



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y FTALATOS EN ACEITE DE OLIVA

Alumna: María Pilar García Cano

Jaén, Octubre, 2024



Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y FTALATOS EN ACEITES DE OLIVA

Alumna: María Pilar García Cano

Jaén, Octubre, 2024

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Generalidades sobre el aceite de oliva	2
1.2. Contaminantes del aceite de oliva: límites máximos permitidos	3
2. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs)	5
2.1. Toxicidad	7
2.2. Regulación	8
3. FTALATOS.....	8
3.1. Toxicidad	9
3.2. Regulación	10
4. OBJETIVOS.....	11
5. METODOLOGÍA	11
6. TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y FTALATOS EN ACEITE DE OLIVA.....	12
6.1. Extracción Líquido-Líquido (LLE).....	12
6.2. Extracción en Fase Sólida (SPE)	13
6.3. Microextracción en Fase Sólida (SPME)	15
6.4. Método QuEChERS	16
6.5. Cromatografía de permeación en gel (GPC).....	17
7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y FTALATOS EN ACEITE DE OLIVA.....	19
7.1. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG- MS).....	19
7.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)/ Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).....	21
8. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN ACEITE DE OLIVA.	23
9. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN ACEITE DE OLIVA	30
10. CONCLUSIONES	39
11. BIBLIOGRAFÍA.	40

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1. Clasificación de los aceites de oliva. (*Vega & Lopez, 2017*)

Figura 2.1. Estructura química de los PAHs más comúnmente analizados en alimentos y en el medio ambiente. (*Abdel-Shafy & Mansour, 2016*).

Figura 3.1. Estructura química general de los ésteres del ácido ftálico. (*Elaboración Propia*)

Figura 3.2. Principales ftalatos (*Elaboración propia*)

Figura 6.1. Principales etapas del procedimiento de SPE. (*González, 2022*)

Figura 6.2. Proceso de SPME. (*Wegglar et al., 2020*)

Figura 6.3. Mecanismo de separación mediante GPC (*García, 2017*)

Figura 7.1. Cromatógrafo de Gases. (*García, 2017*)

Figura 7.2. Esquema instrumental de un espectrómetro y su acoplamiento con la cromatografía (*López, 2017*)

Figura 7.3. Esquema de un sistema de HPLC (*Reuhs, 2017*)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.2. Límites máximos de PAHs en aceites y grasas comercializados para el consumidor final o como ingredientes alimentarios. (*Comisión Europea, 2023b*)

Tabla 8.1 Métodos para la determinación de PAHs en aceite de oliva. (*Elaboración Propia*)

Tabla 8.2. Concentraciones de PAHs encontradas en AOVE. (*Purcaro et al., 2013*).

Tabla 8.3. Concentraciones de PAHs encontradas en muestras de aceite de oliva virgen extra. (*Vichi et al., 2005*).

Tabla 8.4. Contaminantes totales encontrados en las muestras de aceite de oliva. (*Moret et al., 1997*)

Tabla 8.5. Contaminantes encontrados en las diferentes muestras de aceite de oliva procedentes de Portugal. (*Teixeira et al., 2007*)

Tabla 8.6. Resumen de PAHs encontrados en las diferentes muestras de aceite de oliva. (*Ballesteros et al., 2006*)

Tabla 9.1. Métodos para la determinación de ftalatos en aceite de oliva. (*Elaboración Propia*)

Tabla 9.2. Tipos de ftalatos encontrados en diferentes muestras de aceite de oliva (*Cavaliere et al., 2008*)

Tabla 9.3. Concentración de PAEs en AOVE. (*Nanni et al., 2011*)

Tabla 9.4. Ftalatos encontrados en las diferentes muestras de aceite de oliva. (*Barp et al., 2015*)

Tabla 9.5. Ftalatos encontrados en las muestras de AOVE en el Área Industrial. (*Ierapetritis et al., 2014*)

Tabla 9.6. Límites de detección y cuantificación para los diferentes ftalatos. (*Kiralan et al., 2020*)

Tabla 9.7. Concentraciones de ftalatos analizados en muestras de aceite de oliva procedentes de República Checa. (*Vavrouš et al., 2016*)

Tabla 9.8. Ftalatos encontrados en muestras de aceite de oliva envasadas en PET o en vidrio. (*Rios et al., 2010*)

RESUMEN

Este Trabajo de Fin de Grado consiste en una búsqueda bibliográfica sobre la metodología utilizada para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y ftalatos en aceite de oliva.

En primer lugar, se revisan las diferentes categorías comerciales del aceite de oliva, los contaminantes que se encuentran con mayor frecuencia y las características y fuentes de origen de los PAHs y ftalatos. También se realiza una revisión de la normativa europea y de la norma comercial del Consejo Oleícola Internacional (COI), que establecen los límites máximos permitidos de estos contaminantes en el aceite de oliva con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria.

Por otro lado, se revisan las diversas técnicas de tratamiento de las muestras, así como las técnicas de análisis habitualmente utilizadas para la determinación de ambos grupos de contaminantes. Finalmente, se revisan los métodos de análisis utilizados en su determinación en los últimos años.

ABSTRACT

This Final Degree Project consists of a bibliographic search on the methodology used for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phthalates in olive oil.

First, the different commercial categories of olive oil, the contaminants that are most frequently found and the characteristics and sources of origin of PAHs and phthalates are reviewed. A review of European regulations and the Trade Standard of the International Olive Council (IOC) is also carried out, which establish the maximum permitted limits of these contaminants in olive oil with the aim of guaranteeing food safety.

On the other hand, the various sample treatment techniques are reviewed, as well as the analysis techniques usually used for the determination of both groups of contaminants. Finally, the analysis methods used in its determination in recent years are reviewed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre el aceite de oliva.

El aceite de oliva virgen es el jugo extraído mecánicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) mediante procesos de molturación, batido y centrifugación, lo que permite conservar importantes compuestos polifenólicos que le otorgan un gran valor nutritivo, cosmético y medicinal, además de un sabor y aroma agradables (Consejo Oleícola Internacional, 2022).

La obtención del aceite se realiza en varias etapas. La primera es la recepción del fruto en la almazara y la preparación para el resto del proceso. Cuando la aceituna está limpia, se muele y se forma la pasta a partir de la que se obtendrá el aceite. Se realiza a continuación, un batido que permite reunir en una única fase el aceite. El último paso consiste en la separación de la fase sólida (orujo), grasa (aceite) y acuosa (aguas de vegetación). Esta separación actualmente se lleva a cabo a partir del sistema de dos fases, en el cual una centrifugadora horizontal (decánter) se encarga de separar el aceite de la mezcla de orujo y aguas de vegetación (alperujo) en una única fase.

Por otro lado, el aceite que sale del decánter contiene impurezas sólidas y presenta humedad, por lo que antes de su almacenamiento, se han de separar estos elementos. Para ello se puede centrifugar el aceite usando una centrífuga vertical adicionando agua; otra opción consiste en decantar el aceite por gravedad en depósitos diseñados para tal fin. Tras esto el aceite se puede almacenar en bodega. (Salas, 2019).

El aceite de oliva se clasifica en ocho categorías reconocidas internacionalmente, presentando diferentes características de calidad y de pureza. Estas categorías son (Comisión Europea, 2022):

- Aceite de oliva virgen extra (acidez $\leq 0,8\%$).
- Aceite de oliva virgen (acidez $\leq 2\%$).
- Aceite de oliva lampante (acidez $> 2\%$).
- Aceite de oliva refinado (acidez $\leq 0,3\%$).
- Aceite de oliva que contiene solo aceites de oliva vírgenes y aceites de oliva refinados (acidez $\leq 1\%$).
- Aceite de orujo de oliva crudo.
- Aceite de orujo de oliva refinado (acidez $\leq 0,3\%$).

- Aceite de orujo de oliva (acidez $\leq 1\%$)

En la Figura 1.1. se muestra un esquema de la obtención de estos aceites.

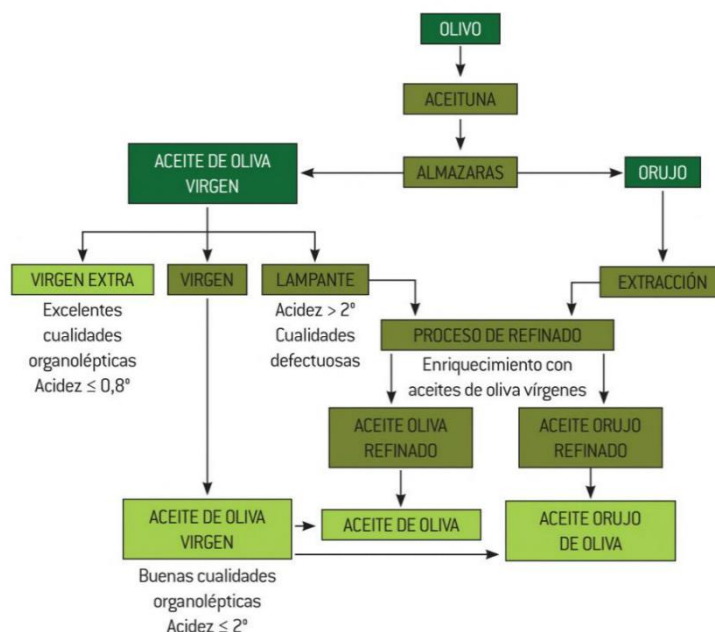


Figura 1.1. Clasificación de los aceites de oliva (Vega & Lopez, 2017)

1.2. Contaminantes del aceite de oliva: límites máximos permitidos.

Los contaminantes pueden estar presentes en los alimentos debido a su inclusión en las diferentes etapas de su procesamiento, como la producción, el transporte o el envasado. Además, la contaminación ambiental puede ser otra fuente de contaminación. Esto afecta negativamente a la calidad de los alimentos y puede poner en riesgo la salud de las personas. Por este motivo, la Unión Europea ha implementado diversas medidas para minimizar el contenido de contaminantes en los alimentos, estableciendo niveles máximos permitidos.

En el aceite de oliva también se pueden encontrar diferentes contaminantes, que pueden clasificarse en tres tipos: biológicos, químicos y físicos. Los contaminantes biológicos incluyen microorganismos, bacterias, virus y hongos que pueden causar enfermedades, y suelen aparecer antes del procesamiento de las aceitunas. Su crecimiento se favorece cuando hay exceso de materia orgánica y agua en el aceite sin filtrar. Los contaminantes físicos, como la presencia de cuerpos extraños, provienen de la manipulación, recolección y procesamiento de las aceitunas.

Sin embargo, los contaminantes químicos son los más comunes y también los que representan el mayor peligro para la salud. Entre ellos, se encuentran los residuos de pesticidas, que provienen de las sustancias utilizadas para combatir plagas y roedores en fábricas o para tratar los olivos. Además, se debe tener en cuenta la contaminación originada por residuos industriales, aguas subterráneas y componentes lipofílicos solubles que pueden estar en el aire alrededor de las fábricas de aceite. El área de cultivo y producción también puede verse afectada por disolventes lipofílicos volátiles. Por último, existen riesgos de contaminación por monómeros, oligómeros tóxicos y plastificantes como el PVC.

A pesar de estos riesgos, actualmente no hay peligro asociado al consumo de aceite de oliva, ya que la Unión Europea ha establecido regulaciones para controlar la presencia de contaminantes en este y otros alimentos. Estas regulaciones se basan en los siguientes principios:

- Los alimentos que contengan una cantidad inaceptable de contaminantes, tanto desde una perspectiva de salud pública como toxicológica, no podrán comercializarse.
- Los contaminantes deben mantenerse en niveles lo más bajos posibles, siguiendo los procedimientos recomendados en cada caso.
- Se han establecido límites máximos permitidos para ciertos contaminantes con el fin de proteger la salud pública.

Estos niveles máximos de contaminantes quedan establecidos en el Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión Europea (CE) (*Comisión Europea, 2023a*). Para el aceite de oliva, están establecidos niveles máximos de los siguientes contaminantes: 3-monocloropropanodiol (3-MCPD) y ésteres de 3-MCPD de ácidos grasos, ésteres glicidílicos de ácidos grasos, PAHs, dioxinas, bifenilos policlorados (PCBs) similares a las dioxinas y PCBs no similares a las dioxinas y ésteres de ftalatos. En la Norma Comercial del COI (*Consejo Oleícola Internacional, 2022*) también se establecen límites máximos para metales pesados, disolventes halogenados y plaguicidas. En los siguientes apartados se estudiarán más detalladamente dos de estos grupos de contaminantes, los PAHs y ftalatos.

2. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs)

Los PAHs son un conjunto de compuestos químicos formados por átomos de carbono e hidrógeno que contienen dos o más anillos de benceno unidos en estructuras lineales, de conglomerados o angulares (*Singh et al., 2016*).

Estos contaminantes son un grupo muy importante de carcinógenos químicos, de los cuales 16 están clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) en base a su ocurrencia y carcinogenicidad (*Wu & Yu, 2012*). También están incluidos en la lista de contaminantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority, 2008*).

Dependiendo del número de anillos de benceno, los PAHs se clasifican como: compuestos de bajo peso molecular, que consisten en menos de cuatro anillos aromáticos, y compuestos de alto peso molecular, de cuatro o más anillos aromáticos. Los PAHs con dos o tres anillos (naftaleno, acenafteno, antraceno, fluoreno, fenantreno) están presentes en el aire, predominantemente en fase vapor. Los PAHs con cuatro anillos (fluoranteno, pireno, criseno) existen tanto en el vapor como en la fase particulada, y los PAHs que tienen cinco o más anillos de benzo[g,h,i]perileno se encuentran predominantemente en la fase particulada. Las moléculas más pequeñas, como el benceno, el tolueno y el hidrocarburo naftaleno bicíclico aromático no se consideran verdaderos PAHs. En general los hidrocarburos más estudiados son el 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA) y el benzo(a)pireno (BaP). Los PAHs más comúnmente encontrados en alimentos y, en concreto, en aceite de oliva son: BaP, benzo[a]antraceno (BaA), criseno (CHR) y benzo[b]fluoranteno (BbF). En la Figura 2.1 se muestra la estructura de estos compuestos junto con la de otros PAHs frecuentemente encontrados en el medio ambiente (*Abdel-Shafy & Mansour, 2016*).

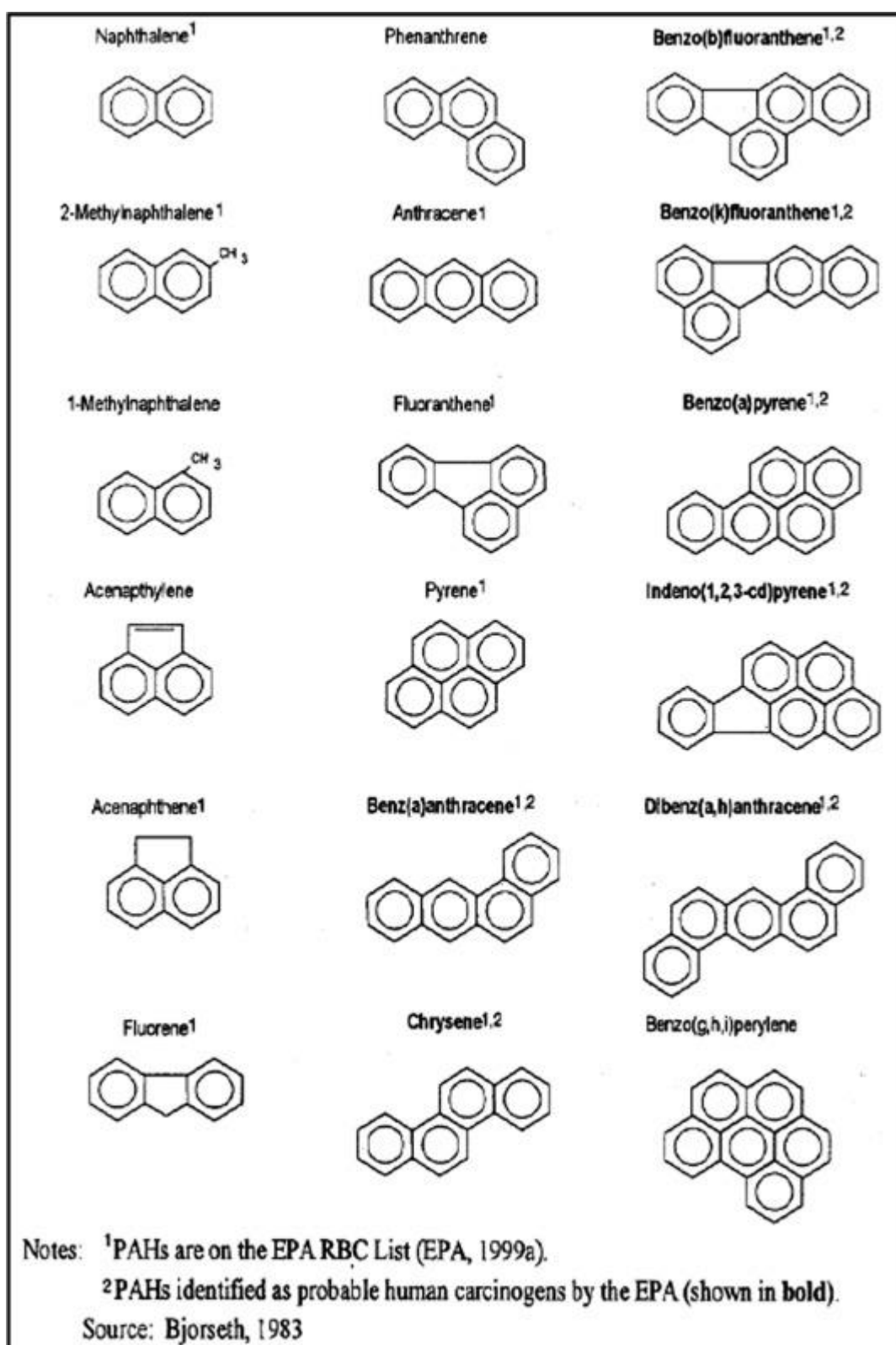


Figura 2.1. Estructura química de los PAHs más comúnmente encontrados en alimentos y en el medio ambiente (Abdel-Shafy & Mansour, 2016).

Aunque los PAHs se generan de manera natural en erupciones volcánicas, incendios, y reacciones geotérmicas, la mayoría son causados por el efecto del ser humano, como en el uso de combustibles fósiles como son el carbón y petróleo, incendios, vertidos de plantas industriales, quema de basuras, etc.

La presencia de estos contaminantes en los alimentos proviene de varias fuentes, como por ejemplo asar la carne a la parrilla o ahumarla, lo que conduce a concentraciones elevadas de aquellos. No obstante, estos alimentos no se consumen con tanta frecuencia como otros que se incorporan en la preparación de muchos alimentos cotidianos, como es el caso de los aceites vegetales que son uno de los principales contribuyentes a la exposición alimentaria a los PAHs. La presencia de PAHs en los aceites de oliva vírgenes se debe a la contaminación de la piel de la aceituna y del propio aceite durante el procesamiento. La contaminación de la piel puede ocurrir ya sea directamente durante el procesamiento en el molino o indirectamente por fuentes ambientales. En esta última situación, los PAHs presentes en el polvo y las partículas procedentes del humo y la contaminación atmosférica pueden contaminar las aceitunas a través de la precipitación atmosférica y esta contaminación superficial puede transferirse al producto final (*Rodríguez-Acuña et al., 2008*).

2.1. Toxicidad

Algunos PAHs son carcinógenos genotóxicos sospechosos. Desde hace tiempo se sabe que se encuentra en niveles bajos en muchos alimentos, especialmente cuando se ahúman o se secan durante el proceso de producción. Se ha establecido una legislación en la Unión Europea que establece los límites máximos de BaP legalmente permitidos en los alimentos con vistas a incluir otros PAHs en la futura legislación (*Comisión Europea, 2023b*).

Los efectos en la salud humana dependen principalmente de la duración y la vía de exposición, de la cantidad de PAHs a la que se está expuesto y de la toxicidad. Algunos ejemplos son irritación ocular, náuseas, vómitos, diarrea y confusión (*Valavanidis et al., 2010*).

También se sabe que la exposición a mezclas de PAHs puede provocar una disminución de la función inmunitaria, cataratas, daños renales y hepáticos, problemas respiratorios y anomalías en la función pulmonar (*Khairy et al., 2009*).

2.2. Regulación.

El Reglamento (UE) 2023/915 de la CE, establece un límite máximo de PAHs para el BaP y la suma de 4 PAHs: BaP, BaA, BbF y CHR en aceites y grasas comestibles (Tabla 2.2.). Para la suma de los PAHs, los límites máximos se refieren a las concentraciones del límite inferior, que se calculan partiendo del supuesto de que todos los valores de las cuatro sustancias por debajo del límite de cuantificación son iguales a cero (*Comisión Europea, 2023b*).

Tabla 2.2. Límites máximos de PAHs en aceites y grasas comercializados para el consumidor final o como ingredientes alimentarios (*Comisión Europea, 2023b*)

Benzo(a) pireno (µg/kg)	Suma de BaP, BaA, BbF y CHR (µg/kg)
2,0	10,0

3. FTALATOS

En el pasado, la mayoría de las herramientas y equipos utilizados en la producción del aceite de oliva se realizaban a partir de materiales convencionales como la madera, roca y cerámica. Pero sin embargo con el tiempo, han sido sustituidos por máquinas que contienen diversas partes hechas de plástico. Además, se ha modificado el embalaje de esta materia prima; antes se envasaba en envases de vidrio y ahora es muy común encontrar aceites envasados en materiales plásticos. Se utilizan diversos tipos de plásticos, como polietileno (PE), cloruro de polivinilideno, cloruro de polivinilo (PVC), tereftalato de polietileno (PET), alcohol etilenvinílico (EVOH), polipropileno (PP) y poliestireno (PS), entre otros. La elección del polímero dependerá de varios factores, como la rentabilidad, la reciclabilidad y los requisitos legales. En la fabricación de estos polímeros habitualmente se incorporan aditivos para potenciar sus propiedades; es el caso de los ésteres de ácido ftálico, de los que se ha informado que presentan riesgos para la salud humana. La estructura general de estos compuestos se muestra en la Figura 3.1. Estos ésteres de ftalatos son sustancias incoloras e inodoros con baja solubilidad en agua, alta

solubilidad en compuestos lipídicos y presentan baja volatilidad. Son capaces de dar varias propiedades a los materiales, como rigidez o flexibilidad, opacidad, y capacidad de soportar temperaturas extremas (Heudorf et al., 2007).

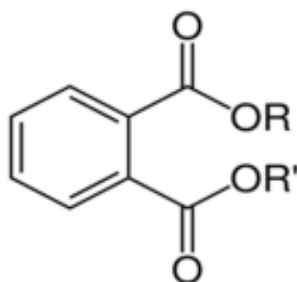


Figura 3.1. Estructura química general de los ésteres del ácido ftálico. (Elaboración Propia)

Los ftalatos no están unidos químicamente a las cadenas de polímeros, y, por lo tanto, pueden migrar a velocidades y niveles que dependen del producto alimenticio envasado y de las condiciones de contacto.

3.1. Toxicidad

Los ftalatos son sustancias potencialmente tóxicas. Aunque su toxicidad está catalogada como baja para algunos como el diisonilftalato (DINP) y diisodecilftalato (DIDP), el di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), dibutilftalato (DBP) y butil benzil ftalato (BBP) están considerados como disruptores endocrinos.

