


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica



**DETERMINACIÓN DE ÓXIDOS DE
COLESTEROL EN MUESTRAS DE
ALIMENTOS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE GASES**

Juan José Lozada Castro

Tesis Doctoral

Madrid 2012

Directores:

Dra. María Jesús Santos Delgado

Dr. Luis María Polo Díez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica



“DETERMINACIÓN DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EN
MUESTRAS DE ALIMENTOS MEDIANTE
CROMATOGRAFIA DE GASES”

Juan José Lozada Castro

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor

por la Universidad Complutense de Madrid

Directores del trabajo:

Dra. M^a Jesús Santos Delgado

Departamento de Química Analítica

Facultad de CC. Químicas

Universidad Complutense de Madrid

Catedrático, Luis M^a Polo Díez

Departamento de Química Analítica

Facultad de CC. Químicas

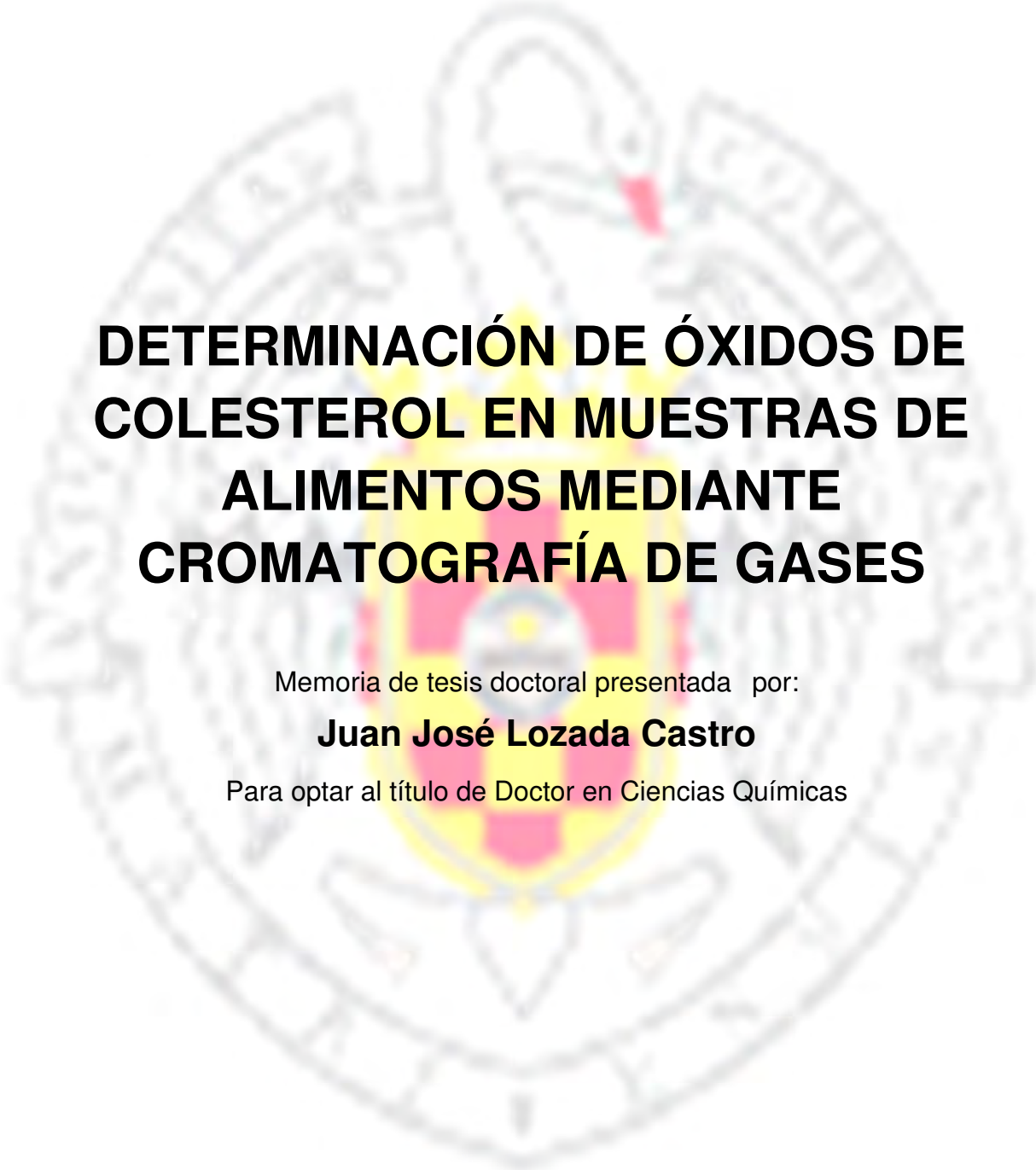
Universidad Complutense de Madrid

Madrid 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica



**DETERMINACIÓN DE ÓXIDOS DE
COLESTEROL EN MUESTRAS DE
ALIMENTOS MEDIANTE
CROMATOGRFÍA DE GASES**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Juan José Lozada Castro

Para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Directores:

Dra. María Jesús Santos Delgado

Dr. Luis María Polo Díez

Madrid 2012



Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléfono: 91 394 4333 31
Fax: 91 394 43 29

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

MARÍA JESÚS SANTOS DELGADO Y LUIS MARÍA POLO DÍEZ
PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “DETERMINACIÓN DE ÓXIDOS DE
COLESTEROL EN MUESTRAS DE ALIMENTOS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE GASES” ha sido realizado en este Departamento
bajo nuestra dirección, constituyendo la TESIS DOCTORAL de su autor

Dra. María Jesús Santos Delgado

Dr. Luis María Polo Díez

Profesora Titular

Catedrático

MADRID, Noviembre 2012

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral se hizo realidad gracias a:

Dios porque es el ser que me provee de la fuerza, la dedicación, la inteligencia y las oportunidades de mi vida.

Mi madre y mi familia por el apoyo incondicional en los momentos difíciles, ofreciéndome su amor y afecto que son los soportes más importantes de la vida.

La universidad de Nariño por la gran oportunidad de financiar mi sostenimiento para concluir mi complementación académica a nivel de posgrado.

El gobierno Español por acogerme y darme la oportunidad de conocer tan interesante cultura.

La Comunidad de Madrid, ya que sin su financiación, proyecto ref. S-0505/AGR/0314, no hubiese sido posible desarrollar tan importante investigación.

La universidad de Complutense de Madrid por permitir la posibilidad de recibir tan importante formación a nivel de posgrado, ya que gracias a su nivel académico fue posible el desarrollo del presente trabajo.

Al grupo de Investigación “Cromatografía Analítica”, por la cooperación y colaboración de sus integrantes; especialmente a la Dra María Eugenia de León González por sus aportes en la interpretación de Resultados.

Al CAI de masas por sus aportes con los análisis que hicieron posible la identificación y caracterización de los compuestos de interés.

Mis grandes amigos y profesores los Doctores María Jesús Santos Delgado y Luis M^a Polo Díez por sus aportes y enseñanzas que han marcado mi vida profesional.

Mis amigos Saúl, José, Yasel y Sara quienes en los momentos difíciles me acompañaron incondicionalmente.

Mis compañeros de trabajo Jesús Romo, Jesús Cabrera, Henry Insuasty, Alejandro Galeano, Ximena Delgado, quienes a la distancia me acompañaron y me brindaron su ayuda para concluir los trabajos de laboratorio.

Al Dr. Henry Insuasty por sus aportes en la interpretación de los mecanismos de reacción.

A todas aquellas personas que de una u otra forma intervinieron y aportaron a mi trabajo.

ÍNDICE

INDICE	I
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Generalidades sobre el colesterol	11
<i>2.1.1. Estructura</i>	12
<i>2.1.2. Síntesis</i>	13
<i>2.1.3. Reacciones de oxidación</i>	18
2.1.3.1. Autooxidación	20
2.1.3.2. Fotooxidación	23
2.1.3.3. Oxidación enzimática	25
<i>2.1.4. Antioxidantes del colesterol</i>	25
<i>2.1.5. Problemas de salud asociados con el colesterol</i>	27
<i>2.1.6. Tratamientos</i>	30
<i>2.1.7. Regulación biológica del colesterol</i>	31
<i>2.1.8. Contenido en los alimentos de consumo frecuente</i>	34
2.2. Generalidades sobre productos de oxidación del colesterol, COPs	36
<i>2.2.1. Estructuras</i>	36
<i>2.2.2. Factores que determinan su formación</i>	38
2.2.2.1. Temperatura	38
2.2.2.2. Radiación	39
2.2.2.3. Envasado y almacenamiento	40
2.2.2.4. Naturaleza de la matriz	40
<i>2.2.3. Características químicas y biológicas</i>	41

