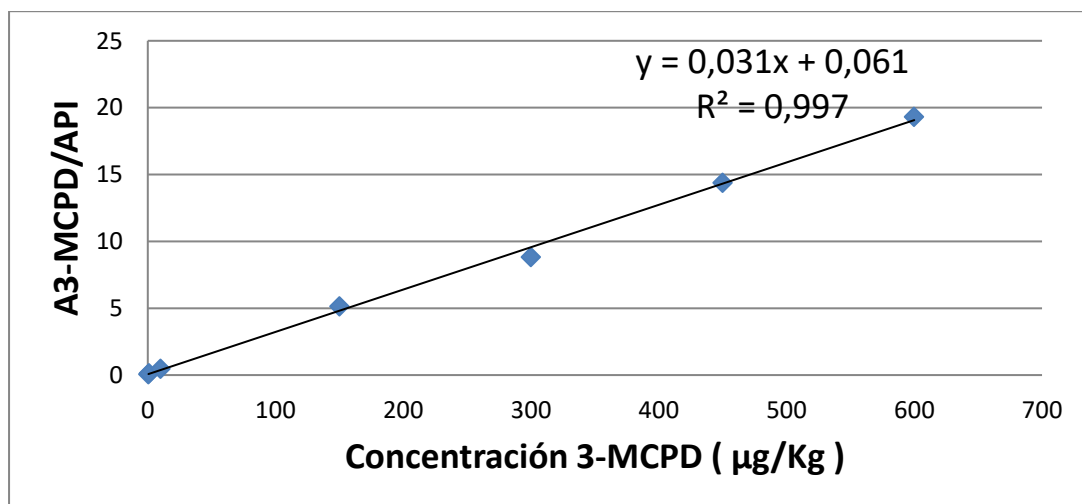


Figura 29: Recta de calibrado, ensayo A.

La recta de calibrado obtenida para el ensayo B se muestra en la Figura 30 y el rango lineal para este ensayo es de 0,5-600µg/Kg de 3-MCPD.

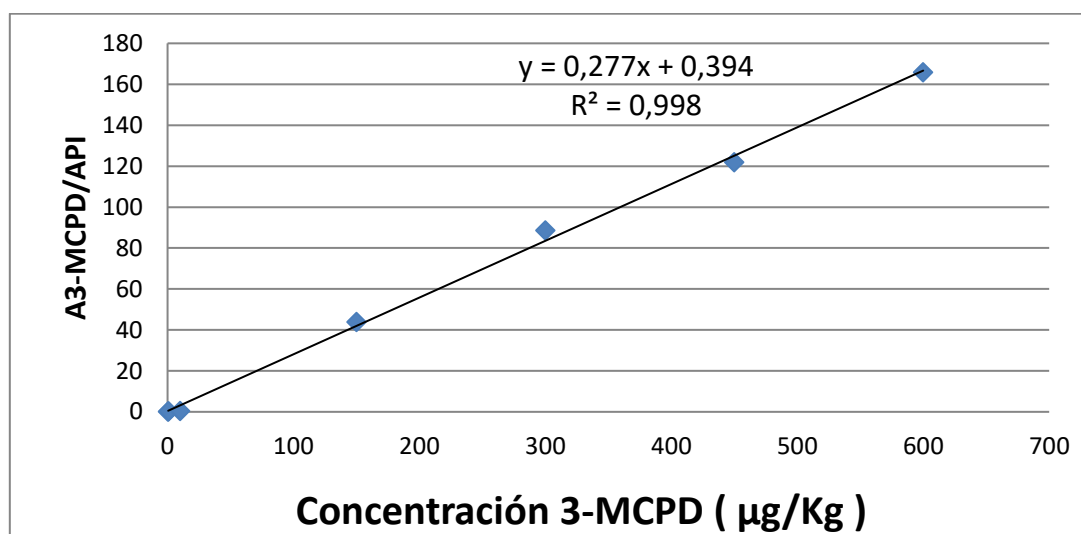


Figura 30: Recta de calibrado, ensayo B.

5.2.2.2 Límite de cuantificación y de detección

Al igual que en el método anterior, el LOQ corresponde con la concentración de 3-MCPD cuya señal/ruido es igual a 10, y el LOD es aquella concentración cuya señal/ruido es igual a 3.

Para poder obtener estos resultados se han realizado diluciones de los puntos con menor concentración de la recta de calibrado, esto se ha realizado tanto para el ensayo A como para el B. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: LOD y LOQ del método

Ensayo A	LOD (µg/Kg)	0,45
	LOQ (µg/Kg)	0,50
Ensayo B	LOD (µg/Kg)	0,43
	LOQ (µg/Kg)	0,50

5.2.2.3 Precisión

Se hizo una evaluación de la precisión del método para los ensayos A y B. Para ello se prepararon seis muestras (10 g de bacaladilla) fortificadas con 400 µL de una disolución de 3-MCPD-d5 diéster de 5 ppm y con 110 µL de una disolución de 3-MCPD diéster de 5 ppm, para ambos ensayos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Los CV obtenidos para ambos ensayos, muestran que el método es reproducible, ya que son menores al 5%.

