



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Índice.

1. Resumen/Abstract.....	pág.1
2. Objetivos.....	pág.3
3. Introducción.....	pág.4
3.1 Aceite de soja epoxidado.....	pág.4
3.2 Usos y aplicaciones del ESBO.....	pág.5
3.3 Toxicidad y exposición del ESBO.....	pág.6
3.4 Aspectos legales.....	pág.7
3.5 Migración del ESBO al alimento.....	pág.9
3.6 Análisis de migración.....	pág.10
3.7 Técnicas de análisis de ESBO.....	pág.11
3.8 Comparación de los métodos.....	pág.13
3.9 Técnica LC-MS.....	pág.15
4. Materiales y métodos.....	pág.18
4.1 Reactivos y muestras.....	pág.18
4.1.1 Patrones y disoluciones.....	pág.18
4.1.2 Muestras.....	pág.18
4.2 Análisis por LC-MS/MS.....	pág.19
4.2.1 Equipo.....	pág.19
4.2.2 Condiciones de análisis.....	pág.20
4.3 Análisis de ESBO mediante el método UPLC-ESI-MS/MS.....	pág.21
4.3.1 Preparación de la muestra.....	pág.21
4.3.2 Recta de calibrado.....	pág.21
5. Resultados.....	pág.23
5.1 Recta de calibrado.....	pág.23
5.2 Calculo de la cantidad de ESBO.....	pág.25
6. Conclusiones/Conclusions.....	pág.28
7. Aportaciones en materia de aprendizaje.....	pág.29
8. Bibliografía.....	pág.30

1. Resumen.

El aceite de soja epoxidado (ESBO) es un aceite modificado procedente de la reacción de epoxidación del aceite de las semillas de soja. Este es una sustancia la cual se utiliza como plastificante, estabilizantes de PVC, etc. Sin embargo su uso más importante es en la industria alimentaria, para películas de PVC y para las tapas de tarros de vidrio y botellas.

Es considerado como un plastificante de baja toxicidad, aun así el comité científico de la alimentación de la unión europea especificó una ingesta diaria admisible de 1 mg/kg. Por ello se encuentra regulado por Reglamento 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, y sus posteriores modificaciones, el cual fija el límite de migración específico aplicable para la sustancia (LME) en 60 mg/kg y en 30 mg/kg cuando el PVC se utilice para sellar tarros de cristal que contengan preparados para lactantes y preparados de continuación o alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.

La fijación de este límite de migración específico hace necesaria la utilización de un método para determinar la cantidad de ESBO que hay en un alimento.

El método de referencia para el análisis de ESBO es el método de Castle et al (1988), pero este presenta una serie de problemas. Por lo que en este trabajo el análisis de ESBO se va a realizar mediante el método UPLC-ESI-MS/MS desarrollado por la unidad del Centro Politécnico Superior del Departamento de Química analítica de la Universidad de Zaragoza, el cual se va a publicar dentro de poco. Este método que nos permite solucionar gran parte de los problemas que presenta el método de Castle.

Los análisis de ESBO se llevaron a cabo en 4 patés de distintas marcas comerciales, siendo estos de pato, campaña y finas hierbas. Todos los patés analizados presentaron cantidades de ESBO.

De todos los patés analizados ninguno de ellos superaba el límite fijado por Reglamento 10/2011.

Abstract.

Epoxidized soybean oil (ESBO) it is modified oil resulting from the reaction of epoxidation of soybean oil seeds. This is a substance which is used as plasticizer, PVC stabilizers... However the most important use it is in the food industry, for PVC films and caps glass jars and bottles.

It is considered a low toxicity plasticizer, even so, the European scientist commission of food, fixed an acceptable daily intake of 1 mg / kg. For that, it is controlled by the Regulation 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, and its subsequent amendments, which fixed the specific limit of migration applicable to the substance (LME) at 60 mg / kg and 30 mg / kg when PVC is used to seal glass jars containing infant formulas and follow-on formulas or containing processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children.

The fixation of this specific limit of migration it makes necessary the use of a method to determine the concentration of ESBO in an aliment.

The reference method for analyze ESBO it is the Castle et al method (1988), but this one present some problems. In this work, is going to be analyzed by the UPLC-ESI-MS / MS method, developed by the unit of the Polytechnic Centre of the Department of Analytical Chemistry of the University of Zaragoza, which is going to be published soon. This method allows us to solve many of the problems which Castle method present.

ESBO analyzes were carried out in 4 different trademarks of pate, those were of duck, campaign and herbs. All pates tested had amounts of ESBO.

Any pates analyzed with this method, only one of them exceeded the limit set by the Regulation 10/2011.

2. Objetivos del estudio.

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es aprender las técnicas y metodología necesaria para la detección y cuantificación de aceite de soja epoxidado (ESBO) en alimentos debido a la migración del envase al alimento. Para poder conseguir superar este objetivo es necesario:

- Estudio bibliográfico para conocer que es el ESBO, las aplicaciones que tiene, qué efectos puede producir en los humanos, la legislación que regula su presencia y los métodos de análisis que pueden ser utilizados para su detección y cuantificación.
- Aplicar tratamiento de muestra previa al análisis.
- Una recta de calibrado con una matriz similar al alimento a analizar.
- Conocer el funcionamiento de la Cromatografía Líquida para aplicarla a la detección rápida de ESBO por LC-ESI-MS/MS.
- Analizar e interpretar los resultados obtenidos tras el trabajo de laboratorio para poder sacar conclusiones.
- Comparación entre el método utilizado y el método que se utiliza habitualmente.

Una vez superadas dichas tareas, se dispondrá de toda la información necesaria para realizar un análisis de ESBO en cualquier matriz alimentaria y de proporcionar una conclusión acorde a los resultados.

3. Introducción.

3.1 Aceite de soja epoxidado.

El aceite de soja epoxidado también conocido ESBO por sus siglas en inglés (Epoxidized soybean oil) es un aceite modificado resultante de la reacción de epoxidación del aceite de soja.

De forma industrial la epoxidación de los aceites vegetales se realiza mediante la reacción de Prileschajew, esta reacción requiere la presencia de un agente oxidante, un catalizador y el sustrato. Como agente oxidante se usa normalmente agua oxigenada debido a que es barata y de fácil uso además el agua es su único subproducto y como catalizador se usa un ácido fuerte, siendo el más utilizado el ácido sulfúrico debido a su bajo coste y excelente actividad catalítica (1).

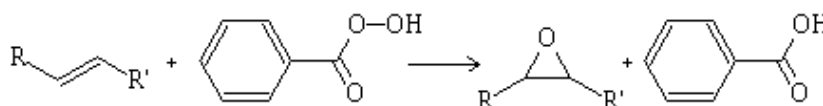


Figura 1. Reacción de Prileschajew (2).

El aceite de soja que se utiliza para la epoxidación proviene de la semilla de la soja (*Glycine max*) que es una legumbre de la familia *Panpolionoideae*. La semilla se encuentra dentro de una vaina pilosa y tiene una longitud de unos 3-8 cm con 2-4 semillas de 5-11 mm de diámetro.

La semilla contiene entorno a un 40% de proteínas, 35% de carbohidratos, 5% de cenizas y un 20% de aceite. El perfil de los ácidos grasos del aceite de soja son principalmente una mezcla de triglicéridos cuya composición es de 11% palmítico (16:0), 4% esteárico (18:0), 23% oleico (18:1), 55% linoleico (18:2), y 8% linolénico (18:3) (3). La fórmula del aceite de soja se muestra a continuación (4):

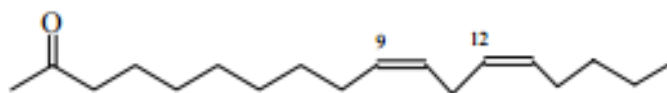


Figura 2. Formula del aceite de soja (4).



Figura 3. Formula del ESBO (4).

