



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estudio de la presencia de cloropropanodiolos y glicidol en aceites vegetales y leches infantiles

Alumno: Marta Cañada Relova

Julio, 2020



Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

Estudio de la presencia de cloropropanodiolos y glicidol en aceites y leches infantiles

Alumna: Marta Cañada Relova

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marta Cañada", is centered on the page.

Jaén, Julio 2020

ÍNDICE

RESUMEN/ ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. GLICIDOL Y CLOROPROPANODIOLES.....	2
1.2. MECANISMOS DE FORMACIÓN.....	3
1.3. ALIMENTOS EN LOS QUE SE ENCUENTRAN	8
1.4. NIVELES MÁXIMOS DE 2-, 3-MCPD Y GLICIDOL EN LOS ALIMENTOS ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN	12
1.5. ESTRATEGIAS PARA LA MITIGACIÓN.....	13
2. OBJETIVOS	16
3. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA ACEITES VEGETALES.....	16
3.1. MÉTODOS INDIRECTOS	18
3.1.1. ETAPAS Y ESTRATEGIAS.....	18
3.1.2. MÉTODOS INDIRECTOS OFICIALES AOCS.....	22
3.1.3. OTROS MÉTODOS INDIRECTOS	24
3.2. MÉTODOS DIRECTOS.....	28
3.2.1. MÉTODOS DIRECTOS PARA EL ANÁLISIS DE ÉSTERES DE GLICIDOL	28
3.2.2. MÉTODOS DIRECTOS PARA EL ANÁLISIS DE ÉSTERES DE MCPD	32
3.3. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS	36
4. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA PREPARADOS INFANTILES	38
4.1. MÉTODOS OFICIALES AOAC.....	38
4.2. OTROS MÉTODOS	40
5. CONCLUSIONES.....	40
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41

RESUMEN/ ABSTRACT

En el presente Trabajo Fin de grado se han estudiado los distintos métodos analíticos para la determinación de glicidol y cloropropanodiolos en aceites vegetales y preparados infantiles. Tanto el glicidol como los cloropropanodiolos son un nuevo grupo de compuestos químicos. Ambos se forman durante el procesado de muchos alimentos. Entre ellos son de especial interés el 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD), que es el más abundante en los alimentos y su isómero 2-monocloropropano-1,3diol (2-MCPD) que se encuentra a concentraciones más bajas. Debido a la toxicidad y a la amplia presencia de MCPD y glicidol unidos a ácidos grasos en diversos productos alimenticios, la protección de la salud de los consumidores exige la mitigación y la vigilancia de su contenido. En especial, preocupa la detección de estos contaminantes en los preparados infantiles ya que estos son los que dan alimento a muchos bebés durante sus primeros meses de vida. Las diferentes estrategias desarrolladas hasta la fecha para el análisis de estos componentes, los factores críticos que afectan a la determinación y las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos desarrollados han sido revisados en este trabajo.

In the present end of degree work, the different analytical methods for the determination of glycidol and chloropropanediols in vegetables oils and infants preparations have been studied. These analytes are a new group of chemical compounds. Both are formed during food processing. Among them, it is of special interest the 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) which is the most abundant in the aliments, and its 2-monochloropropane-1,2-diol (2-MCPD) isomer. The 2-MCPD is found in a low concentrations. Due to the toxicity and the wide presence of MCPD and glycidol in various food products, the protecting consumer health requires mitigation and the monitoring its content. In special, the scientists are concerned about the detection of these contaminants in infant formula because these are the ones that feed many babies during the first month of their lives. The different strategies developed to date for the analysis of these components, the critical factors that affect rge determination, and the advantages and disadvantages of the different methods developed have been reviewed in this work.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GLICIDOL Y CLOROPROPANODIOLES

El glicidol y los cloropropanodiolos son contaminantes que actualmente han tomado especial interés debido a su descubrimiento en distintos alimentos de consumo diario. Puesto que son alcoholes, ambos pueden encontrarse tanto en forma libre como en forma de éster.

-Glicidol: el glicidol se trata de un líquido viscoso cuya estructura contiene un anillo epóxido y un grupo hidroxilo como se puede observar en la figura 1.

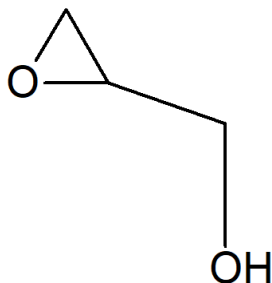


Figura 1. Estructura del glicidol.

Tanto el glicidol en su forma libre como los ésteres son ampliamente utilizados en la industria de la cosmética, farmacéutica y en la producción de polímeros. Los ésteres de glicidol han sido ampliamente utilizados como oxidantes en grasas y aceites (Swern et al., 1970). Fueron detectados por primera vez en aceite de palma en el que se formaban debido a las altas temperaturas en su preparación y a la presencia de gran cantidad de diglicéridos. Recientemente se han detectado junto con los cloropropanodiolos en otros aceites refinados y leches infantiles. Desde este momento se desarrollaron métodos para su análisis y se regularon legalmente (BfR, 2009; Crews et al., 2012; Weißhaar y Perz, 2010). Las propiedades toxicológicas del glicidol crean gran preocupación ya que es un potencial carcinógeno (grupo 2A) que además actúa mediante un mecanismo de acción genotóxico (IARC, 2000). Actúa de diferentes formas dentro del ser humano como puede ser provocando irritación en la piel, provocando mutaciones, dañando el sistema nervioso y ADN. Los ésteres son de baja toxicidad, el riesgo se encuentra debido a la liberación de glicidol libre que puede ser liberado gracias a las lipasas gastrointestinales de los seres humanos.

-Monocloropropanodiolos: son compuestos clorados derivados del glicidol. Están formados por tres átomos de carbono, dos grupos hidroxilo y un átomo de cloro. De entre todos, se pueden destacar el 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD), que es el más abundante en los alimentos y su isómero que aunque se encuentra en una cantidad menor, también importante: 2-monocloropropano-1,3-diol (2-MCPD), cuyas estructuras se pueden observar en la figura 2.



Figura 2. Estructura del 3-MCPD y 2-MCPD.

El 3-MCPD tiene efectos nefrotóxicos (toxicidad ejercida sobre los riñones). Recientemente, se han descubierto otras toxicidades como la hepatotoxicidad, la neurotoxicidad y la inmunotoxicidad. Además, tiene efectos negativos en la fertilidad masculina. En 2012, la *Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer* (IARC) clasificó al 3-MCPD como posible agente carcinógeno (grupo 2B), siendo el riñón el principal órgano afectado. Por otro lado, actualmente los estudios toxicológicos sobre el 2-MCPD son aún limitados. Parece que a pesar de tener una estructura similar al 3-MCPD, sus efectos son distintos, afectando principalmente al corazón y músculo estriado. Diversos estudios llevados a cabo en ratas han demostrado que los principales órganos afectados por los cloropropanodiolos son riñones, corazón, hígado y músculo estriado. Todavía no hay estudios que demuestren esto en humanos.

1.2. MECANISMOS DE FORMACIÓN

Para mejorar la aceptación del consumidor, los aceites comestibles se procesan industrialmente mediante la eliminación o modificación de componentes que pueden afectar negativamente la apariencia, el sabor, etc. Sin embargo, durante el desarrollo de estos procesos pueden darse cambios químicos indeseables y acabar en la formación de compuestos indeseados como los ésteres de glicidol, 3- y 2-MCPD.

Estos ésteres son contaminantes que no existen en los aceites vírgenes. Pueden producirse durante la etapa de desodorización por las elevadas temperaturas que se alcanzan.

-Ésteres de MCPD: el aceite está formado por una amplia variedad de lípidos que pueden interactuar con diferentes fuentes de cloro y llevar a la formación de MCPD durante el refinado de los aceites. El cloro procede de la descomposición térmica de compuestos que contienen cloruro; como se puede observar en la figura 3 dicha descomposición se produce en torno a los 180 °C. Esta temperatura coincide con el inicio de la formación de cantidades significativas de MCPDs. Conforme disminuye la cantidad de cloruro, la cantidad de MCPD aumenta, hasta que llega a cero. En este punto se ha consumido todo el cloruro presente en el medio y por tanto la formación de MCPDs cesa. (Weißhaar, 2011).

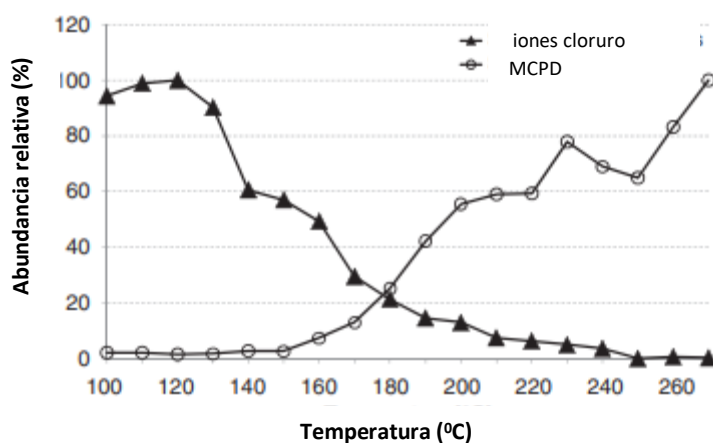


Figura 3. Influencia de la temperatura y cantidad de iones cloruro en la formación de los ésteres de MCPD (Fuente: Nagy et al., 2011)

El cloro se puede encontrar a niveles muy pequeños (ppm) en el aceite de palma crudo (Nagy, et al., 2011). Además, también se han encontrado un grupo de compuestos monoclorados que sufren transformaciones durante el refinado de estos aceites. En cuanto a los lípidos, se propuso que debía haber un enlace entre el contenido de diacilglicerol en los aceites refinados y los niveles de MCPD (Zelinkova, 2006). A esta conclusión se llegó ya que los niveles más altos se encontraron en aceites que se habían obtenido de la pulpa de la fruta. Estos aceites son conocidos por tener un alto contenido en diacilglicerol en comparación con otros aceites como los de semillas (Franke et al, 2009). Los lípidos que se encuentran en mayor porcentaje (90-

95%) (v/v) son los triacilglicerol. Los triacilglicerol pueden hidrolizarse dando lugar a diacilglicerol, monoacilglicerol, fosfolípido, etc. Estos lípidos reaccionan con las fuentes de cloro dando lugar a los ésteres de MCPD (Destailats et al, 2012a).

Todas las etapas para estudiar la formación de los MCPD se han llevado en condiciones parecidas a la desodorización ya que como se ha dicho antes los MCPD se forman casi por completo durante esta etapa. El 3-MCPD es el compuesto mayoritario (Destailats et al, 2012b), puede ser generado a partir de 180-200 °C. El proceso de desodorización se lleva a cabo a unos 240 °C, por lo que la formación de MCPD es posible. Los cloropropanodiol son liberados por la acción de las lipasas que se encuentran dentro del intestino grueso de los seres humanos, mediante una reacción de hidrólisis.

Existen dos mecanismos para la formación de los ester de MCPD:

- Uno de ellos consiste en la realización de una hidrólisis donde los triacilglicerol pasan a diacilglicerol. A continuación se produce una reacción con el cloro resultando en la formación del ion aciloxonio. Seguidamente se produce un ataque del ion cloruro al esqueleto glicerol. La formación de 3-MCPD y 2-MCPD alcanza un máximo con un contenido en agua del 15%. Si no hay agua en el medio, no se puede producir la hidrólisis y por tanto la reacción no se llevaría a cabo (Velíšek et al., 2002).
- El otro mecanismo consiste en la posibilidad de que los triacilglicerol actúen directamente como sustratos en la formación de los ésteres de MCPD a altas temperaturas, sin necesidad de transformarlos en diacilglicerol (Destailats et al., 2012a). Este mecanismo es descrito en la figura 4. En el camino de arriba, incluye la formación de un ión cicloaciloxonio (intermedio de reacción). En el de abajo, se produce una sustitución nucleofílica directa. Ambos caminos dan como resultado la formación de una molécula de éster de MCPD y la liberación de un ácido graso.

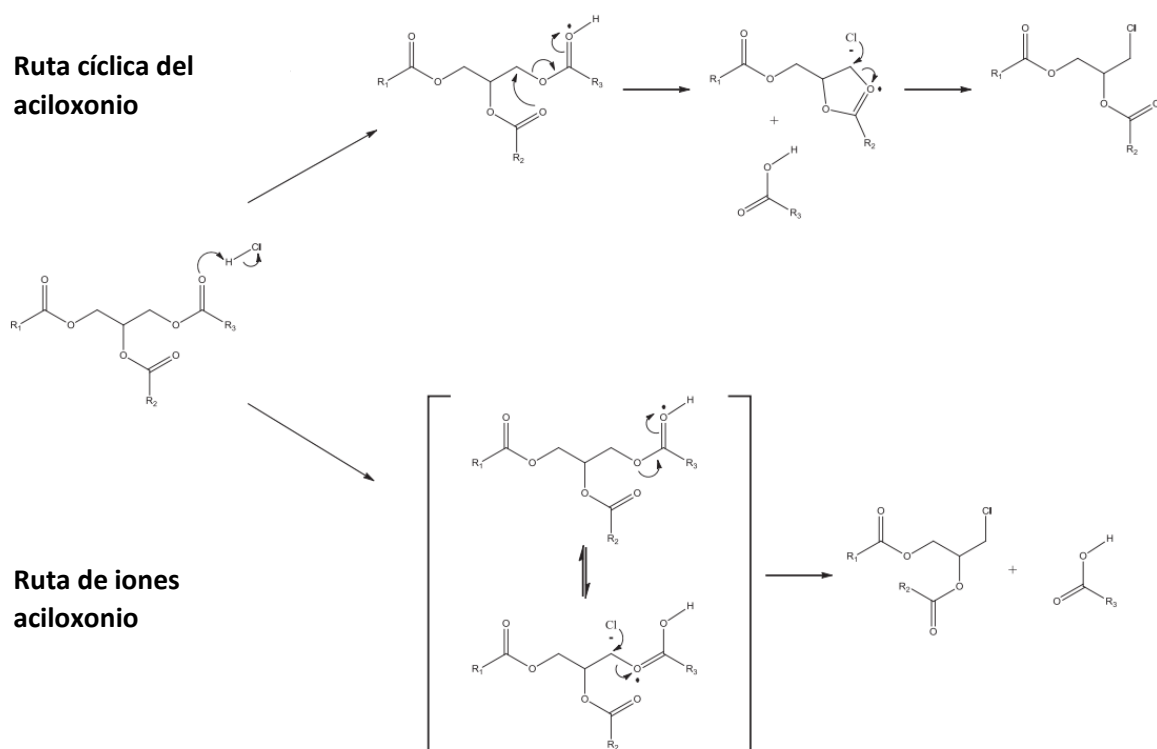


Figura 4. Mecanismo de formación de los ésteres de MCPD (Fuente: Destailats et al., 2012a)

-Ésteres de glicidol: La cantidad de glicidol está directamente relacionada con la de mono y diacilglicéridos. La formación de glicidol se encuentra favorecida por la presencia de diacilglicerol y por las altas temperaturas (Weißhaar y Perz, 2010). La formación de ésteres de glicidol a partir de los diacilgliceroles necesita temperaturas de unos 230 °C. Como se puede observar en la figura 5, la formación de ésteres de glicidol aumenta de forma significativa a partir de los 200°C. En torno a 240°C se alcanza la máxima formación de ésteres. Durante el proceso de desodorización, se alcanzan temperaturas de hasta 235 °C para eliminar del aceite compuestos volátiles que le dan un mal olor. Esta temperatura es próxima a la de máxima formación, por lo que la cantidad de ésteres de glicidol va a aumentar de forma significativa (Craft et al., 2012).

