

DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES DEL PROCESADO DE ALIMENTOS

A. M. Carro; R. A. Lorenzo; J. A. Custodio-Mendoza

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, USC.

Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela (IDIS), USC.

Santiago de Compostela, 15780, España

Introducción

Durante el procesado de los alimentos a altas temperaturas se pueden formar compuestos orgánicos como cloropropanoles y sus ésteres de ácidos grasos y productos de la autooxidación o rancidez oxidativa (Figura 1). Son sustancias altamente reactivas y potencialmente tóxicas, que pueden afectar al valor nutricional del alimento y a la salud pública.



Figura 1. Contaminantes del procesado de alimentos.

Cloropropanoles y ésteres de ácidos grasos

Los cloropropanoles son una familia de compuestos orgánicos clorados que fueron inicialmente identificados en proteínas vegetales hidrolizadas (HVP), presentes en preparados de sopas, pastillas de caldo y salsa de soja. Estos contaminantes se forman por la reacción entre lípidos residuales y glicerol, a altas temperaturas y en medio ácido, lo cual coincide con las condiciones de fabricación de las HVP [1].

De esta familia de contaminantes, el 3-monocloro-1,2-propanodiol (3-MCPD) se encuentra con mayor abundancia en los alimentos.

Los ésteres de cloropropanoles se generan a partir de grasas (acilgliceroles) y aceites refinados o productos con base de aceites en presencia de iones cloruro, a altas temperaturas durante el proceso de fabricación [2].

Los ésteres de cloropropanoles pueden hidrolizarse en el tracto digestivo humano por hidrólisis enzimática catalizada por la enzima lipasa, liberando la forma libre de cloropropanol, por lo que el contenido total ingerido se vería aumentado [2].

Varios estudios toxicológicos sugieren la actividad cancerígena y genotóxica de los cloropropanoles por lo que la *Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA)* ha incluido en 2019 el 3-MCPD en la lista de sustancias cancerígenas y que pueden afectar al sistema reproductor; mientras que la *International Agency for Research on Cancer (IARC)* lo ha clasificado en el grupo 2B, como "posible carcinógeno para humanos".

Con base en las evidencias científicas, en 2018 la *European Food Safety Authority (EFSA)* ha establecido una ingesta diaria tolerable (TDI) de 2 µg/kg pc/día para 3-MCPD y sus ésteres y dado el gran número de ésteres de cloropropanoles, recomienda el control de las formas libres y de sus ésteres en ciertos grupos de alimentos.

Por todo esto, disponer de metodología analítica actual, sensible y robusta para la determinación de estos contaminantes en alimentos es muy importante para poder acceder a información sobre la presencia de estos contaminantes en alimentos, ya que pueden suponer un riesgo para la salud y afectar a las propiedades organolépticas de los alimentos.

Los métodos de determinación de cloropropanoles y sus ésteres incluyen métodos directos, realizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), y métodos indirectos cuando se emplea cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) que requieren de etapas de hidrólisis y posterior derivatización para la determinación de las formas libres [3].

Los métodos directos tienen la capacidad de determinar ésteres de cloropropanoles (o aductos de estos en fase móvil) sin necesidad de modificaciones químicas en su estructura. Sin embargo, la extracción de estos compuestos desde matrices complejas, como los alimentos grasos es difícil debido a la similitud en las propiedades físicas y químicas como solubilidad o polaridad de los analitos con la matriz. De modo que esta metodología de preparación de muestra requiere diferentes volúmenes de disolventes orgánicos para aislar los analitos en un extracto apropiado para la determinación con el consiguiente incremento del tiempo de análisis y de costes [4].