El ESBO obtenido tras la epoxidación se presenta como un líquido viscoso, de color amarillo pálido, con un punto de ebullición de 150°C y un punto de solidificación cercano 5°C. Además posee un peso molecular cercano a 1000 g.mol⁻¹, el cual es un factor importante a tener en cuenta en las mezclas que se realizan posteriormente con PVC evitando la volatilización de monómeros (4).

3.2 Usos y aplicaciones del ESBO.

El ESBO es una sustancia que puede ser utilizada como plastificante y estabilizante de matrices de PVC, como agente dispersante de pigmentos, como agente enmascarante de ácidos, como lubricante interno y externo y en la fabricación de cables, laminas, tubos y tuberías. También puede ser utilizado en algunos productos de uso sanitario como las bolsas contenedoras de sangre y como estabilizante térmico para evitar la deshidrocloración del PVC (este proceso ocurre por la eliminación continuada de ácido clorhídrico (HCl) lo que genera extensos polienos) que causan la decoloración, el deterioro de las propiedades mecánicas y la disminución de la resistencia química del PVC.

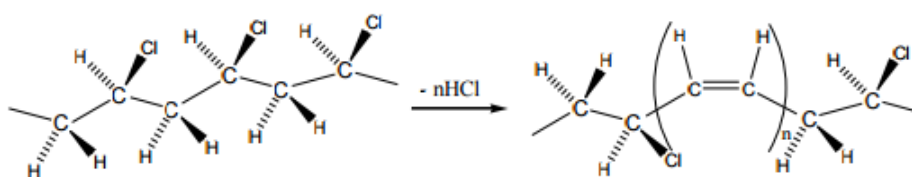


Figura 4. Deshidrocloración del PVC (5).

Su principal aplicación es en la industria alimentaria. El ESBO es utilizado en la industria alimentaria en películas de PVC para el envasado doméstico de alimentos pero sobretodo como plastificante en juntas para tapas metálicas de tarros o botellas de vidrio con el fin de crear un sello que permita prevenir la contaminación microbiana.

Este uso tan extendido se debe a su baja toxicidad y a su capacidad de biodegradarse (6).



Figura 5. Esquema de la tapa de un tarro (7).

3.3 Toxicidad y exposición al ESBO.

El ESBO surgió ante la necesidad de buscar plastificantes distintos a los tradicionales (tipo ftalato) debido al potencial carcinogénico que presentaban estos últimos en las personas. Aunque el ESBO se considera un plastificante de baja toxicidad fue necesaria la realización de estudios de toxicidad.

En el año 1999 el Comité Científico de la alimentación de la Unión Europea especificó una ingesta diaria admisible de 1mg/kg de peso corporal. Este dato se obtuvo basando en el NOAEL (no observed adverse effect level) de 140 mg/kg de peso corporal y en el LOAEL (lowest observed adverse effect level) de 1400 mg/kg de peso corporal, medidas derivadas de una evaluación toxicológica realizada por la British Industrial Biological Research Association (BIBRA) en el año 1980 (8).

Sin embargo la ingesta diaria admisible fijada por el Comité Científico de la alimentación de la Unión Europea no tiene en cuenta las distintas exposiciones que hay entre diversos segmentos poblacionales (niños y adultos).

Los niños debido a su bajo peso corporal y a un mayor consumo de alimentos envasados en botellas, latas y tarros se encuentran más expuestos a esta sustancia. En el año 2003 se realizó un estudio sobre la contaminación de los alimentos para bebés. Las muestras para el estudio se compraron en distintos países de la Comunidad Europea, disponiendo un total de 248 muestras. Los resultados mostraron que 95 de las 248

muestras contenían ESBO con valores de hasta de 135,2 mg/kg. Además se encontraron variaciones entre los niveles encontrados de ESBO, los cuales dependen de la naturaleza del producto alimenticio analizado, sino también de la forma de producción y el porcentaje de grasa (9).

Por otro lado, los adultos presentan una menor exposición al ESBO. Este hecho se debe a un mayor peso corporal y a que durante la vida adulta el consumo de productos alimenticios envasados en botellas, latas y tarros se realiza de forma esporádica y no muy continuada.

3.4 Aspectos legales.

Actualmente los materiales y objetos plásticos en contacto con el alimento, dentro de los cuales se incluye el aceite de soja epoxidado (ESBO), se encuentran regulados por el Reglamento 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, y sus posteriores modificaciones.

En este reglamento se establecen los requisitos específicos para la fabricación y comercialización de materiales y objetos plásticos que van a estar en algún momento en contacto con los alimentos, también establece una serie de requisitos generales y específicos aplicables a los materiales y artículos plásticos para su uso seguro, además de los límites de migración específica y migración global.

En este reglamento el ESBO se encuentra reflejado con en N° CAS 0008013-07-8. En el Anexo I de este reglamento se presenta el límite de migración específico aplicable para la sustancia (LME) el cual es de 60 mg/kg y de 30 mg/kg cuando el PVC se utilice para sellar tarros de cristal que contengan preparados para lactantes y preparados de continuación o alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad (10).

El límite específico aplicable de 30 mg/kg reflejado en este reglamento deriva de lo definido en dos directivas distintas la cuales son la Directiva 2006/141, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE y la Directiva 2006/125, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad (11,12).

Anteriormente se habían regulado los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimentarios mediante:

La Directiva 81/432, sobre determinación del método comunitario de análisis para el control oficial del cloruro de vinilo cedido por los materiales y objetos a los productos alimenticios. Esta Directiva fue transpuesta por Orden de 31 de enero de 1989, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de cloruro de vinilo (13).

La Directiva 80/76, relativa a la determinación del método comunitario de análisis para el control oficial del contenido de cloruro de vinilo monómero en los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Esta Directiva fue transpuesta por Orden de 31 de enero de 1989, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de cloruro de vinilo (13).

La Directiva 72/2002, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Esta Directiva fue transpuesta por el Real Decreto 103/2009, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo (14).

El Real Decreto 103/2009 modifico a su vez al Real Decreto 866/2008, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. En él aparece el aceite de soja epoxidado, el cual presentaba los mismos límites de migración específica aplicable para las sustancias y cuando el PVC se utilice para sellar tarros de cristal que contengan preparados para lactantes y preparados de continuación o alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad encontrados en el Reglamento 10/2011 (14).

Anteriormente el Real Decreto 866/2008 transpuso la Directiva 2007/19, por la que se modifican la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y la Directiva 85/572/CEE del Consejo por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para

controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios (15).

3.5 Migración del ESBO al alimento.

La migración se entiende como la transferencia de sustancias ajenas al alimento desde el material de envase. Esta migración puede deberse a una serie de factores como son:

- El tiempo de contacto. Se produce una mayor migración de sustancias a los alimentos, cuanto mayor es la vida útil del mismo.
- La temperatura. La migración de sustancias aumenta conforme aumenta la temperatura.
- La concentración de sustancias capaces de migrar.
- La movilidad de dichas sustancias. La migración se va a ver influenciada por el tamaño, forma, estructura, densidad y afinidad química de la sustancia por el alimento.
- Estado del alimento. Dependerá de si es un alimento sólido o líquido.
- Del área de contacto entre el envase y el alimento.
- El tipo de sustancia. Las sustancias hidrofóbicas (oligómeros y ácidos grasos) tienden a migrar en alimentos grasos. En el caso contrario las sustancias hidrofóbicas (agentes antiestáticos) tienden a migrar en alimentos con un elevado contenido de humedad.

La migración de estas sustancias puede provocar pérdida de inocuidad por la migración de sustancias con interés toxicológico, pérdida de calidad sensorial o deterioro de las propiedades físicas de los envases (16).

El ESBO es una sustancia hidrofóbica por lo que tiende a migrar en los alimentos grasos. Estos alimentos en algún momento de su vida útil pueden entrar en contacto con las películas de PVC de uso doméstico o con las tapas de los tarros de vidrio o botellas, los principales envases en los cuales se usa el ESBO.



Figura 6. Bote de tomate donde se observa el contacto del alimento con la tapa (7).