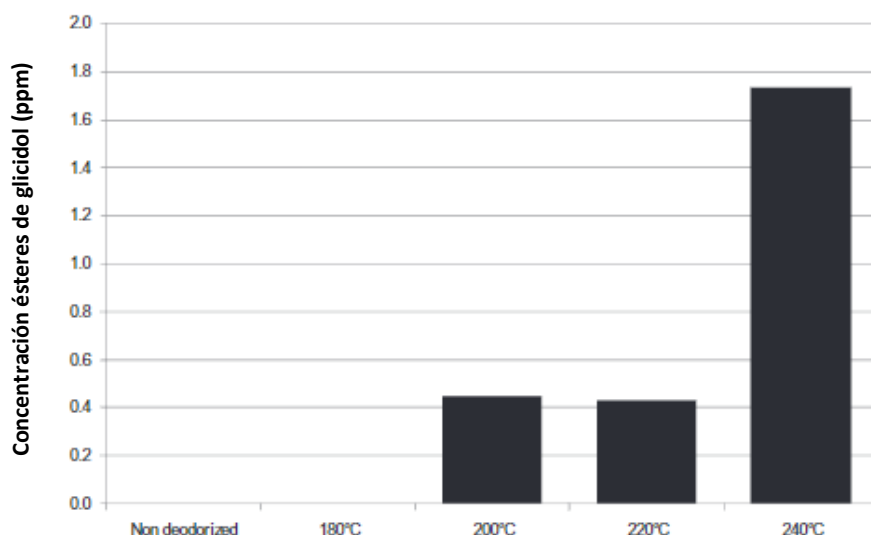


Figura 5. Influencia de la temperatura en la formación de los ésteres de glicidol.
Fuente: Craft et al., 2012.

Los ésteres de glicidol son formados en dos etapas:

1. En esta etapa se lleva a cabo el tratamiento térmico del diacilglicerol, donde se produce un reordenamiento molecular.
2. En la segunda etapa, se produce la pérdida de un ácido graso (Destailats et al., 2012b), como se puede observar en la figura 6.

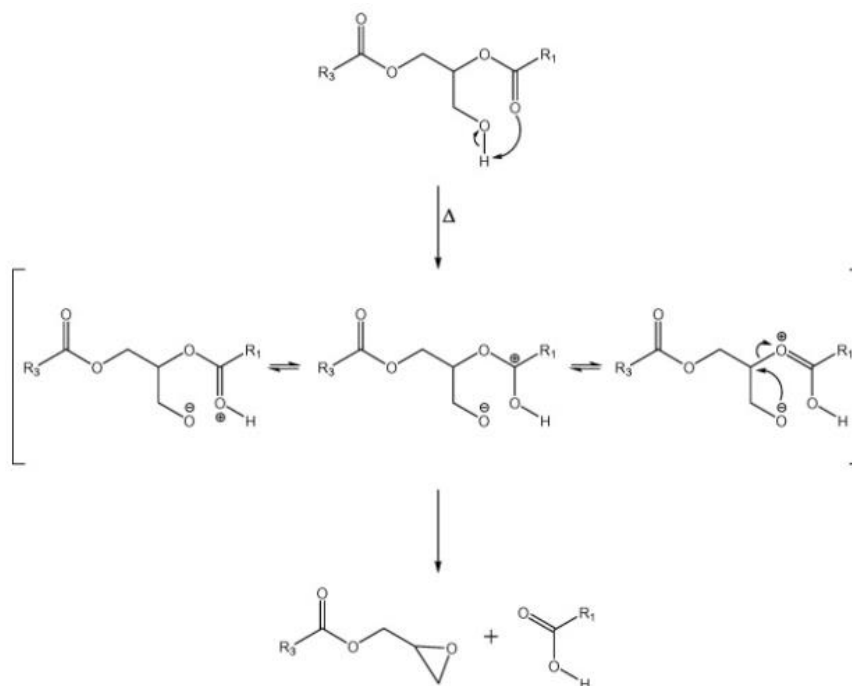


Figura 6. Mecanismo de formación del glicidol (Fuente: Destailats et al., 2012b).

1.3.ALIMENTOS EN LOS QUE SE ENCUENTRAN

El glicidol y los cloropropanodiolos se encuentran en una gran cantidad de alimentos como por ejemplo cereales, café, pan, pescado, carne, salsa de soja, etc. pero en mayor medida se encuentran en aceites refinados y fórmulas infantiles. Se encontraron por primera vez en la proteína vegetal hidrolizada (PVH-ácido) que se utiliza en la fabricación de muchos alimentos como potenciador del sabor. La formación de PVH-ácido se lleva a cabo a elevadas temperaturas. Con estas temperaturas se consiguen obtener los aminoácidos que forman dichas proteínas vegetales. Los cloropropanodiolos encontrados en mayor proporción en los alimentos son el 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) y el 2-monocloropropano-1,3-diol (2-MCPD). La PVH-ácido contiene entre 100-800 mg/kg de 3-MCPD y entre 10-90 mg/kg de 2-MCPD (Velíšek et al., 2002).

Estos contaminantes se desarrollan durante el refinado de grasas o aceites, por lo que todos los alimentos que contengan estas grasas y/o aceites van a estar contaminados también. Solo aparecen en aceites refinados ya que para su formación como se ha visto antes, necesitan unas temperaturas superiores a 140°C que solo se dan durante la refinación. Por ello aquellos aceites en los que no se haya llevado a cabo el proceso de refinación no tendrán estos contaminantes. También se encuentran en bollería industrial, patatas frita, etc. (Kuhlmann, 2012). El pescado ahumado puede tener cantidades considerables de 3-MCPD, además los pescados fritos son fuentes de 3 y 2-MCPD (Karl et al., 2016).

Hay alimentos que utilizan unas resinas en su producción que pueden llevar a la creación de cloropropanodiolos aunque no se alcancen elevadas temperaturas como puede ser el caso de las salchichas o el salami que contienen cantidades significantes de 3-MCPD. Además de su presencia en las resinas, la formación de cloropropanodiolos se puede deber a la interacción entre la grasa y la sal del producto junto con la larga vida de almacenamiento (Haile, 2017).

En 2016, la EFSA llevó a cabo un estudio sobre la presencia de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol en distintos alimentos. En este estudio, se realiza una evaluación sobre la exposición de las personas a estos contaminantes a través de la dieta, dividiendo los datos recogidos sobre contenido en MCPD y glicidol en tres grupos: (1) 3-MCPD (en forma libre) en salsa de soja, PVH y productos relacionados; (2) ésteres de 3- y 2-

MCPD y glicidol en aceites y grasas; (3) 3- y 2-MCPD (libres y esterificados) y glicidol esterificado en grupos de alimentos que no sean los mencionados anteriormente. En las tablas 1, 2 y 3 se muestran las concentraciones encontradas, respectivamente.

Como se puede observar en la tabla 1, los alimentos del grupo 1 que tienen valores medios más altos de 3-MCPD libre son PVH con 25 µg/kg y las mezclas de hierbas y especias con 23 µg/kg. Como se dijo en el apartado anterior, la PVH se utiliza en muchos alimentos como potenciador del sabor, por lo que se encuentra en alimentos como salsas, preparaciones de sopas, condimentos, etc. De ahí que presenten altas cantidades de 3-MCPD. Además, es importante señalar que en ciertos grupos de alimentos como condimentos, salsas saladas y secas para sopas suelen contener 3-MCPD esterificado. Por lo que el contenido puede estar subestimado para estos alimentos.

Tabla 1. Contenido de 3-MCPD libre en salsa de soja, PVH y alimentos relacionados. (Fuente: EFSA, 2016)

Grupos de alimentos	Media (min-máx.) µg/kg	Mediana (máx-min) µg/kg
Hierbas, especias	23 (19-27)	12 (8.3-24)
Condimentos o extractos	11 (9.3-14)	5 (0-10)
Cubitos de caldo	10 (8.5-13)	5 (0-10)
Salsas saladas	5 (0-10)	-
Salsa de soja	4.7 (1.3-8.2)	3.92 (0-6.6)
Aliño	8.8(7-10)	-
PVH	25 (22-28)	5 (0-10)
Preparación en seco para sopas	10 (8.7-12)	5.2 (2.7-9.7)

PVH: proteína vegetal hidrolizada.

En la tabla 2, se indican los valores de las concentraciones de los ésteres de 3- y 2-MCPD y glicidol en distintas grasas y aceites. Como se puede observar las mayores concentraciones se encuentran en el aceite de palma, girasol y maíz. Estos aceites provienen de semillas. Para su producción han tenido que pasar por un proceso de refinación donde se emplean altas temperaturas que favorecen la formación de estos contaminantes. Además, el aceite de palma es rico en diacilglicerol. Como se vio

en el apartado 1.2., los diacilglicerol favorecen junto con la temperatura a las altas concentraciones de estos contaminantes. De ahí que sea uno de los aceites con un mayor contenido en MCPDs y glicidol. En cuanto a las grasas, la margarina presenta altos valores. Esto coincide con otros estudios en los que se afirma que las grasas tanto de origen animal como vegetal son los alimentos que presentan las concentraciones más altas de estos compuestos (Weißhaar, 2011).

Tabla 2. Contenido de ésteres de 2- y 3-MCPD y glicidol en aceites y grasas. (Fuente: EFSA, 2016).

Grupos de alimentos	[3-MCPD] (min-máx.) µg/kg	[2-MCPD] (min-máx.) µg/kg	[glicidol] (min-máx.) µg/kg
Margarina y similares	408 (406-409)	341 (330-352)	175 (9175-176)
Margarina baja en grasa	218 (215-220)	104 (101-107)	140 (140-142)
Aceite de maíz	503 (502-505)	233	475
Aceite de oliva	48 (48-49)	86 (85-88)	15 (0-31)
Aceite de palma	624	270 (249-291)	320
Aceite de cacahuete	229	102 (90-115)	110 (85-135)
Aceite de colza	232 (224-239)	109 (78-140)	100 (100-110)
Aceite de soja	394 (392-396)	167 (159-175)	120 (120-140)
Aceite de girasol	521 (517-524)	218 (207-229)	200
Aceite de nuez	236	127	247
Aceite de coco	608	169 (143-194)	476 (472-479)

Como se observa en la tabla 3, los alimentos del grupo 3 que muestran un mayor valor de 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol son las galletas y los pasteles. Las leches infantiles también presentan una alta cantidad, por lo que es evidente la necesidad de desarrollar métodos eficientes para el análisis de estos alimentos dirigidos a una población particularmente vulnerable. Además, se puede observar como la cantidad de 2-MCPD es la mitad de la cantidad de 3-MCPD para casi todos los alimentos.

Tabla 3. Contenido de 3- y 2-MCPD (libre y esterificado) y glicidol esterificado en alimentos. (Fuente: EFSA, 2016).

Grupos de alimentos	[3-MCPD] (min-máx.) µg/kg	[2-MCPD] (min-máx.) µg/kg	[glicidol] (min-máx.) µg/kg
Leches infantiles	108 (108-109)	44 (31-58)	87 (80-94)
Pan de trigo	31 (24-37)	15 (10-19)	12 (11-12)
Pan de centeno	8.5 (1.9-14)	4.6 (0-9.3)	0.4 (0.08-0.6)
Pan centeno + trigo	11 (5.2-17)	6.1 (1.5-10)	0.8 (0.8-1)
Copos de cereales	12 (6.1-19)	8.7 (3.8-13)	6.3 (5.5-7.1)
Muesli	95 (88-102)	50 (46-55)	84 (83-85)
Porridge	8.8 (0.6-17)	5.9 (0-11)	3 (0-6)
Galletas	200 (194-206)	103 (98-107)	134 (134-135)
Pasteles	138(132-145)	71 (66-75)	102 (102-103)
Hojaldre	106 (100-112)	47(42-53)	21 (19-23)
Pasteles con levadura	133 (127-138)	65 (60-70)	81 (81-82)
Pescado frito	42 (42-43)	14 (13-15)	30
Carne asada	23 (17-29)	6.2 (0.2-12)	43 (42-44)
Pescado ahumado	18 (12-24)	6.1 (0.8-11)	5.8 (4.7-6.8)
Carne ahumada	24 (17-30)	6.2 (0.2-12)	27 (24-30)
Patatas fritas	57 (51-63)	23 (19-28)	41 (40-41)

En los últimos años, se han detectado niveles significativos en preparados infantiles. El origen de la contaminación radica en la utilización de aceites refinados en su elaboración. Dentro de los aceites utilizados, el aceite de palma es el más utilizado ya que es el que más se parece al perfil graso de la leche materna, tanto en su composición como en su textura. Además, muchos preparados infantiles contienen PVH-ácido como ingrediente. Según datos comunicados en el último informe de la EFSA (2016), se estima una media dietética a 3-MCPD de niños alimentados exclusivamente con fórmulas infantiles de 2.4 µg/kg de peso corporal por día. Teniendo en cuenta que la ingesta diaria tolerable (TDI) es de 0.8 µg/kg de peso

corporal por día, los riesgos para la salud son más que evidentes. En el caso del glicidol, los valores de exposición alimentaria variaron desde 1.8 a 2.1 µg/kg de peso corporal por día. Además, podemos concluir que actualmente los niveles más altos de ésteres de 3-MCPD se encuentran en grasas y aceites refinados.