En la Figura 3.2, aparecen los ftalatos citados anteriormente

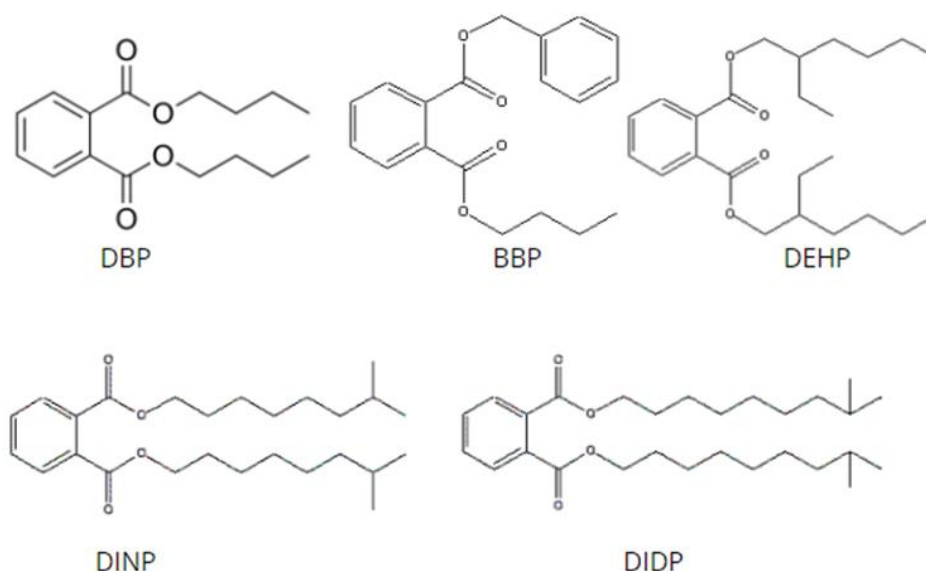


Figura 3.2. Principales ftalatos (Elaboración propia)

Ciertos ftalatos y sus metabolitos tienen un efecto toxicológico grave en la salud humana, especialmente en el sistema reproductivo, endocrino y respiratorio.

3.2. Regulación

Debido a la creciente atención prestada a la seguridad alimentaria de los consumidores en Europa, se han implementado requisitos estrictos para el uso de materiales en contacto con alimentos, como se describe en el Reglamento (CE) nº 1935/2004 (*Comisión Europea, 2004*). En este Reglamento se establece que cualquier material o producto destinado a entrar en contacto directo o indirecto con alimentos no debe transferir sustancias químicas a los productos alimenticios en cantidades que puedan representar un riesgo para la salud humana o el deterioro de sus propiedades organolépticas. En el caso concreto de los ftalatos, se han establecido límites de migración específicos (LME) para los cinco ftalatos siguientes, basándose en una evaluación toxicológica descrita en el Anexo I del Reglamento (UE) 2023/1442 (*Comisión Europea, 2023a*) que modificó el Anexo I del Reglamento (UE) 10/2011 (*Comisión Europea, 2011*)

- DBP: 0,3 mg/kg.
- BBP: 3 mg/kg
- DEHP: 1,5 mg/kg.
- DINP y DIDP: 9 mg/kg (suma de los dos)

Además, se ha establecido un límite total de migración (LME[T]) para el grupo combinado de DBP, BBP y DEHP de 0,6 mg/kg en alimentos, con el objetivo de minimizar la exposición conjunta a estas sustancias.

El límite de migración específica (LME) se define como la cantidad máxima permitida de una sustancia dada liberada, en este caso de ftalatos, desde un material u objeto en alimentos o envases alimentarios (*Comisión Europea, 2023a*). El LME de ftalatos en aceite de oliva se puede determinar mediante el uso de técnicas de análisis como pueden ser la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En 2019, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008) también definió una ingesta diaria tolerable (IDT) de 50µg/kg de peso corporal por día para DBP, BBP, DEHP y DINP, y de 150 µg/kg para DIDP (Silano et al., 2019).

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es realizar una revisión bibliográfica de los métodos de análisis utilizados para la determinación de PAHs y Ftalatos en aceite de oliva.

Este objetivo se concreta en los siguientes objetivos específicos: (1) conocer las propiedades químicas y toxicológicas de los PAHs y ftalatos; (2) revisar lo establecido en la Normativa de la Comisión Europea y la Norma Comercial del Consejo Oleícola Internacional en cuanto al contenido máximo permitido de estos contaminantes; (3) revisar las técnicas de tratamiento de muestra habitualmente utilizadas (fundamento, ventajas y desventajas); y (4) revisar los métodos de análisis utilizados en los últimos años para su determinación.

5. METODOLOGIA.

Para llevar a cabo la revisión bibliográfica se han utilizado diferentes bases de datos como PubMed, Google Académico y Scopus. Dentro de estas bases de datos, algunas de las revistas que he consultado con mayor frecuencia ya que contenían mucha información sobre la determinación de PAHs y ftalatos en aceite de oliva han sido *Molecules*, *Food Chemistry*, *Food Control*, *Agricultural and Food Chemistry* and *Journal of Chromatography A*. También se han consultado las páginas webs de algunos organismos internacionales como EFSA, AESAN y OMS.

Para concretar lo máximo posible la búsqueda de artículos científicos, se han utilizado algunos criterios de selección como el uso de palabras clave, en particular: *PAH determination olive oil*, *olive oil contaminants*, *phthalates determination olive oil*, *EFSA olive oil contaminants*, *AESAN olive oil contaminants*, *OMS phthalates* y *OMS PAHs*.

Aproximadamente, el periodo de tiempo de búsqueda de los artículos ha sido de los últimos 20 años.

Finalmente, en la bibliografía se recogen todos los artículos científicos, libros y webs que se han empleado. Para su elaboración se ha utilizado el gestor bibliográfico de Word.

6. TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y FTALATOS EN ACEITE DE OLIVA.

En cualquier análisis, el tratamiento de la muestra tiene como finalidad obtener el analito de interés en su forma más pura, es decir, separarlo de la matriz. En muchos casos, después de la extracción, el analito no está listo para su determinación final, por lo que es necesario someter el extracto a una etapa de purificación para eliminar los compuestos que interfieren y que provienen de la matriz (*García, 2017*).

El análisis del aceite de oliva presenta un reto debido a que las metodologías analíticas aplicadas implican un nivel considerable de complejidad. Esto se debe principalmente a que el aceite es una matriz con un elevado contenido graso y contiene numerosos componentes que resultan difíciles de aislar. Por ello, es necesario aplicar un tratamiento de la muestra que elimine los coextractantes que puedan estar presentes, además de llevar a cabo varias etapas de purificación. De este modo, se obtiene un extracto limpio de la matriz (*López, 2017*).

Existen distintas técnicas que se pueden utilizar para la extracción de contaminantes en aceites de oliva. En concreto, algunas de las más utilizadas en la determinación de PAHs y ftalatos son la Extracción en Fase Sólida (SPE), la Extracción Líquido-Líquido (LLE), la Microextracción en Fase Sólida (SPME), la metodología QuEChERS y la Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).

A continuación, se presenta un análisis del fundamento y la metodología de estas técnicas, junto con una evaluación de sus ventajas y desventajas.

6.1. Extracción líquido-líquido (LLE)

Esta técnica se utiliza para separar PAHs y ftalatos en aceites comestibles, como el aceite de oliva, aprovechando la solubilidad relativa de los compuestos entre dos disolventes inmiscibles de diferente polaridad. Durante el proceso, los

analitos migran de un disolvente a otro, según su coeficiente de reparto, que es un indicador clave de lo eficiente que será la extracción. El procedimiento implica agitar la muestra junto con un disolvente adecuado, lo que permite que los compuestos se distribuyan entre las fases hasta alcanzar un equilibrio, conocido como el coeficiente de partición. Se busca que este coeficiente sea lo más alto posible para maximizar la extracción.

Además, es esencial tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas y la polaridad de los analitos para seleccionar el disolvente ideal, que debe tener alta afinidad por los compuestos que se desean extraer y, al mismo tiempo, ser inmiscible o de baja solubilidad con la fase restante (*Taghvaei et al., 2016*).

Por ejemplo, se ha propuesto extraer PAHs de aceite de oliva empleando una combinación de acetonitrilo y acetona seguida de una limpieza con cartuchos de SPE (*Taghvaei et al., 2016*).

En el caso de los ftalatos, se ha utilizado la LLE con acetonitrilo para extraerlos de aceites de oliva italianos, obteniendo recuperaciones entre 93,5 y 99,4%. En el estudio, se observó que el DEHP estaba presente en concentraciones más altas en el aceite de oliva que las permitidas por la UE en materiales en contacto con alimentos (1,5 mg/kg) (*Pereira et al., 2019*).

En el caso del aceite de oliva, se considera que una simple LLE sin etapa de limpieza e inyección directa al sistema supone un riesgo para los instrumentos analíticos utilizados, siendo de suma importancia la eliminación de los ácidos grasos libres separados. Estos últimos y los ftalatos tienen polaridades algo similares, por lo que pueden causar interferencias en el análisis cromatográfico o incluso contaminación del sistema.

La LLE presenta el inconveniente de ser una técnica lenta y requerir volúmenes grandes de disolventes para realizar la extracción.

6.2. Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es una técnica que se basa en la partición selectiva de compuestos entre una fase sólida adsorbente y una fase líquida, gaseosa o emulsionada. Su objetivo principal es extraer compuestos de interés o interferentes de una muestra, logrando el enriquecimiento de los analitos al reducir su volumen de un 100 a 500 veces. Además, la SPE permite limpiar la muestra al eliminar

interferencias de la matriz, así como separar y extraer analitos que no son estables en medios líquidos o que presentan alta volatilidad. Esta técnica es especialmente valorada en campos como la química analítica, farmacéutica y ambiental, ya que mejora la sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos (García, 2017). En la Figura 6.1, se muestran las distintas etapas de esta técnica.

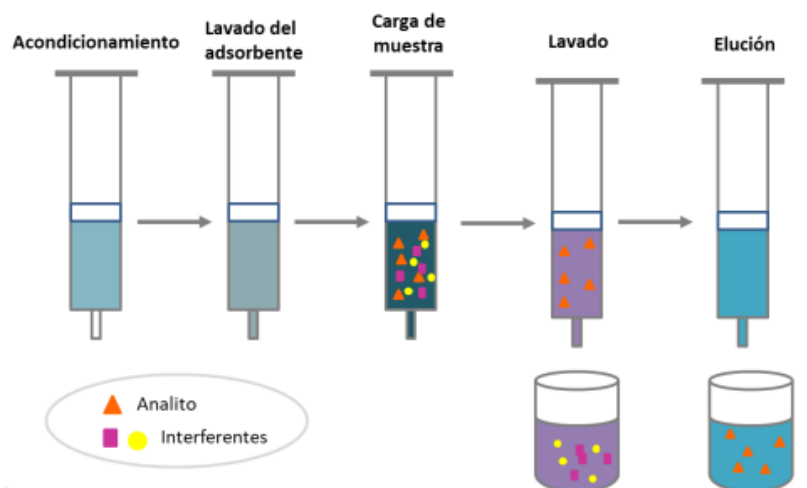


Figura 6.1. Principales etapas del procedimiento de SPE (González, 2022)

Para la determinación de PAHs en muestras de alimentos y de aceites de oliva se utiliza habitualmente como fase sólida Florisil y octadecil silano RP-C18; también se ha descrito el uso de resinas poliméricas, fases reversas, octil silano RP-C8 y carbón activado (Purcaro et al., 2013).

Esta técnica es muy útil, para el análisis específico de compuestos de baja concentración, como son los ftalatos. En el análisis de aceite de oliva se considera un riesgo utilizar cartuchos de SPE porque la mayoría de ellos están fabricados con polietileno, lo que puede provocar la liberación de ftalatos en el adsorbente y una posible contaminación cruzada en la muestra. Por tanto, es recomendable utilizar cartuchos de vidrio (Faraji et al., 2019).

La SPE presenta la ventaja de permitir alcanzar grandes preconcentraciones, lo que dará lugar a obtener límites de detección más bajos. También se eliminan interferencias que provienen de la matriz.

6.3. Microextracción en fase sólida (SPME)

La SPME se basa en el uso de una fibra de sílice fundida, que ha sido recubierta de un adsorbente constituido por un recubrimiento polimérico, para la retención de los analitos. Dicha fibra, se encuentra empaquetada dentro de una jeringa de GC modificada. La técnica consta de dos etapas; la primera es la extracción de los analitos desde la muestra a la fibra y, posteriormente, se lleva a cabo su desorción para el análisis, tal y como se representa en la Figura 6.2. Existen dos métodos de trabajo con esta técnica:

- Inmersión directa (DI-SPME): la extracción de los analitos se realiza con una inmersión de la fibra en la muestra.
- Espacio de Cabeza (HS-SPME): El espacio de cabeza se refiere a la zona de gas que se encuentra por encima de una muestra en un frasco sellado. Este espacio contiene los compuestos volátiles que se desprenden de la muestra. La fibra se introduce en el espacio de cabeza del vial que contiene la muestra, una vez que se ha producido la desorción de los analitos por calentamiento. El analito debe estar en forma gaseosa para su retención en la fibra (*Weggler et al., 2020*).