Cuando estos alimentos grasos entran en contacto con las superficies en las que se encuentra el ESBO, parte del mismo puede migrar al producto. Este suceso puede llegar a provocar que con contactos muy elevados la cantidad de ESBO presente en el alimento exceda el límite específico aplicable fijado por Reglamento 10/2011 (10).

3.6 Análisis de migración.

Los análisis de migración en los alimentos nos permiten conocer si el alimento excede su LME fijado por la legislación. Por ello para llevar a cabo el análisis del ESBO se deben seguir las pautas marcadas por el Reglamento 11/2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos (10). En él aparecen cuatro capítulos relacionados con las pautas de análisis de estas sustancias:

- El capítulo 1 aborda los ensayos de migración específica de materiales y objetos que ya están en contacto con alimentos. En él se explican cómo debe ser la preparación de la muestra, las condiciones de ensayo, el análisis de las sustancias migradas y los casos especiales.
- El capítulo 2 aborda los ensayos de migración específica de materiales y objetos que aún no estén en contacto con alimentos. En él se explican el método de verificación el cual engloba la preparación de muestras, elección del simulante alimentario, condiciones de contacto al usar el simulante, condiciones

específicas para tiempos superiores a 30 días, Condiciones específicas para combinaciones de tiempos y temperaturas de contacto, objetos de uso repetido, análisis de las sustancias que migran y verificación de la conformidad en función del contenido residual por superficie en contacto con el alimento. También se explica las técnicas de cribado el cual engloba la sustitución de migración específica por migración global, contenido residual, simulación de la migración y sucedáneos de los simulantes alimentarios.

- El capítulo 3 aborda los ensayos de migración global, en el se explica cómo debe ser las condiciones normalizadas de ensayo, ensayo sustitutivo de OM7 con el simulante alimentario D2, objetos de uso repetido y las técnicas de cribado la cual engloba el contenido residual y los sucedáneos de los simulantes alimentarios.
- El capítulo 4 aborda los factores de corrección aplicados para comparar los resultados de ensayos de migración con los límites de migración., en el se explican Corrección de la migración específica en alimentos que contengan más de un 20 % de grasa mediante el coeficiente de reducción de grasas (Fat Reduction Factor o FRF), Corrección de la migración al simulante alimentario D2 y Combinación de los factores de corrección anteriores.

3.7 Técnicas de análisis del ESBO.

Los productos típicos en los que se encuentra ESBO son los alimentos sumergidos en aceite, como verduras, setas o pescado y en salsas aceitosas en contacto con la tapa, como salsas de tomate, pastas de oliva o paté.

La comparación de ESBO con los correspondientes ácidos grasos en los alimentos se complica por el hecho de que la epoxidación forma numerosos estereoisómeros y el ESBO sólo contiene algunos de ellos. Para la determinación de la migración de ESBO, es importante saber qué constituyente es relevante.

Para el análisis de ESBO en los alimentos, el pionero es el trabajo hecho por Castle et al y es el que se sigue utilizando oficialmente. El método se basa en la determinación del éster de metilo de ácido linoleico diepoxi, y a partir de ahí se calcula

la concentración de ESBO. El ácido linoleico diepoxi es el analito de elección, debido a que los ácidos grasos saturados en aceite de soja epoxidado son comunes a todas las grasas y aceites, y el ácido oleico epoxi es un producto de oxidación presente en concentraciones sustanciales en el aceite o grasa comestible. El método incluye dos pasos de derivatización de triglicéridos epoxi y la determinación de los derivados por Cromatografía de Gases con Detector de Masas (GC-MS). El paso más crítico de la preparación de la muestra es la transmetilación que se realiza con metóxido / etanol (con el fin de evitar el ataque de los grupos epoxi de ESBO. Para monitorizar el rendimiento de la transmetilación es necesario utilizar un estándar (17).

Para las muestras de alimentos aceitosos, Frankhauser propuso el método en el que después de la transmetilación de los triglicéridos epoxidados, los ésteres metílicos de ácido linoleico diepoxi y dos estándares internos se aíslan por HPLC y se transfieren en línea a un GC-FID usando una interfase en la columna para evaporación del disolvente (18).

Suman et al. desarrolló otro método para el análisis de ESBO en los productos alimenticios, que se basa en la cromatografía líquida de fase reversa con electropulverización de iones trampa tandem y espectrometría de masas y, que incluye un procedimiento de preparación de muestras sencillo con extracción sin ninguna purificación adicional antes del análisis (19).

Weller et al desarrolló un método para el análisis de ESBO en alimentos para bebés basado en el método de Castle et al. Buscaba simplificar el procedimiento para ello la extracción se miniaturizado para mejorar el manejo, reducir los recursos necesarios, simplificar el método, reducir la tensión en el aparato y, por lo tanto, aumentar la muestra de respuesta significativamente. Después de la derivatización, los extractos se limpian usando cromatografía de permeación en gel (GPC) y además se usa un método modificado de cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS) utilizando una inyección splitless pulsada para determinar el analito (20).

En el año 2007 Rothenbacher et al desarrolló un método para determinar ESBO por cromatografía de gases, cuádruplo simple y ensayo de dilución de isótopos estables con espectrometría de masas en tandem (21).

Para determinar la cantidad de ESBO en alimentos embotellados Kawamura et al desarrolló un método. La cantidad de muestra requerida se disminuye a 20 gr y el método de adición estándar es adoptado para la cuantificación, ya que los lípidos en los alimentos interrumpen la hidrólisis del ESBO. Este método tiene un límite de determinación de 5 µgr/gr en una muestra de 20 gr y una recuperación del 87,1-98,9% (22).

Por otro lado Duffy et al desarrolló una base de datos para estimar la exposición de la migración de los envases a los alimentos de ESBO y monómero de estireno. Buscaban proporcionar evaluaciones de la exposición más realistas y también reducir la incertidumbre en la estimación de la exposición mediante el uso de una base de datos de consumo de alimentos que recoja la información del paquete. En esta base se combinan los datos de la NCFs (Irish National Children's Food Survey) y de la IFPD (Irish Food Packaging Database) relacionados con los materiales de embalaje que podrían contener los migrantes de destino. Si un alimento se envasa en un material que pudiera contener dichos migrantes, se considera que el migrante está presente en el alimento (23).

3.8 Comparación de los métodos.

El método de Castle et al es el método de referencia a la hora de realizar un análisis de ESBO, sin embargo este método presenta una serie de desventajas como son la necesidad de disponer de grandes cantidades de muestra, la inyección del extracto derivatizado en el sistema de GC-MS que puede llevar a una rápida contaminación tanto del sistema de GC, así como el detector selectivo de masas (en particular, la fuente de iones), lo que provoca desgaste y la necesidad de realizar paradas para limpieza, lo que no es adecuado para análisis de rutina. También presenta desventajas con respecto a los volúmenes de disolvente utilizado para la extracción ya que son muy elevados, por lo tanto, costosos (17).

Por esta razón, es necesario desarrollar métodos que pueden acelerar la respuesta, sean más sencillos y baratos. En base a eso los objetivos actuales en el análisis de ESBO pasan por reducir el peso de la muestra a un mínimo, pero al mismo tiempo, mantener la sensibilidad necesaria y simplificar el procedimiento para aumentar el número de muestras por día.

Estos objetivos se cumplen si se hace uso del método UPLC-ESI-MS/MS, método desarrollada por la unidad del Centro Politecnico Superior del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza. Este método reduce la cantidad de muestra necesaria, el tiempo para obtener un resultado, simplifica el procedimiento y mantiene una buena sensibilidad.