De los anteriores datos recogidos por la EFSA podemos concluir que actualmente la exposición al 3-MCPD para los grupos de población “adolescentes” y adultos, la media es de 0.9 µg/kg al día, con un mínimo de 0.3 µg/kg al día y un máximo de 1.3 µg/kg al día. Estos valores se encuentran por debajo de la TDI. La exposición al 2-MCPD es más baja, entre 0.1 y 0.3 µg/kg al día. En cuanto al glicidol, en niños alimentados con leches infantiles se encuentra entre 1.8-2.1 µg/kg al día. En adolescentes y adultos se encuentra en torno a 1.4 µg/kg al día.

1.4. NIVELES MÁXIMOS DE 2-, 3-MCPD Y GLICIDOL EN LOS ALIMENTOS ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN

El 3-MCPD, junto con otros cloropropanodiolos, se detectó por primera vez en PVH-ácido y fue detectado algo después en salsas de soja (Velišek et al., 1980). En 2001 la Comisión Europea estableció unos niveles máximos de 3-MCPD de 20 µg/kg en salsa de soja y PVH-ácido, que se han mantenido hasta la actualidad. El *Comité Científico de la Alimentación Humana* estableció una TDI de 2 µg/kg de peso corporal (European Comision, 2001). En 2014, la Comisión Europea emitió una advertencia a los estados miembros sobre la necesidad del control de la presencia de 2 y 3-MCPD, de esteres de 2- y 3-MCPD y de esteres de glicidol en los alimentos (European Comision, 2014).

Tras el informe emitido por la EFSA en 2016, se redujo la TDI a 0.8 µg/kg. En noviembre de 2016, el comité experto Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos Alimentarios (JECFA) evaluó la presencia de estos contaminantes en diferentes alimentos. Tras este estudio, se estableció una nueva TDI para la suma de 3-MCPD y sus ésteres de 4 µg/kg por día, cinco veces superior a la establecida por la EFSA. Este cambio se debía a la diferencia entre el valor de referencia toxicológico calculado por la JCFEA con respecto al calculado por la EFSA. Por ello, la Autoridad Europea estableció una TDI de 2 µg/kg por día. La TDI no se supera en el caso de los adultos,

pero sí se puede apreciar una ligera superación en los consumidores de menos edad y en los lactantes que son alimentados con fórmulas infantiles.

En el caso del glicidol, no se reguló ni se estableció una ingesta diaria tolerable debido a los efectos neoplásicos atribuidos a sus esteres. Por lo que es recomendado que su ingesta fuera *“tan baja como sea razonablemente posible”*.

En febrero de 2018, las autoridades europeas ya establecieron un contenido máximo permitido de ésteres de glicidol en alimentos, concretamente en (1) aceites y grasas vegetales destinados al consumidor o para su uso como ingredientes, 1 mg/kg; (2) en aceites y grasas destinados a la producción de alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, 0.5 mg/kg; (3) en preparados para lactantes, preparados de continuación y alimentos para usos médicos especiales destinados a los lactantes y niños de corta edad en polvo o líquidos, 75 y 10 µg/kg, respectivamente (European Comision, 2018).

1.5. ESTRATEGIAS PARA LA MITIGACIÓN

Las técnicas de mitigación surgen a partir del descubrimiento de las propiedades toxicológicas del glicidol y de los monocloropropanodiolos. La mitigación debería de empezar con la selección de la materia prima o incluso en el cultivo de semillas y frutos. Para dicha mitigación pueden seguir tres estrategias:

1. Evitar los precursores en la materia prima y seleccionar las materias primas adecuadas: en la naturaleza hay muchas fuentes de cloro como en el suelo de plantación del aceite de palma, en el riego, en algunos fertilizantes y en el control de plagas. Otros factores pueden ser genéticos, años de los árboles, agronómicos, medioambientales y el transporte de la materia prima también pueden afectar a la composición final del aceite de palma (Poku, 2002). La selección de suelos pobres en sal y el uso de fertilizantes libres de cloro, herbicidas e insecticidas pueden ayudar a mitigar los ésteres de 3-MCPD y compuestos relacionados, pero todavía no se conoce el impacto que puede tener esta acción.

Para obtener el máximo aceite posible, el aceite de palma debe cosecharse cuando el fruto está maduro. Después del desprendimiento de los primeros frutos sueltos, el contenido de aceite alcanza su máximo. Pero el contenido en ácidos grasos libres

continúa creciendo ya que el exocarpio de la fruta se ablanda y es atacado por las enzimas lipolíticas más fácil (Lin, 2001; Poku, 2002). Por tanto la cosecha comienza inmediatamente después de detectar las primeras frutas sueltas para que el contenido en ácidos grasos y por tanto el de diacilglicerol sea el más bajo posible. El contenido en ácidos grasos libres aumenta un 2% en cuatro horas, por tanto se debe hacer un transporte rápido desde la zona de cosecha hasta el molino donde se va a producir la extracción del aceite. Por tanto es posible producir aceite con menor capacidad para formar ésteres de MCPD y ésteres de glicidol si se lleva a cabo un cuidado transporte de la cosecha (Zulkurnain et al., 2012).

2. Cambiar las condiciones de extracción del aceite, y las del proceso de refinación e introducir nuevas etapas en el proceso: actualmente no está claro de qué manera el proceso de extracción del aceite puede influir en la capacidad para formar MCPD y ésteres de glicidol. Un estudio realizado mostró la desaparición de cloruros en el proceso de extracción (Lin et al., 2012). A través del tratamiento térmico los organocloruros hidrofílicos se convierten en formas lipofílicas, lo que aumenta la capacidad de formación de ésteres de MCPD. Las investigaciones sugieren una revisión en los procesos de extracción. La extracción del aceite a partir de la pulpa del fruto fresco con un disolvente polar bifásico (hexano:agua 2:1) seguido de un tratamiento térmico dio como resultado la reducción de un 95% de ésteres de MCPD en comparación con la extracción con disolventes apolares (hexano:propanol 2:1). Además, los ésteres de MCPD se pueden reducir con un lavado donde se eliminan las sustancias que contienen cloro (Craft et al., 2012).

El proceso de la refinación es uno de los más importantes en la formación de los ésteres ya que durante este proceso se alcanzan altas temperaturas que favorecen dicha formación. En algunas etapas como el desgomado, el uso de ácidos podría favorecer la formación de precursores de los ésteres de MCPD. Se propuso un nuevo tratamiento para disminuir los ésteres que consistía en mezclar el ácido fosfórico con óxido de calcio antes del blanqueo del aceite para neutralizarlo. Se observó una reducción de los ésteres de MCPD entre 30-70% (Ramli et al., 2011). Otra forma de reducir el contenido en ésteres de MCPD y glicidol es en la etapa de neutralización como se puede observar en la figura 7, la neutralización con hidróxido de potasio produce una disminución de la capacidad de formación de dichos ésteres en un 50% (Pudel et al., 2011).

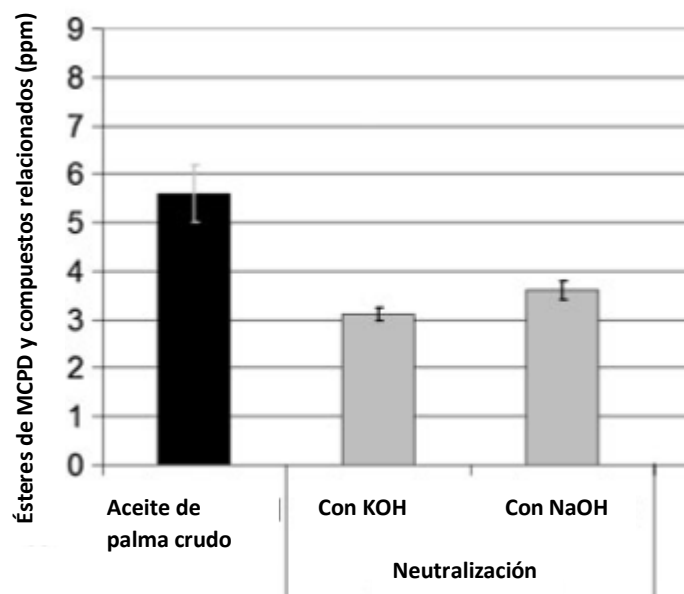


Figura 7. Efecto de la neutralización con diferentes soluciones alcalinas en la formación de ésteres de 3-MCPD y compuestos relacionados. (Fuente: Pude et al., 2011)

Durante la etapa de blanqueamiento, un pH ácido o básico de las tierras blanqueadoras puede favorecer la formación de ésteres de MCPD, por ello se recomienda el uso de tierras neutrales. Durante el proceso de desodorización, con una bajada de la temperatura se puede conseguir reducir la velocidad de formación de los ésteres de MCPD y glicidol. Pero iría acompañado de una bajada en la calidad del aceite. Por ello como alternativa, se plantea una desodorización suave compuesta por dos etapas. Una primera etapa con una alta temperatura sobre unos 250-270°C y una segunda etapa de baja temperatura sobre unos 200°C. Este método reduce la cantidad de ésteres de 3-MCPD y glicidol en un 80%. Esta alternativa ya se está comercializando (Pude et al., 2011). La adición de algunos aditivos como puede ser un alcohol resulta en la formación de aductos clorados volátiles que son eliminados durante la desodorización (Destailats et al., 2011).

3. Reducir los ésteres en la refinación del aceite con absorbentes adecuados o con tratamiento enzimático.

2. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado tiene como objetivo principal poner de manifiesto la problemática que representa la presencia de glicidol y cloropropanodiolos en numerosos alimentos de consumo diario y, en consecuencia, la necesidad de establecer métodos de análisis apropiados que permitan conocer los niveles de concentración de estos compuestos a los que está expuesta la población en general, y especialmente la infantil. Los objetivos específicos que se han establecido son:

- Revisar los niveles de concentración de cloropropanodiolos y glicidol habitualmente encontrados en alimentos, particularmente en aceites vegetales y leches infantiles.
- Revisar los métodos de análisis disponibles en la actualidad para la identificación y cuantificación de monocloropropanodiolos y glicidol en aceites comestibles. Discutir y comparar sus ventajas e inconvenientes.
- Revisar los métodos de análisis disponibles en la actualidad para la identificación y cuantificación de monocloropropanodiolos y glicidol en leches infantiles. Discutir y comparar sus ventajas e inconvenientes.

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA ACEITES VEGETALES

A la hora de analizar tanto los ésteres de glicidol como los de MCPD, existen varios problemas tecnológicos como por ejemplo la ausencia de un cromóforo adecuado que hace que la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detectores ultravioleta o fluorescentes sea inadecuada. Además el alto punto de ebullición limita el desarrollo de un método directo por cromatografía de gases. Así, como se puede observar en la figura 8, para la determinación de cloropropanodiolos y glicidol en aceites existen dos tipos de métodos: indirectos y directos.

Los métodos directos permiten la determinación de MCPD y glicidol sin necesidad de llevar a cabo ninguna transformación química, es decir de forma directa, mediante HPLC-MS/MS. En los métodos indirectos, en un primer paso se produce la liberación de los analitos de los ésteres y una vez determinados, los resultados son expresados como la cantidad total de cada uno de ellos que puede ser obtenida de sus

correspondientes ésteres, es decir “2-MCPD ligado”, “3-MCPD ligado” y “glicidol ligado”. En este método la medida se hace a través de CG-MS.

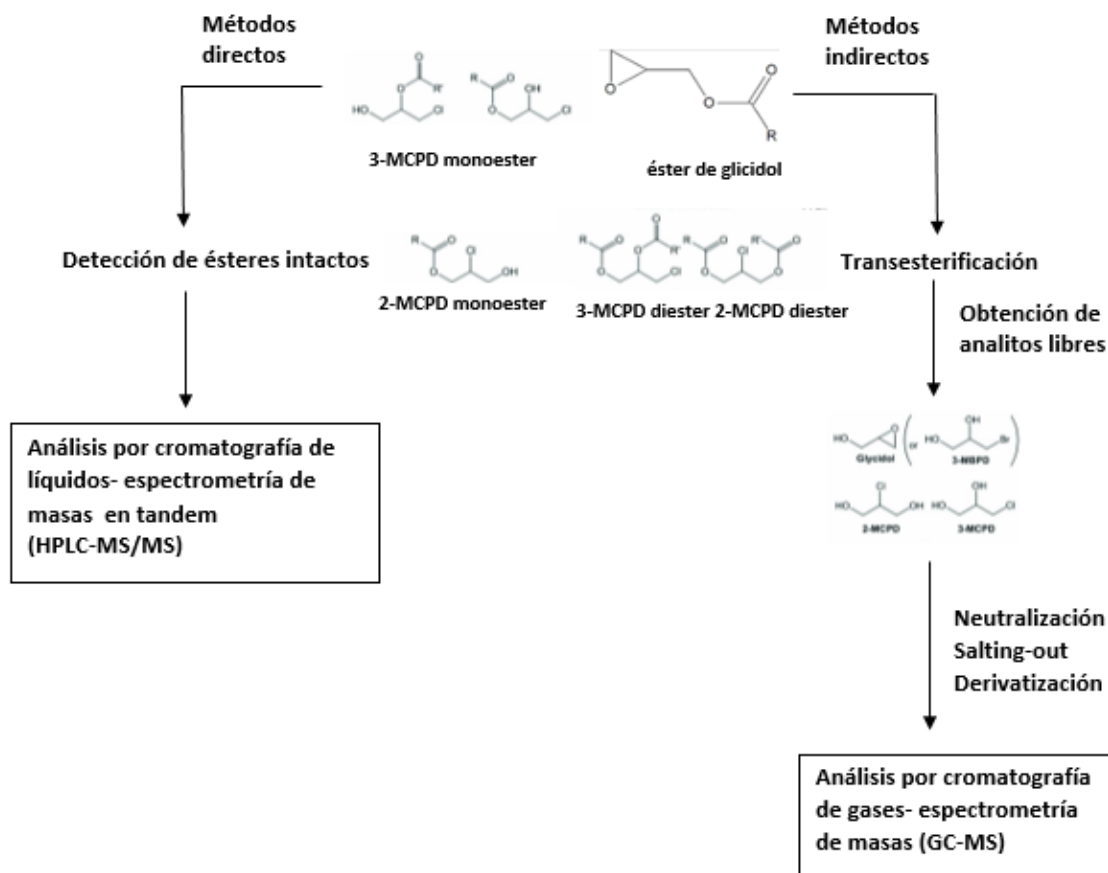


Figura 8. Esquema métodos de análisis de monocloropropanodiol y glicidol en aceite.