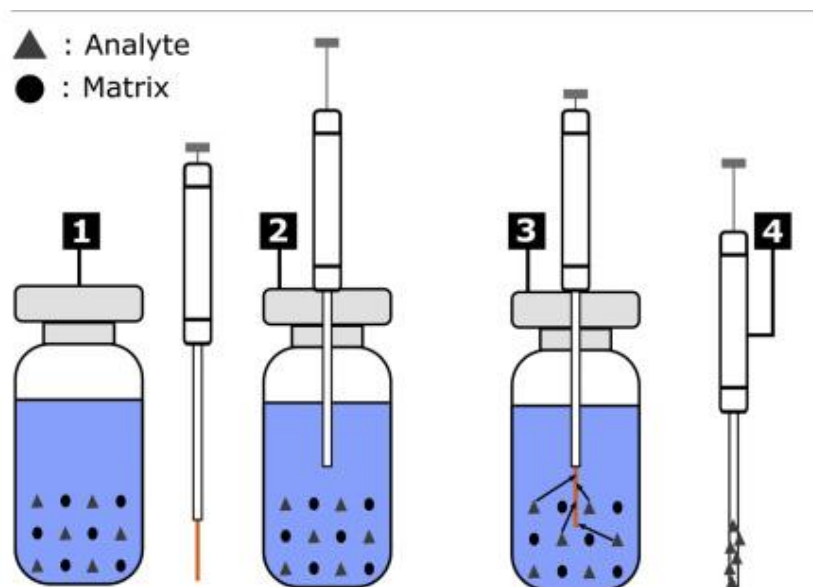


Figura 6.2. Proceso de SPME (*Weggler et al., 2020*)

La técnica de SPME ha sido utilizada por diferentes autores para la extracción de PAHs presentes en aceites de oliva con recuperaciones hasta del 128 % (*Vichi et al., 2005*).

(*Rios et al., 2010*) propone el uso de la de la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME), seguido de un análisis posterior por GC con trampa de iones MS/MS, para detectar y cuantificar los niveles de ftalatos en aceite de oliva sin manipulación de la muestra y evitando así la contaminación externa por aire

Las principales ventajas de esta técnica son su bajo coste, que no necesita disolventes orgánicos para la preconcentración y los pequeños volúmenes de muestra requeridos

6.4. Método QuEChERS

Este método fue introducido por primera vez por Anastassiades (*Anastassiades et al, 2003*), utilizándolo para determinar pesticidas en frutas y verduras.

Este método combina dos etapas, una etapa de extracción de la muestra con acetonitrilo y diferentes sales, y una fase de dispersión en fase sólida donde se realiza una limpieza o "clean-up". A continuación, tras la extracción y concentración de los analitos, puede realizarse la identificación y cuantificación de los compuestos de interés por análisis cromatográfico.

El método QuEChERS se basa en una fase inicial de extracción simple con acetonitrilo y sales, seguida por una etapa de dispersión en fase sólida (dSPE). Esta segunda fase facilita la eliminación del agua presente en la muestra y lleva a cabo un proceso de limpieza o "clean-up". Para ello, se añade una mezcla de sulfato de magnesio y un sorbente, que puede ser una amina primaria-secundaria (PSA), C18, carbón negro grafitado (GCB), o una combinación de estos, dependiendo de las características de la muestra.

Una vez completada la extracción, el extracto obtenido puede ser analizado mediante cromatografía de gases o cromatografía líquida. Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para este tipo de determinaciones debido a su alta sensibilidad, su capacidad para separar, identificar y analizar de forma cualitativa y cuantitativa compuestos de diversa naturaleza, y la rapidez de los

nuevos sistemas cromatográficos, que permiten obtener resultados en tiempos cada vez más cortos.

Para la extracción de PAHs mediante el uso de esta técnica los disolventes usados por algunos autores han sido mezclas de acetona, isooctano y acetato de etilo, lo cual incrementa la selectividad por estos analitos apolares además del uso de PSA para el paso de extracción con sorbentes, en algunos casos se usa combinación de este junto a MgSO₄ y sílica gel en fase reversa. (*González-Curbelo et al., 2015*)

En cuanto a los ftalatos, se propuso un método analítico basado en el QuEChERS modificado y GC-MS/MS para determinar 15 PAEs en aceites vegetales comestibles. Para minimizar el riesgo de contaminación secundaria e interferencia de la matriz compleja y obtener resultados precisos y confiables, se utilizó la combinación de 50 mg de GCB y 80 mg de PSA para la purificación. El método de extracción modificado fue económico, simple, rápido, confiable, respetuoso con el medio ambiente, altamente efectivo y suficientemente sensible (*Wang et al., 2022*).

Este método presenta varias ventajas, entre las que están, la simplicidad y rapidez ya que QuEChERS combina la extracción y limpieza en pocos pasos. Esta técnica utiliza menos cantidad de disolventes (principalmente acetonitrilo); presenta mayor eficiencia, es decir, al incorporar una fase sólida dispersiva (dSPE) para la limpieza, QuEChERS permite una eliminación más efectiva de interferencias sin necesidad de múltiples extracciones. Otra de las ventajas más importantes es la versatilidad, ya que el método es adecuado para una amplia variedad de matrices alimentarias y puede adaptarse a distintos plaguicidas. Se produce una mejor recuperación de analitos al emplear sales que ajustan el PH y mejoran la partición del analito en la fase orgánica

6.5. Cromatografía de permeación en gel (GPC)

La GPC es una técnica que puede emplearse en la preparación de muestras. Su principio se basa en separar diferentes analitos en función de su tamaño. Se utiliza comúnmente en la purificación de extractos que contienen compuestos de alto peso molecular. La separación ocurre debido a la exclusión de moléculas

según su tamaño, lo que hace crucial la elección de una fase estacionaria cuyas dimensiones coincidan con las de los analitos a separar. Estos analitos se disuelven en una fase móvil, junto con los compuestos de los que se desea separarlos. La fase estacionaria suele estar compuesta por materiales poliméricos o de sílice.

En la GPC no hay interacciones químicas entre la fase estacionaria y la fase móvil, ya que la separación depende únicamente del tamaño de las moléculas presentes en el extracto. El objetivo de la fase móvil es desplazar los compuestos a través de la columna, por lo que su elección debe basarse en la solubilidad de los analitos, la viscosidad del medio y su compatibilidad con el material de relleno seleccionado (García, 2017). El mecanismo de la técnica se muestra en la Figura 6.3.

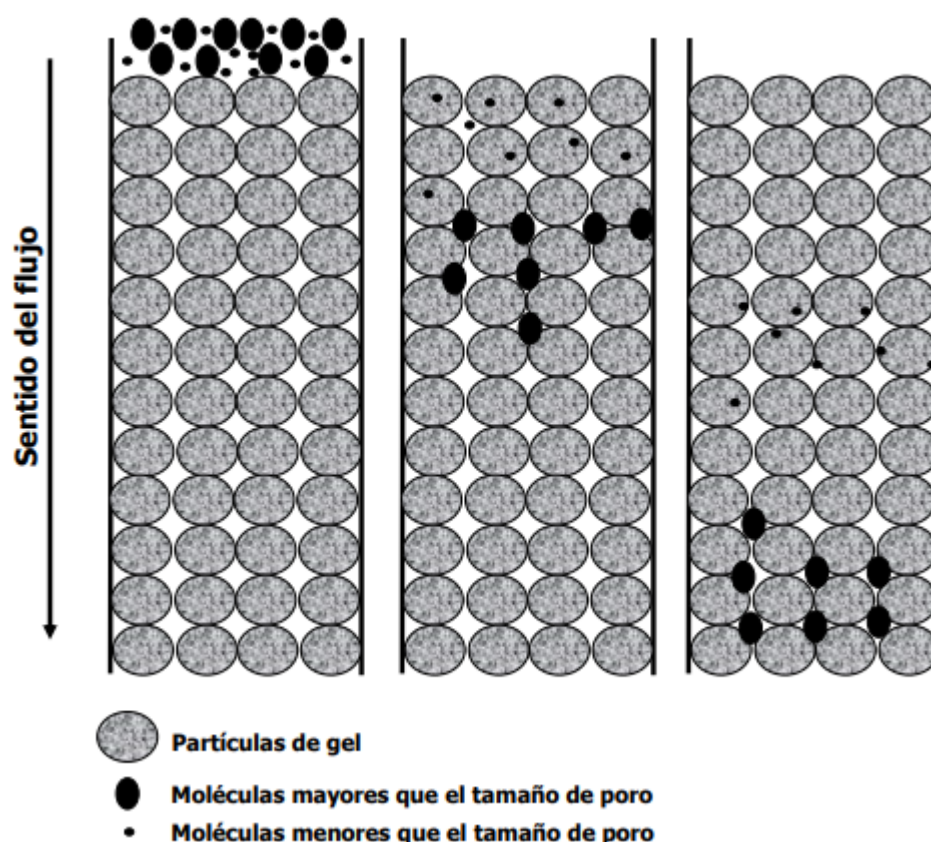


Figura 6.3. Mecanismo de separación mediante GPC (García, 2017)

Esta técnica se ha utilizado se ha utilizado para la extracción de PAHs y plaguicidas en diferentes tipos de aceites de oliva, consiguiendo unos resultados

de precisión y exactitud satisfactorios (recuperación: 84–110%) (*Ballesteros et al. 2006*).

En la determinación de ftalatos en aceite de oliva se ha utilizado la GPC para eliminar compuestos de alta masa molecular como grasas y otros compuestos no deseados, obteniéndose una recuperación de 71% y 112%, demostrando que la técnica es efectiva para analizar ftalatos en una matriz compleja como el aceite de oliva (*Cavaliere et al., 2008*).

7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y FTALATOS EN ACEITE DE OLIVA.

Existen diferentes metodologías analíticas para caracterizar los aceites de oliva y controlar la presencia de contaminantes. Para el caso de PAHs, se utiliza habitualmente la Cromatografía de Gases (GC) acoplada a la Espectrometría de Masas (GC-MS) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Para los ftalatos se utilizan también GC-MS y HPLC. A continuación, se describirán brevemente estas técnicas.

7.1. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. (GC-MS)

La Cromatografía de Gases es una técnica de separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles, equipada por un inyector donde se vaporiza la muestra, seguido de una columna capilar donde la muestra es transportada por una fase móvil y separada según volatilidad y polaridad (dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria), y un detector. En la Figura 7.1, se muestra un esquema de un cromatógrafo de gases.

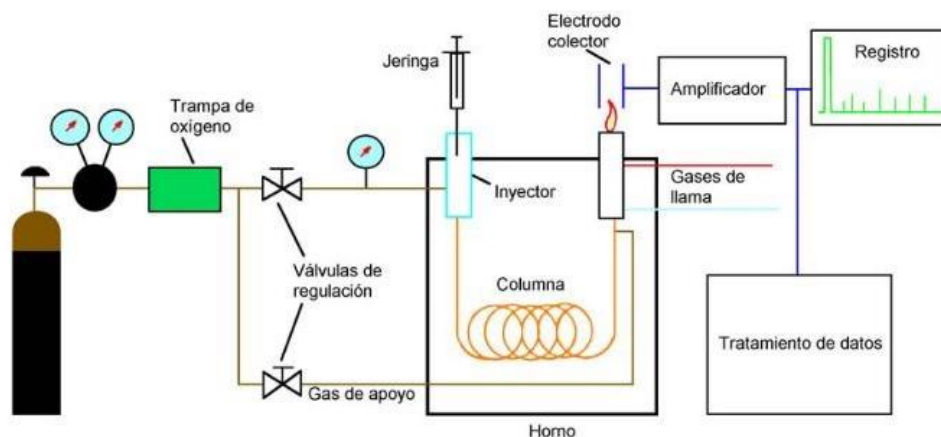


Figura 7.1. Cromatógrafo de gases. (García, 2017)

La temperatura de la columna se ajusta para igualar la del horno cromatográfico, permitiendo la separación de los analitos según su punto de ebullición, siempre que la columna tenga una buena discriminación entre ellos. Esta técnica se puede realizar a temperatura constante o mediante una rampa de temperatura programada. La rampa de temperatura es más común, ya que incrementa la eficiencia del análisis al variar los factores de retención de los compuestos. Este método es más eficiente, reduciendo así el tiempo de análisis (García, 2017).