Tabla 12: Precisión del método

Punto	ENSAYO A		ENSAYO B	
	A3-MCPD/API	Concentración 3-MCPD (µg/Kg)	A3-MCPD/API	Concentración 3-MCPD (µg/Kg)
1	0,35	9,46	2,85	8,88
2	0,37	9,96	2,80	8,68
3	0,35	9,43	2,78	8,60
4	0,36	9,69	2,83	8,79
5	0,37	9,89	2,61	7,99
6	0,35	9,25	2,81	8,72
CV (%)	2,9		3,7	

5.2.3 Aplicaciones Analíticas

El método validado ha sido aplicado a diferentes tipos de pescado. En concreto se aplicó a otra bacaladilla y una merluza rebozada.

En la Tabla 13 podemos ver los resultados obtenidos para las muestras analizadas, cada muestra se analizó para el ensayo A y B tres veces, y el resultado expresado es la media de las dos repeticiones.

Tabla 13: Aplicaciones analíticas

TIPO DE ACEITE	Contenido Total (µg/Kg)	3-MCPD éster (µg/Kg)
Bacaladilla	No se detecta	No se detecta
Merluza rebozada (Contiene aceite de palma)	115,19	11,51

Como era de esperar, la merluza contiene una cantidad considerable en 3-MCPD por dos causas, en primer lugar porque contiene aceite de palma y en segundo lugar debido al proceso de producción de un producto rebozado.

A su vez se ha analizado una segunda bacaladilla, que no se ha usado de blanco. Se confirma que las bacaladillas, pescado crudo sin procesar en general, no contienen 3-MCPD. En la Figura 31 se muestran los cromatogramas correspondientes al ión m/z 91 (3-MCPD fenilboronato), comparando la bacaladilla, que no contiene nada, y la merluza rebozada. En la que se puede apreciar lo comentado en este párrafo.

En el pescado en general varía la concentración en función del proceso de producción y los ingredientes usados.