En marzo de 2007 se publicó el reglamento 333/2007, en el que se dan una serie de pautas que deben de cumplir todos los métodos de análisis seguidos para la determinación de 3-MCPD:

Tabla 4. Criterios de funcionamiento aplicables a los análisis para el 3-MCPD.

(Fuente: Unión Europea (UE), 2007)

Criterio	Valor recomendado	Concentración
Blancos de campo	Inferior al LOD	—
Recuperación	75-110 %	Todos
LOD	5 µg/kg (o menos) en materia seca	
LOQ	10 µg/kg (o menos) en materia seca	—
Precision	< 4 µg/kg	20 µg/kg
	< 6 µg/kg	30 µg/kg
	< 7 µg/kg	40 µg/kg
	< 8 µg/kg	50 µg/kg
	< 15 µg/kg	100 µg/kg

3.1. MÉTODOS INDIRECTOS

3.1.1. ETAPAS Y ESTRATEGIAS

A continuación se explican las etapas de las que generalmente constan los métodos indirectos:

-Adición de un patrón interno deuterado, necesario para la cuantificación de los cloropropanodiolos y glicidol. Se utiliza un patrón interno deuterado ya que ayuda a mejorar la reproducibilidad.

-Transesterificación: en esta etapa se produce la ruptura de los ésteres de MCPD y glicidol en presencia de metanol (metanólisis). De esta manera se obtiene el 2- y 3-MCPD y glicidol de forma libre. La metanólisis puede ser catalizada por sustancias ácidas o alcalinas, dando lugar a los dos tipos de transesterificación cuyas ventajas e inconvenientes vienen recogidos en la tabla 5, además de posibles mejoras para reducir algunas de sus desventajas.

Tabla 5. Transesterificación ácida y básica. (Fuentes: Wheißhaar, 2008; Ermacora y Hrnčirik, 2012; Kuhlmann, 2011a)

	Transesterificación ácida	Transesterificación básica
Ventajas	No hay degradación de 3- y 2-MCPD	Proceso rápido (5-10 min.)
Inconvenientes	El medio ácido cataliza las reacciones de sustitución nucleofílicas, lo que puede provocar la formación de MCPD en presencia de cloro	El 3-MCPD liberado es inestable, puede perder el átomo de cloro y convertirse en glicidol. Lo mismo ocurre para el 2-MCPD, aunque es más estable
Mejoras	Eliminación del cloro a través de una extracción líquido-líquido	Se ha ideado un nuevo método en el que se utilizan bajas temperaturas (reacción a -22°C) para reducir la degradación del 3-MCPD

La hidrólisis de los ésteres también se puede llevar a cabo mediante lipasas, aunque es poco común.

-Neutralización y *salting out*: durante la etapa de neutralización se detiene la reacción de transesterificación con la adición de un agente neutralizante. En el caso de la transesterificación ácida se utiliza hidrogenocarbonato de sodio y en la transesterificación básica se realiza con varios ácidos. Tras la neutralización, se lleva a cabo una etapa de *salting out* con una alta concentración de sales. Estas sales se añaden junto con el agente neutralizante o justo después de la neutralización. El objetivo de esta etapa es la purificación de la muestra para facilitar la extracción de los componentes lipofílicos. Para el análisis de 3-MCPD, se utilizan sales como cloruro de sodio, sales de sulfato y bromuro de sodio (Masukawa et al., 2010). Cuando se emplea el cloruro de sodio, el glicidol reacciona con el cloruro transformándose en 3-MCPD y en menor medida en 2-MCPD. El pH del medio es crítico en el rendimiento

de la reacción. Para evitar la reacción del glicidol con el cloruro se pueden llevar a cabo dos estrategias: (1) eliminación de los ésteres de glicidol antes de la transesterificación; (2) sustitución del cloruro de sodio por otra sal libre de cloruro. De esta manera, no se produce la conversión del glicidol a 3-MCP y se puede medir el 3-MCPD sin que interfiera el glicidol. Por diferencia se puede determinar el contenido en glicidol. En el caso de llevar a cabo una transesterificación ácida, el glicidol no se puede medir ya que se degrada irreversiblemente en este medio (Hrnčirik et al., 2011).

-Derivatización y análisis por CG-MS: el análisis por cromatografía de gases presenta varias ventajas como la rapidez, buena resolución, alta selectividad...Sin embargo, el rango de aplicación de GC está restringido por las características de los compuestos analizados, en concreto por su peso molecular, polaridad y estabilidad térmica. Los monocloropropanodiolos son moléculas con baja volatilidad y muy polares. Esto hace que su estudio por CG sea más complicado. Para aumentar su volatilidad se realiza una etapa de derivatización. El agente derivatizador más usado es el ácido fenilborónico (PBA). La reacción del ácido fenilborónico con el 2- y 3-MCPD se realiza mediante tratamiento ultrasónico a temperatura ambiente (Ermacora y Hrnčirik , 2012; Wheißhaar, 2008).

En la figura 9, se detallan algunas de las estrategias que se han seguido para la determinación de los ésteres de MCPD en presencia de los ésteres de glicidol.

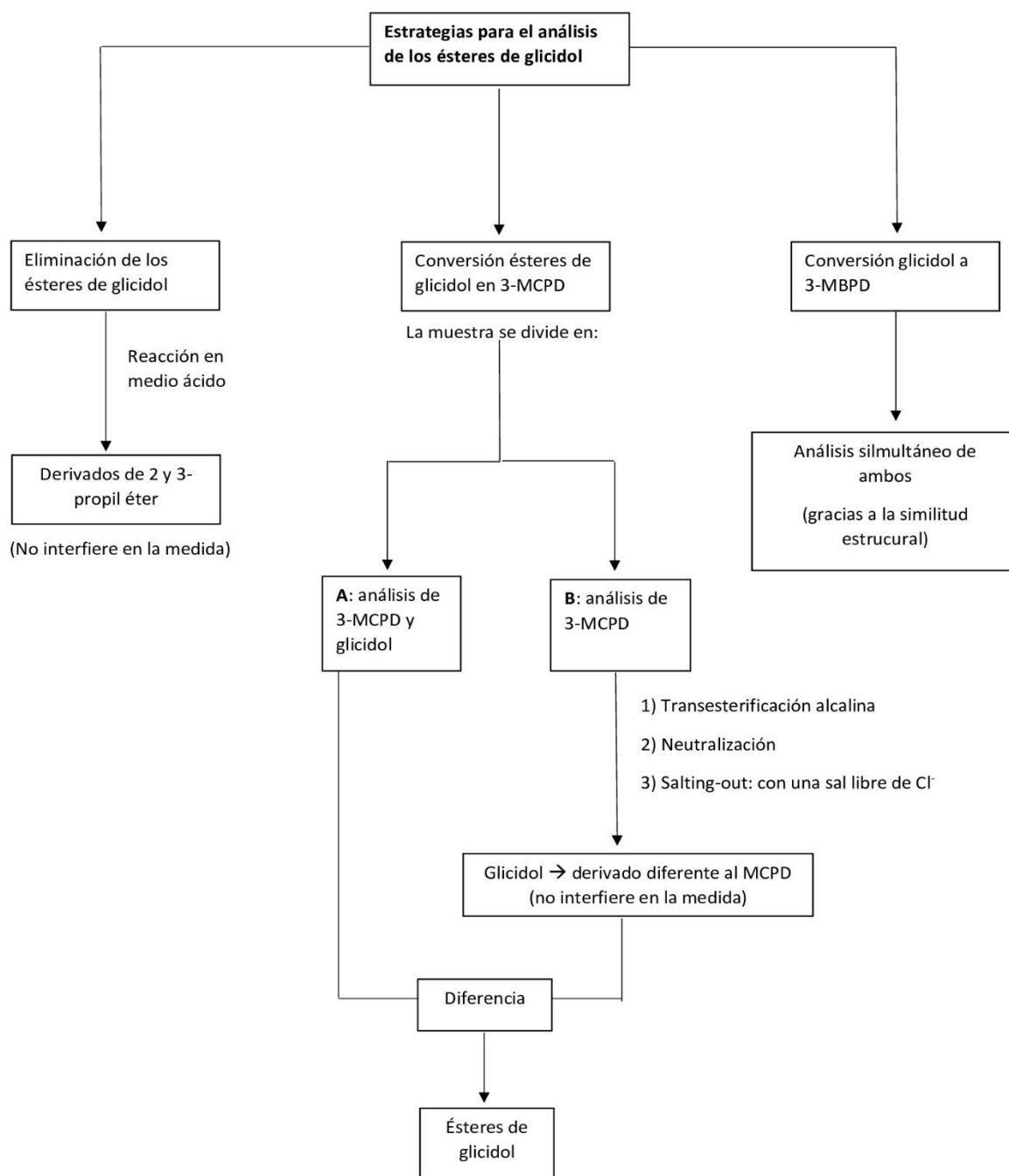


Figura 9. Estrategias para la determinación de los ésteres de MCPD en presencia de los de glicidol por métodos indirectos.

3.1.2. MÉTODOS INDIRECTOS OFICIALES AOCS

Varias etapas analíticas de las descritas anteriormente, se han utilizado para crear los diferentes métodos de análisis. A día de hoy son 3 los métodos normalizados por la AOCS (Sociedad Americana de Químicos de Aceites):

Estos tres métodos aplicables a la cuantificación de ésteres de 3-MCPD y glicidol en aceites comestibles y grasas.

-Método DGF: (DGF, 2011) en este método se realizan en dos ensayos: en el ensayo A, se determina la suma de los ésteres de 3-MCPD y ésteres de glicidol (expresados como 3-MCPD y glicidol unido). Mientras que en el ensayo B se determina la cantidad de los ésteres de 3-MCPD únicamente. La cantidad de ésteres de glicidol se calcula a partir de la diferencia entre los dos ensayos aplicando un factor no estequiométrico que representa la conversión de glicidol en 3-MCPD durante las etapas de preparación de la muestra.

Procedimiento seguido en los ensayos:

-Ensayo A: se disuelve una alícuota de aceite en ter-butil metil éter y se añade el patrón interno, en este caso: 1,2-dipalmitoil-3-MCPD pentadeuterado. La transesterificación alcalina se realiza a temperatura ambiente durante 3.5-5.5 minutos, por reacción con una solución metanólica de hidróxido de sodio (2% p/v) o metóxido de sodio (2.5% p/v). La mezcla de reacción se neutraliza con una disolución ácida de cloruro de sodio (20% p/v) que induce la conversión del glicidol en 2- y 3-MCPD. Los ésteres metílicos de ácidos grasos generados durante la transesterificación alcalina son eliminados de la mezcla de reacción a través de una extracción líquido-líquido con iso-hexano. Tanto el 2-MCPD como el 3-MCPD son extraídos con una mezcla de dietil éter y acetato de etilo (3/2 v/v) y derivatizados con ácido fenilborónico. Después de la evaporación de los disolventes orgánicos, que contiene al 2- y 3-MCPD derivatizados, se disuelve en isooctano antes del análisis por CG-MS. La cuantificación de los ésteres de 3-MCPD y glicidol está basado en la relación de señales 3-MCPD/3-MCPD-d5.

-Ensayo B: se toma una segunda alícuota de la muestra de aceite y se disuelve en ter-butil metil éter, el patrón interno utilizado es el mismo que para el ensayo A. La mezcla se somete a una transesterificación bajo las mismas condiciones que en el

ensayo A. Una vez completada la reacción, la mezcla se neutraliza mediante la adición de una solución ácida libre de cloruros, como por ejemplo bromuro de sodio. Dependiendo de la sal usada, el glicidol es convertido en los diferentes derivados (2- y 3-MBPD en el caso de usar NaBr) que no es cuantificado ni interfiere en la medida de los ésteres de 3-MCPD. Para la siguiente etapa de purificación y derivatización de los analitos se sigue el mismo procedimiento que en el ensayo A. Finalmente se lleva a cabo el análisis por CG-MS.

-Método SGS 3 en 1: (Kuhlmann, 2011a, b) El análisis seguido en este método no se basa en un análisis diferencial, pero si se requiere de dos ensayos separados para tener en cuenta la conversión parcial de 2- y 3-MCPD a glicidol en medio alcalino. Los ensayos A y B se aplican para la determinación de ésteres de glicidol y ésteres de MCPD respectivamente. El ensayo B también se utiliza para calcular la tasa de conversión de ésteres de 2- y 3-MCPD a glicidol durante la transesterificación alcalina.

Procedimientos de los ensayos:

-Ensayo A: se disuelve en dietil éter una alícuota de la muestra de aceite. Los patrones internos usados son 2- y 3-MCPD deuterado y glicidol deuterado. Se añaden a la muestra y se enfría a $-22^{\circ}\text{C}/-25^{\circ}\text{C}$. La reacción de transesterificación alcalina se lleva a cabo a la misma temperatura ($-22^{\circ}\text{C}/-25^{\circ}\text{C}$) durante 16 horas con una disolución diluida de hidróxido de sodio en metanol (0.25% p/v). La reacción se para con la adición de una solución de bromuro de sodio (60% p/v), que permita la conversión de glicidol a 2- y 3-MBPD. Posteriormente, la muestra es purificada por extracción líquido-líquido con iso-hexano y los analitos son extraídos con dietil éter/acetato de etilo (3/2 v/v) derivatizado con ácido fenilborónico. Finalmente se inyecta en el sistema CG-MS. La cuantificación de los ésteres de glicidol (expresada como glicidol ligado) está basada en la relación de señales 3-MBPD/3-MBPD-d5. A través del ensayo B se va a obtener un factor de corrección para compensar la conversión de MCPD a glicidol durante la transesterificación.

-Ensayo B: una segunda alícuota de aceite se disuelve en dietil éter. El patrón interno en este caso solo es el 2- y 3-MCPD pentadeuterado. El procedimiento seguido es el mismo que para el ensayo A. La cuantificación de los ésteres de 2- y 3-MCPD (expresada como 2- y 3-MCPD ligado) está basada en la relación de señales de 2-MCPD/2-MCPD-d5 y 3-MCPD/3-MCPD-d5 respectivamente.