2.2.4. Estudios de Toxicidad	43
2.2.4.1. In-Vivo	43
2.2.4.2. In-Vitro	45
2.2.5. Presencia en alimentos	47
2.3. Irradiación de alimentos para su conservación	48
2.3.1. Generalidades	49
2.3.2. Tipos de radiación	49
2.3.2.1. Rayos gamma	49
2.3.2.2. Rayos X	50
2.3.2.3. Electrones acelerados (E-beam)	50
2.3.3. Instrumental para la irradiación	51
2.3.4. Normativa internacional y legislación española	51
2.3.5. Efectos de la irradiación	55
2.3.5.1. Químicos	55
2.3.5.2. Biológicos	57
2.3.5.3. Calidad nutricional y características organolépticas de los alimentos	61
2.3.6. Aplicación en la Industria Alimentaria	65
2.4. Preparación de muestra para el análisis de COPs mediante técnicas cromatográficas	69
2.4.1. Extracción de la fracción lipídica	69
2.4.1.1. Lixiviación	69
2.4.1.2. Extracción acelerada con disolventes, ASE	70
2.4.1.3. Extracción con fluidos supercríticos	71
2.4.2. Purificación y enriquecimiento	72

2.4.2.1.	Extracción en fase sólida	72
2.4.2.2.	Saponificación	73
2.4.2.3.	Transesterificación	74
2.4.3.	<i>Problemas asociados con la preparación de muestra</i>	75
2.5.	Técnicas cromatográficas para la determinación de COPs	77
2.5.1.	<i>Aspectos específicos en HPLC en relación con la determinación de COPs</i>	78
2.5.2.	<i>Aspectos específicos en GC en relación con la determinación de COPs</i>	78
2.5.3.	<i>Métodos cromatográficos para la determinación de COPs</i>	78
2.6.	Tratamiento quimiométrico de los datos	82
2.6.1.	<i>Análisis de la Varianza</i>	82
2.6.2.	<i>Diseño experimental</i>	87
2.6.3.	<i>Análisis de componentes principales</i>	97
3.	OBJETIVOS	105
4	PARTE EXPERIMENTAL	111
4.1	Reactivos	113
4.1.1	<i>Estándares</i>	113
4.1.2	<i>Disolventes</i>	113
4.1.3	<i>Otros reactivos</i>	113
4.2	Muestras	114
4.3	Equipos y Materiales	114
4.3.1	<i>Equipos cromatográficos</i>	114
4.3.1.1	Cromatógrafo HPLC	114

4.3.1.2	Cromatógrafo de gases	115
4.3.1.3	Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas	116
4.3.2	<i>Instrumental para la preparación de las muestras</i>	117
4.3.2.1	Extractor acelerado con disolventes, ASE	117
4.3.2.2	Sistemas de evaporación de disolventes	118
4.3.2.2.1	<i>Rotavapor</i>	118
4.3.2.2.2	<i>Evaporadores de grandes volúmenes de disolventes</i>	118
4.3.2.2.3	<i>Evaporador de pequeños volúmenes de disolventes</i>	119
4.3.2.3	Sistema de vacío para SPE	120
4.3.2.4	Agitador mecánico	120
4.3.2.5	Sistema para eliminar el exceso del derivatizante Tri-Sil	121
4.3.3	<i>Otros sistemas</i>	122
4.3.4	<i>Materiales</i>	122
4.4.	Procedimientos	123
4.4.1.	<i>Preparación de las disoluciones patrón de reserva</i>	123
4.4.1.1.	Disoluciones individuales de COPs	123
4.4.1.1.1.	<i>Disolución de 7β-OH de 400 mg/L</i>	123
4.4.1.1.2.	<i>Disoluciones patrón individuales de 1000 mg/L de los siguientes estándares: Colesterol, β-epoxido, α-epoxido, triol, 6-ceto, 7-ceto, 25- OH</i>	123
4.4.1.2.	Disolución patrón de 1000 mg/L del IS, 9,10-difenil antraceno	123
4.4.2.	<i>Preparación de las disoluciones de trabajo</i>	124
4.4.2.1.	Disolución de 7 β -OH de 5 y 50 mg/L	124
4.4.2.2.	Disoluciones individuales de 5 y 50 mg/L de los estándares: colesterol; β -epoxido; α -epoxido; triol; 6-ceto; 7-ceto; 25- OH	124

4.4.2.3.	Disolución de trabajo de estándar interno de 50 mg/L	124
4.4.3.	<i>Disoluciones para el calibrado de COPs mediante HPLC</i>	124
4.4.4.	<i>Determinación de parámetros característicos de las muestras</i>	125
4.4.4.1.	Agua	125
4.4.4.2.	Lípidos	125
4.4.4.3.	Colesterol	126
4.4.5.	<i>Irradiación de las muestras</i>	127
4.4.6.	<i>Preparación de muestras para la determinación de COPs</i>	127
4.4.6.1.	Lixiviación	127
4.4.6.2.	Extracción acelerada con disolventes, ASE	128
4.4.6.3.	Extracción en fase sólida, SPE	128
4.4.6.3.1.	<i>Clean up para HPLC</i>	128
4.4.6.3.2.	<i>Clean up para GC</i>	129
4.4.7.	<i>Separación de COPs en patrones mediante HPLC</i>	129
4.4.7.1.	Calibrados de COPs mediante HPLC	130
4.4.8.	<i>Determinación de COPs mediante HPLC en muestras de alimentos</i>	130
4.4.9.	<i>Validación del método para la determinación de COPs mediante HPLC</i>	131
4.4.10.	<i>Separación de COPs en patrones mediante GC-FID</i>	132
4.4.10.1.	Derivatización con Tri-Sil	132
4.4.10.2.	Selección del patrón interno (IS)	132
4.4.10.3.	Selección del caudal de la fase móvil (He)	132
4.4.10.4.	Calibrados de los COPs mediante GC-FID	133
4.4.11.	<i>Identificación de los derivados de COPs mediante GC-MS</i>	133

4.4.11.1.	Patrones	133
4.4.11.2.	Muestras	134
4.4.12.	<i>Estudios de estabilidad de los Tri-Sil-COPs-derivados</i>	135
4.4.13.	<i>Determinación de COPs mediante GC-FID en muestras de alimentos</i>	135
4.4.14.	<i>Validación del método para la determinación de COPs mediante GC</i>	137
4.4.15.	<i>Influencia de los parámetros característicos de las muestras en la formación de COPs</i>	137
4.4.16.	<i>Identificación y minimización de transformaciones de COPs durante la preparación de muestra para análisis cromatográfico mediante GC-FID</i>	138
4.4.16.1.	Detección de transformaciones de COPs durante el clean up mediante SPE	138
4.4.16.1.1.	<i>Modo de elución total</i>	138
4.4.16.1.2.	<i>Modo colección de fracciones</i>	139
4.4.17.	<i>Metodología propuesta para la determinación de COPs en muestras de alimentos mediante GC-FID con minimización de transformaciones</i>	140
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	143
5.1	Análisis de COPs mediante HPLC	145
5.1.1.	<i>Determinación de los parámetros característicos de las muestras</i>	147
5.1.1.1.	<i>Agua</i>	147
5.1.1.2.	<i>Lípidos</i>	148
5.1.1.3.	<i>Colesterol</i>	148
5.1.2.	<i>Separación de los COPs mediante HPLC en patrones</i>	149
5.1.3.	<i>Características analíticas</i>	150
5.1.4.	<i>Optimización de preparación de la muestra</i>	155
5.1.4.1.	Extracción de la fracción lipídica	156

5.1.4.2.	Clean up y preconcentración de COPs mediante SPE	161
5.1.5.	<i>Determinación de COPs mediante HPLC en muestras de alimentos</i>	161
5.1.5.1.	Carne picada	162
5.1.5.2.	Jamón cocido	163
5.1.5.3.	Jamón serrano	164
5.1.5.4.	Queso blando	164
5.1.6.	<i>Validación del método para la determinación de COPs mediante HPLC</i>	165
5.1.7.	<i>Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de alimentos. Estudios estadísticos</i>	168
5.1.7.1.	Análisis de la varianza, ANOVA	171
5.1.7.1.1.	<i>Carne picada</i>	171
5.1.7.1.2.	<i>Jamón cocido</i>	173
5.1.7.1.3.	<i>Jamón serrano</i>	175
5.1.7.1.4.	<i>Queso blando</i>	177
5.1.7.2.	Análisis de correlación	180
5.2.	Análisis de COPs mediante GC	183
5.2.1.	<i>Determinación de los parámetros característicos de las muestras</i>	185
5.2.1.1.	<i>Agua</i>	185
5.2.1.2.	<i>Lípidos</i>	186
5.2.1.3.	<i>Colesterol</i>	188
5.2.2.	<i>Reacción de derivatización de COPs patrón con Tri-Sil</i>	189
5.2.3.	<i>Optimización de parámetros cromatográficos para la separación de los COPs-Tri-Sil-derivados mediante GC-FID</i>	196
5.2.3.1.	Selección del patrón interno (IS)	196
5.2.3.2.	Selección del caudal de la fase móvil (He)	197