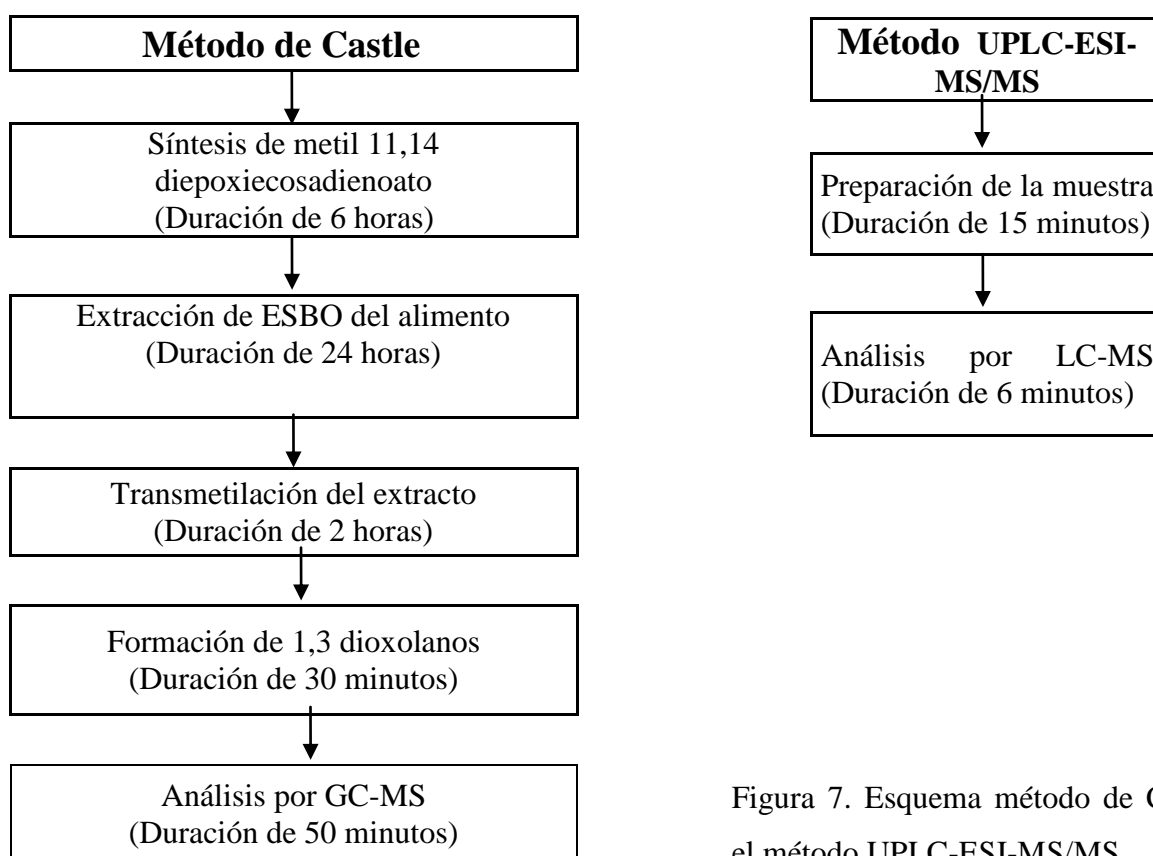


Figura 7. Esquema método de Castle y el método UPLC-ESI-MS/MS

3.9 Técnica LC-MS.

La cromatografía es una técnica de separación dinámica en la que los analitos se distribuyen entre dos fases, la fase móvil y la fase estacionaria. Según la naturaleza de sus fases existen 4 tipos de cromatografía:

- Cromatografía líquido - líquido.
- Cromatografía gas - líquido.
- Cromatografía líquido -sólido.
- Cromatografía gas - sólido.

La técnica LC-MS la cual se utiliza en este trabajo se encontraría dentro de la cromatografía liquido-sólido puesto que la fase móvil es un líquido el cual fluye a través de la columna que contiene la fase fija. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil la cual actúa como portador de la muestra.

La separación cromatográfica en LC-MS es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria. Es una cromatografía de alto rendimiento si se compara con otras como la cromatografía de gases ya que no se encuentra limitada por la volatilidad o la estabilidad de la muestra.

Además a esta técnica se le puede incorporar la Espectrometría de Masas, técnica analítica usada para identificar y cuantificar los compuestos como en el caso de la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS, siglas en inglés). La LC-MS/MS puede ofrecer no solo muchas ventajas en comparación con los métodos más tradicionales, sino también mayor sensibilidad y precisión, preparación simplificada de muestras y un rango dinámico cuantitativo.

En la Espectrometría de masas la muestra es ionizada (y por tanto destruida) usando diversos procedimientos para ello. De todos ellos el más usual y/o utilizado es la técnica denominada de Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad.

Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un

tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducidos a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos.

Cada compuesto es único, y cada uno de los compuestos se ionizará y fragmentará de una determinada manera, y en este principio se basa la espectrometría de masas para identificar cada analito.

Con la espectrometría de masas se puede proporcionar información acerca de la:

- Composición elemental de las muestras: de esta se encarga la espectrometría de masas atómico.
- Composición de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas.
- Composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas.
- Estructura y composición de superficies sólidas.
- Relaciones isotópicas de átomos en las muestras.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica de separación de sustancias más ampliamente utilizada. Los sistemas HPLC-MS facilitan el análisis de muestras que tradicionalmente han sido difíciles de analizar por GC-MS es decir, analitos poco volátiles. Como resultado, la técnica es ampliamente utilizada en el análisis de fármacos, proteínas, etc.

Los sistemas de ionización que han hecho posible este desarrollo son los sistemas API-EI y APCI. De esta forma se pueden analizar compuestos de peso molecular de hasta 100kDa, con un rango de polaridades que va desde analitos no polares hasta los muy polares.

Los espectros de masas obtenidos por HPLC-MS suelen ser más sencillos que los obtenidos en GC-MS debido a que el nivel de fragmentación de las moléculas es menor. El inconveniente es que los espectros dependen parcialmente de los parámetros de ionización, es decir, que no pueden ser considerados como “huella dactilar” del compuesto y, por tanto, la comparación con colecciones de espectros estándares no es posible. Por esta razón, la comparación del espectro de masas de analitos con patrones debe realizarse en las mismas condiciones de trabajo.

LC-MS es muy común en farmacocinéticos estudios de los productos farmacéuticos y por lo tanto la técnica más frecuentemente utilizada en el ámbito de bioanálisis. Así mismo se utiliza en el desarrollo de drogas e identificación de las mismas. La alta sensibilidad y la selectividad y el alto rendimiento de LC / MS / MS que sea eficaz para la determinación de trazas en matrices biológicas complejas.

Es de aplicación en estudios medioambientales en distintos medios: residuos farmacéuticos, residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas, así como metabolitos de estos productos.

Así mismo, se aplica en la determinación de trazas de residuos de contaminantes en productos alimenticios (24).

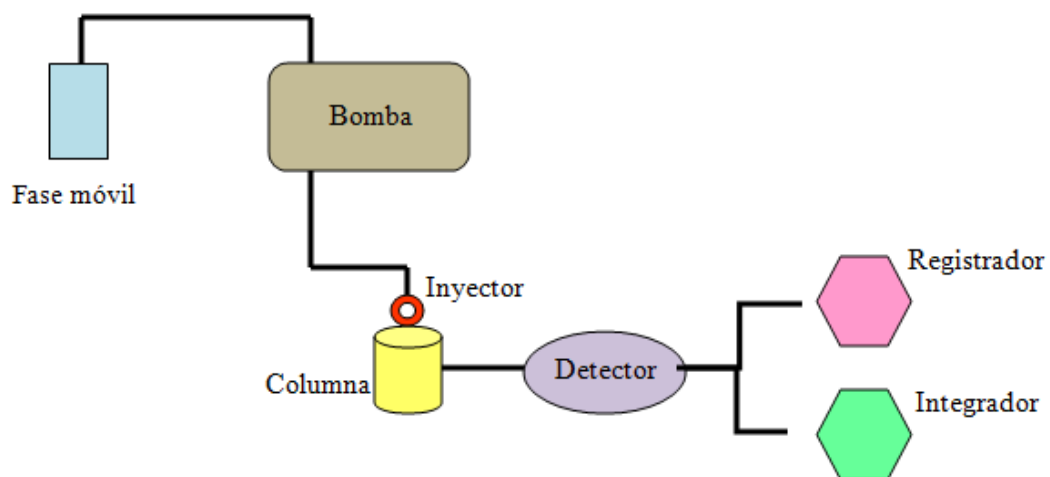


Figura 8. Esquema de un cromatógrafo de líquidos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Reactivos y muestras.