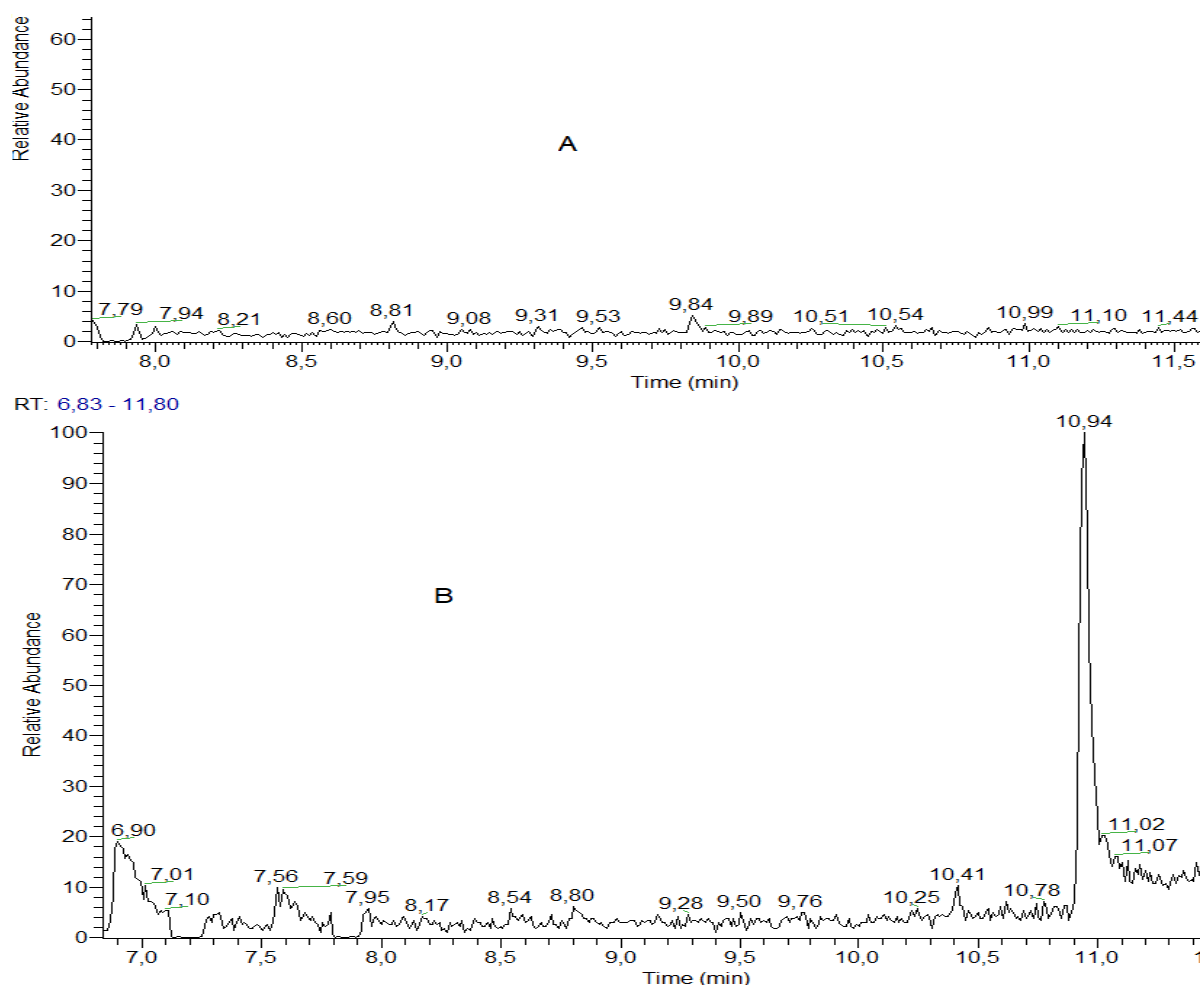


Figura 31: Cromatogramas GC-MS/MS en modo MS/MS Ión extraído m/z 147- $\rightarrow$ 91:
A) Bacaladilla; B) Merluza rebozada.

5.3 DETERMINACIÓN DE 3-MCPD LIBRE EN PRODUCTOS DE PESCADO

5.3.1 Principio del método

Este método (Figura 32) solo cuantifica el 3-MCPD libre que hay en la muestra. Se compone de un solo ensayo, en este se usa el patrón interno 3-MCPD-d5, que a diferencia de los anteriores patrones usados es libre y no diéster (Karl et.al, 2016). Este permite que el método sea reproducible, debido a que sus características hacen que tenga un comportamiento similar al que tiene el analito objeto de estudio.

La muestra homogeneizada y con el patrón se disuelve en NaCl y se calienta a 90°C, produciéndose la desnaturalización de las proteínas que contenga la matriz (Figura 33). Una vez que se ha dejado enfriar, se centrifuga y se filtra, quedando en el filtro los restos de la matriz y pasando al tubo falcon la fase acuosa sin ninguna impureza. Este extracto se le realiza un *clean-up* con hexano, eliminando de esta manera los compuestos no polares que contiene la matriz.

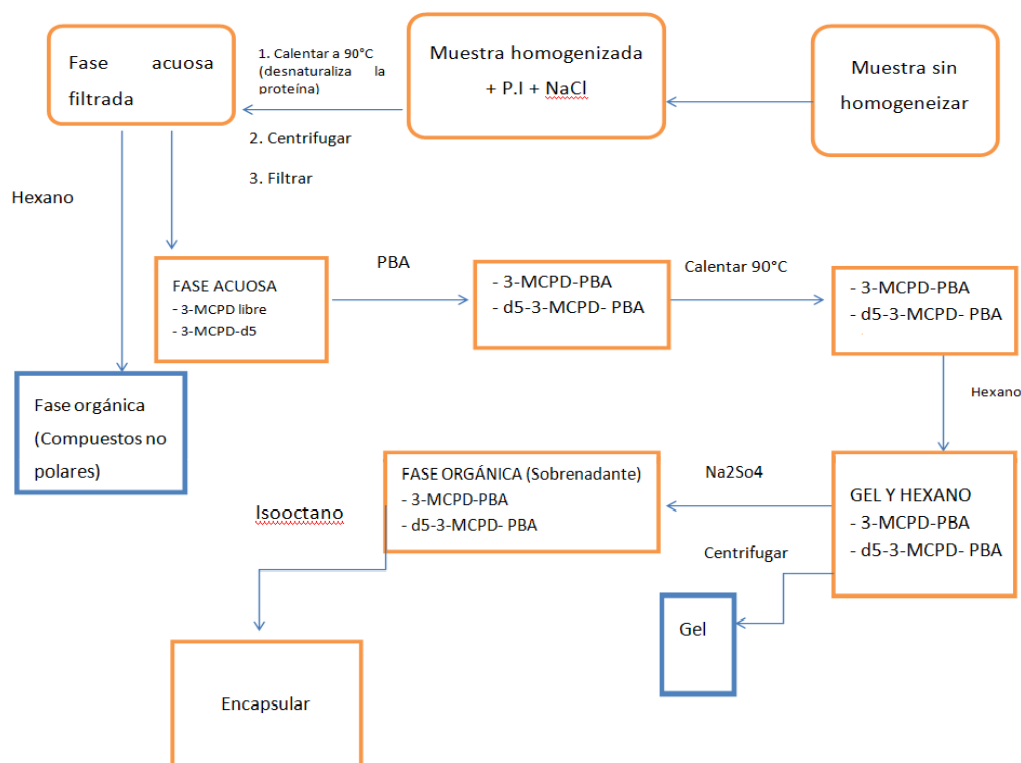


Figura 32: Esquema general del método analítico (PI: patrón interno)

Posteriormente se realiza en la fase acuosa la derivatización con PBA, transformando los analitos en compuestos volátiles para poder cuantificarlos a través de GC/MS.