5.2.3.3.	Separación de COPs mediante GC-FID en patrones	197
5.2.4.	<i>Características analíticas</i>	200
5.2.5.	<i>Optimización de la extracción de la fracción lipídica</i>	205
5.2.6.	<i>Identificación de COPs mediante GC-MS en muestras de alimentos</i>	208
5.2.7.	<i>Estudios de la estabilidad de los Tri-Sil-COPs-derivados</i>	217
5.2.8.	<i>Determinación de COPs mediante GC-FID en muestras de alimentos</i>	218
5.2.8.1.	Carne picada	219
5.2.8.2.	Jamón cocido	220
5.2.8.3.	Jamón serrano	221
5.2.8.4.	Queso blando	221
5.2.8.5.	Salmón ahumado	222
5.2.9.	<i>Validación del método para la determinación de COPs mediante GC</i>	223
5.2.10.	<i>Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en las muestras de alimentos. Estudios estadísticos</i>	225
5.2.10.1.	Análisis de la varianza, ANOVA	225
5.2.10.1.1.	<i>Carne picada</i>	325
5.2.10.1.2.	<i>Jamón cocido</i>	230
5.2.10.1.3.	<i>Jamón serrano</i>	233
5.2.10.1.4.	<i>Queso blando</i>	235
5.2.10.1.5.	<i>Salmón ahumado</i>	237
5.2.10.2.	Análisis de correlación	241
5.2.10.3.	Análisis de Componentes principales, PCA.	242
5.2.10.3.1.	<i>Carne picada</i>	245
5.2.10.3.2.	<i>Jamón cocido</i>	245
5.2.10.3.3.	<i>Queso blando</i>	247

5.2.10.3.4.	<i>Jamón serrano</i>	248
5.2.10.3.5.	Salmón ahumado	249
5.3.	Influencia de los parámetros característicos de las muestras, contenido de agua, lípidos y colesterol en la formación de COPs	253
5.3.1.	<i>Análisis mediante HPLC-UV</i>	256
5.3.2.	<i>Análisis mediante GC-FID</i>	262
5.3.3.	<i>Carne picada</i>	273
5.3.4.	<i>Jamón cocido</i>	274
5.3.5.	<i>Jamón serrano</i>	274
5.3.6.	<i>Queso blando</i>	274
5.3.7.	<i>Salmón ahumado</i>	275
5.4.	Comparación de los métodos cromatográficos HPLC-UV y GC-FID para la determinación de COPs	277
5.5.	Identificación y minimización de transformaciones de COPs para su determinación mediante GC-FID en alimentos	281
5.5.1.	<i>Detección de transformaciones de COPs en estándares durante la etapa de clean up mediante SPE</i>	285
5.5.1.1.	Ensayos con cartuchos polares	285
5.5.1.1.1.	<i>Modo de elución total</i>	285
5.5.1.1.2.	<i>Modo colección de fracciones</i>	287
5.5.1.2.	Ensayo con cartuchos apolares	294
5.5.1.2.1.	<i>Modo de elución total</i>	294
5.5.1.2.2.	<i>Modo colección de fracciones</i>	295
5.5.2.	<i>Metodología propuesta para la determinación de COPs mediante GC en muestras de alimentos con minimización de transformaciones</i>	301
5.5.2.1.	Influencia del pH del tampón durante la evaporación del eluyente en las transformaciones de COPs	303

5.5.2.1.1.	<i>Ensayos con estándares</i>	303
5.5.2.1.2.	<i>Ensayos en muestras</i>	304
5.5.2.2.	Influencia de los parámetros característicos de las muestras de lomo sobre la formación de los COPs	311
5.5.3.	<i>Identificación de COPs mediante GC-TOF en muestras enriquecidas</i>	313
5.5.4.	<i>Determinación de COPs en muestras de lomo fresco y adobado irradiadas</i>	317
5.5.4.1.	Análisis de la varianza, ANOVA	320
5.5.4.1.1.	<i>Lomo fresco</i>	320
5.5.4.1.2.	<i>Lomo adobado</i>	323
5.5.4.2.	Análisis de correlación	325
5.5.4.3.	Análisis de Componentes principales, PCA	328
5.6.	Influencia de la irradiación E-beam del total de las muestras estudiadas sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy mediante PCA	331
6.	CONCLUSIONES	337
7.	BIBLIOGRAFIA	351
	APÉNDICES	373
	Listado de Tablas	375
	Listado de Figuras	380
	ANEXOS	387
	Publicaciones	389
	Congresos	429

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Área de los picos cromatográficos
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
Acetoacetil-CoA	Acetoacetil-coenzima A
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESA	Agencia Española de Seguridad Alimentaria
al.	Colaboradores
ANOVA	ANalysis Of VAriance (Análisis de varianza)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Asociación de químicos para la excelencia analítica)
A_r	Argon
A_r	Área relativa
ARN	Ácido ribonucleico
ASE	Accelerated Solvent Extraction (Extracción acelerada con disolventes)
ASIM	Atmospheric Space Interactions Monitor (Monitor de interacción del espacio atmosférico)
ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana para el Ensayo de Materiales)
b	Pendiente del calibrado
b_i	Coefficientes estimados de la ecuación
BHA	Butil hidroxianisol

BHT	Butil hidroxitolueno
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (N,O-bis (trimetilsilil) acetamida)
C ₁₈	Octadecilsilano
C ₈	Octilsilano
CCF	Cromatografía de capa fina
CE	Epicatequina
Ct	Catequina
CHCl ₃	Cloroformo
Clean up	Proceso de limpieza de las muestras
CODEX	Comisión creada por la FAO y la OMS para desarrollar normas alimentarias
Col	Colesterol
COPs	Cholesterol oxidation products (Óxidos de Colesterol, oxisteroles, productos de oxidación del colesterol)
COPs _T	COPs totales
cov _{ii}	Covarianza
CP	Carne picada
CSN	Consejo de seguridad nuclear
DCM	Diclorometano
EC	Ecuación de calibrado
ECD	Electron Capture Detector (Detector de captura de electrones)
EGC	Epilagocatequina
ER	Endoplasmic Reticulum (Membrana del retículo endoplásmico)
E _r	Error relativo
Et.P	Éter de petróleo

Et ₂ O	Éter etílico
eV	Electrón-voltios
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación)
FAO/OIEA/OMS	Comité mixto de expertos sobre la comestibilidad de los alimentos irradiados
FID	Flame Ionization Detector (Detector de ionización de llama)
F _m	Flujo de la fase móvil
FSC	Supercritical Fluid Chromatography (Cromatografía de fluidos supercríticos)
g	Gramos
G	Porcentaje de lípidos
GC	Gas Chromatography (Cromatografía de gases)
GC-FID	Gas Chromatography whit Flame Ionization Detection (Cromatografía de gases con detección de ionización con llama)
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
GC-TOF	Gas Chromatography with Time-of-the-Flight mass analyzer (Cromatografía de gases con espectrometría de masa de tiempo de vuelo)
Gy	Gray, unidad de irradiación
h	hora
<i>h</i>	Niveles del factor
H	Altura equivalente a un plato teórico
H ₀	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alternativa

HDL	High density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)
Hex	Hexano
HMG-CoA-reductasa	Hidroxi-metil-glutaril CoA reductasa
HMDG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMDS	Hexametildisilano
HPC	Hidroxiperoxicolesterol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HPLC-APCI-MS	High Performance Liquid Chromatography with Atmospheric Chemical Pressure Ionization- Mass Spectrometry (Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de masas con ionización a Pa)
HPLC-ELSD	High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector (Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de dispersión de luz tras evaporación)
HPLC-IR	High Performance Liquid Chromatography with Infrared Detection (Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de infrarrojos)
HPLC-MS	High-Pressure Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detector (Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de espectrometría de masas)
HPLC-UV	High-Pressure Liquid Chromatography with UV Detector (Cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta)
I	Matriz diagonal
ID	Internal Diameter (diámetro interno)
IDL	Intermediate-Density Lipoproteins (Lipoproteína de densidad intermedia)
Insig	Insulin induced gene (insulina inducida por gen)
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Instituto de Investigaciones Médicas)
In-Vitro	Experimentos con cultivos de células

In-Vivo	Experimentos con organismos pluricelulares
IONMED	Centro de servicios especializado en el tratamiento de productos mediante radiación ionizante (electrones acelerados)
IR	Infrared Radiation (Radiación infrarroja)
IS	Internal Standard (Estándar interno)
JC	Jamón cocido
JS	Jamón serrano
k	Número de factores
kg	Kilogramo
kGy	Kilogray
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
LA	Lomo adobado
LC	Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de columna)
LC-PB-MS	Liquid Chromatography Particle Beam Mass Spectrometry (Cromatografía de líquidos con detector de Espectrometría de Masas de haz de partículas)
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor (Receptor de lipoproteínas de baja densidad)
LF	Lomo fresco
Lip	Lípidos
LLE	Liquid-Liquid Extraction (Extracción líquido-líquido)
LOD	Limit of Detection (Límite de detección)
LOQ	Limit of quantification (Límite de cuantificación)
LPME	Liquid Phase Micro Extraction (Microextracción en fase líquida)

LPS	Lipopolisacárido bacteriano
m	Metros
m/z	Relación masa carga en espectrometría de masas
MeOH	Metanol
MeV	Megaelectrón voltios
mg	Miligramos
mL	Mililitro
min	Minuto
mL/min	Mililitro/minuto
mm	Milímetro
MPa	Mega pascales
MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de masas)
MTBE	Metil tert-butil éter (t-butil-metil-éter)
n	Número de experimentos
N	Número total de experimentos
NADPH	Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Coenzima Lactaldehído reductasa)
NaOH	Hidróxido sódico
nd	No detectado
ng	Nanogramos
ng/g	Nanogramos/gramo
NH ₂	Amino
NIST	National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología)
nm	Nanómetros