4.1.1 Patrones y disoluciones.

Los reactivos utilizados para llevar a cabo el método son los que se presentan en la siguiente tabla:

Reactivo	Nº CAS	Empresa
Ácido fórmico	64-18-6	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri,EE.UU)
Acetona (grado HPLC)	67-64-1	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri,EE.UU)
Acetonitrilo (grado HPLC)	75-05-8	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri,EE.UU)
Aceite de soja epoxidado (estándar interno)	08-07-8013	Fluka. (St.Louis, Missouri,EE.UU)

Tabla 1.Tabla de reactivos.

También fue necesario preparar una disolución de acetona con ácido fórmico al 0,1% (disolvente A) y una disolución de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (disolvente B), necesarias posteriormente para el uso del sistema LC-MS.

Para poder realizar la recta de calibrado fue necesario preparar una solución patrón de ESBO con una concentración de 500 ppm.

4.1.2 Muestras.

Para realizar el análisis de ESBO en el alimento se utilizaron distintos pates, los cuales fueron paté 2 pates de pato de distinta marca, paté de campaña y paté de finas hierbas.

El paté de pato 1 tenía como ingredientes hígado y grasa de pato (36%), hígado y carne de pollo (30%), carne y tocino de cerdo (9%) leche descremada, sal aromas, ácido ascórbico, potenciador del sabor (E-621) y nitrato sódico. Este paté de pato se identificó como PP.

El paté de pato 2 tenía como ingredientes hígado y grasa de pato (42%), grasa de cerdo, hígado de pollo, leche descremada, sal aromas, ácido ascórbico, potenciador del sabor (E-621) y nitrato sódico. Este paté de pato se identificó como PATO.

El paté de campaña tenía como ingrediente carne e hígado de cerdo (27%), leche descremada, huevo, sal, especias, aromas, potenciador del sabor (E-621), nitrito sódico y estabilizante (E-45li). Este paté se identificó como PC.

El paté de finas hierbas tenía como ingredientes carne e hígado de cerdo (22%), leche descremada, huevos, sal, especias y aromas, finas hierbas, potenciador del sabor (E-621), dextrosa y conservador (nitrato sódico). Este paté se identificó como FH.

4.2 Análisis por LC-ESI-MS/MS.

La determinación por espectrometría de masas se llevó a cabo en modo “daughters”). Se usa un voltaje (usualmente entre 1000 y 3500 V) el cual se aplica a un capilar por donde una solución líquida fluye. El voltaje aplicado causa la formación de iones en estado líquido los cuales son eyectados del capilar en forma de un aerosol que contiene gotas de iones o iones con moléculas del solvente con diferentes grados de solvatación. Estas gotas comienzan a reducirse en tamaño de modo que los iones eventualmente sufren repulsiones electrostáticas entre ellos que generan su expulsión de las gotas. De esta manera, los iones en estado gaseoso son generados y pasan por el cono hacia el detector. El detector está formado por una serie de dispositivos que transforman los iones en electrones y luego en fotones. Estos últimos son ampliados y detectados en el fotomultiplicador el cual registra la señal (24).

4.2.1 Equipo.

El equipo utilizado para realizar el análisis de ESBO es el sistema LC Ultra Performance Acquity (Waters Corporation, Milford MA, EE.UU.), compuesto por bomba cuaternaria de suministro de disolvente, un inyector automático termostaticado y el compartimiento del horno de columna.

La separación cromatográfica se realizó usando una columna de 1,7 μ m 2,1x100mm Acquity UPLC BEH C.

La detección se llevó a cabo utilizando un Acquity TQD tándem-MS cuadrupolo equipado con una fuente de electrospray Z-spray de ionización (ESI) (Waters Corporation, Milford MA, EE.UU). La detección ESI-MS / MS se realizó en el monitoreo de reacción múltiple (MRM).

4.2.2 Condiciones de análisis.

Las condiciones de análisis que se utilizaron para llevar a cabo el análisis de ESBO son las que se muestran en la siguiente tabla:

Flujo		0,6 ml/min
Temperatura de la columna		35°C
Volumen de inyección		5 ml
Gradiente		
Tiempo(min)	%A	%B
0	50	50
3	80	20
4.5	50	50
5.5	50	50
Electrospray MS		
Flujo del gas de desolvatación		600 L h ⁻¹
Flujo del gas de Cono		60 L h ⁻¹
Temperatura del gas de desolvatación		450 °C
Temperatura de la fuente		150 °C
Voltaje Capilar		3 kV

Tabla 2. Tabla de parámetros cromatográficos.

Componente	Tiempo de retención (minutos)	Transición
P1 (C ₆₅ H ₉₄ O ₉)	1.76	927>671,5
P2 (C ₆₂ H ₉₄ O ₅)	1.05	941,7>686,3
P3 (C ₅₉ H ₉₆ O ₈)	1.46	955,7>673,06
P4 (C ₅₇ H ₁₀₀ O ₁₁)	0.74	983,7>671,2
P5 (C ₅₇ H ₁₀₀ O ₁₀)	0.79	983,91>685,6
P6 (C ₆₀ H ₁₀₀ O ₉)	0.64	997,8>685,17
P7 (C ₅₇ H ₉₆ O ₁₃)	0.61	1012,8>699,95

Tabla 3. Tabla con las transiciones utilizadas para monotorizar, el tiempo de retención, el componente detectado en cada transición y su concentración en el ESBO.

4.3 Análisis de ESBO mediante el método de análisis UPLC-ESI-MS/MS.

4.3.1 Preparación de las muestras.

Se homogeniza la muestra mediante una batidora convencional. Después en un vial de 20 ml se pesan 0.07 gr de paté homogeneizado y se añaden 7 gr de acetona. Para favorecer la extracción de ESBO de la muestra se realiza una agitación del vial en el Vortex durante dos minutos. Para poder extraer de forma más sencilla la acetona con ESBO separando así la muestra de la acetona, se realiza una centrifugación a 2.500 rpm durante 3 minutos. Tras la centrifugación se extrae la acetona, se hace pasar por un filtro de 0.22µm y se encapsula en un vial para su posterior análisis.

Este proceso se realiza por triplicado para cada una de los pates a analizar.

4.3.2 Recta de calibrado.

Para obtener la recta de calibrado lo primero que se debe hacer es dopar un 1 gr de paté libre de ESBO con unos determinados gr de solución patrón de ESBO de 500 ppm. La siguiente tabla muestra los puntos de la recta que se realizaron, los gramos de pate pesados y los gramos de solución patrón de ESBO añadidos:

RECTA DE CALIBRADO		
Concentración (ppm)	gr de paté	gr de patrón ESBO
5	1,011	0,01
10	1,0727	0,0206
30	1,0074	0,0745
45	1,0227	0,0913
60	1,0454	0,1257
80	1,0662	0,1622

Tabla 4. Datos de la recta de calibrado.

Una vez añadidas esas cantidades en viales de 20 ml para favorecer que el paté se dope se llevan a agitación durante 24 h. Pasadas las 24 h se realiza el procedimiento de preparación de muestras explicado anteriormente, sin embargo este proceso se realiza por quintuplicado para cada uno de los puntos.

RECTA DE CALIBRADO					
Punto 5 ppm	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5
gr de paté	0,0766	0,0778	0,079	0,0745	0,0719
gr de acetona	7,0081	7,0836	7,0052	7,0034	7,0123
Punto de 10 ppm	10.1	10.2	10.3	10.4	10.5
gr de paté	0,0789	0,0721	0,0744	0,0757	0,0729
gr de acetona	7,0025	7,0027	7,0141	7,0439	7,0015
Punto de 30 ppm	30.1	30.2	30.3	30.4	30.5
gr de paté	0,0723	0,0725	0,0725	0,076	0,0773
gr de acetona	7,0318	7,0414	7,0015	7,0259	7,1156
Punto de 45 ppm	45.1	45.2	45.3	45.4	45.5
gr de paté	0,068	0,072	0,078	0,076	0,071
gr de acetona	7,434	7,021	7,116	7,065	7,293
Punto de 60 ppm	60.1	60.2	60.3	60.4	60.5
gr de paté	0,0737	0,073	0,0768	0,0767	0,0735
gr de acetona	7,1918	7,0887	7,035	7,078	7,0782
Punto de 80 ppm	80.1	80.2	80.3	80.4	80.5
gr de paté	0,074	0,073	0,079	0,073	0,076
gr de acetona	7,255	7,026	7,163	7,045	7,244

Tabla 5. Datos de las replicas realizadas a partir del paté dopado anteriormente.