-Método combinado Unilever: (Ermacora y Hrnčíčik, 2013) En este método se miden los tres analitos de manera simultánea bajo un mismo ensayo.

Procedimiento:

Una muestra de aceite es disuelta en tetrahidrofurano y el patrón interno (diésteres de 3-MCPD pentadeuterado y ésteres de glicidol pentadeuterado). Durante la primera etapa de preparación de la muestra, los ésteres de glicidol son convertidos en 2- y 3-MBPD monoésteres por la adición de una disolución acidificada de bromuro de sodio (0.1% p/v). Una vez completada la reacción, la fase orgánica, que contiene los ésteres de 2- y 3-MCPD y ésteres de 3-MBPD es separada y evaporada. El residuo es disuelto en tetrahidrofurano y se inicia la transesterificación ácida con la adición de una disolución alcohólica ácida (1.8% v/v), en concreto ácidos sulfúrico en metanol. Después de 16 horas a 40°C, la muestra es neutralizada. Seguidamente se añade una disolución acuosa de sulfato de sodio (20% p/v) para facilitar la eliminación de los ésteres metílicos de ácidos grasos generados durante la transesterificación. La muestra purificada, se derivatiza con ácido fenilborónico. Finalmente se analiza por CG-MS. La cuantificación de los ésteres de 2- y 3-MCPD (expresado como 2- y 3-MCPD ligado) está basada en la relación de señales de 2-MCPD/3-MCPD-d5 y 3-MCPD/3-MCPD-d5 respectivamente. La cuantificación de los ésteres de glicidol (expresado como glicidol ligado) está basada en la relación de señales de 3-MBPD/3-MBPD-d5.

El primer método desarrollado tenía una baja selectividad ya que los ésteres de glicidol fueron identificados junto con los ésteres de 3-MCPD. Más tarde se modificó el método de análisis donde se permitía una cuantificación separada de los contaminantes, los ésteres de glicidol se eliminaban con un tratamiento ácido.

3.1.3. OTROS MÉTODOS INDIRECTOS

En la tabla 6, se recogen las características de los métodos de la AOCS y otros métodos indirectos desarrollados en los últimos años para la determinación de ésteres de 2- y 3-MCPD y de glicidol basados en la transesterificación ácida, básica y enzimática.

Tabla 6. Métodos indirectos para la determinación de los ésteres de 2- y 3-MCPD y glicidol en aceites y grasas.

Método	Componentes analizados	Patrón interno	Condiciones transesterificación	Condiciones Salting out	Bibliografía
Método Weißhaar	Suma de ésteres de 3-MCPD y ésteres de glicidol.	3-MCPD-d5	Alcalina Temperatura: ambiente Tiempo: 10 min	NaCl (20% p/v)	Weißhaar(2008)
DGF C-VI 18: Análisis A + Análisis B	Ésteres de 3-MCPD y ésteres de glicidol	3-MCPD-d5	Alcalina Temperatura: ambiente Tiempo: 10 min	NaCl (20% p/v)	DGF (2009) Weißhaar y Perz (2010)
Método BfR 82 FC-009-01 y 02	Ésteres de 3-MCPD	3-MCPD-d5	Alcalina Temperatura: ambiente Tiempo: 9-10 min	(NH ₄) ₂ SO ₄ (40% p/v)	Wöhrlin et al. (2011)
Método DGF 18 (10): Análisis A+B	Ésteres de 3-MCPD y ésteres de glicidol	3-MCPD-diE-d5	Alcalina Temperatura: ambiente Tiempo: 3.5-5.5min	Análisis A: NaCl (20% p/v) Análisis B: NaBr (60% p/v)	DGF (2011)
Método SGS 3 en 1: Alícuota A+B	Ésteres de glicidol y ésteres de 2- y 3-MCPD	3-MCPD-d5/ 2-MCPD-diE-d5 3-MCPD-d5/ 2-MCPD-d5 Glicidol-E-d5	Alcalina leve Temperatura: -22/-25°C Tiempo: 16 h	NaBr (60% p/v)	Kuhlmann (2011a, 2011b)
Método ICT	Ésteres de 3-MCPD	3-MCPD o 3-MCPD-diE-d5	Ácida Temperatura: 40°C Tiempo: 16 h	NaCl (20% p/v)	Dininová et al. (2004); Zelinková et al. (2006)
Método BfR 82 FC-008-02	Ésteres de 3-MCPD	3-MCPD-d5	Ácida Temperatura ambiente durante 2 h en agitación + 40°C 16 h	(NH ₄) ₂ SO ₄ (40% p/v)	Wöhrlin et al. (2011)

Método	Componentes analizados	Patrón interno	Condiciones transesterificación	Condiciones Salting out	Bibliografía
Método Nestlé	Ésteres de 3-MCPD/ 2-MCPD	3-MCPD-d5 o 3-MCPD-E-d5	Ácida Temperatura: 40°C Tiempo: 16 h	NaCl (saturado)	Dubois et al. (2012)
Método estándar unilever	Ésteres de 3-MCPD/ 2-MCPD	3-MCPD-diE-d5	Ácida Temperatura: 40°C Tiempo: 16 h	Na ₂ SO ₄ (20% p/v)	Ermacora y Hrnčířík (2012)
Método combinado unilever	Ésteres de 3-MCPD/ 2-MCPD y ésteres de glicidol	3-MCPD-diE-d5 Glicidol-E-d5	Ácida Temperatura: 40°C Tiempo: 16 h	Na ₂ SO ₄ (20% p/v)	Ermacora y Hrnčířík (2013)
Método enzimático: Lipasa (Aspergillus oryzae)	Ésteres de 3-MCPD/ 2-MCPD	3-MCPD-d7	Temperatura: 23°C Tiempo: 24 h	-	Hamlet y Sadd (2004)
Método enzimático: Lipasa (candida antarctica)	Ésteres de 3-MCPD/ 2-MCPD	3-MCPD-diE-d5 2-MCPD-diE-d5	Temperatura: 40 °C Tiempo: 16 h	NaBr (30% p/v)	Chung y Chan (2012)
Método enzimático: Lipasa (Candida rugosa)	Ésteres de 3-MCPD y ésteres de glicidol	3-MCPD-d5 3-MBPD-d5	Temperatura: ambiente Tiempo: 30 min	NaBr (35% p/v)	Miyazaki et al. (2012)

En 2011, se hizo un estudio sobre los distintos factores críticos que afectan a la exactitud, selectividad y robustez de los métodos indirectos basados en la transesterificación alcalina y ácida. El principal resultado de la comparación fue que ambos enfoques permiten una determinación precisa y repetible de los ésteres de 3-MCPD y glicidol cuando se aplican estrictamente las condiciones descritas en sus respectivos protocolos analíticos (Hrnčířík et al., 2011).

En el mismo año, se llevó a cabo otro estudio basado en una comparación interlaboratorio destinada a evaluar la veracidad de diferentes métodos indirectos para el análisis de ésteres de 2 y 3-MCPD. Los métodos a análisis fueron dos con transesterificación ácida (método Nestlé y “Unilever standard method”) y uno con transesterificación alcalina (SGS 3-in-1). El estudio incluía 10 muestras de aceites comestibles de diferentes orígenes, composición y nivel de contaminación. Cada grupo analizó el conjunto de muestras de acuerdo con su propio método, validado internamente. Los resultados mostrados en las figuras 10 y 11, muestran una buena coincidencia entre los tres conjuntos de datos, para ambos analitos. Este estudio apoya lo dicho anteriormente, donde ambas transesterificaciones muestran una determinación precisa y repetible.

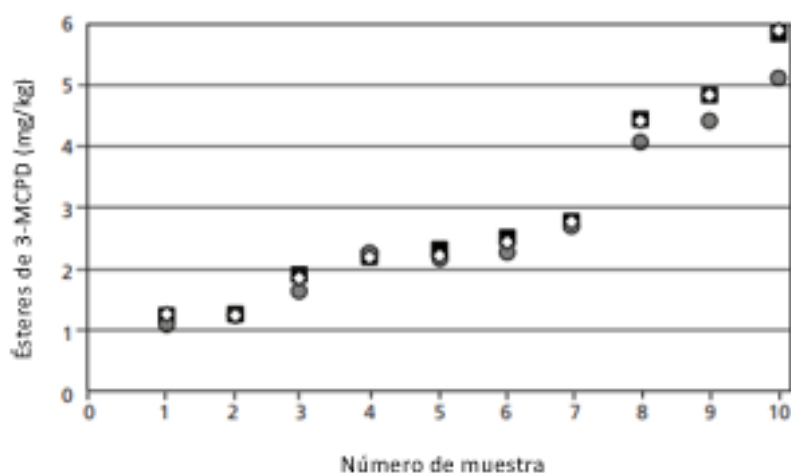


Figura 10. Niveles de 3-MCPD en las 10 muestras. Círculos: Nestlé. Rombos: Unilever standard method. Cuadro: SGS 3-in-1. (Fuente: MacMahon, 2014b)

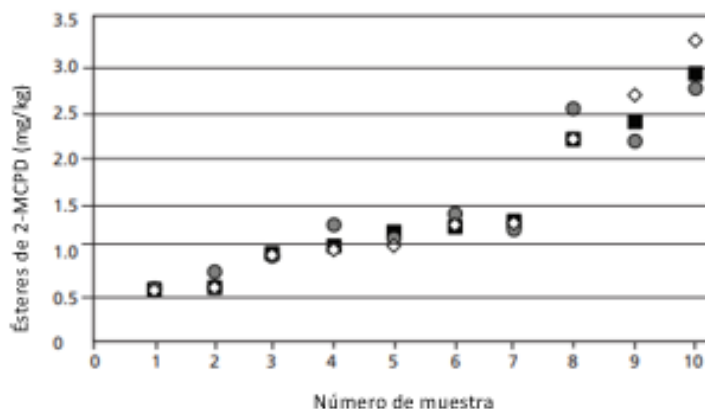


Figura 11. Niveles de 2-MCPD en las 10 muestras. Círculos: Nestlé. Rombos: Unilever standard method. Cuadro: SGS 3-in-1. (Fuente: MacMahon, 2014b)

3.2. MÉTODOS DIRECTOS

En general los métodos directos están basados en el análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (HPLC-MS) de las fracciones que se aíslan por cromatografía en columna, HPLC o a partir de las muestras de aceite diluido que no necesitan preparación de muestra. El desarrollo de métodos directos cuenta con un gran problema y es que se necesita un estándar para cuantificar cada monoéster o diéster. En el caso del 2- y 3-MCPD hay mayor dificultad ya que tienen dos grupos OH y hay multitud de combinaciones de ésteres posibles con ácidos grasos. En cuanto al glicidol, la situación es también compleja a pesar de que este forma sólo un éster con cada ácido graso. Los métodos directos para la determinación de los ésteres de glicidol están más avanzados que los métodos para los ésteres de MCPD. Estos métodos se desarrollaron con el objetivo de resolver algunos problemas que presentaban los métodos indirectos, ya que en algunos casos se sobreestimaban algunos de los analitos por interconversión. Uno de los retos más importantes en el desarrollo de estos métodos es la previa eliminación de los triacilglicerolés ya que influyen en la precisión y exactitud del método.

3.2.1. MÉTODOS DIRECTOS PARA EL ANÁLISIS DE ÉSTERES DE GLICIDOL

En un principio los métodos para el estudio de ésteres de glicidol fueron sólo indirectos. Estos métodos cuentan con bajos límites de cuantificación y detección y

con una pequeña biblioteca de estándares analíticos. Sin embargo, recientemente el análisis de ésteres de glicidol se ha llevado a cabo con análisis directos omitiendo la participación de reacciones químicas.

En el primer método desarrollado (Musakawa et al., 2010) se determinaron cinco ésteres de glicidol en aceite, aplicando una combinación de extracción en fase sólida y UHPLC-MS con ionización a presión atmosférica en modo positivo. La preparación de muestra consistió en una extracción con acetonitrilo y posterior extracción en fase sólida con un cartucho de C18 seguida por un cartucho de sílica. Gracias a esto se eliminaron una gran cantidad de acilgliceroles presentes en el aceite, lo que llevó a una mejora significativa de la robustez y la estabilidad del método. Más tarde se realizaron una serie de cambios en este método (Masukawa et al., 2011), donde se cambió el uso de UHPLC por HPLC. Lamentablemente, esta variación dio lugar a tasas de recuperación mucho más bajas de los ésteres de glicidol y mostró una precisión insuficiente. Además, la cantidad de aceite aplicada a la SPE se redujo diez veces, lo que dio lugar a una eliminación más eficiente de los diacilgliceroles. Las muestras se diluyeron con una mezcla de acetona/ cloroformo en lugar de acetonitrilo, lo que permitió el análisis de grasas sólidas.

En conclusión, el nuevo método mostró una mejor recuperación y menores límites de detección y cuantificación en comparación con el método original de 2010. Desafortunadamente, el nuevo método incluye el uso de un disolvente altamente tóxico (cloroformo). Por ello se hizo una nueva modificación (Shiro et al., 2011) donde se utilizó una combinación de disolventes para la preparación de las muestras: la acetona/cloroformo fue sustituida por una mezcla de terc-butil metil éter/ acetato de etilo y el eluyente utilizado en la limpieza SPE fue hexano/acetato de etilo. En 2013, se desarrolló un método en el que se utilizaba CG-MS. La inyección de la muestra se hizo en frío para evitar la formación de más ésteres de glicidol. Los límites de detección fueron más bajos que los métodos que utilizaban HPLC. A continuación en la tabla 7, se detallan algunos métodos directos para el análisis de glicidol en aceites vegetales.