Una vez derivatizada la fase acuosa se vuelve a calentar a 90°C y posteriormente se añade hexano para extraer el 3-MCPD-PBA y 3-MCPD-d5-PBA, en este caso a diferencia del método anterior para pescado, se forman unos geles los cuales se tratan añadiendo sulfato sódico y centrifugando en la microcentrifuga. Una vez hecho esto se recoge la fase orgánica y se evapora, para redissolver posteriormente con iso-octano e inyectar la muestra en el instrumento.



Figura 33: Proceso de desnaturalización de la proteína

5.3.2 Parámetros analíticos

Al igual que en los métodos anteriores, se ha trabajado en modo MS/MS, debido a que la sensibilidad es mayor y el ruido de fondo menor.

También se usa los mismos iones para el 3-MCPD fenilboronato (m/z 91) y para el 3-MCPD-d5 fenilboronato (m/z 93). El blanco que se ha usado para los posteriores ensayos ha sido el mismo, la bacaladilla. Aunque ya se hizo una prueba en el método anterior, también se comprobó que la bacaladilla está libre de 3-MCPD libre.

5.3.2.1 Calibración

Para llevar a cabo la calibración se usaron seis muestras (10 g de bacaladilla), fortificadas con 200 μ L de una disolución de 3-MCPD-d5 (patrón interno) de 5 ppm y con diferentes volúmenes (1-300 μ L) de una disolución de 3-MCPD de 5 ppm. Cada una de las muestras se realizó por duplicado.

La recta de calibrado obtenida se muestra en la Figura 34 y el rango lineal para este ensayo es de 0,5-150 μ g/Kg de 3-MCPD.

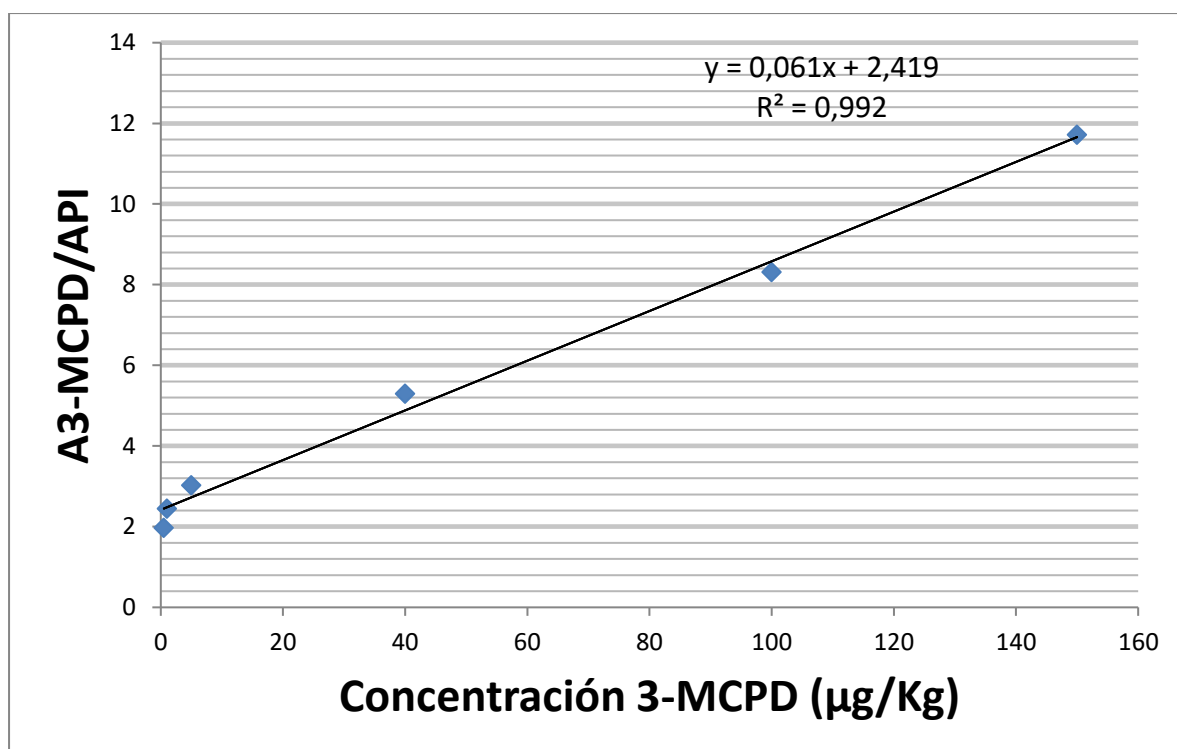


Figura 34: Recta de calibrado.

5.3.2.2 Límite de cuantificación y de detección

El LOQ corresponde con la concentración de 3-MCPD cuya señal/ruido es igual a 10, y el LOD es aquella concentración cuya señal/ruido es igual a 3.

Para poder obtener estos resultados se han realizado diluciones de los puntos con menor concentración de la recta de calibrado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: LOD y LOQ del método

LOD (µg/Kg)	0,37
LOQ (µg/Kg)	0,50

5.3.2.3 Precisión

Se hizo una evaluación de la precisión del método. Para ello se prepararon cinco muestras (10 g de bacaladilla) fortificadas con 200 µL de una disolución de 3-MCPD-d5 de 5 ppm y con 80 µL de una disolución de 3-MCPD de 5 ppm. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15.