5. Resultados.

5.1 Recta de calibrado.

Una vez finalizado el análisis de las muestras por parte del equipo LC, de cada replica analizada se obtiene un cromatograma. Los cromatogramas presentan 7 picos distintos los cuales corresponden a las distintas transiciones utilizadas para monotorizar. El esquema siguiente presenta de forma visual este hecho:

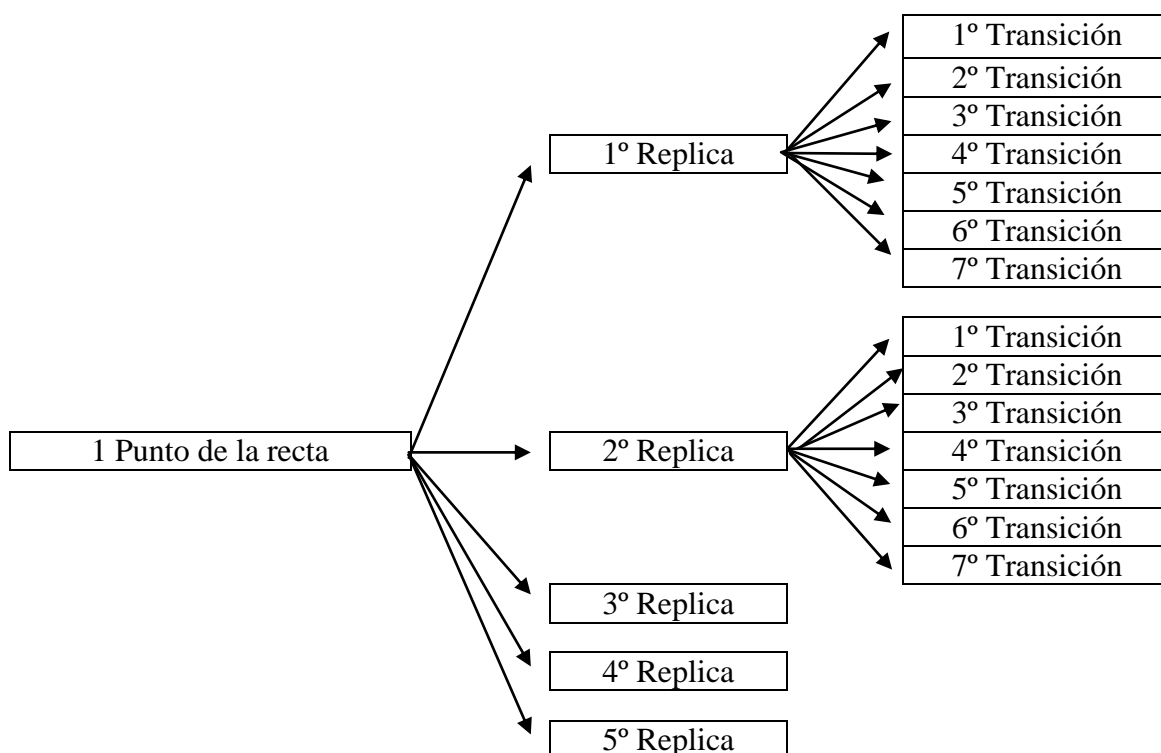


Figura 9. Esquema de un punto de la recta con sus correspondientes replicas y transiciones.

En la figura 10 se muestra un cromatograma de una disolución patrón y en la figura 11 las transiciones extraídas con las que se va a trabajar.

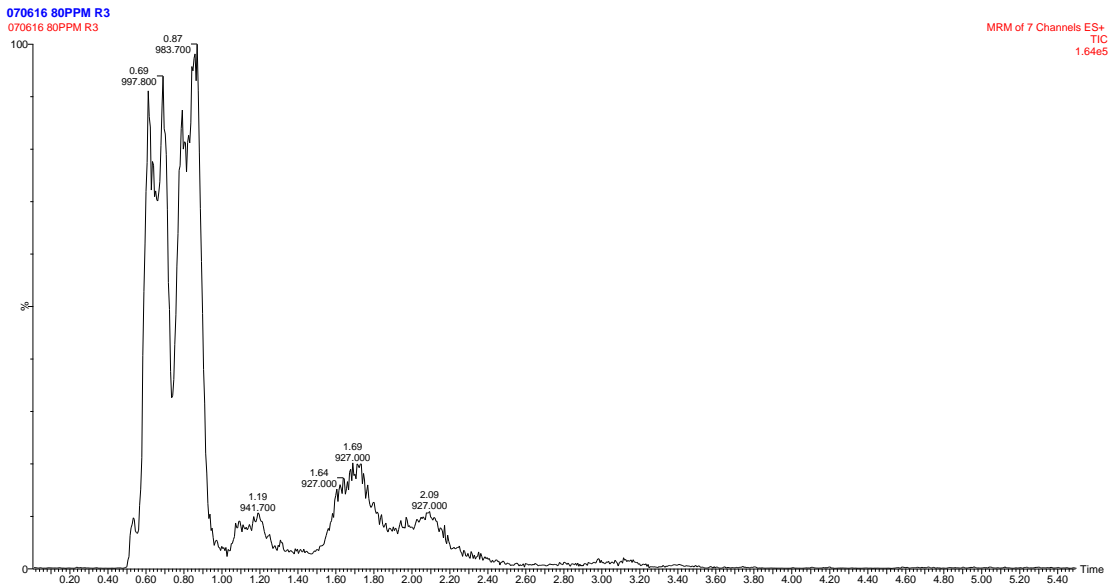


Figura 10. Cromatograma de una de las disoluciones patrón de 60 ppm.