Al cromatógrafo de gases se le pueden acoplar distintos sistemas de detección, entre ellos un espectrómetro de masas (MS). Este detector es el más utilizado en la determinación de PAHs y ftalatos.

El acoplamiento entre GC y MS (GC-MS) da lugar a una técnica que combina la alta capacidad de separación de la GC con la capacidad de identificación de la MS, permitiendo así obtener información detallada sobre la composición de las muestras.

La MS se utiliza para identificar y cuantificar compuestos químicos en cualquier muestra. Se basa en la ionización de las moléculas de la muestra para producir iones que luego son separados en un analizador y detectados en función de su relación masa-carga (m/z). Se obtiene de esta forma un espectro de masas que representa la abundancia de los iones a diferentes valores de m/z , y que es único para cada compuesto, permitiendo así su identificación (López, 2017).

En la espectrometría de masas de baja resolución (MS), la capacidad para diferenciar entre iones de masas distintas es limitada, por lo que se usa para

muestras de composición simple. Sin embargo, no es adecuada para separar iones con masas muy similares. Por otro lado, la espectrometría de alta resolución (HRMS) ofrece una mayor precisión, permitiendo distinguir entre iones con diferencias mínimas en masa, lo cual es clave para analizar mezclas complejas. Mientras que la MS proporciona masas con 2 decimales, la HRMS puede alcanzar 4-5 decimales, siendo más precisa y sensible.

En la Figura 7.2 se muestra un esquema del instrumento empleado en GC-MS.

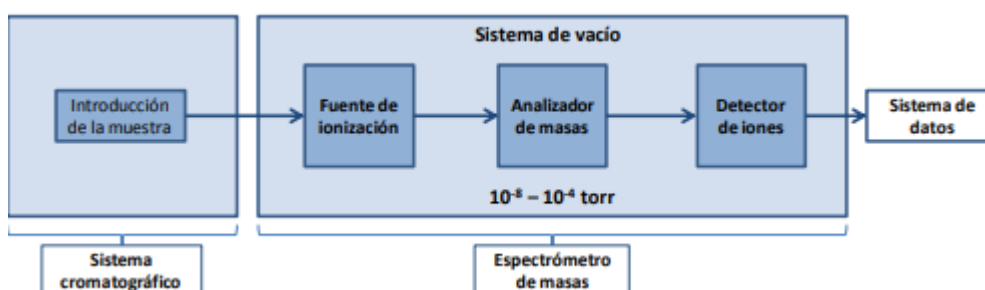


Figura 7.2. Esquema instrumental de un espectrómetro y su acoplamiento con la cromatografía (López, 2017)

Para la determinación de PAHs en aceite de oliva se ha propuesto el uso de GC-MS con espaciado de cabeza (HS-GC-MS) (Vichi et al., 2005). El método desarrollado es sencillo, económico y rápido. La técnica GC-MS se ha propuesto también para la determinación de ftalatos previa LLE con acetonitrilo, obteniendo valores de LOQ ligeramente inferiores a $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (Barp et al., 2015).

7.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)/Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).

Es una técnica en la que la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria se encuentra en una columna. La fase móvil es un disolvente que contiene a la muestra en una forma de mezcla de solutos. La interacción fase móvil-soluto tiene una alta importancia en la cromatografía de líquidos ya que la facilidad para cambiar la naturaleza de la fase móvil hace que esta técnica sea versátil y aumenta la selectividad al poder utilizar soluciones que se adecuen en los analitos en cuestión (Reuhs, 2017).

La clasificación de los diferentes tipos de HPLC se realiza en función del mecanismo de separación que se aplique, a la naturaleza de su fase estacionaria

éstas son, en fase inversa, intercambio iónico, pares iónicos y exclusión molecular dependiendo de la interacción fisicoquímica que se dé lugar entre analitos y fase estacionaria.

Los detectores más aplicados en HPLC son los de absorbancia ultravioleta-visible (UV-Vis) y fluorescencia (FLD). La elección entre uno u otro va a depender de los analitos en cuestión. También es muy frecuente el acoplamiento de HPLC con MS (HPLC-MS). En la Figura 7.3 se muestra un esquema de un sistema de HPLC.

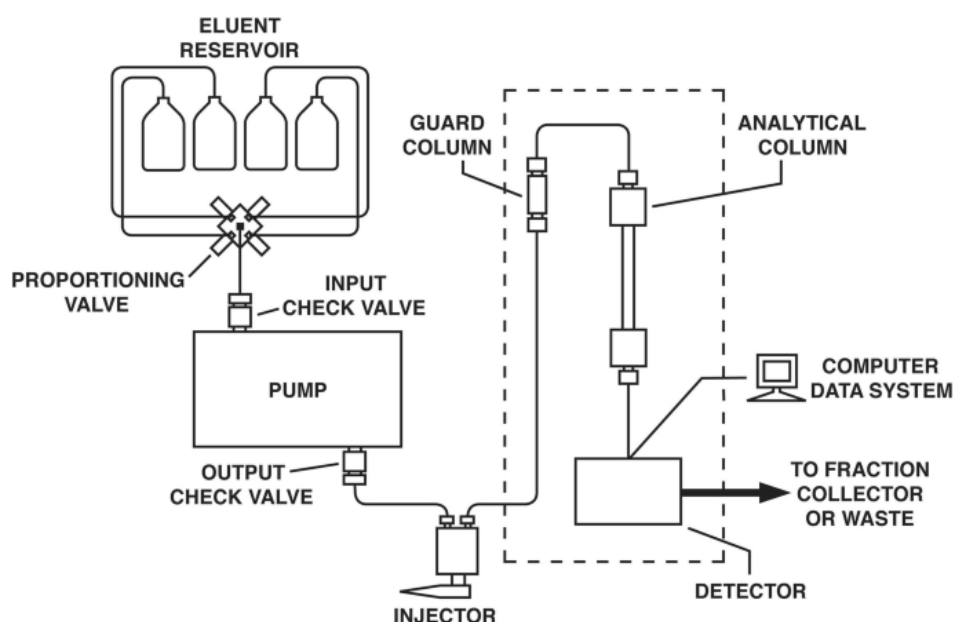


Figura 7.3. Esquema de un sistema de HPLC (Reuhs, 2017)

La técnica HPLC con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) es ampliamente utilizada para la determinación de compuestos que son naturalmente fluorescentes. El detector de fluorescencia es extremadamente sensible y selectivo, lo que lo convierte en una excelente opción para el análisis de sustancias fluorescentes en concentraciones muy bajas, como es el caso de los PAHs. Las principales ventajas de esta técnica analítica son la alta sensibilidad para detectar trazas de sustancias en muestras complejas y la selectividad que permite detectar solamente compuestos fluorescentes.

Bogusz y colaboradores, propusieron varios métodos basados en el empleo de HPLC-FLD para la determinación de PAHs, en concreto de BaP, en grasas y aceites animales y vegetales, utilizando HPLC en fase inversa (*Bogusz et al., 2004*).

En la técnica HPLC-MS, primero se separan los componentes de la muestra en el sistema cromatográfico según sus propiedades químicas; a continuación, para facilitar el análisis e identificar los compuestos, los componentes se introducen en la fuente de ionización de un espectrómetro de masas, donde se ionizan y se analiza su masa (*Reuhs, 2017*).

La MS proporciona información adicional sobre la identidad y estructura de los compuestos, ya que cada uno tiene una huella de masa única. Las principales ventajas del uso de esta técnica son la alta sensibilidad y la elevada capacidad de detección e identificación del analito.

Esta técnica fue utilizada, para la determinación de varios contaminantes, por ejemplo; *Vavrous y colaboradores* aplicaron la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) para la determinación de ocho ftalatos en aceites comestibles, incluido el aceite de oliva. El grupo realizó LLE seguido de SPE para eliminar los principales componentes de la matriz, intentando minimizar la manipulación de la muestra para evitar la contaminación cruzada. También equiparon su sistema analítico con una trampa de contaminación, logrando LOD similares de 5,5–110 µg/kg (*Vavrouš et al., 2016*).

8. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN ACEITE DE OLIVA

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los métodos utilizados para determinar PAHs en aceites de oliva en los últimos años. En la Tabla 8.1 se muestra recogida la información más relevante de dichos métodos y a continuación se desarrollan cada uno de ellos de forma más detallada.

Tabla 8.1 Métodos para la determinación de PAHs en aceite de oliva (*Elaboración Propia*)

Muestra	Tratamiento de muestra	Técnica de análisis	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Concentraciones encontradas (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)	Referencias
AOVE	SPE	GC-MS HPLC - FLD	GC-MS: 1 HPLC- FLD: 0.5	GC-MS: 5,5 HPLC- FLD: 1,7	No especificado	80	(Bogusz <i>et al.</i> , 2004)
AOVE	SPME	GC-MS	No especificado	0,32-0,12	0,16-0,81	35-85	(Purcaro <i>et al.</i> , 2013)
AOO			No especificado		0,19-0,72		
AOVE	HS-SPME	GC-MS	<1	0,2-5,2	0,4-26	74-118	(Vichi <i>et al.</i> , 2005)
AO	LLE-SPE	GC -MS	No especificado	No especificado	827,27	87,59-73,64	(Wu & Yu, 2012)
AOVE AO AOL	LLE-SPE	HPLC- FLD	0,012 -1,4	No especificado	0,01-52,9	31,9-92,2	(Moret <i>et al.</i> , 1997)
AOV	LLE-SPE	HPLC - FLD	4-92	No especificado	0,08-13,22	29-79	(Teixeira <i>et al.</i> , 2007)

Muestra	Tratamiento de muestra	Técnica de análisis	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Concentraciones encontradas (µg/kg)		Porcentaje de recuperación (%)	Referencias
AO	LLE	HPLC-FLD	0,5	No especificado	1,2-9,7		90,5	(Pupin et al.,1996)
AOO AOV	GPC	GC-MS/MS	0,10-0,20	No especificado	0,3-88,7		89-100	(Ballesteros et al.,2006)
AOVE	LLE	GC-MS	No especificado	0,07-8,33	BcFL	BghiP	24-99	(Arena et al.,2024)
					2,21-2,8	3,7-9,9		

(SPE, extracción en fase sólida; SPME, microextracción en fase sólida; HS-SPME, microextracción en fase sólida con espacio de cabeza; LLE, extracción líquido-líquido.)

(AOVE, aceite de oliva virgen extra; AOV, aceite de oliva virgen; AOO, aceite de orujo de oliva; AO, aceite de oliva; AOL, aceite de oliva lampante.)

(GC-MS, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; HPLC-FLD, cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia; GPC, cromatografía de permeación en gel; GC-MS/MS, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem)

(BcFL, Benzo[c]fluoreno; BghiP, Benzo[ghi]perileno)

Bogusz y colaboradores (*Bogusz et al., 2004*) determinaron los niveles de BaP en muestras de aceite de oliva virgen extra mediante SPE, lo que aseguró altas recuperaciones de BaP y benzo(k)fluoranteno, utilizado como patrón interno para HPLC. Los extractos se analizaron con GC-MS y HPLC utilizando tanto columnas estándar como de baja presión o cromatografía rápida, lo que permitió tiempos de análisis reducidos, de 8 y 5 min respectivamente. Las concentraciones encontradas están por debajo de los criterios establecidos por la Unión Europea donde se establece para cada PAH un límite de 2 µg/kg (*Comisión Europea, 2023b*). El uso de SPE permitió manejar entre 50 y 100 muestras diarias, con una recuperación superior al 80%. Como alternativa se probó la dispersión en fase sólida de la matriz (MSPD) pero resultó menos ventajosa y por tanto no fue efectiva ya que cada muestra debería de tratarse de forma individual sin posibilidad de poder trabajar en serie. Las columnas cortas se utilizan para hacer un análisis más rápido utilizando el HPLC y, por tanto, permitieron detectar BaP con la misma sensibilidad que las columnas estándar., pero en un tiempo menor. La aplicación de GC-MS de baja presión redujo el tiempo de análisis hasta cinco veces en comparación con la técnica de GC-MS estándar. Por lo tanto, se seleccionó la primera como técnica cromatográfica de elección para el análisis de BaP.