El CV obtenido muestra que el método es reproducible, ya que es menor al 5%.

Tabla 15: Precisión del método

Punto	A3-MCPD/API	Concentración 3-MCPD (µg/Kg)
1	2,48	1,064
2	2,48	1,046
3	2,48	1,026
4	2,49	1,156
5	2,49	1,099
CV (%)	4,7	

5.3.3 Aplicaciones Analíticas

El método validado ha sido aplicado a diferentes tipos de pescado. En concreto se aplicó a otra bacaladilla, una merluza rebozada y palometa ahumada conservada en aceite de girasol.

En la Tabla 16 podemos ver los resultados obtenidos para las muestras analizadas, el resultado expresado es la media de las dos repeticiones que se han realizado para cada muestra.

Tabla 16: Aplicaciones analíticas

TIPO DE ACEITE	3-MCPD libre (µg/Kg)
Bacaladilla	No se detecta
Merluza rebozada (Contiene aceite de palma)	1,16
Palometa ahumada conservada en aceite de girasol	27,72

La palometa ahumada es la que contiene más 3-MCPD libre, debido a que el proceso del ahumado contribuye al aumento considerable de su concentración, la merluza rebozada contiene una cantidad considerable aunque mucho más baja que la palometa. A su vez se ha analizado una segunda bacaladilla, que no se ha usado de blanco, y no contiene 3-MCPD Libre.

En la Figura 35 se muestran los cromatogramas correspondientes al ión m/z 91 (3-MCPD fenilboronato) de la merluza rebozada y la palometa ahumada.