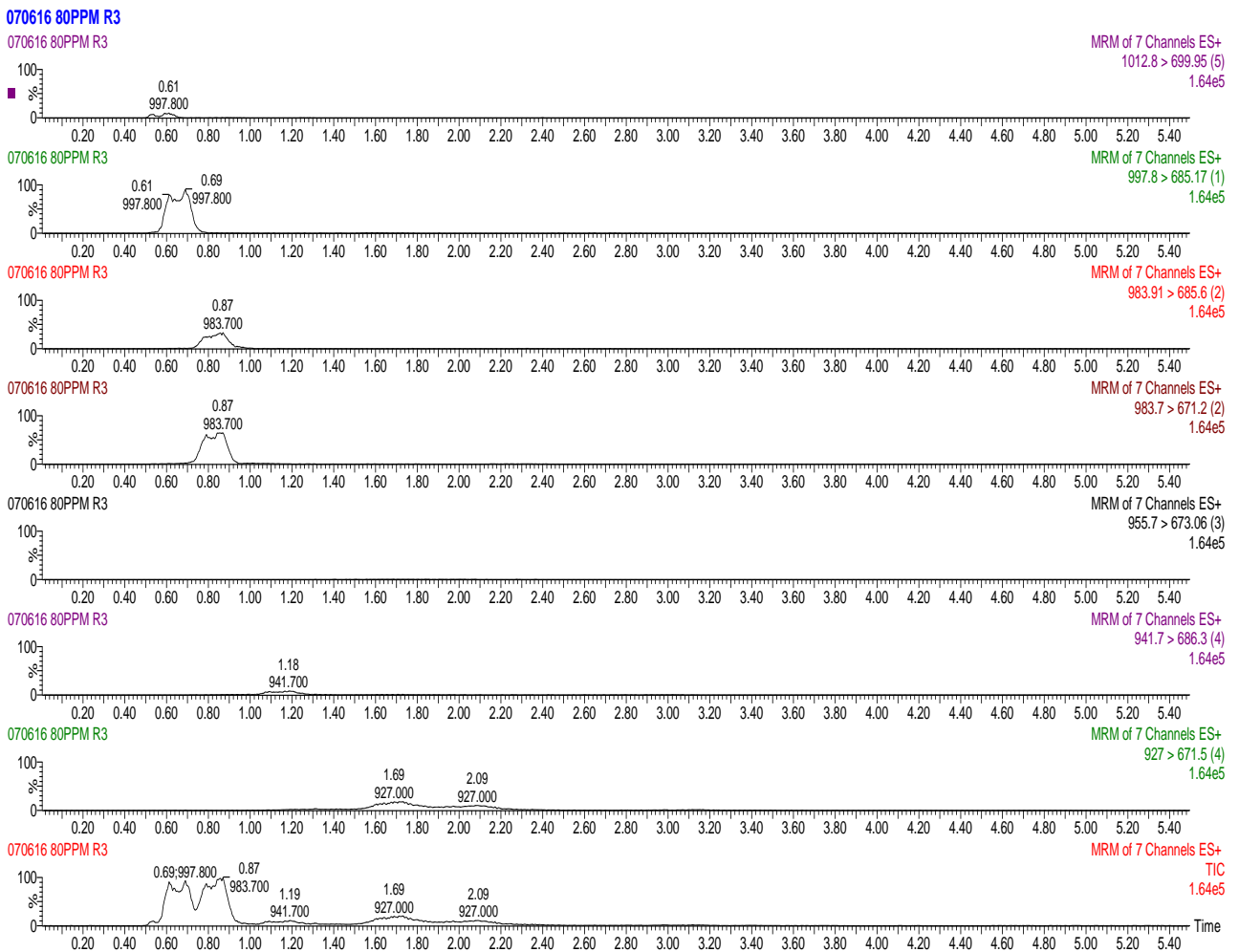


Figura 11. Transiciones con las que se van a trabajar de la disolución 60 ppm.

Se calcula el área que corresponde a cada transición, esto se realiza en todas las replicas de cada punto de la recta. Una vez ya se han calculado todas las áreas, para cada punto de la recta se realiza la media de las áreas obtenidas en cada transición. Con esto cada punto de la recta dispone del área media de cada transición.

Para poder obtener una recta de cada una de las transiciones se deben agrupar las áreas medias de cada concentración en función de la transición a la que pertenecen. Después para obtener la recta solo queda representar la concentración con respecto al área, esto se realiza para cada una de las transiciones. Las rectas obtenidas para cada transición se muestran en la siguiente tabla:

	Recta	R²
<i>1º Transición</i>	$y=82.657x+2246.7$	0,9434
<i>2º Transición</i>	$y=40.983x+482.16$	0,9972
<i>4º Transición</i>	$y=327.73x+2353.7$	0,9928
<i>5º Transición</i>	$y=154.21x+813.16$	0,9999
<i>6º Transición</i>	$y=400.16x+1833.2$	0,9998
<i>7º Transición</i>	$y=17.434x+78.101$	0,9547

Tabla 6. Rectas obtenidas para cada transición y la R².

Para la transición 3 no se pudo obtener una recta puesto que en ninguna de las replicas analizadas se pudo calcular el área para dicha transición. Además para poder obtener estas rectas fue necesario eliminar algún punto (marcado en naranja) con el fin de obtener un R² superior a 0.9.

5.2 Calculo de la cantidad de ESBO.

Para obtener la concentración de ESBO presente en las muestras analizadas lo primero que se debe hacer es calcular el área de cada transición de todas las muestras analizadas. En la figura 12 se muestra un cromatograma de una de las muestras analizadas y en la figura 13 las transiciones extraídas con las que se va a trabajar en esa muestra.

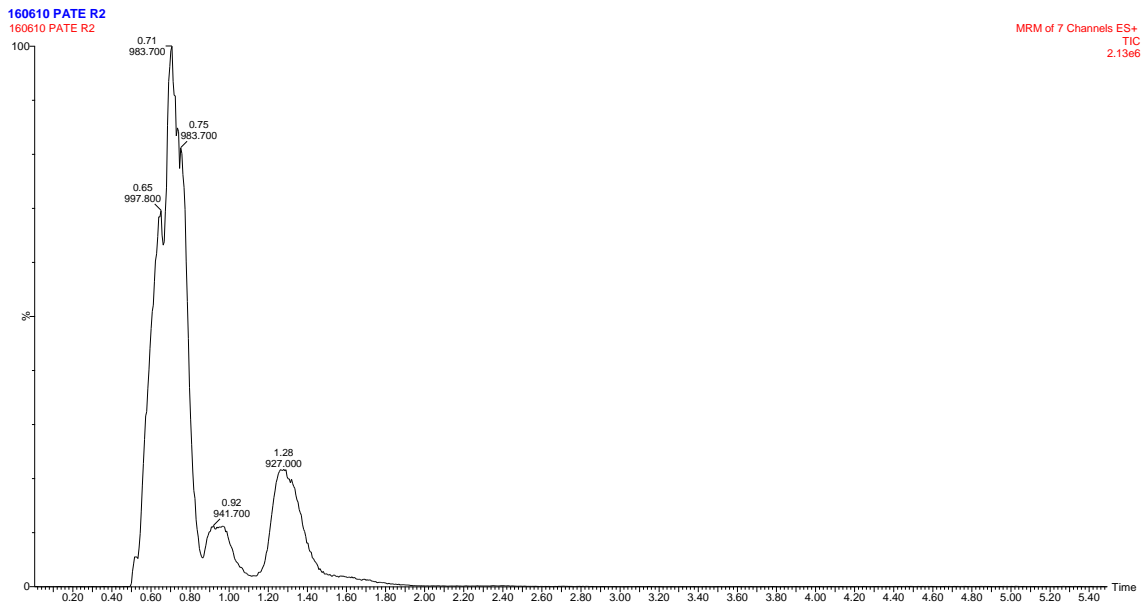


Figura 12. Cromatograma de la réplica 2 de la muestra de paté de pato 2.

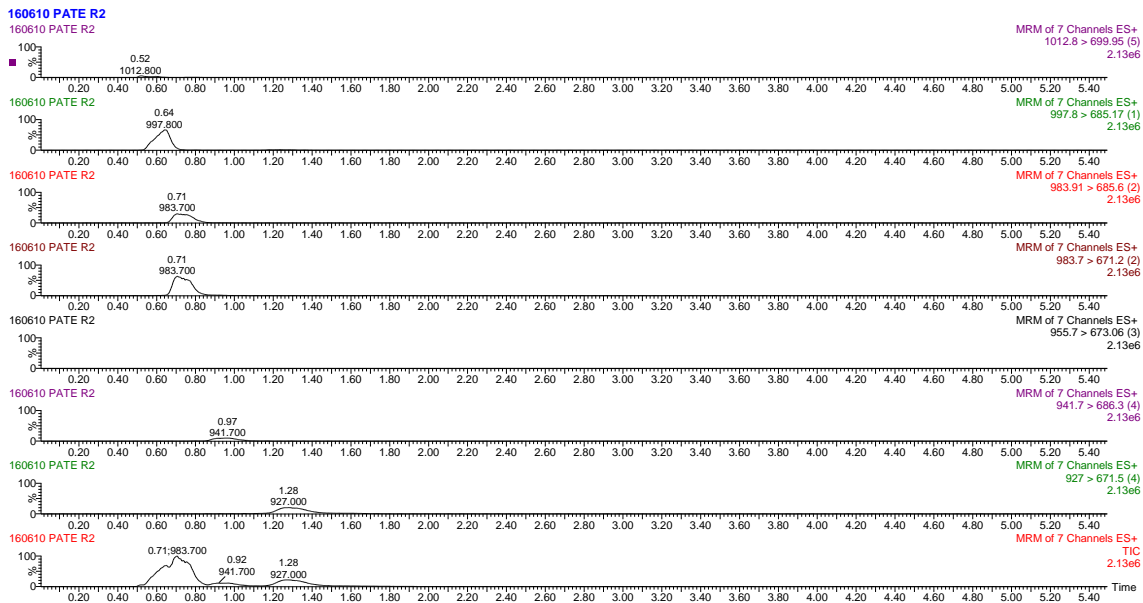


Figura 13. Transiciones de la réplica 2 de la muestra de paté de pato 2.