Por otra parte, los métodos indirectos requieren de reacciones de derivatización con agentes como ácido fenilborónico (PBA), agentes sililantes como N,O-bis(trifluoroacetamida) (BSTFA) o acilantes como N-heptafluorobutirilimidazol (HFBI), entre otros. Los ésteres de cloropropanoles requieren de una etapa adicional de hidrólisis ácida [5], alcalina [6] o enzimática previa a la derivatización. Los métodos indirectos con hidrólisis ácida y alcalina se utilizan en los métodos oficiales de la American Oil Chemists' Society (AOCS) y la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), aunque son largos y laboriosos.

En este contexto, el grupo de investigación posee una amplia experiencia en el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de cloropropanoles en aguas [7, 8] productos de panadería, leche y bebidas de soja [9, 10]. Se han propuesto técnicas novedosas de preparación de muestra para la extracción de estos compuestos, como la extracción por líquidos presurizados (PLE), la microextracción líquida-líquida dispersiva

(DLLME) y la microextracción en fase sólida (SPME). En estos estudios se propone la incorporación de la reacción derivatización durante la extracción en un solo paso, previa a la determinación simultánea de cloropropanoles mediante GC-MS.

Recientemente, en 2019 se ha publicado un estudio, pionero en España, sobre la presencia de diésteres de cloropropanoles en más de cien muestras de aceites vegetales comestibles, muestras de margarinas y patatas fritas (Figura 2)[11].

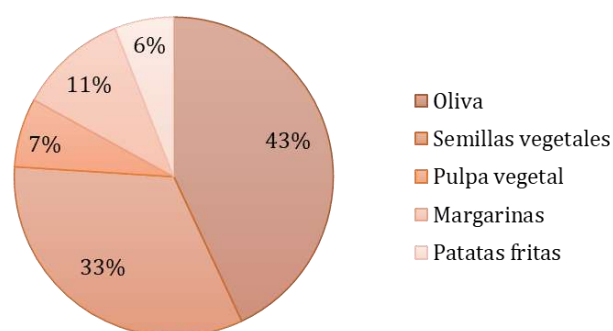


Figura 2. Distribución porcentual de muestras positivas.

de determinación simultánea de siete diésteres de cloropropanoles con ácidos linoleico, oleico, palmítico y esteárico, utilizando HPLC-HESI-MS/MS, los analitos fueron extraídos de las matrices oleosas usando un procedimiento modificado de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) que incluye separación por extracción líquido-líquido y un paso de purificación del extracto en fase sólida dispersiva (dSPE) [12].

En las muestras analizadas se encontraron diésteres de 3-MCPD con ácido linoleico, oleico y palmítico en diferentes aceites refinados. Sin embargo, coincidiendo con otros estudios, estos contaminantes no fueron detectados en los aceites vírgenes y de oliva virgen extra.

Productos secundarios de autoxidación lipídica

En los últimos años la industria alimentaria ha desarrollado productos con un perfil lipídico más saludable: mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Pero estos

lípidos insaturados tienen mayor capacidad de oxidación que altera la calidad de los alimentos. La autooxidación lipídica se produce a través de mecanismos radicalarios y en presencia de oxígeno, conduciendo a la formación de una variedad de compuestos orgánicos incluyendo hidroperóxidos y endoperóxidos inestables que, a su vez, se degradan en aldehídos y cetonas, denominados productos secundarios de la autooxidación lipídica.

El desarrollo de la degradación oxidativa de los lípidos en alimentos está relacionado con diversos factores como el calor, la radiación UV, el tipo de embalaje, el tiempo y la temperatura de almacenaje de los productos alimentarios.

La presencia de estos compuestos en los alimentos puede alterar las propiedades organolépticas de los mismos al reaccionar con el contenido proteico. Los productos secundarios de la autooxidación lipídica son altamente reactivos llegando a formar aductos con los ácidos nucleicos por lo que son considerados potencialmente tóxicos.

La IARC clasifica el malondialdehído (MDA) y la acroleína (ACRL) en el grupo 3 como "no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano", mientras que otros compuestos como acetaldehído, formaldehído, pentanal y propanal son clasificados en el grupo 2B.