NP-C	Enfermedad Niemann-Pick tipo C
nq	No cuantificado
°C	Grado centígrado
°C/min	Grado centígrado/minuto
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Logaritmo cambiado de signo de la concentración de protones
P	Presión
P	Espacio dimensional de las variables originales
P'	Espacio dimensional de las variables componentes principales
Pa	Presión atmosférica
PC	Principal Components (Componentes principales)
PCA	Principal Component Analysis (Análisis de componentes principales)
pmoles	Picomoles
psi	Unidad de presión (libra/pulgada ²)
QB	Queso blando
QM	Quilomicrones
R	Recuperación
R^2	Coefficiente de determinación
r^2	Coefficiente de regresión
R_f	Factor de respuesta experimental
RGSA	Registro General Sanitario de Alimentos
RL	Rango Lineal
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies reactivas del Oxígeno)

rpm	Revoluciones/minuto
R_s	Resolución cromatográfica
RSD	Relative Standard Deviation (Desviación estándar relativa)
RTE	Ready to eat (Alimentos listos para el consumo)
SA	Salmón ahumado
SCAP	SCREBP cleavage activating protein (Proteína activadora de SCREBP por escisión)
S/N	Relación Señal-Nuido en cromatografía
SF	Super Fluid (Fluido supercrítico)
SFE	Super Fluid Extraction (Extracción por fluidos supercríticos)
SPE	Solid Phase Extraction (Extracción en fase sólida)
SRE	Sistema Retículo Endotelial
SREBPs	Sterol Regulatory Element Binding Proteins (Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides)
SS	Suma de cuadrados
s^2	Varianza estimada
S1P	Proteasa 1
S2P	Proteasa 2
T	Temperatura
T_a	Temperatura ambiente
TBARS	ThioBarbituric Acid Reactive Substances
TBHQ	t-butil hidroxiquinona
$T_{columna}$	Temperatura de la columna
$T_{detector}$	Temperatura del detector
T_{horno}	Temperatura del horno

t	Tiempo
T _{inyección}	Temperatura de inyección
TMCS	Trimethyl chlorosilane (Trimetilclorosilano)
TMS	Trimetilsilil
TMSI	1-(Trimethylsilyl) imidazole (1-(Trimetilsilil) imidazol)
t _R	Tiempo de retención cromatográfico
triol	Colestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT)
Tri-Sil	Reactivo derivatizante (HMDS: TMCS en piridina)
\bar{u}	Velocidad media de flujo lineal
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida ultrarrápida)
UPLC-APCI-MS	Ultra Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Chemical Pressure Ionization- mass spectrometry (Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de masas con ionización a Presión atmosférica)
USA	United State of America (Estados Unidos de América)
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de Estados Unidos)
UV	Ultraviolet Radiation (Radiación ultravioleta)
V	Volumen
V _{inyección}	Volumen de inyección
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein (Lipoproteínas de muy baja densidad)
V:V	Relación de volúmenes
W _{lípidos}	Peso de lípidos
W _{muestra}	Peso inicial de muestra
w/w	Peso/peso

W^T	Matriz de transformación
x_i	Variable independiente
X	Valor medio
X_i	Variabes originales (factor)
y_i	Variable dependiente
Y	Respuesta
α	Nivel de significación (valor-P)
α -epóxido	5,6- α -epoxi-5 α -colestano-3 β -ol (a-epóxido)
β_i	Coefficientes de la ecuación
β -epóxido	5,6- β -epoxi-5 β -colestano-3 β -ol (b-epóxido)
Σ_x	Matriz de covarianza
φ_i	Autovectores
λ	Longitud de onda
λ_i	Autovalores
μg	Microgramo
μL	Microlitros
μm	Micras
$\mu\text{g/g}$	Microgramo/gramo
σ^2	Varianza
v	Grados de libertad
25-OH	25-hidroxicolesterol
2-PrOH	2-Propanol
6-ceto	6-cetocolesterol (6-keto)
7-ceto	7-cetocolesterol (7-keto)

7 α -OH	7 α -hidroxicolesterol
7 β -OH	7 β -hidroxicolesterol (7b-OH)
7-OOH	7-hidroperoxicolesterol
5-OOH	5-hidroperoxicolesterol
6-OOH	6-hidroperoxicolesterol
5 α -HPC	5 α -hidroperóxidos
7 α -HPC	7 α -hidroperóxidos
9,10-DFA	9,10-difenilantraceno
20 α -HC	20 α -hidroxicolesterol
25-HC	25-hidroxicolesterol

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El colesterol, esteroide de origen animal, cumple numerosas funciones metabólicas. Se estima que por cada dos o tres moléculas de fosfolípidos que constituyen parte de la matriz lipídica de las membranas, existe una molécula de colesterol (Valenzuela et al., 2002); esta molécula puede participar en reacciones en las que se oxida para formar una amplia gama de compuestos denominados óxidos de colesterol (COPs) (Morrissey y Kiely, 2006). Hasta el momento se han identificado más de 60 COPs, algunos presentan actividad biológicas adversa *in vivo*, entre ellos se encuentra el 7 β -hydroxycolesterol, colesterol 5 β ,6 β -epoxido (β -epoxido), colesterol 5 α ,6 α -epoxido (α -epoxido), cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol), 6-cetocholestanol (6-ceto), 7-cetocholesterol (7-ceto) y 25-hydroxycolesterol (25-OH), que son frecuentemente detectados en alimentos. Sus efectos sobre el organismo han sido ampliamente detallados (Phelan y Mahler, 1997; Chang y Liu, 1997; Chang et al., 1997; Chang et al., 1998; Chang y Liu, 1998; Tsuzukia et al., 2000; Gheli et al., 2002; Vejux et al., 2009;); los COPS con mayor actividad biológica son: α -epoxicolesterol (o colesterol-5 α ,6 α -epóxido) causante de lesiones ateroscleróticas y con actividad carcinógena (Guardiola et al 1996), 25-hidroxicolesterol (o 5-colesten-3 β -25-diol) y el colestanotriol (o colesten-3 β -5 α -6 β -triol), ambos con actividad citotóxica y angiotóxica (Addis, 1986; Park y Addis, 1986; Nourooz-Zadeh y Appelquist, 1987; Zhang et al., 1991). Diversos estudios *in vivo* han puesto de manifiesto que la intensidad de las lesiones arterioscleróticas inducidas por la ingesta de elevadas dosis de COPs es superior a la producida por dietas ricas en colesterol (Peng y Taylor, 1984; Brown y Jessup, 1999; Miyuki et al., 2002; Tavori et al

2009). Además, este tipo de compuestos puede alterar las funciones de membrana, incrementando su permeabilidad, entre otros problemas de salud a nivel celular (Hennings y Boissonneault, 1987; Phelan y Mahler, 1997; Chang y Liu, 1998; Brown et al., 1999; Yin et al., 2000; Tsuzukia et al., 2000; Deckert et al., 2002; Miyuki et al., 2002; Valenzuela et al., 2004).

Los COPs se pueden formar en alimentos de origen animal por cambios en la temperatura (T), acción enzimática o por efecto de irradiación, siendo las dietas de esta naturaleza una fuente de COPs; por tanto, es necesario controlar los procesos de fabricación de los alimentos con el fin de que sus contenidos se encuentren dentro de los límites establecidos por las reglamentaciones alimentarias, lo cual requiere de procedimientos analíticos adecuados que permitan determinar COPs en matrices alimentarias. Cada vez es más frecuente, sobre todo en las grandes urbes, el consumo de comidas preparadas tanto dentro como fuera del hogar. Esta situación ha dado lugar a que la industria alimentaria transforme alimentos ya procesados tales como jamón cocido, jamón serrano, embutidos, mortadela, fiambres de ave, diversos tipos de pescado ahumado, quesos frescos y curados, en productos listos para el consumo (RTE) suministrados en envases domésticos. Esto implica una reducción de su tamaño por troceado, loncheado, dosificación, envasado u otras operaciones conducentes a facilitar la venta o el trabajo en el hogar incrementando los riesgos de contaminación. En estas operaciones, diversos microorganismos patógenos, procedentes del entorno, utillaje empleado en las operaciones y por los manipuladores, pueden potencialmente contaminar el alimento, siendo necesario higienizar el producto RTE antes de que llegue al consumidor. La irradiación de alimentos es un método físico de higienización que

elimina organismos patógenos o permite minimizar esta contaminación; consiste en exponer el alimento a la acción de radiaciones ionizantes (E-Beam) durante un cierto tiempo; la energía radiante emitida puede producir ionizaciones, rupturas y pérdida de “estabilidad” de las moléculas del alimento con el que interaccionan, formando sustancias ajenas a la composición inicial del alimento (Comité Mixto de Expertos FAO/OIEA/OMS); en consecuencia, es un factor de riesgo potencial para la salud debido a la formación de COPs. Se debe establecer si la radiación (E-Beam) es un factor que desencadena la formación de COPs a partir del colesterol, por medio de los diferentes mecanismos químicos que generalmente se inician con la formación de radicales libres.