Tabla 7. *Métodos de análisis directos para la determinación de glicidol en aceite.*

Método	LD/LQ	Calibración	Preparación de muestra	Columna cromatográfica	Fase móvil	Bibliografía
UHPLC-MS (APCI*) Modo SIM	LD: <20 pg LQ: 0.0045-0.012 µg/mL	Externa	Doble SPE: -Cartucho C18 -Cartucho sílica	Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2.1 mm (D.I))	A: acetonitrilo/metOH/agua (17/17/6) B: propan-2-ol	Masukawa et al., 2010
HPLC-MS (APCI*) Modo SIM	LD: 0.7-1.0 ng/mL LQ: 2.2-3.3 ng/mL	Externa	Doble SPE: -Cartucho C18 Cartucho sílica	150 mm x 4.6 mm D.I: 5 µm	A: acetonitrilo/metOH/agua (17/17/6) B: propan-2-ol	Masukawa et al., 2011
LC-MS (APCI*) Modo SIM	LD: 25-33 µg/kg LQ: 0.08-0.11 µg/kg	Patrón interno: Heptanodecanoato de glicidol	Doble SPE: -Cartucho C18 -Cartucho sílica gel	150 mm x 4.6 mm D.I: 5 µm	A: metOH B: propan-2-ol	Shiro et al., 2011
LC-TOF-MS (ESI*) Modo SIM	LD: 100 µg/kg (excepto para el miristato de glicidol: 290 µg/kg)	Patrón interno: [² H ₃₁]-palmitato de glicidol	Dilución de la muestra antes de la inyección	Luna C18 50 mm x 3 mm (D.I.), 100Å	A: MeOH/ acetatónitrilo/ acetato de metanol-sodio (8/1/1 v/v/v) B: diclorometano/ acetónitrilo/ acetato de metanol-sodio (8/1/1 v/v/v)	Haines et al., 2011

Método	LD/LQ	Calibración	Preparación de muestra	Columna cromatográfica	Fase móvil	Bibliografía
LC-MS/MS (APCI⁺) y 1LC-TOF-MS (APCI⁺)	LQ: 50-100 µg/kg	Adición de patrón: [13C4]-palmitato de glicidol, -oleato de glicidol, -linoleato de glicidol, -linoleato de glicidol	GPC combinado con SPE, cartuchos de sílica para aceites ricos en monoacilglicerolos y diacilglicerolos	LC-MS/MS: Luna C18, 50 mm x 3mm. D.I: 3 µm LC-TOF-MS: UHPLC 50 x 21 mm. D.I: 1.8 µm	LC-MS/MS: A: metanol/agua (75/75 v/v) B: propan-2-ol con 0.5% de ácido fórmico LC-TOF-MS: A: metanol/agua (75/75 v/v) B: propan-2-ol con 0.1% de ácido fórmico	Dubois et al., 2011
LC-MS (APCI⁺)	LQ: 40-160 ng/g LD: 200-600 ng/g	Patrón interno: [2H31]- palmitato de glicidol	Dilución de la muestra antes de la inyección	YMC-Pack ODS-AM C18 (150 mm x 3 mm) (3µm (D.I.), 120Å)	A: meOH/ acetonitrilo/ agua (125/125/150 v/v/v) B: acetona	Blumhorst et al., 2011
LC-MS/MS (APCI⁺) Modo MRM	LD: 5-10 veces menor en comparación con los métodos publicados anteriormente	Patrones internos: [2H5]-palmitato de glicidol, estereato, oleato, linoleato, linolenato	Doble SPE: -Cartucho c18 -Cartucho de sílica	Gemini C18 (250 mm x 2.0 mm (D.I), 5µm)	Modo isocrático 100% meOH	Becalski et al., 2012
GC-MS (APCI⁺) Modo MRM	LQ: <30 ng/g. LD: más bajo que los métodos que utilizan HPLC.	Patrones internos: [2H5]-palmitato de glicidol, estereato, oleato, linoleato, linolenato	Dos etapas de SPE con cartuchos de C18 y sílica	Pursuit XRs C18 (150 mm x 2.0 (D.I), 3µm)	A: MeOH/ agua (92/8 v/v) B: propan-2-ol/ agua (98/2 v/v) Ambas contienen: 2mM formiato de amonio/ 0.05% de ácido fórmico	MacMahon et al., 2013b

3.2.2. MÉTODOS DIRECTOS PARA EL ANÁLISIS DE ÉSTERES DE MCPD

Estos métodos se desarrollaron debido a la falta de fiabilidad de algunos de los métodos indirectos debido a las duras condiciones de hidrólisis. Los enfoques directos analizan los ésteres de MCPD sin liberar el MCPD del éster. Este tipo de métodos no fueron ampliamente utilizados antes de 2010 ya que los ésteres de 3-MCPD son compuestos apolares que no se determinaban bien por HPLC de fase inversa. Además, tienen una volatilidad bastante baja por lo que la separación por cromatografía de gases también sería difícil. Sin embargo, el avance de la tecnología y los nuevos tipos de columnas de cromatografía de líquidos han hecho posible el desarrollo de métodos directos.

En 2011, se realizó una determinación directa de ésteres de MCPD y ésteres de glicidol en aceites vegetales (Haine et al., 2011) utilizando HPLC combinada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (HPLC-TOF-MS), los resultados fueron más bajos que los obtenidos mediante el protocolo DGF (método indirecto). En 2012, se desarrolló un nuevo método en el que se realizaba una extracción doble en fase sólida y una columna de gel de sílice para separar y concentrar el 3-MCPD. Se llevó a cabo una cromatografía líquida de ultra-eficacia (UHPLC) con ionización de electrospray (ESI) y espectrometría de masas de tiempo de vuelo para la detección. Este método se comparó con el método indirecto de Nestlé (Dubois et al., 2012), resultando que este necesitaba menos estándares químicos, aunque requería una preparación de la muestra más compleja. Sin embargo el método directo proporcionó una información detallada sobre la identificación y concentración de los distintos ésteres de 3-MCPD. A partir de 2012, se desarrollaron un número creciente de métodos donde se combinaban la HPLC o UHPLC con espectrometría de masas de alta resolución para detectar directamente los ésteres de 2- y 3-MCPD (Li et al., 2015; MacMahon et al., 2013a; 2014a).

En resumen, los métodos analíticos directos para medir los ésteres de 3-MCPD tienen algunas ventajas como el perfil de los ésteres, requieren menos preparación de muestra, etc. El perfil es importante para las investigaciones toxicológicas. Sin embargo requieren instrumentos muy caros y cálculos posteriores complejos. A continuación en la tabla 8, se muestran algunos métodos directos para el análisis de MCPD.

Tabla 8. *Métodos de análisis directos para la determinación de cloropropanodiolos en aceites.*

Método	LOD/LOQ (µg/kg)	Técnica analítica	Columna	Fase móvil A	Fase móvil B	Gradiente	Modo de Ionización	Bibliografía
ADM	4-60/-	Sistema Agilent 1200 con TOF-MS	Phenomenex Luna C ₁₈ , 100Å (tamaño de poro) 50 x 3mm 3 µm partícula	10:80:10 0.26 mM acetato de sodio en MeOH: MeOH: acetonitrilo	10:80:10 0.26 mM acetato de sodio en MeOH: CH ₂ Cl ₂ : acetonitrilo	100% A 5 min, rampa a 35% A a los 15 min, 100% B hasta los 19 min, reequilibrar con 100% A hasta 24 min	Electrospray (ESI)	Haines et al., 2011
Procter y Gamble	-/20-30	Shimadzu 10vp HPLC con AB Sicex API 5000 espectrómetro de masas en modo SRM	Phenomenex Luna C ₁₈ , 100 Å (tamaño de poro), 50 x 2.1 mm, 3 µm partícula	90:10 3 mM acetato de amonio en MeOH: acetonitrilo	80:10:10 CH ₂ Cl ₂ : acetonitrilo: 3 mM acetato de amonio en MeOH	100% A durante 5 min., rampa de 35% A a los 15 min, 100% B hasta los 19 min., reequilibrar con 100% A	ESI, positive ion	Pinkston y Stoffolano, 2011
Institute of chemical technology	-	Accela UHPLC con Thermo Fisher Scientific Exactive Espectrómetro de masas orbitrap	Phenomenex Kinetix mibibore C8 (50x 2.1 mm, 1.7 mm)	90:10 MeOH: 10 mM formato de amonio en agua	10 mM formato de amonio en MeOH	0% y 0.4 mL/min a tiempo 0, rampa de 100% B y 0.5 mL/min a 2 min., mantener a 100% B y 0.6 mL/min hasta 7 min., 0% y 0.4 mL/min hasta 8.5 min.	ESI, positive ion	Moravcova et al., 2012.
Nestlé Research Center	20-50/100	Agilent 1290 UHPLC con espectrometría de masas Q-TOF	UHPLC HSS T3 VanGuard (5x 21 mm, 1.8 µm)	0.1% ácido fórmico, 10 mM formato de amonio en 75:25 MeOH:agua	0.1% ácido fórmico, 10 mM formato de amonio en isopropanol	100% A hasta 5% a 12 min, continua 5% A durante 3 min., acondicionamiento con 100%A durante 3 min	ESI positive ion	Dubois et al., 2012

Método	LOD/LOQ (µg/kg)	Técnica analítica	Columna	Fase móvil A	Fase móvil B	Gradiente					Modo de Ionización	Bibliografía
Fujil Oil Co.	~0.02 0.93/ ~0.08-2.02	Dionex Ultimate 3000 UHPLC con Bruker Daltonics MicrOTOF II TOF-MS	C18 VanGuard column (5x 2.1 mm, 1.7 µm) acoplado con UPLC BEH C18 (50x 2.1 mm, 1.7 mm)	0.2 mM formato de sodio en 85:15 agua: MeOH	0.2 mM formato de sodio en 97.5: 2.5 MeOH: agua	Rampa desde 85% B hasta 90% B en 4 min., rampa de 100% B en 8 min, 100%B hasta 26 min., vuelta a 85%B hasta 30 min					ESI positive ion	Hori et al., 2012
Kao Corporation	-	Agilent 12000 LC con sistema Agilent 6460 triple cuadrupolo LC-MS/MS	Columna ODS (4.6 mm x 150 mm, 5µm)	0.085 mmol/L acetato de amonio en 95:5 MeOH: agua	0.085 mmol/L acetato de amonio en alcohol isopropílico	Monoéster: 100%A durante los primeros 15 min., rampa 100%B hasta 20 min., vuelta a 100%A durante 5 min. Diéster: 80%A durante los 2 primeros min., rampa 100%B hasta 40 min., vuelta a 80%A hasta 45 min.					Ionización a presión atmosférica Positive ion	Shiro et al., 2012
Food and Consumer Affairs Bureau	-/0.02-0.08	HPLC con espectrometría de masas triple cuadrupolo	Phenomenex Luna C18, columna (2x 50 mm, 3µm)	A: agua B: 0.01 mol/L acetato de amonio en MeOH	C: MeOH D: alcohol isoamílico	Tiempo	A	B	C	D	ESI positive ion	Yamazaki et al., 2013
						0-3	30	10	50	10		
						3-10	2	10	88	0		
						10-11	2	10	45	40		
						11-22	1	10	89	0		
						22-30	0	10	85	5		
						30-35	0	0	0	100		
						35-40	30	10	50	10		
U.S. Food and Drug Administration Monoesters	10-60/30-180	Shimadzu Prominence UFLC con espectrómetro de masas	C ₁₈ (2 x 150 mm, 3 µm)	2 mM acetato de amonio y 0.05% ácido fórmico 75:25 MeOH: agua	2 mM formato de amonio y 0.05% ácido fórmico 98:2 alcohol isoamílico: agua	100% A y 0.200 mL/min durante 2 min. Paso a 70%A hasta los 15 min. Rampa de 35%A a 30.2 min. Hasta 0% A y 0.250 mL/min a 30.5 min. Minuto 40: vuelta a 100%A hasta 46.75 min y vuelta a 0.200 mL/min y 0%A a 47 min					ESI positive ion	MacMahon et al., 2013b

Archer Daniels Midland Company (ADM): en este método no se necesita limpieza de las muestras antes del análisis, se pesa con precisión una gota de aceite y se combina con una solución que contiene el patrón interno. La muestra es analizada por HPLC acoplada con espectrometría de masas (TOF-MS).

En el análisis de los monocloropropanodiolos a través del método indirecto DGF se presentaban una serie de errores como la conversión de algunos analitos en 3-MCPD. Esta hipótesis está respaldada por datos que demuestran que los aceites que no contienen ésteres de 3-MCPD usando el método ADM, presentan cantidades medibles de 3-MCPD usando el método estándar DGF. Por lo que el método ADM fue una mejora de la metodología indirecta. Sin embargo, este método no está exento de inconvenientes, la inclusión de sodio en la fase móvil tiene efectos perjudiciales en el sistema MS. La sal hace que el instrumento se ensucie más rápidamente y requiere una limpieza diaria. En el método “Procter and Gamble”, el acetato de amonio reemplaza a las sales de sodio, con esto se consigue evitar la problemática de las sales de sodio y además, los aductos de amonio de los ésteres de MCPD pueden fragmentarse por MS/MS, por lo que se corrigen los problemas de ionización del método ADM.

El método “Nestlé” presenta el primer intento de incorporar una estrategia de limpieza de muestra en el análisis de ésteres de MCPD. Los monoésteres de MCPD, junto con los ésteres de glicidol se separan de los triglicéridos mediante una limpieza de extracción en fase sólida en dos etapas. El método fue incapaz de distinguir entre mono y diésteres de MCPD isoméricos, requiriendo la cuantificación de picos cromatográficos individuales.

El primer método basado en cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) acoplada con espectrometría de masas triple cuadrupolo (QqQ MS) para ésteres de 3-MCPD en aceites comestibles fue el de “Fuji Oil Co.” Todos los analitos fueron separados en nueve minutos sin purificación de muestra. El sistema era preciso y sensible. El método será una herramienta poderosa para la investigación de ésteres de 3-MCPD.

3.3. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS

Los métodos indirectos presentan algunas ventajas ya consiguen la conversión de todos los ésteres de ácidos grasos a 3-MCPD, 2-MCPD y glicidol libre que lleva a límites de detección bajos con el uso de una pequeña librería de estándares analíticos. Sin embargo, los métodos directos requieren observar cada éster individualmente, por lo que la suma de los límites de detección de cada éster puede conducir a límites de detección más altos que los métodos indirectos. Además, necesitan una gran cantidad de estándares analíticos.

Los métodos directos también tienen algunas ventajas, ya que no requiere la hidrólisis de los ésteres. Por tanto los contaminantes son analizados tal como ocurren en los aceites y grasas sin transformación estructural. Esto elimina la posibilidad de creación o destrucción de 3-MCPD o 2-MCPD bajo las condiciones básicas o ácidas que se dan en los métodos indirectos. En condiciones de hidrólisis, también existe la posibilidad de interconversión entre 2-MCPD, 3-MCPD y glicidol. Además, se ha demostrado la sobreestimación de MCPD de los monoésteres porque se hidrolizan más rápidamente que los diésteres de MCPD correspondientes. En los métodos directos no hay que hacer transesterificación por lo que los errores durante la preparación de muestra disminuyen. Por otro lado los métodos directos dan información sobre la estructura de los ésteres, mientras que en los métodos indirectos no pueden aportar esta información.