Purcaro y colaboradores (*Purcaro et al., 2013*) utilizaron la SPME para el tratamiento de muestra, seguida de un análisis mediante GC-MS para la determinación de 16 PAHs en muestras de AOVE y muestras de AOO, entre otros aceites vegetales. Las muestras fueron adquiridas en un mercado local. Las concentraciones encontradas están por debajo de los criterios establecidos por la legislación de la Unión Europea para varios PAHs. (*Comisión Europea, 2023b*)

En la tabla 8.2 se muestran las concentraciones de PAHs, encontradas en AOVE y en AOO.

Tabla 8.2. Concentraciones de PAHs encontradas en AOVE (*Purcaro et al., 2013*).

PAHs	AOVE(µg/kg)	AOO(µg/kg)
BaA	0,16	0,21
Ch	0,81	0,19

BbF	<LOQ	1,20
BkF	<LOQ	0,68
BjF	<LOQ	0,72
BeP	<LOQ	0,31
BaP	<LOQ	0,52
IP	0,35	0,57
DBahA	<LOQ	0,42
BghiP	0,24	0,55

Vichi y colaboradores (*Vichi et al., 2005*), llevaron a cabo un estudio en el que se utilizó como tratamiento de muestra la HS-SPME, seguida de una detección mediante GC-MS, para la determinación simultánea de hidrocarburos aromáticos volátiles y semivolátiles en 10 muestras de AOVE, obtenidas de comercios locales.

Los contaminantes detectados fueron MAHs como benceno, tolueno y etilbenceno, seguidos de PAHs, como naftaleno, acenafteno, fluorantreno y pireno. .

En la tabla 8.3, se muestran las concentraciones de varios PAHs en las muestras de aceite de oliva virgen extra.

Tabla 8.3. Concentraciones de PAHs encontradas en muestras de AOVE (*Vichi et al., 2005*).

PAHs	Concentración (µg/kg)
Naftaleno	5–16
Fenantreno	8–26
Metilnaftaleno	n.q.-7
Acenafteno	0,4–1
Acenaftileno	0,4–5,7
Fluoreno	n.q.
Antraceno	n.q.-5
Fluoranteno	n.q.-11
Pireno	n.q.-11

(n.q., no especificado)

El Reglamento (UE) 2023/915 (*Comisión Europea, 2023b*) establece un límite máximo de 2 µg/kg para BaP y 10 µg/kg para los 4 PAHs principales. Los PAHs

de este estudio no están incluidos directamente en los límites máximos establecidos por la normativa actual para aceites de oliva.

Wu y colaboradores (*Wu & Yu, 2012*), analizaron las concentraciones de 16 PAHs en cuatro aceites comestibles recolectados en China (aceite de oliva, aceite de maní, aceite recolectado de una campana extractora de cocina y aceite de un puesto de comida frita). Los PAHs de las muestras de aceite se extrajeron mediante una LLE, luego se pasaron a través de un cartucho de SPE para su limpieza y posteriormente para su determinación se utilizó una GC-MS. La concentración media de PAHs para la muestra de aceite de oliva fue 827,27 µg/kg (con 770,83 µg/kg de PAHs ligeros y 56,44 µg/kg de PAHs pesados).

Se aplicó una mejora en el método de tratamiento de muestras, el cual consiste en un procedimiento mejorado de preparación de muestra, en el cual se produjo una extracción más eficiente de PAHs utilizando N,N-dimetilformamida (DMF) en lugar de otros solventes, lo que permite una extracción más eficiente de los PAHs del n-hexano. Esto reduce la interferencia de los lípidos durante el análisis. Otra de las mejoras fue disminuir la cantidad de triglicéridos y otros hidrocarburos presentes en la muestra, lo que facilita la identificación de los PAHs. También se obtiene mayor recuperación y precisión.

Moret y colaboradores (*Moret et al., 1997*), investigaron sobre 35 muestras de AOVE procedente de Italia, 9 muestras de aceite de oliva de Croacia, 9 muestras de aceites procedentes de supermercados locales y 2 muestras de aceite lampante tomadas en diferentes etapas del proceso de refinación. Para la determinación de PAHs, se utilizaron mejoras en el tratamiento de muestra en comparación con estudios anteriores. Estas mejoras incluyen, el uso de una LLE y una posterior SPE en lugar de cromatografía en columna, optimizando así el proceso de purificación. Para la determinación de PAHs se optó por el HPLC-FLD, que permitió una mejora en la sensibilidad y selectividad y por tanto mayor precisión para detectar PAHs. Los PAHs encontrados en las diferentes muestras de aceite, las concentraciones máximas y mínimas en las que se encuentran, el límite de detección y el porcentaje de recuperación se muestran en la tabla 8.4.

Tabla 8.4. Contaminantes totales encontrados en las muestras de AOVE. (Moret et al., 1997)

PAHs	Concentración (µg/kg)	Límite de detección (µg/kg)	Recuperación (%)
Naftaleno (Na)	No especificado	1,4	31,9
Fluoreno (Fl)	0,39 – 3,97	0,39	42,5
Fenantreno (Pa)	4,9 – 52,9	0,3	55,0
Antraceno (A)	0,04 – 3,01	0,07	65,0
Fluorantreno (F)	1,12 – 37,0	1,04	55,0
Pireno (P)	1,6 – 27,9	0,4	52,5
Benzo(a)antraceno (BaA)	0,02 – 2,29	0,19	50,0
Criseno (Ch)	0,09 – 1,89	0,32	57,0
Benzo(b)fluorantreno (BbF)	0,07 – 1,76	0,04	65,0
Benzo(k)fluorantreno (BkF)	0,01 – 0,63	0,012	92,2
Benzo(a)pireno (BaP)	0,03 – 1,21	0,015	87,0
Dibenzo(a,h)antraceno (DBahA)	0,02 – 1,28	0,05	82,0
Benzo(g,h,i)perileno (BghiP)	0,08 – 1,24	0,077	75,0
Indeno(1,2,3-c,d)pireno (IP)	0,02 – 1,24	0,18	80,0
Naftaleno (Na)	No especificado	1,4	31,9

Por tanto, las concentraciones de los diferentes PAHs se encuentran dentro de los límites establecidos por el Reglamento UE 2023/915 de la Comisión Europea, (Comisión Europea, 2023b) lo que asegura que los aceites analizados son seguros para el consumo.

Teixeira y colaboradores (*Teixeira et al.,2007*) analizaron 8 muestras comerciales de aceite de girasol, soja, y aceite de oliva virgen procedente de Portugal. Para la determinación de PAHs en las diferentes muestras, en concreto en las dos muestras de aceite de oliva virgen, se emplearon mejoras en el proceso de extracción que incluyó una LLE, seguida de una SPE. Esto mejoró la precisión en la cuatificación de PAHs en aceite de oliva. Para la determinación se empleó como técnica de análisis el HPLC-FLD.

Los contaminantes y las concentraciones encontradas en el aceite de oliva se muestran en la tabla 8.5.

Tabla 8.5. Contaminantes encontrados en las diferentes muestras de aceite de oliva procedentes de Portugal. (*Teixeira et al.,2007*)

PAHs	Concentraciones (µg/kg)
Naftaleno	2,68 - 10,64
Fenantreno	1,08 - 13,22
Fluoreno	0,08 - 1,53
Pireno	0,58 - 2,89
Benzo[a]pireno	0,17 - 0,27
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,36 - 0,45

Las concentraciones encontradas de PAHs en las muestras de aceite de oliva están dentro de los límites permitidos por el Reglamento UE 2023/915 (*Comisión Europea, 2023b*).

Pupin y colaboradores (*Pupin, 1996*), determinaron BaP, en 40 muestras de AO procedentes de Europa, Argentina y mezclas con aceites vegetales, vendidas en el mercado brasileño. La técnica de tratamiento de muestra utilizada fue una LLE, y la técnica de análisis empleada que se utilizó fue el HPLC-FLD.

La concentración de BaP, varía según el origen del aceite; en las muestras de aceite de oliva europeos tiene una concentración hasta 1,2 µg/kg, en los aceites de oliva importados de Europa pero envasados en Brasil presenta una concentración hasta 9,7 µg/kg.

Algunas de las muestras de este estudio exceden el límite permitido por el Reglamento UE 2023/915 (*Comisión Europea, 2023b*).

Ballesteros y colaboradores (*Ballesteros et al., 2006*), estudiaron la presencia de PAHs, en 15 muestras de AOV y refinado y 10 muestras de AOO de Andalucía. La técnica de tratamiento de muestra utilizada fue una mejora por lo que se utilizó la combinación de ionización electrónica y química, optimizando la limpieza con GPC para mejorar la eficiencia de extracción y limpieza de muestras. Como técnica de determinación de contaminantes se utilizó la GC-MS/MS. Los contaminantes encontrados y la concentración en la que aparecen en las distintas muestras de aceite se muestran en la tabla 8.6.

Tabla 8.6. Resumen de PAHs encontrados en las diferentes muestras de aceite de oliva. (*Ballesteros et al., 2006*)

Muestra	Benzo(e)pireno (µg/kg)	Benzo(a)pireno (µg/kg)	Benzo(k)fluorante no (µg/kg)	Benzo(g,h,i)perileno (µg/kg)
AOV	0,3-2,0	0,3-1,2	0,9–1,4	0,5-1,5
AO	1,0-2,2	1,0	1,0	1,2
AOO	0,8-88,7	0,8-37,4	0,8-1,4	1,0–77,5

Las concentraciones encontradas de contaminantes en algunas muestras de aceite de orujo de oliva presentaron niveles de PAHs superiores al límite de 2 µg/kg para BaP y otros PAHs, como lo establece el Reglamento UE 2023/915 (*Comisión Europea, 2023b*).

Arena y colaboradores (*Arena et al., 2024*), llevaron a cabo en este estudio la determinación de PAHs, en 10 muestras de AOVE, provenientes de productos italianos.

En el tratamiento de muestra, se aplicaron varias mejoras, la primera fue una LLE empleando acetonitrilo para la extracción de los contaminantes, posteriormente se produjo una simplificación del tratamiento de muestra mediante la eliminación de pasos de purificación y concentración. Posteriormente el análisis se realizó mediante GC-MS.

Para las concentraciones obtenidas de los PAHs analizados, no se reportan límites máximos específicos para los contaminantes BcFL y BghiP en la legislación actual de UE (*Comisión Europea, 2023b*).

9. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN ACEITE DE OLIVA

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los métodos utilizados para determinar ftalatos en aceites de oliva. En la Tabla 9.1 se muestra recogida la información más relevante de dichos métodos y a continuación se desarrollan cada uno de ellos de forma más detallada

Tabla 9.1. Métodos para la determinación de ftalatos en aceite de oliva (*Elaboración Propia*)

Muestra	Tratamiento de muestra	Técnica de análisis	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Concentraciones encontradas (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)	Referencias
AOVE AO AOO	GPC	GC-MS/MS	22-148	37-182	29-4700	71,1-112,2	(Cavaliere et al., 2008)
AOVE	Dilución con hexano	GC-MS	1-10	3-40	1,134–90	82-106	(Nanni et al., 2011)
AOVE AO	LLE DI-SPME	GC-MS/MS	< 70	156-523	127-7207	3-70	(Barp et al., 2015)
AOVE AO	LLE	GC-MS/MS	29	97	1310-7520	94-96	(Pereira et al., 2019).
AOVE	SPE	GC-MS	8-200	25-600	25-5000	62-100	(Ierapetritis et al., 2014)
AO AOO	Separación de fases	GC-MS	60-1970	90-2280	230-602000	87-100	(Kıralan et al., 2020)
AO	LLE SPE	HPLC-MS/MS	No especificado	5,5-59	14-4700	42-100	(Vavrouš et al., 2016)
AOV	SPME	GC-MS/MS	20-50	No especificado	112-840	83-99	(Rios et al., 2010)

AO	QUECHERS	GC-MS/MS	0,01-8,00	0,07-26,68	610-1850	70,11-115	(Wang <i>et al.</i> , 2022)
----	----------	----------	-----------	------------	----------	-----------	--------------------------------

(SPE, extracción en fase sólida; SPME, microextracción en fase sólida; DI-SPME, microextracción en fase sólida con inmersión directa; LLE, extracción líquido-líquido; GPC cromatografía de permeación en gel)

(AOVE, aceite de oliva virgen extra; AOO, aceite de orujo de oliva; AO, aceite de oliva) (GC-MS, cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas; GC-MS/MS, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tandem; HPLC-MS/MS, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem)

Cavaliere y colaboradores (*Cavaliere et al., 2008*), analizaron 16 muestras de aceite de oliva comercial (6 muestras de AOVE, 6 de aceite de oliva refinado y 4 muestras de AOO), obtenidas en supermercados en Italia. Las muestras se sometieron a un tratamiento GPC, para limpiar los compuestos de alta masa molecular, esto eliminó eficazmente las grasas y otros compuestos no deseados. Como técnica de análisis se empleó la GC-MS/MS, para detectar y cuantificar los ftalatos presentes en el aceite de oliva. Se detectaron 3 tipos de PAEs (DBP, BBP y DEHP), en los diferentes tipos de aceite. En la Tabla 9.2, se muestran los ftalatos encontrados en las tres muestras de aceite de oliva diferentes, la concentración de cada uno junto a los límites de determinación y de cuatificación determinados.