Los contenidos de COPs referidos en la bibliografía para alimentos varían ampliamente dependiendo de las metodologías y técnicas analíticas usadas, siendo las técnicas cromatográficas HPLC y GC las más empleadas para su análisis. HPLC permite la determinación directa de algunos COPs que presentan propiedades de absorción de radiación en la región ultravioleta (UV) del espectro; sin embargo, GC permite la determinación de todos los COPs aunque se requiere realizar un proceso de derivatización lo cual hace incrementar el tiempo (t) de análisis, si bien, esta técnica, tiene ciertas ventajas; presenta mayor capacidad de picos que HPLC permitiendo separar un número mayor de COPs y se dispone de un número mayor de detectores genéricos que permiten detectar todos estos compuestos con límites de detección relativamente bajos (Guardiola et al., 1995). Sin embargo, la separación de COPs por GC requiere condiciones muy específicas, puesto que se trata de separar derivados de un mismo precursor (colesterol), presentan pesos moleculares, puntos de ebullición y

propiedades fisicoquímicas muy similares, todo lo cual implica que eluyan a tiempos de retención (t_R) muy cercanos, formando pares críticos.

Por otra parte, la formación de artefactos y su monitorización son preocupaciones comunes en el análisis de COPs; estos artefactos incluyen COPs que no se encuentran en la muestra antes del análisis, sino que se generan durante el análisis de COPs, o bien están inicialmente presentes en la muestra pero sus contenidos se incrementan (o disminuyen) durante el análisis (Bush y King, 2009). Se ha dedicado especial atención a los artefactos derivados del colesterol, ya que en comparación con los COPs se encuentran presentes en exceso; sin embargo, los artefactos pueden resultar de sobre- y sub-estimaciones de contenidos y tipos de COPs presentes. Si bien se dispone de numerosas reseñas sobre las actividades biológicas, presencia en los alimentos y análisis de COPs, sin embargo, métodos para monitorizar la generación de artefactos no son universalmente utilizados, lo que resulta en un creciente cúmulo de información, sin duda, a veces errónea.

La composición de los alimentos de origen animal es muy compleja y requiere numerosas etapas para llevar a cabo el análisis de COPs. Además, los COPs pueden reaccionar durante las etapas de preparación de muestra, especialmente en la extracción de lípidos y limpieza de COPs (Bush y King, 2009); en consecuencia, los análisis de COPs en muestras complejas presentan una serie de dificultades añadidas, tales como destreza del operador en el manejo de muestras, alto consumo de tiempo y de reactivos y, por ende, costes de análisis elevados. Desde 1956 se han diseñado, desarrollado, estandarizado y validado una gran cantidad de metodologías analíticas que han permitido conocer parcialmente el comportamiento de los COPs, siendo común a la

mayoría, la extracción de lípidos mediante lixiviación y el sistema de limpieza de muestras mediante extracción en fase sólida, SPE (Lai et al., 1995; Jonson et al., 1996; García Regueiro y Marachiello, 1997; Careri et al., 1998; Boselli, et al., 2001; Petron et al., 2003; Lu et al., 2007; Menéndez-Carreño et al., 2008).

Existe una amplia variedad de métodos, en general, específicos de la matriz. Las comparaciones de los contenidos de COPs son a menudo difíciles de interpretar debido a las diferencias en la metodología y las complicaciones originadas por la formación de artefactos (Guardiola et al., 1995; Garcia Regueiro et al., 1997; Ulberth et al., 1998; Dionisi et al., 1998; Rodriguez-Estrada et al., 2004; Ubbayasekera et al., 2004). Los mismos factores que inician la autooxidación y fotooxidación contribuyen a la generación de artefactos; la exposición al aire, luz o metales propaga la oxidación de colesterol y COPs, y estos factores oxidativos pueden ser limitados durante el análisis (Appelqvist et al., 1996; Dutta et al., 1999; Appelqvist et al., 2004). Los artefactos son también generados por las condiciones experimentales, las cuales comprometen la estabilidad del colesterol y COPs existentes.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades sobre el colesterol

El colesterol (5-colesten-3 β -ol) es un esteroide de origen animal que cumple numerosas funciones metabólicas:

- Constituye la estructura básica para la formación de las hormonas esteroidales.
- A partir de él se forman las sales biliares cuyo papel es importante en la digestión y absorción de las grasas en el tracto intestinal.
- Posee importantes funciones regulatorias en el metabolismo intracelular de los ácidos grasos.
- Es junto con los fosfolípidos uno de los componentes más importantes de las membranas celulares (citoplasmática, nuclear y de orgánulos). Se estima que por cada dos o tres moléculas de fosfolípido que forma la matriz lipídica de las membranas, existe una molécula de colesterol (**Figura 1**).

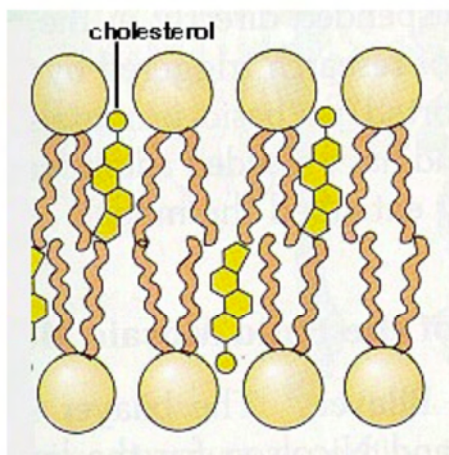


Figura 1. Estructura de la matriz lipídica de las membranas

El colesterol tiene en los organismos animales un doble origen: aportación alimentaria (con la ingesta de alimentos de origen animal, sobre todo la yema de huevo, hígado y carnes rojas), pero esencialmente su síntesis a nivel de ciertos órganos como el hígado, intestino y la glándula corticosuprarrenal, a partir de la acetilcoenzima A (Acetil-CoA), los cuales son la sede del catabolismo y de la eliminación del colesterol en forma de ácidos biliares y de esteroides neutros.

2.1.1. Estructura

El colesterol está formado por una molécula de ciclopentano perhidrofenantreno, constituida por cuatro carbociclos condensados, denominados A, B, C y D que presentan varias sustituyentes, **Figura 2:**

- 1- Dos radicales metilos en las posiciones de los carbonos C-10 y C-13.
- 2- Una cadena alifática en la posición C-17.
- 3- Un grupo hidroxilo en la posición C-3
- 4- Una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6

En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza constituida por el grupo hidroxilo y una cola apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos.

Esta molécula presenta un doble enlace entre C-5 y C-6 del anillo B. Este doble enlace genera una estructura en la que C-4 y C-7 de los anillos A y B, respectivamente se encuentran en el mismo plano. A partir de esta estructura cabe esperar que ambas posiciones C-4 y C-7 sean más reactivas. Sin embargo, la posición C-7 es más susceptible a reaccionar. Por el contrario, la C-4 es menos reactiva, posiblemente por el

efecto de escudo del grupo hidroxilo en C-3. Las posiciones C-20 y C-25 de la cadena alifática lateral son terciarias y por tanto más susceptibles de ataques oxidativos que otros carbonos.

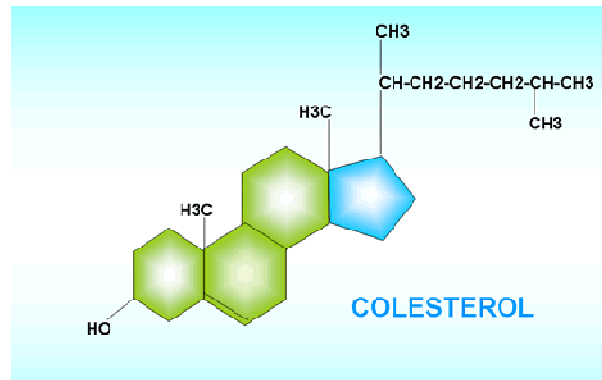
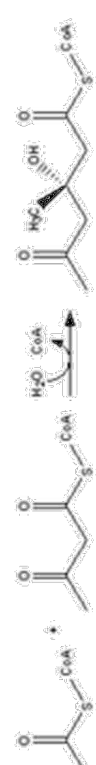
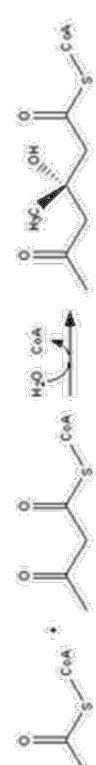
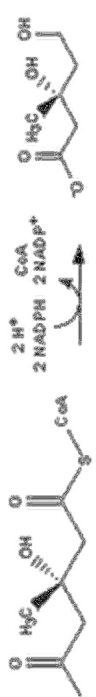