Comparando los resultados obtenidos por el método directo con los obtenidos por el método indirecto se llegó a la conclusión de que los resultados no eran comparables. La aplicación de métodos indirectos dio como resultado niveles mucho más bajos de ésteres de glicidol. Esto llegó a suponer una posible eliminación incompleta de los ésteres de glicidol y sus componentes relevantes en aceites que eran ricos en acilglicerol. Finalmente, se llegó a la conclusión de que el método directo puede llegar a determinar con mayor precisión los niveles de ésteres de glicidol (Shimizu et al., 2010; Masukawa et al., 2011).

Una versión modificada fue estudiada en colaboración con la AOCS y se publicó como método oficial de la AOCS. Las muestras se disolvieron en una mezcla de terc- butil metil éter/acetato de etilo en un cartucho de sílice. El extracto se analizó mediante cromatografía líquida con espectrómetro de masas.

Los enfoques analíticos tanto directos como indirectos son métodos prácticos para estimar los ésteres de MCPD y glicidol pero sólo los métodos indirectos pueden analizar simultáneamente los ésteres de 2- y 3-MCPD y glicidol.

Comparando los niveles de ésteres de MCPD determinados por el método indirecto con transesterificación ácida con un método directo con purificación de la muestra a través de SPE con HPLC-TOF-MS como análisis (Dubois et al., 2012). Dado que el método directo no permitió la separación de los ésteres de 2- y 3-MCPD, para que los resultados fueran comparables, en el método directo también se expresó el resultado como la suma de los ésteres de 2- y 3-MCPD. Como se puede observar en la figura 12, los resultados mostraron una buena relación entre los dos métodos, esto confirma la fiabilidad de los métodos indirectos basados en la transesterificación ácida. Además la determinación a través del método indirecto presenta más ventajas ya que el número de estándares requeridos es menor para este tipo de análisis.

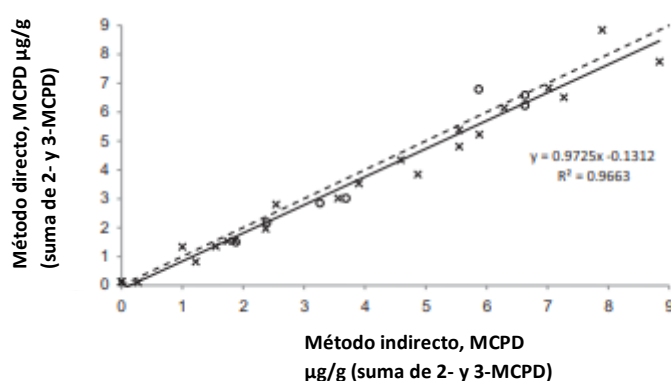


Figura 12. Niveles de MCPD analizados con método directo frente a los niveles de MCPD analizados con método indirecto. (Fuente: Dubois et al, 2012)

En el caso de ésteres de glicidol, el número de ésteres diferentes en las muestras de aceite y grasas es limitado entre cinco y siete, por lo tanto los métodos directos parecen ser más convenientes. Un estudio realizado donde se comparan un método directo basado en la purificación del aceite con una columna de sílica gel y el método indirecto SGS 3-in-1 en varias muestras de aceite, detalló que las diferencias entre los dos conjuntos de datos fueron inferiores al 10-15% para la mayoría de las muestras analizadas, lo que indica una buena correlación incluso para niveles altos de concentración y por tanto una buena precisión de los métodos (Granvogl y Schieberle, 2011).

4. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA PREPARADOS INFANTILES

La leche materna humana es la mejor y más valiosa, ya que contiene los nutrientes esenciales para mejorar el sistema inmune y proteger a los bebés de alergias e infecciones. Sin embargo, reemplazar la leche natural con fórmulas infantiles es cada día más común. Las fórmulas infantiles suelen contener aceites refinados. En la preparación de esta leche puede que la constitución del aceite cambie y por tanto el contenido en cloropropanodiol y glicidol se vea modificada. Por ello las técnicas seguidas para el análisis de estos contaminantes en las fórmulas infantiles sufren algunas modificaciones con respecto a los análisis en aceites. En preparados infantiles, la determinación de ésteres de MCPD y glicidol representa un reto en la actualidad. Este reto se debe a la complejidad de las matrices y a que estos productos se presentan con composiciones y estados muy diversos, como puede ser polvo, líquido concentrado, líquido preparado para consumir... La grasa de la leche, se encuentra rodeada de una capa de proteínas a través de una capa de fosfolípidos que es necesario destruir para la extracción de la grasa. Este proceso deberá llevarse con mucho cuidado para que no se produzca la interconversión de los analitos. Para el análisis de MCPD y glicidol en productos alimenticios que contienen grasa, como las leches infantiles, se dispone de un número limitado de métodos.

4.1. MÉTODOS OFICIALES AOAC

Actualmente, como se puede ver en la figura 13, sólo hay dos métodos validados por la AOAC para la determinación de MCPDs y glicidol en fórmulas infantiles (Dubois et al., 2019; Kuhlmann, 2019). En ambos métodos, se analizan tanto MCPDs libres como los ésteres de MCPDs y glicidol. Aunque hay una diferencia entre ambos métodos, en el primero (Método 1) se analizan por separados los ésteres y las formas libres, mientras que en el segundo (Método 2) se hace una determinación conjunta de ambas formas. Otra gran diferencia entre ambos métodos es la forma de extracción de la grasa. En el primero se realiza una extracción líquido-líquido con etil acetato y en el segundo se lleva a cabo una triple extracción con una mezcla de metanol y ter butil metil éter. Los analitos libres son derivatizados con ácido fenilborónico (PBA) y se mide mediante CG-MS. La conversión no deseada de 3-MCPD a glicidol durante la transesterificación alcalina se corrige aplicando un factor de transformación

representativo. Con este factor también se corrigen las variaciones de tiempo y temperatura que se hayan podido dar de manera inevitable durante la transesterificación.

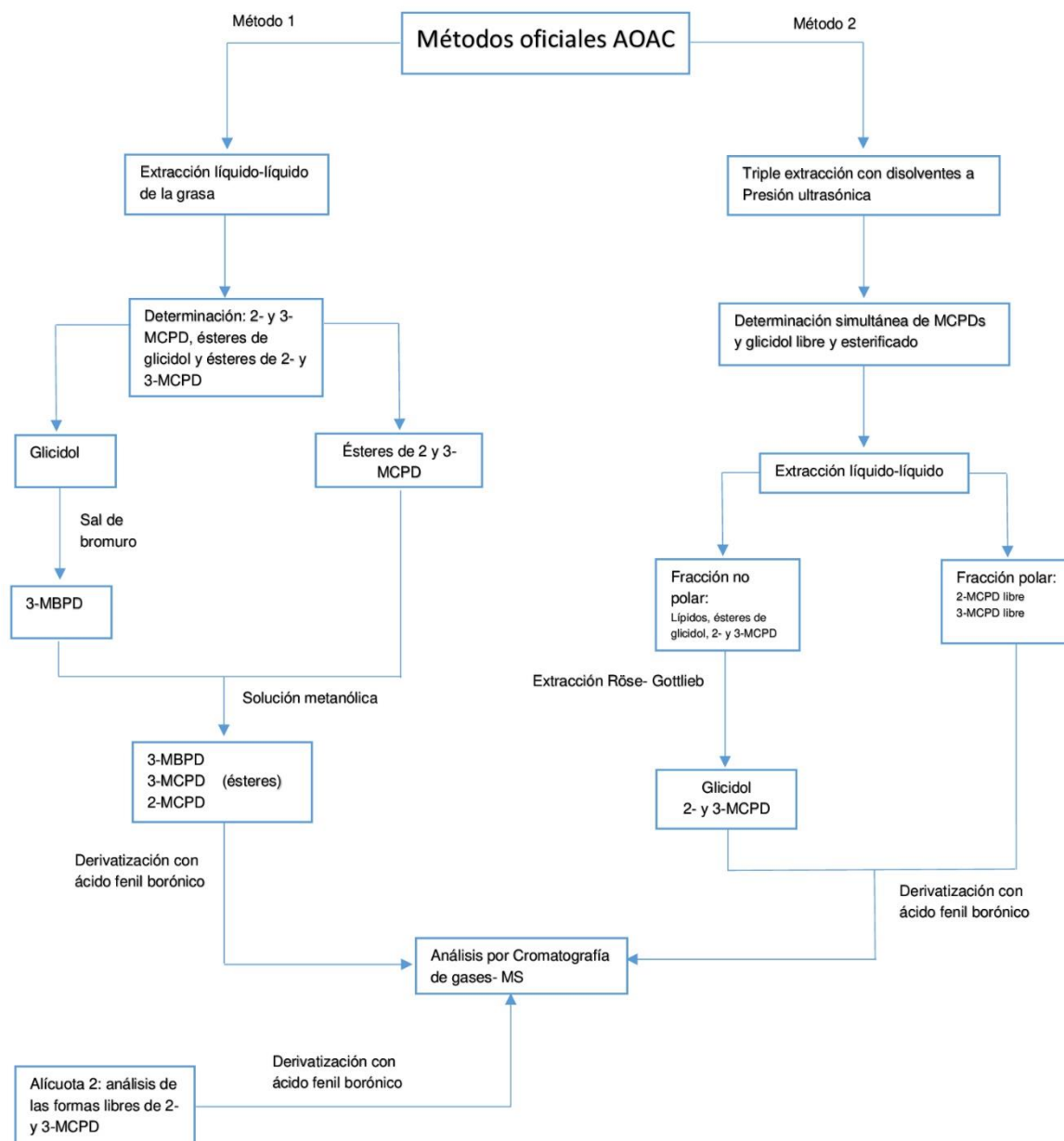


Figura 13. Métodos oficiales de la AOAC para el análisis de MCPDs y glicidol en preparados infantiles.

La matriz es eliminada mediante extracción líquido-líquido. Los analitos son derivatizados con ácido fenil borónico y medidos como derivados de dioxaborolano por cromatografía de gases-Masas (CG-MS). La calibración se lleva a cabo mediante

calibración interna, utilizando el compuesto pentadeuterado como patrón interno para cada analito.

4.2. OTROS MÉTODOS

EL desarrollo de métodos de análisis en fórmulas infantiles deberá llevarse con mucho cuidado evitando la no deseable interconversión de los analitos. En el 2015 se desarrolló un método en el que en primer lugar se extrajo la grasa de la fórmula infantil en polvo siguiendo la técnica de extracción acelerada con disolventes (ASE). Como disolvente de extracción se utilizó una mezcla de isohexano y acetona (80/20 v/v). El disolvente recogido se secó bajo una suave corriente de nitrógeno hasta peso constante. Se determinó el contenido de grasa gravimétricamente. Los ésteres de glicidol se convirtieron en ésteres de monobromopropanodiol (3-MBPD), que fueron derivatizados y analizados por CG-MS. En este estudio, se llegó a la conclusión de que la combinación de la extracción de gases con la técnica ASE junto con el análisis desarrollado por Ermacora y Hrnčič (2013) dio lugar a buenos resultados para el análisis de MCPD y glicidol en la grasa extraída de fórmulas infantiles. Este método tiene un límite de detección de 0.04 mg/kg para el 2- y 3-MCPD ligado y 0.06 mg/kg para el glicidol ligado. Además, se demostró que la extracción de grasa es un parámetro crítico del procedimiento que influye en la robustez del método. (Wöhrlin et al., 2015). En 2016 se desarrolló otro método que en comparación con los oficiales de la AOAC se lleva a cabo un análisis cuantitativo de los extractos libres mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). La extracción se lleva a cabo mediante una extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Después, se lleva a cabo un proceso de centrifugación y el extracto de grasa se limpia mediante extracción en fase sólida. (Leigh J. K., 2016).

5. CONCLUSIONES

Se han revisado y comparado los métodos desarrollados para el análisis de glicidol, 2- y 3-MCPD hasta la fecha en dos grupos de alimentos en los que se encuentran habitualmente: aceites y grasas y fórmulas infantiles. Las conclusiones obtenidas de este estudio son:

- Se necesita más información acerca de los efectos tóxicos que pueden causar estos contaminantes en los órganos humanos, el contenido de ésteres de MCPD y glicidol en los alimentos, el efecto del procesamiento y la forma de reducir su formación y exposición a los mismos. Esta información es muy importante para evaluar el riesgo y desarrollar las pautas de regulación.
- Los métodos directos e indirectos de análisis requieren materiales de referencia caros y un proceso de preparación de la muestra más bien complicado. Esto hace que su aplicabilidad en análisis de rutina sea limitada.
- En general, los métodos indirectos necesitan un número de estándares analíticos menor que los métodos directos. Por ello un desafío importante es el desarrollo de estándares para la cuantificación de los ésteres de MCPD, lo que requiere esfuerzos adicionales para desarrollar la síntesis y purificación de dichos estándares.
- En el caso de aceites y grasas se han desarrollado hasta la fecha muchos métodos, algunos de los cuales han sido incluso adoptados como métodos oficiales por distintos organismos como AOAC, DGF y AOCS.
- Aunque en los últimos años se ha avanzado en el análisis de estos contaminantes en las fórmulas infantiles con el desarrollo de dos métodos oficiales, el número de métodos desarrollados aún es escaso. Esto se debe a que estos análisis cuentan con algunos retos como: (1) la extracción de los analitos es mucho más difícil que en otros alimentos, (2) la eficiencia de la extracción puede ser muy diferente debido a la gran variabilidad en la composición de las fórmulas infantiles, por lo que los análisis deben incluir un número elevado de muestras y diferentes tipos de preparados y (3) es necesario evitar tratamientos de muestra que puedan provocar la interconversión de los analitos entre sí.

6. BIBLIOGRAFÍA

Becalski A., Feng S. Y., Lau B. P., Zhao T. (2012). *Glycidyl Fatty Acid Esters in Food by LC-MS/MS: Method Development*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 403: 2933-2942.