A falta de datos toxicológicos, la EFSA ha establecido un umbral de preocupación toxicológica (TTC) de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día para MDA y la World Health Organization (WHO) estableció una TDI de 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día para ACRL, de 0.1 mg/Kg pc/día para acetaldehído y de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día para formaldehído en agua de bebida.

El MDA, es considerado uno de los principales marcadores de la oxidación lipídica en alimentos y de estrés oxidativo celular en muestras biológicas [11]. Su determinación se realiza mediante el test de ácido tiobarbitúrico (TBA) y medidas espectrofotométricas.

Este método es poco selectivo ya que muchos compuestos orgánicos reaccionan con el TBA para formar las denominadas *sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico* (TBARS). Además, se necesitan condiciones extremas de

acidez ($\text{pH} < 2$), temperaturas superiores a 90 °C y tiempos de reacción entre 1-16 h [12].

Ante la complejidad de las muestras alimentarias y la falta de selectividad de esta técnica se ha propuesto el acoplamiento de técnicas de separación como HPLC con detector de fluorescencia o espectrofotométrico para su determinación.

En colaboración con el grupo del Prof. Rodrigues, de Química Analítica e Qualidade Alimentar de la Universidad de Porto (Portugal) se ha publicado un método pionero para el análisis de MDA en aceites vegetales comestibles utilizando una microextracción por difusión en fase gas (GDME), patentada por este grupo de la Univ. Porto.

Esta técnica sigue las tendencias actuales de la *Química Analítica Verde* en la reducción de los residuos orgánicos, ya que emplea volúmenes reducidos de muestra, disoluciones acuosas y además permite la extracción y derivatización simultáneas de compuestos volátiles y semivolátiles sin necesidad de pretratamiento.

El analito es extraído desde la muestra al espacio de cabeza difunde a la fase aceptora a través de una membrana porosa de PTFE, obteniendo un factor de enriquecimiento considerable debido a la simultánea extracción y derivatización del analito. El extracto acuoso obtenido se inyecta directamente en el sistema de HPLC-FLD-UV [13].

Los resultados obtenidos de esta investigación demuestran que se pueden relacionar las concentraciones de MDA encontradas con el grado de oxidación de los aceites vegetales analizados.



Figura 3. Protocolo de extracción GDME-DLLME.

Posteriormente se ha publicado una nueva aplicación de esta técnica a la determinación de productos de la peroxidación lipídica en cuarenta y ocho muestras grasas utilizando una combinación de GDME y DLLME (Figura 3) [14].

Con ello no solo se logró la determinación simultánea de seis productos secundarios de la peroxidación lipídica incluyendo MDA y ACRL, sino que también se incrementó la sensibilidad del método al concentrar el extracto acuoso de la GDME en un disolvente apropiado para GC-MS, disminuyendo así los límites de detección. En la figura 4 se muestra la presencia de malondialdehído, formaldehído, acetaldehído, acroleína, propanal y pentanal en muestras de aceite de oliva virgen extra (EVO), aceite refinado de oliva 1º (ROO 1º) y 0,4º (ROO 0,4º), aceite de orujo de oliva (POO), aceite refinado de girasol (RSO), aceite de girasol enriquecido con antioxidantes (RSOa), y aceite de mezcla de semillas.

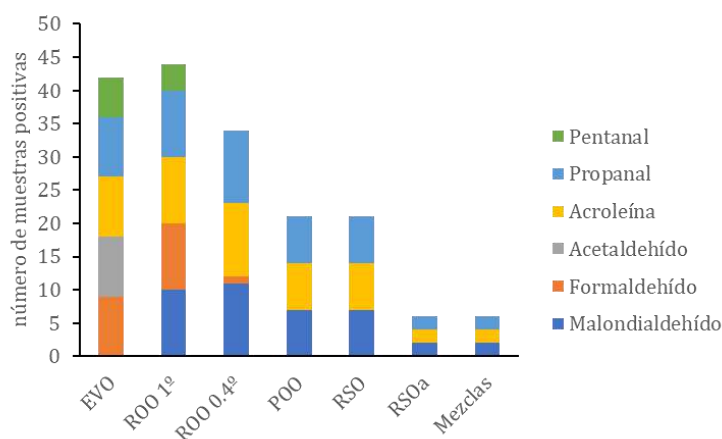


Figura 4. Distribución porcentual de muestras positivas.