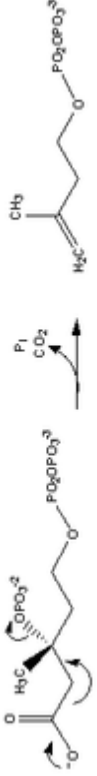



Figura 2. Estructura molecular del colesterol

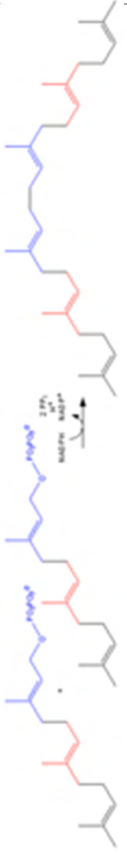
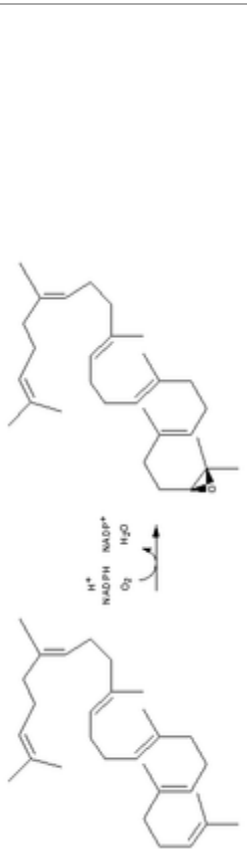
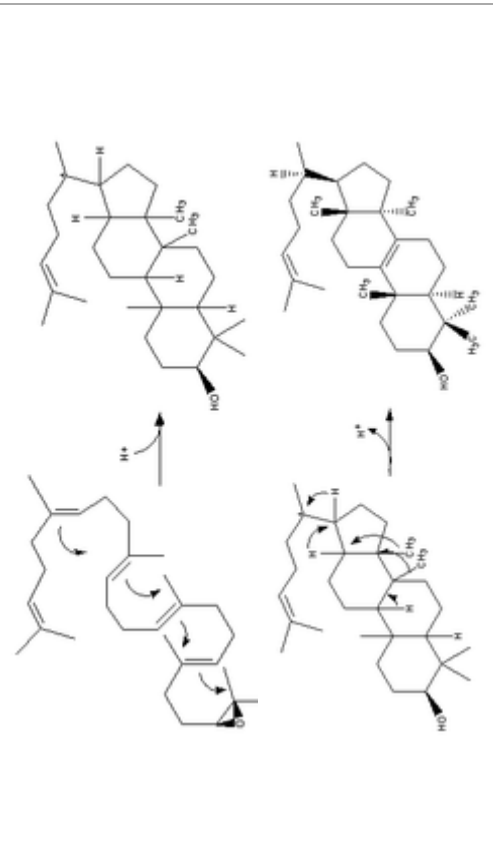
2.1.2. Síntesis

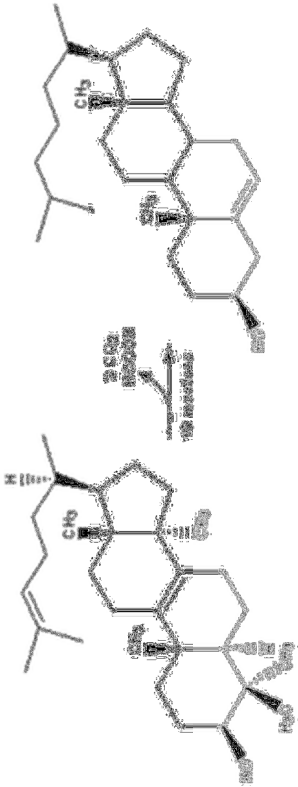
Bloch (1964) propuso que la molécula de acetato se fusiona en unidades isoprenoides antes de incorporarse a la molécula de colesterol. Las 6 unidades isoprenoides se fusionan para formar escualeno (hidrocarburo poli-isoprenoide) de cadena lineal que finalmente se cicla formando colesterol. A esta conclusión se llegó alimentando animales con escualeno marcado isotópicamente y se obtuvo colesterol en el excremento marcado radioactivamente. El camino biosintético propuesto por Blonch se presenta en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Formación del colesterol a partir de Acetil CoA

Tipo de reacción	Reacción	Sustrato inicial	Enzima	Producto final
Condensación		2 Acetil CoA	Acetoacetyl tiolasa	Acetoacetyl CoA
Condensación		acetoacetyl CoA y acetyl CoA	HMG-CoA sintasa	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA)
Reducción por NADPH		HMG-CoA	HMG-CoA reductasa	Mevalonato y CoA
Fosforilación		Mevalonato	Mevalonato quinasa	Mevalonato 5-fosfato
Fosforilación		Mevalonato fosfato	5-Fosfomevalonato quinasa	5-pirofosfomevalonato

Fosforilación		5-pirofosfomevalonato	Pirofosfomevalonato descarboxilasa	3-fosfomevalonato 5-pirofosfato
Descarboxilación		3-fosfomevalonato 5-pirofosfato	Pirofosfomevalonato descarboxilasa	Δ^3 -isopentil pirofosfato
Isomerización		Isopentil pirofosfato	Isopentil pirofosfato isomerasa	33-dimetilalil pirofosfato
Condensación		33-dimetilalil pirofosfato e isopentil pirofosfato	Geranyl transferasa	Geranyl pirofosfato (10C)
Condensación		Geranyl pirofosfato e isopentil pirofosfato	Geranyl transferasa	Farnesil pirofosfato (15C)

<p>Condensación</p>		<p>Farnesil 2 pirofosfato</p>	<p>Escualeno sintasa</p>	<p>Escualeno (30 C)</p>
<p>Reducción NADPH</p>		<p>Escualeno</p>	<p>Escualeno epoxidasa</p>	<p>Escualeno 23- epóxido</p>
<p>Ciclación</p>		<p>Escualeno 2, 3- epóxido</p>	<p>Lanosterol ciclasa</p>	<p>Lanosterol</p>

<p>19 reacciones consecutivas *, no aclaradas</p>		<p>Lanosterol</p>	<p>Colesterol</p>
---	--	-------------------	-------------------

* Estas reacciones pueden agruparse de la siguiente manera:

1. Tres moléculas de acetyl-CoA se combinan entre sí formando mevalonato, el cual es fosforilado a 3-fosfomevalonato 5-pirofosfato.
2. El 3-fosfomevalonato 5-pirofosfato es descarboxilado y desfosforilado a 3-isopentil pirofosfato.
3. Ensamblaje sucesivo de seis moléculas de isopentil pirofosfato para originar escualeno, vía geranyl pirofosfato y farnesil pirofosfato.
4. Ciclación del escualeno a lanosterol.
5. El lanosterol se convierte en colesterol después de numerosas reacciones sucesivas, enzimáticamente catalizadas, que implican la eliminación de tres grupos metilo (-CH₃), el desplazamiento de un doble enlace y reducción del doble enlace de la cadena lateral

Otra forma de obtener colesterol consiste en convertir la acetil-CoA a unidades isoprenoides mediante una serie de reacciones las cuales comienzan con la formación de hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA). En la cetogénesis, las enzimas para su síntesis se encuentran en la mitocondria, por el contrario, cuando su destino es la síntesis de colesterol, se encuentran en el citoplasma; sin embargo, el mecanismo catalítico es el mismo. En este caso **3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)** es precursor de dos intermediarios isoprenoides: isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato (**Figura 3**).

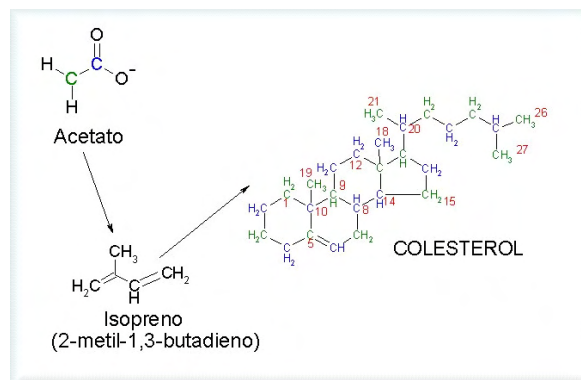


Figura 3. Formación del colesterol a partir de unidades isoprenoides

2.1.3. Reacciones de oxidación

La oxidación de lípidos (grasas y aceites), es también conocida como rancidez oxidativa para diferenciarla de la lipoperoxidación celular, aunque, conceptualmente ambos procesos significan lo mismo: destrucción por oxidación de los ácidos grasos mono y poli-insaturados presentes en los alimentos (rancidez oxidativa) o en las membranas biológicas u otros componentes celulares (lipoperoxidación).

La rancidez oxidativa es un proceso químico que ha sido muy estudiado y su(s) mecanismo(s) de acción y los productos que genera son relativamente bien conocidos

(Guardiola et al., 1995; Valenzuela et al., 2000). Sin embargo, la participación del colesterol en este proceso ha sido escasamente abordada. El colesterol por su estructura química, derivado del ciclopentano perhidrofenantreno, posee un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 del anillo aromático, que es también susceptible de sufrir oxidación. De esta manera, cuando el colesterol, presente en muestras biológicas o en materias primas, u otros productos oleosos que lo contienen, es sometido a una oxidación, da origen a una serie de productos oxidados, de diferente estructura, aún no bien definidos químicamente, que se identifican colectivamente con el nombre de oxisteroles (COPs) (Maerker, 1987).

El colesterol también puede sufrir procesos de oxidación cuando está acompañado de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La **Tabla 2** muestra el resultado de Addis y Warner (1991); se puede observar que la oxidación de LDL *In Vitro* va acompañada por la formación de una variedad de oxisteroles. Se desconoce el efecto que puede tener la presencia de estos productos de oxidación en la función metabólica y en la probable acción patológica de esta lipoproteína (Valenzuela et al. 2002a).