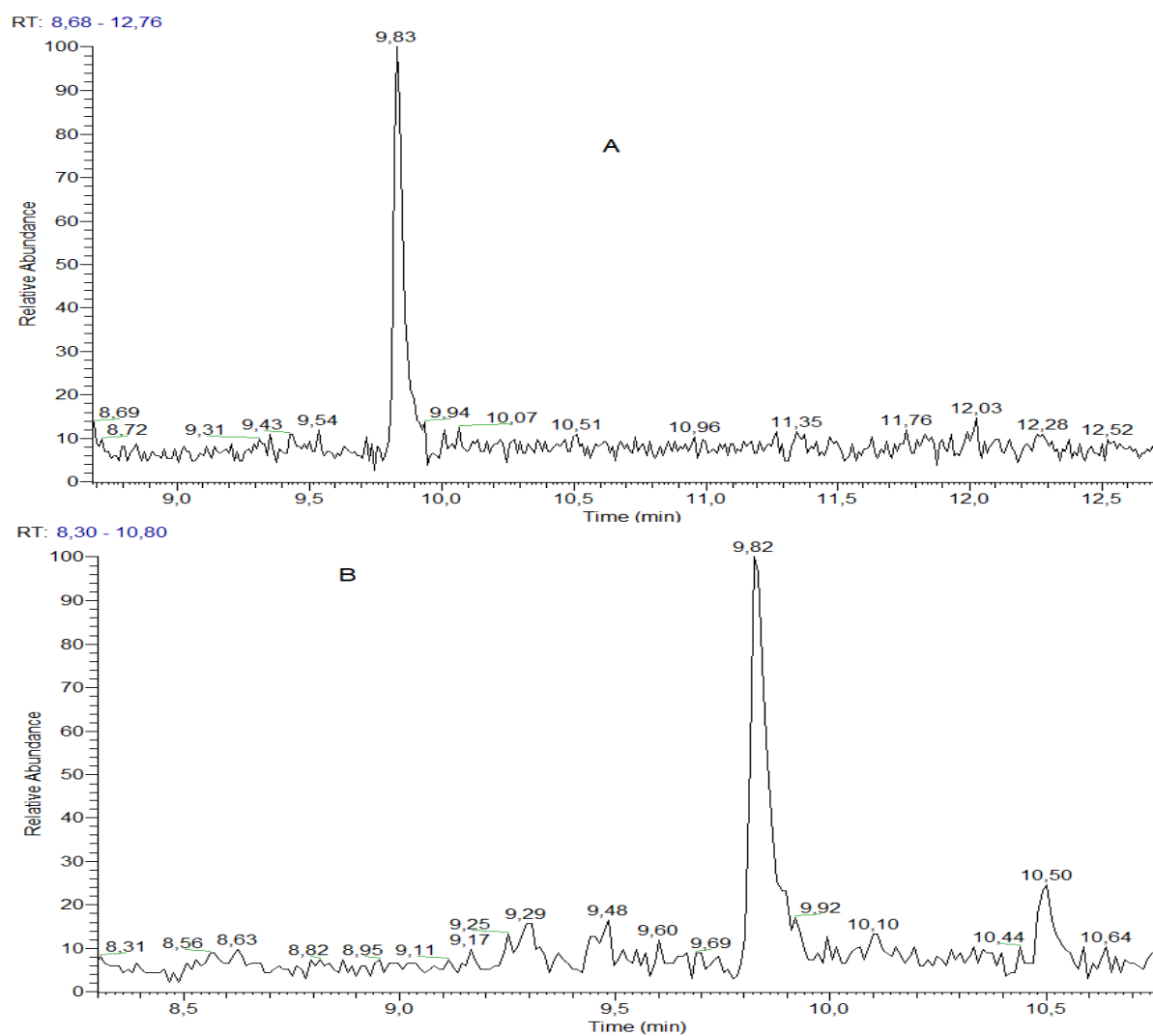


Figura 35: Cromatogramas GC-MS/MS en modo MS/MS Ión extraído m/z 147- $\rightarrow$ 91:
 A) Merluza rebozada; B) Palometa ahumada.

6. CONCLUSIONES

- Se ha aplicado un método analítico, previamente desarrollado y validado y basado en Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas en Tándem, a la determinación de ésteres de 3-MCPD y ésteres de glicidol en diferentes tipos de aceites vegetales, vírgenes y refinados, y en productos derivados (aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva, aceite de orujo de oliva, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de soja, margarina y preparado para fritura). De los resultados obtenidos se deduce que la presencia de 3-MCPD y glicidol se debe a su procesamiento (refinación).
- Se han demostrado las ventajas que tiene el consumo de Aceite de Oliva Virgen y Virgen Extra frente al de otros aceites, incluyendo el aceite de oliva y el aceite de orujo de oliva, en cuanto a la ausencia de 3-MCPD y glicidol, ya que de los aceites analizados eran los únicos que no los contenían.
- Se ha validado un método analítico sensible y selectivo, basado en Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas en Tándem, para la determinación del contenido en: (A) ésteres de 3-MCPD y, (B) ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol, en productos derivados del pescado conteniendo entre sus ingredientes aceites refinados.
- Se ha validado un método analítico sensible y selectivo, basado en Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas en Tándem, para la determinación del 3-MCPD libre en productos derivados del pescado.
- Se ha demostrado la aplicabilidad de los tres métodos mediante el análisis de muestras reales de aceites vegetales y productos derivados y diferentes productos derivados del pescado. Las concentraciones de 3-MCPD y glicidol encontradas en los alimentos mencionados son del mismo orden que las informadas por la *European Food Safety Authority*.
- Se ha demostrado que el pescado sin procesar no contiene 3-MCPD ni glicidol, no suponiendo su ingesta un perjuicio para la salud en este aspecto. Sin embargo sí ha encontrado 3-MCPD libre en pescado ahumado, a pesar de no contener aceites refinados entre sus ingredientes, lo que parece indicar que su presencia es debida al propio proceso de ahumado.

Esto nos hace pensar que es posible que en el caso de los aceites de orujo de oliva la presencia de 3-MCPD ésteres se deba tanto a la etapa de desodorización como al secado del orujo

- Se ha contribuido a la Recomendación realizada por la Unión Europea sobre la necesidad de evaluar los niveles de 3-MCPD y glicidol en productos alimenticios, especialmente aceites y grasas y derivados, a fin de conocer los niveles de exposición de la población a estos compuestos a través de la dieta.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición) 3-MCPD, glicidol y sus ésteres (10/05/17). Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/3_MCPD_ficha_tecnica_definitivo.pdf.
- [2] AOCS (American Oil Chemists' Society). AOCS Official Method Cd 29a-13.2- and 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils and fats by acid transesterification.2013a. Disponible en:<http://www.aocs.org/>.
- [3] AOCS (American Oil Chemists' Society). AOCS Official Method Cd 29b-13.Determination of bound monochloropropanediol- (MCPD-) and bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol-) by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). 2013b. Disponible en:<http://www.aocs.org/>.
- [4] AOCS (American Oil Chemists' Society). AOCS Official Method Cd 29c-13.Fatty-acid-bound 3-chloropropane-1, 2, diol (3-MCPD) and 2,3-epoxy-propane-1-ol (glycidol), Determination in oils and fats by GC/MS (Differential Measurement).2013c. Disponible en:<http://www.aocs.org/>.
- [5] BMEL (*Bundes ministerium für Ernährung und Landwirtschaft*).Leitsätze für Fische, Krebs und Weichtiere und Erzeugnisse Daraus. Disponible en: <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Lebensmittelbuch/LeitsaetzeFische.html>.
- [6] Boden L., Lundgren M., Stensio K.E., Gorzynski M. Determination of 1,3-dichloro-2-propanol and 3-chloro-1,2-propanediol in papers treated with polyamidoamine-epichlorohydrin wet-strength resins by gas chromatography-mass spectrometry using selective ion monitoring. Journal of Chromatography A, 1997, 788, 195-203.
- [7] Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Occupational Health Guide line for Glycidol, 1978. Disponible en: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/81-123/pdfs/0303.pdf>.
- [8] Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Glycidol. Disponible en:<https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0159.html>.
- [9] Craft B.D., Nagy, K., Seefelder, W., Dubois, M., Destailats, F. Glycidyl esters in refined palm (*Elaeisguineensis*) oil and related fractions. Part II: practical recommendations for effective mitigation. Food Chemistry, 2012, 132, 73-79