Conclusiones

Las concentraciones de todos estos contaminantes del procesado, encontradas en los alimentos grasos analizados, hasta el momento, están relacionadas con la composición del alimento, el contenido de ácidos grasos, el grado de oxidación, las condiciones del procesado o el tipo de envase. Por ello, estos compuestos podrían ser utilizados como marcadores de calidad alimentaria.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación: Proyectos AGL-2014-53647-R y RTI2018-096450-B-I00 y Fondos Feder.

Referencias

[1] J. Velíšek. Chloropropanols in: D.R. Lineback, R.H. Stadler (Eds.) Process-induced food toxicants. Occurrence, formation, mitigation, and health risks, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2009, pp 539-562

[2] C.G. Hamlet, P.A. Sadd. Chloropropanols and chloroesters in: D.R. Lineback, R.H. Stadler (Eds.) Process-induced food toxicants. Occurrence, formation, mitigation, and health risks, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2009, pp 175-214

[3] C. Crews y col. Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives. Food Add.Contam. Part A 30 (2013) 11-45

[4] T.H. MacMahon y col. Analysis of processing contaminants in edible oils. Part 2. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the direct detection of 3-monochloropropanediol and 2-monochloropropanediol diesters, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 4748-4757

[5] A. Cichelli y col. Glycidols esters, 2-Chloropropane-1,3-diols, and 3-Chloropropane-1,2-diols contents in real olive oil samples and their relation with diacylglycerols. J. Am. Oil Chem. Soc. 97 (2019) 15-23

[6] R. Zwagerman, P. Overman. Optimized Analysis of MCPD- and Glycidyl Esters in Edible Oils and Fats Using Fast Alkaline Transesterification and 13C-Correction for Glycidol Overestimation: Validation Including Interlaboratory Comparison. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 121 (2019) 1800395

[7] A.M. Carro y col. Solid-phase micro-extraction procedure for the determination of 1,3-dichloro-2-propanol in water by on-fibre derivatisation with bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 893-901

[8] P. González y col. Combined solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry used for determination of chloropropanols in water. J. Sep. Sci. 34 (2011) 1-8

[9] I. Racamonde y col. Determination of chloropropanols in foods by one-step extraction and derivatization using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6878 - 6883

[10] A.M. Carro y col. Simultaneous derivatization and ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of chloropropanols in soy milk and other aqueous matrices combined with gas-chromatography- mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1319 (2013) 35 - 45

[11] J.A. Custodio-Mendoza y col. Occurrence and exposure of 3-monochloropropanediol diesters in edible oils. Food Chem. 270 (2019) 214 - 222

[12] J.A. Custodio-Mendoza y col. Development of a partitioned liquid-extraction-dispersive solid phase extraction procedure followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analysis of 3-monochloropropane-1,2-diol diesters in edible oils. J. Chromatogr. A 1548 (2018) 19 - 26

[11] D. del Rio y col. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 15 (2005) 316-328

[12] N. Kishikawa y col. Chromatographic methods and sample pretreatment techniques for aldehydes determination in biological, food, and environmental samples, J. Pharm. Biomed. Anal. (2019) 175

[13] J.A. Custodio-Mendoza y col. Analysis of free malondialdehyde in edible oils using gas-diffusion microextraction, J. Food Comp. Anal. 82 (2019) 103254

[14] J.A. Custodio-Mendoza y col. Determination of malondialdehyde, acrolein and four other products of lipid peroxidation in edible oils by Gas-Diffusion Microextraction combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, J. Chromatogr. A 1627 (2020) 461397