Tabla 2. Formación de oxisteroles en LDL modificadas por oxidación

Esterol^a	LDL-control^b	LDL-oxidada^b
Colesterol	687	358
7 α -OH	-----	56
α -epóxido	-----	48
β -epóxido	-----	21
7 β -OH	-----	60
7-ceto	-----	181

LDL lipoproteína de baja densidad; ^a μ g Esterol/mg proteína LDL;

^b 200 μ g de LDL incubados 20 h a 37 °C

La oxidación lipídica y de esteroides (colesterol) siguen las mismas rutas: **autooxidación, fotooxidación y oxidación enzimática**, dando lugar a distintos hidroperóxidos. Se cree que los hidroperóxidos que derivan de la oxidación de los ácidos grasos no saturados tienen un papel importante en la oxidación del doble enlace A-5, que es el más sensible a la oxidación.

La oxidación del colesterol de la carne da lugar a una amplia gama de compuestos secundarios potencialmente tóxicos para el organismo, estando ésta inversamente relacionada con la estabilidad oxidativa del resto de lípidos de la matriz cárnica. Tanto la especie animal como el aporte graso de la dieta condicionan el grado de insaturación de los lípidos y, en consecuencia, la síntesis de óxidos del colesterol en carne fresca. La mayor parte de las técnicas de procesado, especialmente el cocinado y los tratamientos de irradiación, incrementan drásticamente la velocidad de formación de oxisteroides. Por otra parte, la formación de óxidos del colesterol puede verse minimizada, tanto mediante técnicas de envasado en atmósferas protectoras y/o almacenamiento en congelación, como mediante el uso de antioxidantes. En este último sentido, la suplementación de la dieta con vitamina E viene siendo considerada como uno de los métodos más eficaces para disminuir el grado de acumulación de este tipo de compuestos en carne fresca y productos cárnicos procesados (Gil et al., 2004).

2.1.3.1. Autooxidación

Es la causa principal del deterioro oxidativo del colesterol; es una reacción autocatalítica con oxígeno molecular. La autooxidación del colesterol normalmente comienza en el carbono C-7 por desprotonación seguida de la adición de una molécula

de oxígeno formando los productos primarios de oxidación del colesterol que son los isómeros del 7-hidroperoxicolesterol. Estos compuestos dan lugar al 7 α -hidroxicolesterol y 7 β -hidroxicolesterol los cuales se encuentran normalmente en los alimentos (**Figura 4**). Ambos isómeros del 7-hidroperoxicolesterol pueden sufrir deshidratación durante el calentamiento dando lugar al 7-cetocolesterol, el cual se puede formar también por deshidratación de los isómeros del 7-hidroxicolesterol en presencia de radicales libres (Nielsen et al., 1996). El 7-cetocolesterol está considerado como el oxiestrol mayoritario en matrices alimenticias.

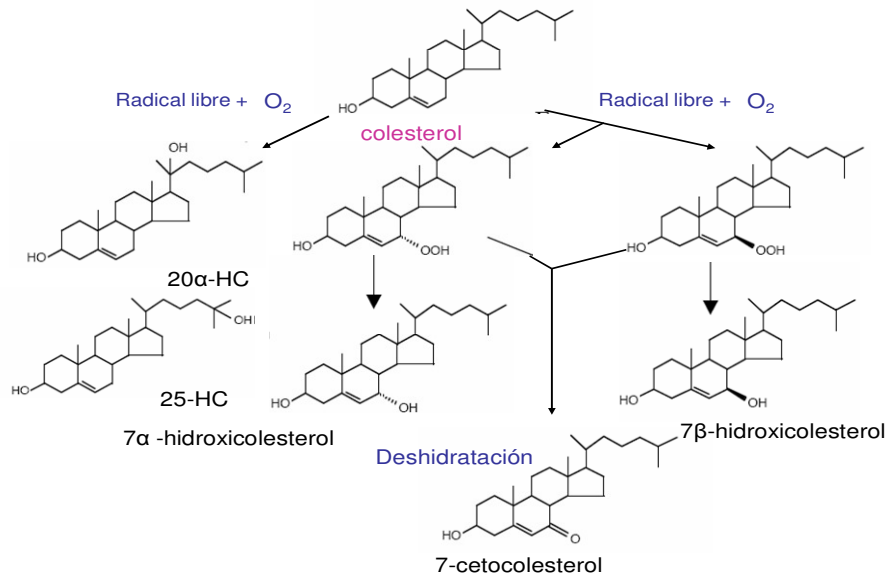


Figura 4. Autooxidación del colesterol

La oxidación de la cadena lateral se produce en las posiciones C-20 y C-25 dando lugar a los respectivos hidroxisteroles. Por otra parte, la formación de epóxidos isómeros de colesterol se produce por la interacción entre colesterol y el radical hidroxílico (**Figura 5**). Estos epóxidos se pueden hidrolizar en medio ácido transformándose en triol que posee mayor toxicidad (Bösinger et al., 1993).

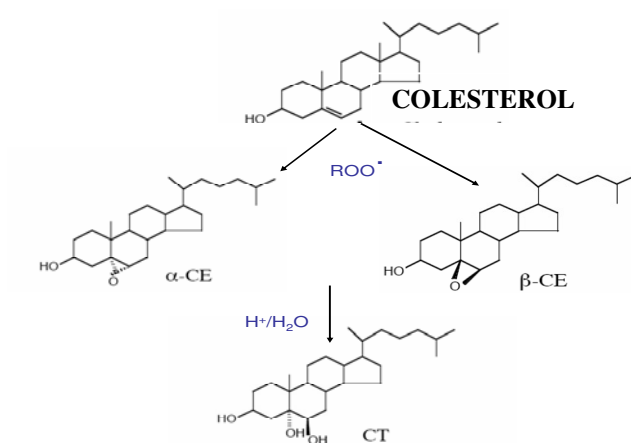


Figura 5. Formación de epóxidos y triol

Desde la década de los ochenta se han realizado numerosos estudios sobre las rutas de oxidación del colesterol y sobre la cinética que gobierna estas reacciones, encontrándose que comienza por reacciones vía radical, seguida de la epoxidación, deshidratación, reducción y deshidrogenación. Sin embargo, la información sobre la degradación del colesterol es compleja y limitada debido a la dificultad que entraña la identificación de estos productos. En la **Figura 6** se muestra un resumen de las principales rutas de oxidación del colesterol.

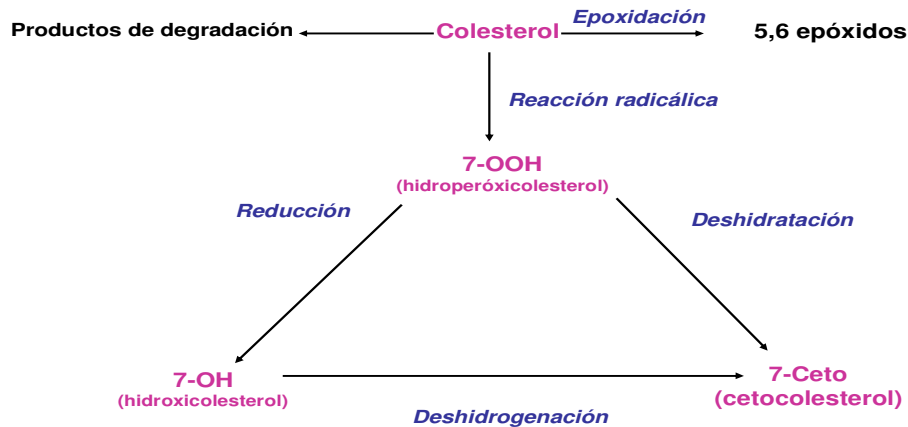


Figura 6. Principales rutas de oxidación del colesterol

2.1.3.2. Fotooxidación

Algunos pigmentos naturales o colorantes sintéticos son fotosensibles, así, la clorofila y la hematóporfirina, pueden absorber energía en forma de radiación y transferirla para formar oxígeno singlete el cual reacciona con el doble enlace del anillo B del colesterol y produce la migración de los electrones del doble enlace permitiendo la formación del hidroperóxido en el carbono C-5. El 5-OOH puede transformarse en el hidroperóxido más estable 7-OOH o 6-OOH en menor proporción.

Se evaluó la fotooxidación del colesterol y de lípidos de hamburguesas de pavo crudo envasados en recipientes retráctiles de película transparente, almacenadas a 4 ° C bajo condiciones comerciales en dos períodos de almacenamiento diferentes, 3 y 11-días. Cuando la carne se almacenó en la oscuridad a 4 °C, el índice de peróxidos máximo se alcanzó después de 5 días y la concentración máxima de COPs se logró sólo después de 7 días. En la carne de pavo expuesta a luz fluorescente blanca se incrementó el contenido de COPs y el índice de peróxidos después de 1 día de almacenamiento (12 h

de exposición a la luz efectiva). Una lámpara de bajo nivel que produce ondas azules (tonos cálidos de la lámpara) es útil para disminuir la peroxidación y la oxidación del colesterol, siendo ésta una solución adecuada para la exposición de productos cárnicos en los supermercados o las industrias de procesamiento de carne; esto indica que los procesos de fotooxidación depende del tipo de luz al cual sea sometido el alimento; generalmente, los procesos ocurren de forma superficial cuando las ondas son de baja potencia (Kristensen et al, 2001; Boselli et al., 2005; Boselli et al., 2009).