Una vez realizado esto, en cada una de las muestras se sustituye el área obtenida en la recta de transición correspondiente, las cuales se han obtenido previamente. El resultado obtenido se debe multiplicar por la concentración del compuesto que se detecta en cada transición. Estas concentraciones son las siguientes:

Componente	% en la mezcla
P1 (C ₆₅ H ₉₄ O ₉)	53
P2 (C ₆₂ H ₉₄ O ₅)	3,09
P4 (C ₅₇ H ₁₀₀ O ₁₁)	10,69
P5 (C ₅₇ H ₁₀₀ O ₁₀)	10,69
P6 (C ₆₀ H ₁₀₀ O ₉)	6,69
P7 (C ₅₇ H ₉₆ O ₁₃)	9,49

Tabla 7. Concentraciones de los distintos compuestos que forman parte del ESBO.

El resultado de la multiplicación se suma para así obtener la concentración de ESBO que tiene esa muestra, este resultado se da en mg/kg.

A continuación se muestran los resultados de ESBO en las muestras analizadas como la media de las tres réplicas y con la desviación estándar.

Muestra	Concentración de ESBO (mg/kg)
<i>Finas hierbas</i>	17,5±0,8
<i>Paté de pato 1</i>	50,5±0,3
<i>Paté de campaña</i>	46,8±0,7
<i>Paté de pato 2</i>	53,5±0,8

Tabla 8. Concentración de ESBO en las muestras analizadas.

6. Conclusiones

Los resultados que se han obtenido tras el análisis de las cuatro muestras de paté muestran que todos ellos presentan cierta cantidad de ESBO.

De todas estas muestras la de paté de finas hierbas, presenta en el producto una concentración menor que el resto de las muestras que tienen más materia grasa. Todas ellas tienen una concentración inferior al límite de migración específica fijado por el Reglamento 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, el cual es de 60 mg/kg.

El método desarrollado ha resultado ser un método rápido de análisis de ESBO en comparación con el método de Castle, con mínima manipulación de la muestra y por eso con menos probabilidad de error. Esto permite el análisis de muestras en serie de forma más fácil que con el método oficial.

Conclusions

The results obtained after analysis of the four samples of paté show that they all samples have a certain amount of ESBO.

Of these samples, the fine herbs paté, presented in the product lower than other samples having more fat matter concentration. All have a lower concentration specified migration limit set by Regulation 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, which is 60 mg / kg.

The method developed has proved to be a quick method of analysis ESBO compared to the method Castle, with minimal sample handling and therefore less chance of error. This allows the analysis of samples in series so easier than with the official method.

7. Aportaciones en materia de aprendizaje.

La realización de este trabajo me ha permitido saber manejar de forma más adecuada las bases de datos y la búsqueda de artículos científicos, además de mejorar en mi capacidad a la hora de seleccionar y sintetizar la información encontrada tanto en español como en inglés.

Este trabajo también me ha permitido trabajar de forma más autónoma dentro de un laboratorio, permitiéndome también utilizar equipos que durante la realización del grado no había tenido la oportunidad de utilizar.

8. Bibliografía.

1. L. Boyacá y Á. Beltrán. Producción de epóxido de soya con ácido peracético generado *in situ* mediante catálisis homogénea. *Ingeniería e investigación*, 30(5): 136-140.(2010)
2. M. Padwe . *Advances in Chemistry*, Vol. 10. Austin, Texas. (1954)
3. A.Fankhauser-Noti, K.Fiselier,S.Biedermann-Brem y K.Grob. Assessment of epoxidized soy bean oil (ESBO) migrating into foods: Comparison with ESBO-like epoxy fatty acids in our normal diet. *Food and Chemical Toxicology*, 44(6): 1279–1286.(2006)
4. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to the use of Epoxidised soybean oil in food contact materials. *EFSA Journal* ,64(7):1-17. (2004)
5. A.Córdoba y J. Medina. Optimización de formulaciones de PVC flexible. Sistema plastificante DOP-ESBO. *Revista iberoamericana de polímeros*, Vol 9(3), (2009).
6. G. Wypych. *Handbook of plasticizers*. ChemTec, Toronto, Canadá, (2004).
7. M.Suman. Specific migration of plasticizers coming from closure gaskets: the LC-MS direction.Barilla SpA-Food research labs,Parma,Italy. (2011).
8. The British Industrial Biological Research Association Industrial (BIBRA).Toxicity profile: epoxidised soy Bean oil.UK. (1997)

9. C. Simoneau y L.Fantoni. European survey of contamination of homogenized baby food by epoxidized soybean oil migration from plasticized PVC gaskets. *Food Additives and Contaminants*, 20(4): 1087-1096. (2003)

10. Unión Europea. Reglamento 10/2011, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, y sus posteriores modificaciones. *Diario oficial de la Unión Europea*, 15 de enero de 2011, núm 12, pp. 1-89.

11. Unión Europea. Directiva 2006/141, de 22 de diciembre de 2006, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE. *Diario oficial de la Unión Europea*, 30 de diciembre de 2006, núm. 401, pp. 1-33.

12. Unión Europea. Directiva 2006/125, de 5 de diciembre de 2006, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. *Diario oficial de la Unión Europea*, 6 de diciembre de 2006, núm. 339, pp. 16-35.

13. España. Orden de 31 de enero de 1989, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de cloruro de vinilo. *Boletín oficial del estado*, 11 de febrero de 1989, núm. 36, pp. 4170-4174.

14. España. Real Decreto 103/2009, de 6 de febrero de 2009, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. *Boletín oficial del estado*, 17 de febrero de 2009, núm.41, pp. 16869-16875.

15. España. Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo de 2008, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. Boletín oficial del estado, de 30 de mayo de 2008, núm. 131, pp. 25070-25120.

16. V. Fernández. Interacción envase-producto: detección de causas de problemas organolépticos, migración de componentes y residuos de envases en contacto con el alimento. Ministerio de Industria, Argentina.(2013).

17. L.Castle, M.Sharman y J.Gilbert. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of epoxidized soybean oil. Contamination of foods by migration from plastic packaging. Journal association of analytical chemistry, Vol 71(6): 1183-85. (1988)

18. A.Fankhauser-Noti, K. Fiselier, S. Biedermann-Brem y K. Grob. Assessment of epoxidized soy bean oil (ESBO) migrating into foods: comparison with ESBO-like epoxy fatty acids in our normal diet. Food chemical toxicology, Vol 44(8):1279-86. (2006)

19. M.Suman, E. De Dominicis, C. Commissati. Trace detection of the chlorohydrins of epoxidized soybean oil in foodstuffs by UPLC-ESI-MS/MS. J Mass Spectrom. Sep; 45(9):996-1002.(2010)

20. A.Weller, M.Herrnreiter y A.Donaubauer. A miniaturized method to determine epoxidized soybean oil in baby food. LC-GC Europe, Vol 20(5):280. (2007).

21. T.Rothenbacher y W. Schwack. Determination of epoxidized soybean oil by gas chromatography/single quadrupole and tandem mass spectrometry stable isotope dilution assay. *Rapid communications in mass spectrometry*, Vol 21(12):1937-43. (2007)

22. Y.Kawamura, S.Kanno, M.Mutsuga y K.Tanamoto. Determination of epoxidized soybean oil in bottled foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. Vol 47(6):243-8. (2006).

23. E.Duffy y MJ.Gibney. Use of a food-consumption database with packaging information to estimate exposure to food-packaging migrants: epoxidized soybean oil and styrene monomer. *Food additives contamination*, Vol 24(2):216-25.(2007).

24. J.Pitt. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. Vol 30(1): 19–34.(2009).