- [10] CSIC (Centro Superior de Investigaciones Científicas). Disponible en:
http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf.
- [11] Destailats, F., Craft, B.D., Dubois, M., Nagy, K. Glycidyl esters in refined palm (*Elaeisguineensis*) oil and related fractions. Part I: formation mechanism. Food Chemistry, 2012, 131, 1391-1398.
- [12] DGF (Deutsche Gesellschaft Für Fettwissenschaft). DGF Standard Method C-III 18 (09) A & B: ester-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD esters) and glycidol (glycidylesters). Determination in fats and oils by GC-MS. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, Germany, 2009.
- [13] DGF (Deutsche Gesellschaft Für Fettwissenschaft). DGF Standard Method C-VI-18(10)A & B: ester-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD esters) and glycidol (glycidylesters). Determination in Fats and Oils by GC-MS. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, Germany, 2011.
- [14] EFSA (European Food Safety Authority). Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment. EFSA Journal, 2013, 11, 3381.
- [15] EFSA (European Food Safety Authority). Risks for human health related to the presence of 3- and 2- monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. EFSA Journal, 2016, 14, 4426.
- [16] Ermacora A., Hrnčířík K. Evaluation of an improved indirect method for the analysis of 3-MCPD esters based on acid transesterification. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012, 89, 211-217.
- [17] Ermacora A., Hrnčířík K. *Indirect detection techniques for MCPD esters and glycidyl esters*. Processing contaminants in edible oils MCPD and Glycidylesters. MCPD and Glycidyl Esters. S. Macmahon, Ed. AOCS Press, Illinois, USA, 2014. ISBN: 978-0-9888565-0-9.

- [18] FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos, 1^a Reunión. Documento de debate sobre cloropropanoles obtenidas por fabricación de proteínas vegetales hidrolizadas mediante ácido y procesado térmico de los alimentos, Beijing (China), 2007. Disponible en ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCCF/cccf1/cf01_13s.pdf.
- [19] FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos, 2^a Reunión. Programa conjunto FAO/OMS sobre las normas alimentarias, La Haya (Países Bajos), 2008. Disponible en ftp://ftp.fao.org/codex/Reports/Alinorm08/al31_41s.pdf.
- [20] Gutiérrez M.C, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. Boletín Intexterdel Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial, 2002, 122, 37-41. Disponible en: <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [21] Haile B., Satheesh N. Review on 3-MCPD: A chloropropanol formed during food processing. Der Pharma Chemical, 2017, 9, 84-90.
- [22] Hamlet C.G, Sadd PA, Crews C., Velísek J. and Baxter D.E. Occurrence of 3-chloro-propane-1,2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review. Food Additives and Contaminants, 2002, 19, 619-631.
- [23] Hamlet C.G., Sadd P.A. Kinetics of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) degradation in high temperature model systems. European Food Research and Technology, 2002, 215, 46-50.
- [24] Hamlet C.G..*Chloropropanols and Their Esters*. Bioactive Compounds in Foods.J. Gilbert and H. Senyuva, Eds. Wiley-Blackwell, Singapore, 2008.ISBN: 978-1-4051-5875-6.
- [25] Hrnčířík K., Zelinkova Z., Ermacora A.Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1,2-diol esters. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011, 113, 361-367.
- [26] IARC (International Agency for Research on Cancer), 2000. Glycidol. In *Some Industrial Chemicals*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2000, 77, 469-486.

- [27] IARC (International Agency for Research on Cancer). 3-Monochloro-1, 2-propanediol. In *Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012, 101, 349-374.
- [28] INSHT (Instituto Nacional para la Seguridad y Salud en el Trabajo). Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España, 2017. Disponible en:
http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/LEP%20_VALORES%20LIMITE/Valores%20limite/LEP%202017.pdf
- [29] ILSI (International Life Science Institute). 3-MCPD esters in food products. Summary Report of an ILSI Europe workshop held in February 2009. Disponible en:
<http://www.ilsi.org/europe/publications/final%20version%203%20mcpd%20esters.pdf>.
- [30] ILSI (International Life Sciences Institute). MCPD and glycidyl esters in food products. ILSI Europe Report Series 2011, 1-24. Disponible en:
<http://www.ilsi.org/Europe/Documents/MCPD%20Report%202012.pdf>.
- [31] ISO/DIS 18363-1, Animal and vegetables fats and oils – Determination of fatty-acid bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxi-propane-1-ol (glycidol)-Differential method using GC/MS, 2014.
- [32] Jedrkiewicz R., Glowacz A., Gromadzka J., Namiesnik J. Determination of 3-MCPD and 2-MCPD esters in edible oils, fish oils and lipid fractions of margarines available on Polish market. *Food Control*, 2016, 59, 487-492.
- [33] Jedrkiewicz R., Glowacz-Różyńska A., Gromadzka J., Konieczka P., Namiesnik J. Novel fast analytical method for indirect determination of MCPD fatty acid esters in edible oils and fats based on simultaneous extraction and derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409, 4267-4278.
- [34] Jira W. 3-Monochloropropan-1,2-diol in geräucherten Fleischerzeugnissen. *Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach*, 2010, 49, 89-96.
- [35] Karl H., Kuhlmann J., Merkle S., Fritsche J. Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2016, 118, 406-417.