Tabla 9.2. Tipos de ftalatos encontrados en diferentes muestras de aceite de oliva. (*Cavaliere et al., 2008*)

Tipo de Aceite	PAEs	Concentración (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recuperación (%)
AOVE	DBP	152-368	33	46	101,1-110,7
	BBP	85-1750	22	37	100,0-112,0
	DEHP	439-1660	148	182	71,7-94,8
AO	DBP	96-394	33	46	101,1-110,7
	BBP	29-10	22	37	100,0-112,0
	DEHP	386-2660	148	182	71,7-94,8
AOO	DBP	163-490	33	46	101,1-110,7
	BBP	171-649	22	37	100,0-112,0
	DEHP	1270-4700	148	182	71,7-94,8

Se observa que el contaminante más común y con una concentración de hasta 4700 µg/kg en aceite de orujo de oliva es el DEHP.

Las concentraciones encontradas de DEHP (en algunas muestras superando 2660 µg/kg) están por encima del límite establecido por el Reglamento UE 2023/915 (*Comisión Europea, 2023b*) , que establece un límite de 1500 µg/kg para este compuesto en productos alimentarios.

Nanni y colaboradores (*Nanni et al., 2011*), investigaron los niveles de cuatro PAEs principales: (DEHP, DBP, DIB, DINP), en 172 muestras de aceites vegetales, incluidas muestras de AOVE procedentes de Italia. Para el

tratamiento de muestra se utilizó un inyector de desorción térmica en lugar de un pretratamiento complejo de extracción, lo que minimizó el riesgo de contaminación externa durante el análisis. Las muestras fueron preparadas con la adición de una solución estándar interna, mezcladas con hexano y luego inyectadas en el sistema GC-MS.

El sistema GC-MS, se utilizó como técnica de análisis, para la determinación de los diferentes ftalatos (DEHP, DINP, DBP, DIBP). En la Tabla 9.3 se muestran la concentración de los PAEs encontrados en la muestra de aceite de oliva.

Tabla 9.3. Concentración de PAEs en AOVE. (Nanni et al., 2011)

PAEs	Concentración en AOVE (µg/kg)
DEHP	1,134
DINP	1,722
DBP	90
DIBP	No especificado

Las concentraciones de los ftalatos de este estudio, DEHP, DINP y DBP, se encuentran dentro de los límites máximos establecidos por el Reglamento de la Unión Europea (Comisión Europea, 2023b). Establece para el DEHP un límite de 1,500 µg/kg, para el DINP 15,000 µg/kg y para el DBP, 300 µg/kg. En cuanto al DIBP, no tiene un límite específico regulado por el reglamento, por lo que no se aplica

Barp y colaboradores (Barp et al., 2015), investigaron 2 muestras de AOVE y una muestra de AO en un mercado local de Italia. Utilizaron una mejora en el tratamiento de muestra el cual implicó una LLE utilizando acetonitrilo para eliminar la mayor parte de los triglicéridos. Posteriormente se aplicó una DI-SPME para extraer los ftalatos antes del análisis GC-MS/MS

La técnica para el análisis, GC-MS/MS, se utilizó en modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM) para garantizar mayor sensibilidad en la detección y cuantificación de ftalatos. En la tabla 9.4, aparecen las distintas muestras de aceite de oliva analizadas, y los PAEs, encontrados junto a las concentraciones de cada uno.

Tabla 9.4. Ftalatos encontrados en las diferentes muestras de aceite de oliva. (Barp et al., 2015)

Muestras		Contaminantes encontrados (µg/kg)
Muestra 1	AOVE	DEP: 228
		DiBP:953
		DBP: 127
		DEHP: 618
		DiNP + DiDP: 5991
Muestra 2	AOVE	DEHP: 310
		DiNP + DiDP: 7207
Muestra 3	AO	DiBP: 944
		DEHP: 2341
		DiNP + DiDP: 1074

Las concentraciones encontradas de DEHP y DiNP+DiDP, superan los límites permitidos por el Reglamento de la UE 2023/1442, donde se establecen los límites que se aplican a materiales y objetos de plástico destinados a entrar en contacto con alimentos (Comisión Europea, 2023a). Por ejemplo, para el DEHP en la muestra de aceite de oliva común, alcanza los 2341 µg/kg, excediendo considerablemente los valores permitidos para materiales en contacto alimentos, donde el LME para el DEHP es de 1500 µg/kg.

Pereira y colaboradores (Pereira et al., 2019), realizaron un breve estudio sobre la presencia de ftalatos en muestras de aceite de oliva recogidas en el mercado europeo. Se recogieron 16 muestras de aceite de oliva recolectadas de 6 países europeos en el último trimestre de 2014. Las muestras incluían AOVE, AOV y AO. Las muestras se procesaron mediante una LLE usando acetonitrilo.

Se utilizó la GC-MS, como técnica de determinación, con modos de detección SIM y MS/MS para detectar los contaminantes. Los contaminantes detectados en las distintas muestras fueron DEHP, con una concentración promedio de 1310 µg/kg, en algunas muestras tiene un máximo de concentración de 7520 µg/kg; el DiNP, con concentración promedio de 1520 µg/kg teniendo en algunas muestras un máximo de 6290 µg/kg y la suma de DiBP+DBP, que se han encontrado en concentraciones menores que el límites de cuantificación.

El Reglamento de la UE 2023/1442, donde se establecen los límites que se aplican a materiales y objetos de plástico destinados a entrar en contacto con alimentos (*Comisión Europea, 2023a*) , nos indica que el LME para DEHP es de 1500 µg/kg, y para DINP, de 9000 µg/kg. En este estudio, 4 de las 16 muestras superaron el límite permitido para DEHP, alcanzando hasta 7520 µg/kg en una muestra. Por lo tanto, estas concentraciones no están dentro de los límites permitidos.

Ierapetritis y colaboradores (*Ierapetritis et al ., 2014*), analizaron 20 muestras de AOVE, que provienen de un área industrial. La técnica de tratamiento de muestra que se usó, reemplazó la técnica de extracción por cromatografía de exclusión molecular, esa técnica fue la SPE, lo que permitió reducir el uso excesivo de disolventes y mejorar la limpieza de las muestras. La técnica de análisis empleada fue la GC-MS.

Los ftalatos que se encontraron en el área industrial y su concentración aparecen en la tabla 9.5.

Tabla 9.5. Ftalatos encontrados en las muestras de AOVE en el área industrial (*Ierapetritis et al ., 2014*)

PAEs	Concentración (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
DBP	<25 - 150	8	25
DiBP	<25 - 700	8	25
DEHP	<50 - 5000	20	50
BBP	No detectable	20	50
DiNP	No detectable	200	600
DiDP	No detectable	170	500

La recuperación obtenida oscila entre 96 y el 100%, esto indica la precisión y la eficacia de la técnica de extracción aplicada.

Según el Reglamento UE 2023/1442 (*Comisión Europea, 2023a*), el LME para DEHP es de 1500 µg/kg y los niveles de DEHP encontrados en el área industrial llegan hasta los 5000 µg/kg , lo que excede significativamente el límite permitido.

Kıralan y colaboradores (*Kıralan et al., 2020*), llevaron a cabo una investigación, de 36 muestras de AO y AOO, entre las que había 12 de AO, 20 de AOVE y 4 de AOO

Las muestras se obtuvieron en mercados locales y supermercados en Turquía en agosto de 2019. Como tratamiento de esas muestras se utilizó un procedimiento basado en la separación de fases. Las muestras preparadas fueron analizadas por GC-MS. Se introdujeron algunas modificaciones menores respecto a métodos previos, como el uso de vidrio exclusivamente en el laboratorio para evitar la contaminación cruzada por ftalatos, lo que representa una mejora para reducir falsos positivos en la detección de estos compuestos.

Los principales contaminantes analizados fueron: DEHP, donde se encontraron en 28 muestras, con concentraciones desde 230 µg/kg hasta un máximo de 602000 µg/kg ;DBP y BBP, fueron detectados en pocas muestras, con concentraciones de hasta 500 µg/kg para DBP y 70500 µg/kg para BBP .

En cuanto a los límites de detección y cuantificación, cada ftalato tiene su valor determinado. En la tabla 9.6 se resumen los límites de detección y cuantificación para cada ftalato presente en las diferentes muestras.

Tabla 9.6. Límites de detección y cuantificación para los diferentes ftalatos. (*Kıralan et al., 2020*)

PAEs	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
DBP	60	90
BBP	1970	2280
DEHP	100	230
DINP	1370	1750
DIDP	1200	1400

De acuerdo con el Reglamento UE 2023/1442, (*Comisión Europea, 2023a*) las concentraciones de DEHP y DBP superan el límite permitido en algunas muestras.

Vavrouš y colaboradores (*Vavrouš et al., 2016*), determinaron ftalatos en 25 muestras de aceites comestibles, entre estas, 7 muestras de AO adquiridos en República Checa. La técnica de tratamiento de muestra utilizada para el aceite

de oliva, se basó en LLE con acetona-metanol, seguida de una limpieza mediante SPE. Posteriormente, se utilizó el HPLC-MS/MS como técnica de análisis para la determinación de ftalatos. En la tabla 9.7, aparecen los diferentes ftalatos, la concentración a la que se encuentran y los límites de cuantificación de cada uno.

Tabla 9.7. Concentraciones de ftalatos analizados en muestras de aceite de oliva procedentes de Republica Checa. (Vavrouš *et al.*, 2016)

PAEs	Concentración (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
DEP	<LOQ	13
DiBP	14-98	11
DBP	71-80	24
BBP	14-210	5,5
DEHP	560-4700	11
DiNP	110-1300	59
DiDP	40-1400	14

De acuerdo con el Reglamento UE 2023/1442, (Comisión Europea, 2023a), no todas las concentraciones de ftalatos encontrados, están dentro de los límites permitidos.

Rios y colaboradores (Rios *et al.*., 2010), analizaron 6 muestras de AOV. Las muestras fueron analizadas en duplicado a los 8,10 y 12 meses, y fueron almacenadas en botellas de vidrio o de PET (tereftalato de polietileno). Se utilizó como método de tratamiento de muestra la SPME, lo que permitió evitar la manipulación directa de las muestras, y así reducir la contaminación secundaria. Para el análisis y la cuantificación de los ftalatos se utilizó la GC-MS/MS. En la tabla 9.8, aparecen los diferentes PAEs analizados en las muestras de aceite de oliva.

Tabla 9.8. Ftalatos encontrados en muestras de aceite de oliva envasadas en PET o en vidrio. (Rios *et al.*, 2010)

PAES	Concentración máxima (µg/kg)	Material de envase
DIBP	216	PET

DBP	175	PET
BBP	211	PET
	112	vidrio
DEHP	840	PET
	237	vidrio

En la tabla se puede observar la diferencia de concentraciones obtenidas dependiendo del material de envase que se utilice para las muestras de AOV- En este estudio, las concentraciones de DEHP en PET 840 $\mu\text{g/kg}$ y DBP en PET 175 $\mu\text{g/kg}$, están dentro del límite permitido por el Reglamento UE 2023/1442 (Comisión Europea, 2023a).