BfR (Federal Institute for Risk Assessment) (2009). *Infant formula and follow-up formula may contain harmful 3-MCPD fatty acid esters*. Disponible en: https://www.bfr.bund.de/cm/349/infant_formula_and_follow_up_formula_may_contain_harmful_3_mcpd_fatty_acid_esters.pdf [Acceso el día: 17/01/2020].

Blumhorst M.R., Venkitasubramanian P., Collison M.W. (2011). *Direct Determination of Glycidyl Esters of Fatty Acids in Vegetable Oils by LC-MS*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 88: 1275-1283.

Chung S.W.C., Chan B.T.P. (2012). *Simultaneous Determination of 2- and 3-Monochloropropane-1,3-diol Esters in Foods by Enzymatic Hydrolysis and GC-MS Detection*. Chromatographia, 75: 1049-1056.

Craft B.D., Nagy K., Seefelder W., Dubois M., Destailats F. (2012). *Glycidil Esters in Refined Palm Oil and Related Fractions. Part II: Practical Recommendations for Effective Mitigation*. Food chemistry, 132: 73-79.

Crews C., Chiodini A., Granvogl M., Hamlet C., Hrnčič K., Kuhlmann J., Lampen A., Scholz G., Weißhaar R., Wenzl T. (2012). *Analytical Approaches for MCPD Esters and Glycidyl Esters in Food and Biological Samples: A review and Future Perspectives*. Food additives and Contaminants, 30: 11-45.

Destailats F., Nagy K. L., Sandoz L., Craft B. (2011). *Plant Oil Refinement in the Presence of Alcohol*. European Patent Application EP 2: 502 501 A1.

Destailats F., Craft B.D., Sandoz L., Nagy K. (2012a). *Formation mechanism of monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters in refined palm oil and related fractions*. Food additives and contaminants, 29: 29-37.

Destailats F., Craft B.D., Dubois M., Nagy K. (2012b). *Glycidil esters in refined palm oil and related fractions. Part I: Formation mechanism*. Food Chemistry, 131: 1391-1398.

DGF (Deutsche Gesellschaft Für Fettwissenschaft) (2009). *DGF Standard Method CIII 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.

DGF (Deutsche Gesellschaft Für Fettwissenschaft) (2011). *DGF Standard Method CVI-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.

Dininová V., Svejková B., Doležal M., Velíšek J. (2004). *Determination of Free and Bound 3-Chloropropane-1,2-diol by Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection Using Deuterated 3-Chloropropane-1,2-diol as Internal Standard*. Czech Journal of Food Sciences, 22: 182-189.

Dubois M., Tarres A., Goldmann T., Loeffelmann G., Donaubauer A., Seefelder W. (2011). *Determination of Seven Glycidyl Esters in Edible Oils by Gel Permeation Chromatography Extraction and Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 12291-12301.

Dubois M., Tarres A., Goldmann T., Empl A.M., Donaubauer A., Seefelder W. (2012). *Comparison of indirect and direct quantification of esters of monochloropropanediol in vegetable oils*. Journal of Chromatography A. 1236: 189-201.

Dubois M., Empl A.M., Jaudzems G., Basle Q., Konings E. (2019). *Determination of 2- and 3-MCPD as well as 2- and 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters (GE) in Infant and Adult/Pediatric Nutritional Formula by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Method, First Action 2018.03*. Journal of AOAC International, 102: 903-914.

EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). (2016). *Risk 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, 14: 4426. Disponible en: [file:///F:/TFG/\(CONTAM\)-2016-EFSA_Journal.pdf](file:///F:/TFG/(CONTAM)-2016-EFSA_Journal.pdf) [Acceso el día: 14/05/2020].

Ermacora A., Hrnčířik K. (2012). *Evaluation of an Improved Indirect Method for the Analysis of 3-MCPD Esters Based on Acid Transesterification*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 89: 211-217.

Ermacora A., Hrnčířik K. (2013). *A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 90: 1-8.

European Commission (2001). *Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. Official Journal of the European Union, L77, 16.01.2001: 1-13.

European Commission (2014). *Commission Recommendation of 10 September 2014 on the monitoring of the presence of 2 and 3-monochloropropane-1,2-diol (2 and 3-MCPD), 2- and 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in food*. Official Journal of the European Union, L 271, 12.09.2014: 93-95.

European Commission (2018). *Commission Regulation (EU) 2018/290 of 26 February 2018 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of glycidyl fatty acid esters in vegetable oils and fats, infant formula, follow-on formula and foods for special medical purposes intended for infants and young children*. Official Journal of the European Union, L 55, 27.2.2018: 27-29.

Franke K., Strijowski U., Fleck G., Pudiel F. (2009). *Influence of Chemical Refining Process and Oil Type on Bound 3-Chloro-1,2-propanediol Contents in Palm Oil and Rapessed Oil*. Food Science and Technology. 42: 1751-1754.

Granvogl M., Schieberle P. (2011). *Quantification of glycidyl esters via stable isotope dilution analysis*. Paper presented at the 102nd AOCS annual meeting and expo, Cincinnati, OH, May 1-4.

Haile B., Satheesh N. (2017). *Review on 3-chloro-1,2-propanediol: A chloropropanol formed during food processing*. Der Pharma Chemica, 9: 84-90.

Haines T.D., Adlaf K.J., Pierceall R.M., Lee I., Venkitasubramanian P., Collison M.W., (2011). *Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC-TOFMS*. Journal of the American Oil Chemists' Society 88: 1-14.

Hamlet C.G., Sadd P.A. (2004). *Chloropropanols and Their Esters in Baked Cereal Products*. Czech Journal of Food Sciences, 22: 259-262.

Hori K., Matsubara A., Uchikata T., Tsumara K., Fukusaki E., Takeshi B. (2012). *High-throughput and Sensitive Analysis of 3-monochloropropane-1,2-diol Fatty Acid Esters in Edible Oils Using Liquid Chromatography Time-of-flight Mass Spectrometry*. Journal of Food Science and Technology, 48: 204-208.

Hrnčířík K., Zelinková Z, Ermacora A. (2011). *Critical Factors of Indirect Determination of 3-Chloropropane-1,2-diol Ester*. European Journal of Lipid Science and Technology, 113: 361-367.

IARC (2000). *Glycidol*. In: IARC Monographs Volume 77. *Some industrial chemicals*. Lyon, France, 469-486.

IARC (2012). *3-Monochloro-1,2-propanediol*. In IARC Monographs Volumen 101. *Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water*. Lyon, France, 349-374.

Karl H, Kuhlmann J., Merkle S., Fritsche J. (2016). *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, 118: 406-417.

Kuhlmann J. (2011a). *Determination of Bound 2-3-Epoxy-1-propanol (Glycidol) and Bound Monochloropropanediol (MCPD) in Refined Oils*. European Journal of Lipid Science and Technology, 113: 335-344.

Kuhlmann J. (2011b). *Indirect Determination of Bound Glycidol and MCPD in Refined Oils*. Paper presented at the 102nd AOCS Annual Meeting and Expo, May 1-4.

Kuhlmann J. (2012). *Analysis and occurrence of bound glycidol and MCPD in oil containing foods*. Proceedings of the 103rd AOCS Annual Meeting and Expo. Long beach, California, USA.

Kuhlmann J. (2019). *2-Monochloropropanediol (2-MCPD), 3-Monochloropropanediol (3-MCPD), and Glycidol in Infant and Adult/Pediatric Nutritional Formula: Single-Laboratory Validation, First Action 2018.02*. Journal of AOAC International, 102: 1205-1220.

Leigh J. K. (2016). *Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Detection of 3-Monochloropropanediol Esters and Glycidyl Esters in Infant Formula*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 64: 9442-9451.

Li H., Chen D., Miao H., Zhao Y., Shen J. (2015). *Direct determination of fatty acid esters of 3-chloro-1,2-propanediol in edible vegetable oils by isotope dilution-ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. Journal Chromatography A. 1410: 99-109.

Lin S., Akoh C.C. (2001). *Recovery of used frying oils with adsorbent combination: Refrying and frequent oil Replenishment*. Food Research International, 34: 159-166.

Lin S.W., Kuntom A., Ibrahim N. A., Ramli M. R., Razar R. A. A. (2012). *The Possible Mitigation Procedures for the Reduction of Formation of Chloropropanol Esters and Related Compounds*. Palm Oil Development. 57:21-27.

MacMahon S., Begley T.H., Diachenko G.W. (2013a). *Occurrence of 3-MCPD and glycidyl esters in edible oils in the United States*. Food Additives and Contaminants, Part A. 30: 2081-2092.

MacMahon S., Begley T. H., Diachenko G.W. (2013b). *Analysis of processing Contaminants in Edible Oils. Part 1. A Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Direct Detection of 3-monochloropropanediol (3-MCPD) Monoesters and Glycidyl Esters*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 4737-4747.

MacMahon S., Ridge C.D., Begley T.H. (2014a). *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the direct detection of 2-monochloropropanediol (2-MCPD) esters in edible oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62: 11647-11656.

MacMahon S. (Ed.) (2014b). *Processing Contaminants in Edible Oils: MCPD and Glycidyl Esters*. USA. AOCS PRESS. ISBN: 978-0-9888565-0-9.

Masukawa Y., Shiro H., Nakamura S., Kondo N., Jin N., Suzuki N., Ooi N., Kudo N. (2010). *A New Analytical Method for the Quantification of Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils*. Journal of Oleo Science, 59: 81-88.

Masukawa Y., Shiro H., Kondo N., Kudo N. (2011). *Generalized Method to Quantify Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils*. Journal of American Chemical Society, 88: 15-21.

Miyazaki K., Koyama K., Sasako H., Hirao T. (2012). *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, 89: 1403-1407.

- Moravcora E., Vaclavik L., Lacina O., Hrbek V., Riddellova K., Hajslova J. (2012). *Novel Approaches to Analysis of 3-chloropropane-1,2-diol Esters in Vegetale Oils*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 402: 2871-2888.
- Nagy K., Sandoz L., Craft B., Destailats F. (2011). *Mass-Detect Filtering of Isotope Signatures to Reveal the Source of Chlorinated Palm Oil Contaminants*. Food Additives and Contaminants, 28: 1492-1500.
- Pinkston J. D., Stoffolano P.J. (2011). *Update on the Development of a Sensitive Accurate, and User-Friendly Method for the Direct Determination of 3-MCPD Esters*. Presented at the 102nd AOCS Annual Meeting and Expo, Mayo 1-4.
- Poku K. (2002). *Small-Scale Palm Oil Processing in Africa*. FAO Agricultural Services Bulletin 148. Food and agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy
- Pudel F., Benecke P., Fehling P., Freudenstein A., Matthäus B., Schwaf A. (2011). *On the necessity of Edible Oil Refining and Possible Sources of 3-MCPD and Glycidyl Esters*. European Journal of Lipid Science and Technology, 113: 368-373.
- Ramli M.R., Siew W.L., Ibrahim N.A., Hussein R., Kuntom A., Razak R.A.A., Nesaretnam K. (2011). *Effects of degumming and bleaching on 3-MCPD esters formation during physical refining*. Jorunal of the Americal Oil Chemists' Society, 25: 391-400.
- Shimizu M., Kudo N., Shiro H., Yasunaga K., Masukawa Y., Katsuragi Y., Yasumasu T. (2010). *Comparison of Indiretct and Direct Quantification of Glycidol Fatty Acid Ester in Edible Oils*. Journal of Oleo Science, 59: 535-539.
- Shiro H., Kondo N., Kibune N., Masukawa Y. (2011). *Direct method for Quantification of Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils*. European Journal of Lipid Science and Technology, 113: 356-360.
- Shiro H., Osawa K., Kawai S., Suzuki N., Masukawa Y. (2012). *Determination of 3-MCPD Fatty Acid Esters in Edible Oils*. Presented at the 103rd AOCS Annual Meeting and Expo, Long Beach, 29 Abril- 2 Mayo.
- Swern D., Wieder R., McDonough M., Meranze D., Shimkin M. B. (1970) *Investigation of fatty acids and derivates for carcinogenic activity*. Cancer Research, 30: 1037-1046.

UE (Unión Europea). (2007) *Reglamento Nº 333/2007 de la comisión de 28 de marzo de 2007 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios*. Diario Oficial de la UE, L 88-29.

Velíšek J., Davídek J., Kubelka V., Janíček G., Svobodova Z., Simicova Z. (1980). *New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28: 1142-1144

Velíšek J., Dolezal M., Crews C., Dvorak T. (2002). *Optical isomers of chloropropanediols: mechanisms of their formation and decomposition in protein hydrolysates*. Czech Journal of Food Science, 20: 191-170.

Weiðhaar R. (2008). *Determination of Total 3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in Edible Oils by Cleavage of MCPD esters with _Sodium Methoxide*. European Journal Lipid Science and Technology, 110: 183-186.

Weiðhaar R., Perz R. (2010) *Fatty acid esters of glycidol in refined fats oils*. European Journal of Lipid Science and Technology, 112: 158-165.

Weiðhaar R. (2011). *Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates*. European Journal Lipid Science and Technology, 113: 304-308.

Wöhrlin F., Fry H., Preiss-Weigert A. (2011). *A Collaborative Study for the Determination of 3-MCPD-Fatty Acid Esters in Edible Fats and Oils. Second Collaborative Study Part I. Method Validation and Proficiency Test*. Bundeinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin. Disponible en: <file:///F:/TFG/collaborative-study-for-the-determination-of-3-mcpd-fatty-acid-esters-in-edible-fats-and-oils.pdf> [Acceso el día: 30/06/2020].

Wöhrlin F., Fry H., Lahrssen-Wiederholt M., Preiß-Weigert A. (2015). *Occurrence of fatty acid esters of 3-MCPD, 2-MCPD and glycidol in infant formula*. Food Additives and Contaminants. Parte A, 32: 1810-1822.

Yamazaki K., Ogiso M., Isagawa S., Urushiyama T., Ukena T., Kibune N. (2013). *A New Direct Analytical Method Using LC-MS/MS for the Fatty Acid Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in Edible Oils*. Food Additive and Contaminants, 110:183-186.

Zelinková Z., Svejkovska B, Velisek J.,Dolezal M. (2006). *Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils*. Food Additive and Contaminants, 23: 1290-1298.

Zulkurnain M., Lai O.M., Latip R.A., Nehdi I.A., Ling T.C., Tan T. C., Tan C.P. (2012). *The Effects of Physical refining on the formation of 3-monochloropropane-1,2-diol esters in relation to palm oil minor components*. Food Chemistry, 135: 799-805.