- [36] Kaze N., Sato H., Yamamoto H., Watanabe Y. Bidirectional conversion between 3-Monochloro-1,2-propanediol and glycidol in course of the procedure of DGF standard methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, 88, 1143-1151.
- [37] Kissa E. Determination of 3-Chloropropanediol and related dioxolanes by gas-chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1992, 605, 134-138.
- [38] Koyama K., Miyazaki K., Abe K., Egawa Y., Kido H., Kitta T., Miyashita T., Nezu T., Nohara H., Sano T., Takahashi Y., Taniguchi H., Yada H., Yamazaki K., Watanabe Y. Collaborative study of an indirect enzymatic method for the simultaneous analysis of 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters in edible oil. *Journal of Oleo Science*, 2016, 65, 537-568.
- [39] Kuhlmann J. Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011a, 113, 335-344.
- [40] Kuhlmann J. Indirect determination of bound glycidol & MCPD in refined oils. *Proceedings of the 102nd AOCS Annual Meeting & Expo*, Cincinnati, Ohio, USA, 2011b.
- [41] Kuhlmann J. Analysis & occurrence of bound glycidol and MCPD in oil containing foods. *Proceedings of the 103rd AOCS Annual Meeting & Expo*, Long Beach, California, USA, 2012.
- [42] Kuhlmann J. Status and recommendations on analysis of free and ester-bound 2- & 3-MCPD and glycidol. *Proceedings of the AOCS Annual Meeting & Industry Show cases*, Orlando, Florida, USA, 2017.
- [43] Küsters M., Bimber U., Reeser S., Gallizzendöfer R., Gerhartz M. Simultaneous determination and differentiation of glycidyl esters and 3-Monochloropropane-1,2-diol esters in different foodstuffs by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 6263-6270.
- [44] Miyazaki K., Koyama K., Sasako H., Hirao T. Indirect method for simultaneous determinations of 3-Chloro-1,2-Propanediol fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2012, 89, 1403-1407.
- [45] Parras J. Trabajo Fin de Grado: Determinación de los niveles de contaminantes emergentes en aceites vegetales. TAUJA. 2016. Disponible en: <http://tauja.ujaen.es/handle/10953.1/2927>.

- [46] Robjohns. S., Marshall R., Fellows M., Kowalczyk G. In vivo genotoxicity studies with 3-monochloropropan – 1,2 – diol. *Mutagenesis*, 2003, 18, 401-404.
- [47] Rouessac F., Rouessac A. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, 2nd Ed. Wiley, Great Britain, 2007. ISBN: 978-0-470-85903-2.
- [48] Sparkman O.D., Penton Z.E., Kitson F.G. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, 2nd Ed. Academic Press, 2011. ISBN: 9780123736284.
- [49] Svejtkovská B., Novotný O., Divinová V., Réblová Z., Dolezal M., Velisek J. Esters of Chloropropane-1,2-diol in Foodstuffs. *Czech Journal of Food Sciences*, 2004, 22, 190-196.
- [50] UE (Unión Europea). Reglamento (UE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la UE*, 2006, L364/5.
- [51] UE (Unión Europea). Reglamento (UE) N° 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Diario Oficial de la UE*, 2011, L-2011-82592.
- [52] UE (Unión Europea). Recomendación de la Comisión de 10 de septiembre de 2014 sobre el control de la presencia de 2- y 3-monocloropropano.1, 2-diol (2- y 3-MCPD), de ésteres de ácidos grasos de 2-y 3-MCPD y de ésteres glicidílicos de ácidos grasos en los alimentos. *Diario Oficial de la UE*, 2014, L271/93.
- [53] Velíšek J., Davídek J., Hajslova J., Kubelka V.J., Janíček G., Mankova B. Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A*, 1978, 167, 241-244.
- [54] Weibhaar R., Perz R. Fatty Acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010, 112, 158-165.
- [55] Weibhaar R. Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, 113, 304-308.
- [56] Willits J. Los 3-MCPD y su importancia en la industria del aceite de palma. *Palmas*, 2013, 34, tomo II, 165-173. Disponible en: <file:///D:/Datos%20de%20Usuario/UJA/Downloads/10713-10989-1-SM.pdf>.

- [57] Xing X., Cao Y. Determination of 3-chloro-1,2- propanediol in soy sauces by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Food Control, 2007, 18, 167-172.
- [58] Zafra-Gómez A., Garballo-Rubio A., Soto-Chinchilla J., Moreno A.A novel method for the determination of glycidyl and 3-monocholorpopanediol esters in fish oil by gas chromatography tandem mass spectrometry.Talanta, 2017, 165, 267-273.