Wang y colaboradores (Wang et al., 2022), analizaron 2 ftalatos DBP y DEHP en 10 muestras de AO adquiridas en un mercado local. El tratamiento de muestra se basó en una técnica modificada que combina QUECHERS con una purificación eficiente usando GCB y PSA, lo que reduce la interferencia de la matriz compleja de los aceites y mejora la sensibilidad del análisis. Se utilizó la GC-MS/MS como técnica de análisis para cuantificar los PAEs.

Según los límites establecidos por el Reglamento UE 2023/1442 (Comisión Europea, 2023a), el DBP no cumple, ya que el LME permitido para este compuesto es de 300 $\mu\text{g/kg}$, y se encontraron concentraciones de hasta 610 $\mu\text{g/kg}$, y el DEHP, cumple en algunas muestras, pero las concentraciones de hasta 1850 $\mu\text{g/kg}$ podrían superar el LME permitido de 1500 $\mu\text{g/kg}$

10. CONCLUSIONES.

Tras la revisión bibliográfica realizada sobre la determinación de PAHs y ftalatos en aceites de oliva, se obtienen las siguientes conclusiones:

- Los tratamientos de muestra habitualmente empleados para la determinación de PAHs se basan en las técnicas de microextracción en fase sólida (SPME), extracción en fase solida (SPE) y extracción líquido-líquido (LLE).
- La técnica de análisis más utilizada para la determinación de PAHs es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con espacio de cabeza (HS-GC-MS) ya que no requiere de un tratamiento previo de la muestra. También se ha usado con frecuencia la cromatografía de líquidos

de alta resolución (HPLC) con detector fluorométrico ya que algunos PAHs presentan fluorescencia.

- Los tratamientos de muestras empleados para la determinación de ftalatos utilizan habitualmente la extracción líquido-líquido (LLE), la microextracción en fase sólida con inmersión directa (DI-SPME) y la extracción en fase sólida (SPE).
- La técnica de análisis utilizada para la determinación de ftalatos es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Los ftalatos habitualmente encontrados en las muestras de aceite de oliva son DEHP, DBP y DINP.
- Los PAHs principalmente encontrados en las muestras de aceite de oliva son BaP, BaA, BbF y CHR
- Es muy importante controlar los materiales de envase para evitar la migración de ftalatos al aceite de oliva y, en general, a los alimentos, por lo que las regulaciones y prácticas de fabricación deben enfocarse en minimizar esta fuente de contaminación.
- Las concentraciones encontradas de ftalatos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en los aceites de oliva están, en la mayoría de los casos, por debajo de los límites máximos establecidos por la normativa de la Unión Europea y la norma comercial del COI. Por tanto, podemos considerar que la ingesta de aceite de oliva no es una fuente importante de ambos tipos de contaminantes para los consumidores.

11. BIBLIOGRAFÍA.

Consejo Oleícola Internacional. (2022). Trade Standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T.15/NC N° 3/Rev. 19. Obtenido de https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/12/Norme-comerciale-REV-19_ENK.pdf

Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25, 107-123. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>

- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), 412–431. doi:<https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Arena, A., Zoccali, M., Mondello, L., & Tranchida, P. Q. (2022). Direct analysis of phthalate esters in vegetable oils by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 396, 133721. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133721>
- Arena, A., Zoccali, M., Tranchida, P. Q., & Mondello, L. (2024). Cryogenic-zone-compression gas chromatography-mass spectrometry for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in extra virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1732, 465248. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465248>
- Ballesteros, E., García Sánchez, A., & Ramos Martos, N. (2006). Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1111(1), 89-96. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.101>
- Barp, L., Purcaro, G., Franchina, F. A., Zoccali, M., Sciarrone, D., Tranchida, P. Q., & Mondello, L. (2015). Determination of phthalate esters in vegetable oils using direct immersion solid-phase microextraction and fast gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 887, 237-244. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.039>
- Bertoz, V., Purcaro, G., Conchione, C., & Moret, S. (2021). A Review on the Occurrence and Analytical Determination of PAHs in Olive Oils. *Foods*, 10, 324. <https://doi.org/10.3390/foods10020324>.
- Bogusz, M. J., El Hajj, S. A., Ehaideb, Z., Hassan, H., & Al-Tufail, M. (2004). Rapid determination of benzo(a)pyrene in olive oil samples with solid-phase

- extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography–mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1026(1), 1-7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.044>
- Cavaliere, B., Macchione, B., Sindona, G., & Tagarelli, A. (2008). Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The determination of phthalates in olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1205(1), 137-143. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.009>
- Comisión Europea. (2004). Reglamento (CE) n.º 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, 1-18. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02004R1935-20210327>
- Comisión Europea. (2011). Reglamento (UE) nº 10/2011 de la Comisión sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L12/1, 1- 142. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02011R0010-20230831>
- Comisión Europea. (2022). Reglamento Delegado (UE) 2022/2104 de la Comisión de 29 de julio de 2022 por el que se completa el Reglamento (UE) N° 1308/2013 del Parlamento Europeo y el Consejo, en lo que respecta a las normas de comercialización del aceite de oliva. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L284,, 1-22. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32022R2104>
- Comisión Europea. (2023a). Reglamento (UE) 2023/1442 de la Comisión, de 11 de julio de 2023, por el que se modifica el anexo I del Reglamento (UE) n.º 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 177/45, 1-14. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/1442/oj/spa>
- Comisión Europea. (2023b). Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión de 25 de abril de 2023 relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los alimentos y por el que se deroga el Reglamento

- (CE) N° 1881/2006. Diario Oficial de la Unión Europea, L119, 1-55. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/es/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915>
- Consejo Oleícola Internacional. (Noviembre de 2022). Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T.15/NC(n.º 3/Rev. 19). Obtenido de <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2023/10/NC-REV-19-ESP.pdf>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food-Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA, 6, 1-114. doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.724>
- Faraji, M. Y. (2019). Recent Advances and Trends in Applications of Solid-Phase Extraction Techniques in Food and Environmental Analysis. *Chromatographia*, 82, 1207-1249. doi:<https://doi.org/10.1007/s10337-019-03726-9>
- Fasano, E., Cirillo, T., Esposito, F., & Lacorte, S. (2015). Migration of monomers and plasticizers from packed foods and heated microwave foods using QuEChERS sample preparation and gas chromatography/mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1015-1021. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.066>
- Freitas, F., & Cabrita, M. J. (2023). A Critical Review of Analytical Methods for the Quantification of Phthalates Esters in Two Important European Food Products: Olive Oil and Wine. *Molecules*, 28(7628). doi:<https://doi.org/10.3390/molecules28227628>
- García, A. (2017). Desarrollo de metodologías para la determinación de contaminantes en aceites de oliva. Cuantificación del contenido graso y humedad en aceitunas y orujo. [Tesis doctoral]. Universidad de Jaén.
- González, N. (2022). Desarrollos analíticos basados en técnicas en flujo, extracción en fase sólida y técnicas espectroscópicas para el análisis de alimentos. [Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur]. Repositorio Digital Institucional de la Biblioteca Central "Profesor Nicolás Matijevic" de la Universidad Nacional del Sur. Obtenido de <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/6227>

- González-Curbelo, M., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169–185. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>
- Heudorf, U. M.-S. (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(5), 623–634. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.07.011>
- Ierapetritis, I., Lioupis, A., & Lampi, E. (2014). Determination of Phthalates into Vegetable Oils by Isotopic Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 7, 1451–1457. doi:<https://doi.org/10.1007/s12161-013-9770-x>
- Jiang, D., Xin, C., Li, W., Chen, J., Li, F., Chu, Z., . . . Shao, L. (2015). Quantitative análisis and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils marketed in Shandong of China. *Food Chem Toxicol*, 83, 61-67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.06.001>
- Khairy, M. A., Kolb, M., Mostafa, A. R., EL-Fiky, A., & Bahadir, M. (2009). Risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Mediterranean semi-enclosed basin affected by human activities (Abu Qir Bay, Egypt). *Journal of hazardous materials*, 170(1), 389-397. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.04.084>
- Kıralan, S. S., Toptancı, İ., Abacıgil, T. Ö., & Ramadan, M. F. (2020). Phthalates levels in olive oils and olive pomace oils marketed in Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(8), 1332-1338. doi:<https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1766120>
- López, R. (2017). Estudio de la transferencia de los contaminantes orgánicos al aceite de oliva virgen durante el proceso de elaboración. [Tesis doctoral]. Universidad de Jaén.
- Moret, S. P. (1997). HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 205, 116–120. doi:<https://doi.org/10.1007/s002170050136>
- Nanni, N., Fiselier, K., Grob, K., Di Pasquale, M., Fabrizi, L., Aureli, P., & Coni, E. (2011). Contamination of vegetable oils marketed in Italy by phthalic acid

- esters. Food Control, 22(2), 209-214.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.05.022>
- Pereira, J., Selbourne, M. d., & Poças, F. (2019). Determination of phthalates in olive oil from European market. Food Control, 98, 54-60.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.003>
- Pupin, A. M. (1996). Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market. Food Chemistry, 55(2), 185-188. doi:[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00075-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00075-5)
- Purcaro, G., Picardo, M., Barp, L., Moret, S., & Conte, L. S. (2013). Direct-immersion solid-phase microextraction coupled to fast gas chromatography mass spectrometry as a purification step for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oil. Journal of Chromatography A, 1307, 166-171.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.068>
- Reuhs, B. L. (2017). High-Performance Liquid Chromatography. En S. S. Nielsen, & C. Springer (Ed.), Food Analysis (págs. 213–226). Food Analysis. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_13
- Rios, J., Morales, A., & Márquez-Ruiz, G. (2010). Headspace solid-phase microextraction of oil matrices heated at high temperature and phthalate esters determination by gas chromatography multistage mass spectrometry. Talanta, 80(5), 2076-2082.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.008>
- Salas, T. (2019). Determinación de compuestos del aceite de oliva virgen relacionados con enfermedades cancerígenas y neurodegenerativas. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Sevilla. Obtenido de <https://idus.us.es/handle/11441/91601?locale-attribute=en>
- Silano, V. B. (2019). Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzyl-phthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials. European Food Safety Authority. EFSA, 17(12). doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5838>
- Singh, L., Varshney, J. G., & Agarwal, T. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons formation and occurrence in processed food. Food

- Teixeira, V. H., Casal, S., & Oliveira, M. P. (2007). PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chemistry*, 104(1), 106-112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.007>
- Valavanidis, A. F. (2010). The role of stable free radicals, metals and pahs of airborne particulate matter in mechanisms of oxidative stress and carcinogenicity. En B. H. Springer (Ed.), *Urban Airborne Particulate Matter: Origin, Chemistry, Fate and Health Impacts*. Environmental Science and Engineering (págs. 411-426). doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-12278-1_21
- Vavrouš, A., Pavloušková, J., Ševčík, V., Vrbík, K., & Čabala, R. (2016). Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1456, 196-204. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.014>
- Vega, A. M., & Lopez, M. Y. (2017). Influencia de los métodos de procesamiento. En *Elaboración de aceites de oliva vírgenes* (págs. 129-130). Ediciones Mundi-Prensa. Obtenido de <https://books.google.es/books?id=aTA2DwAAQBAJ>
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2005). Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1090(1), 146-154. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.007>
- Wang, X., Sun, X., Wang, X., Qi, X., Wang, D., Jiang, J., . . . Li, P. (2022). Determination of 15 phthalic acid esters based on GC–MS/MS coupled with modified QuEChERS in edible oils. *Food Chemistry: X*, 16. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100520>

- Weggler, B. A., Gruber, B., Teehan, P., Jaramillo, R., & Dorman, F. L. (2020). Chapter 5 - Inlets and sampling. *Separation Science and Technology*, 12, 141-203. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813745-1.00005-2>
- Wu, S., & Yu, W. (2012). Liquid–liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils from China. *Food Chemistry*, 134(1), 597-601. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.155>