La irradiación del 7-ceto en dispersión acuosa da lugar al 7-cetocolesterol, indicando que la hidrogenación debe ocurrir a través de la interacción entre el 7-ceto y los productos de la radiólisis del agua. Sin embargo, al incrementar la intensidad de la radiación, los epóxidos isómeros del colesterol, y 7α -OH y 7β -OH pueden dar lugar a la formación del 6-ceto y 7-ceto, respectivamente. Se ha observado una menor proporción de los isómeros 7α -OH y 7β -OH; lo cual implica que los isómeros 7-OH y 7-ceto son interconvertibles en función de las condiciones de irradiación. En la **Figura 7** se muestran las rutas de formación de oxisteroles por irradiación (Nielsen et al 1996).

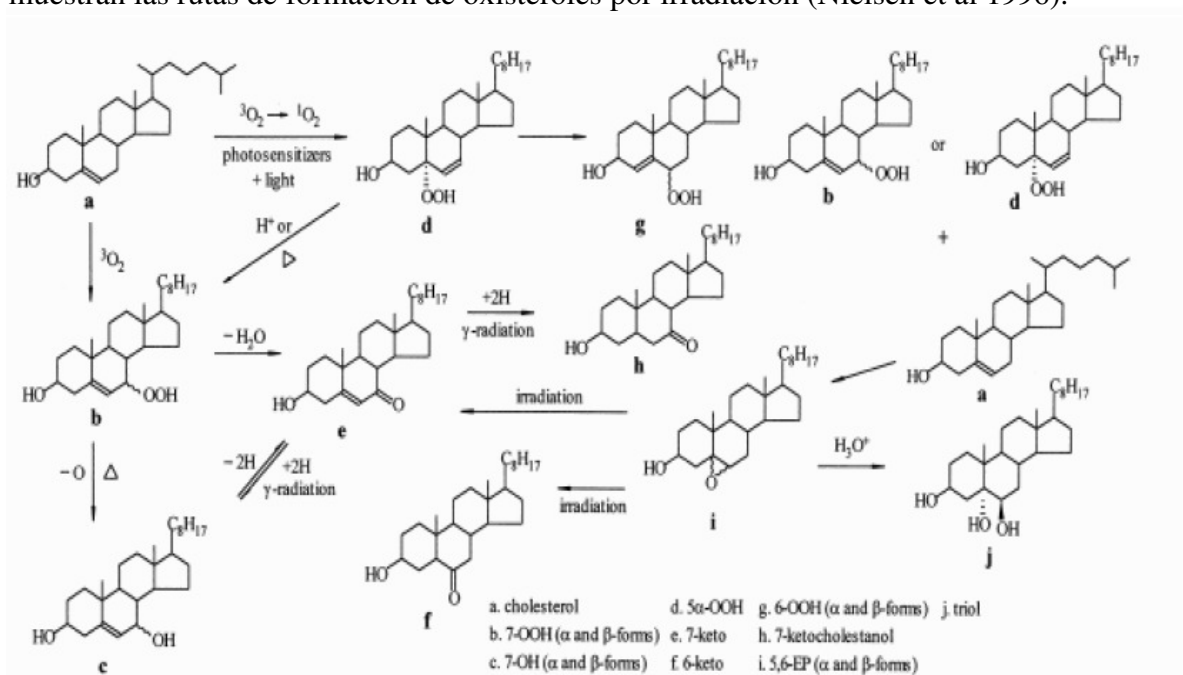


Figura 7. Rutas de formación de oxisteroles por irradiación

2.1.3.3. Oxidación enzimática

Existen enzimas presentes en los alimentos que pueden producir la oxidación del colesterol. Algunas investigaciones muestran que la conversión de los 5 α -hidroperóxidos (5 α -HPC) en 7 α -HPC, la epimerización de 7 α -HPC en 7 β -HPC, y la formación de los epímeros del hidroxicolesterol (7-HC) desde los correspondientes hidroperóxidos tiene lugar mediante reacciones enzimáticas. Estas reacciones deben ser estudiadas en mayor extensión debido al hecho de que estos productos se pueden formar también mediante las reacciones no enzimáticas vistas anteriormente (Drodoesky et al., 1965). Las enzimas que principalmente pueden catalizar la oxidación del colesterol son la monooxigenasa, dioxigenasa, dehidroxigenasa y las oxidasas. Las reacciones enzimáticas y no enzimáticas pueden ocurrir simultáneamente o individualmente durante la producción de los alimentos, procesado, distribución y almacenamiento de los mismos (Dobarganes y Marquez-Ruiz, 2003).

2.1.4. Antioxidantes del colesterol

Los antioxidantes, tanto aquellos de origen sintético como natural, son ampliamente utilizados por la industria oleoquímica para prevenir o retrasar el desarrollo del proceso oxidativo de las grasas y aceites. Su mecanismo de acción ha sido intensamente estudiado, utilizándose aquellos más adecuados para su aplicación a diferentes tipos de grasas o aceites; antioxidantes tales como butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), ter-butil hidroxiquinona (TBHQ), galatos de propilo u octilo, o tocoferoles (vitamina E), entre otros, son extensamente aplicados para estabilizar grasas o aceites, tanto de origen animal como vegetal, con resultados que dependen de la cantidad y tipo de antioxidante(s) utilizados(s) (Valenzuela y Nieto, 1996, Valenzuela et

al., 2002b). Sin embargo, la información respecto al efecto de estos antioxidantes en la prevención de la formación de COPs es muy escasa; uno de los pocos estudios disponibles sobre el efecto de antioxidantes en la formación de oxisteroles fue realizado por Huber et al. (1995) utilizando yema de huevo deshidratada; los resultados de este estudio son de difícil interpretación debido principalmente, a la complejidad del modelo utilizado. Li et al (1996) estudiaron el efecto del α -tocoferol en la inhibición de la formación de oxisteroles por efecto de la T y de la adición de colesterol en aceite de pescado, aceite de girasol y aceite de palma; observaron que el α -tocoferol sólo inhibe la formación de oxisteroles en el aceite de pescado, siendo no efectivo como antioxidante en los aceites vegetales. Los autores no ofrecen explicación a esta diferencia en la acción del antioxidante, aunque, postulan un mecanismo diferente para la formación de oxisteroles en aceites animales (de pescado en este caso) y aceites vegetales. Más recientemente Shozen et al. (1997) realizaron un estudio de protección de polvo de anchoa (anchoveta deshidratada y molida), producto de gran consumo en los países asiáticos, por efecto del BHA y del α -tocoferol; estudiaron la variación del contenido de ácidos grasos poli-insaturados y la formación de oxisteroles en el producto envasado en función del tiempo (t), observando una correlación entre la disminución del contenido de ácidos grasos poli-insaturados y el aumento en la formación de los oxisteroles, con lo que argumentan la existencia de un mecanismo común de oxidación. Sin embargo, sólo el α -tocoferol inhibe la formación de oxisteroles siendo casi inefectivo el BHA (excepto en el producto envasado al vacío). Estudios más recientes han demostrado que el BHT y el TBHQ son antioxidantes que pueden inhibir la oxidación del colesterol cuando ésta es inducida en conjunto con la oxidación de un aceite vegetal poli-insaturado. El mismo efecto se observó para el caso del α - y γ -

tocoferol, con el antioxidante natural grado alimenticio extracto de Rosemary (romero), y con el flavonoide quercetina (Valenzuela et al., 2002a). Los polifenoles del vino rojo han mostrado tener propiedades antioxidantes (Deckert, et al., 2002) previniendo la formación de 7 β -OH y 7-ceto.

2.1.5. Problemas de salud asociados con el colesterol

Diferentes circunstancias tales como la edad condiciones genéticas, condiciones patológicas, o hábitos alimenticios, producen un aumento paulatino del nivel de LDL sanguíneo, facilitando, entre otros factores, el desarrollo de la aterosclerosis, que forma parte de las enfermedades cardiovasculares, causa importante de muerte en los países de occidente. Por tanto las concentraciones altas de LDL a nivel sanguíneo, constituyen entre otros factores, un antecedente importante de riesgo cardiovascular. Por otra parte, las hiperlipemias, alteraciones en el metabolismo de las grasas, originan un aumento en sangre de lípidos, triglicéridos y colesterol; estos dos circulan juntamente con partículas proteicas lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), LDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL) dando lugar a las lipoproteínas. Las LDL son las encargadas de llevar el colesterol a los tejidos pero, cuando éste supera la cantidad normal se forma la placa de ateroma en las arterias lo que puede desencadenar arterioesclerosis; se trata del colesterol malo. Las HDL llevan el colesterol al hígado, impidiendo que se deposite y se acumule en venas y arterias; el colesterol acompañado de partículas HDL es comúnmente llamado colesterol bueno.

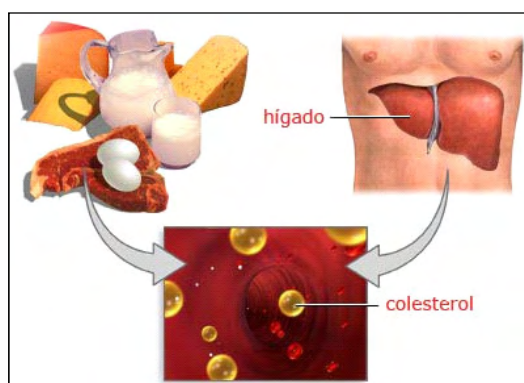


Figura 8. Diferencia entre Colesterol bueno y colesterol malo. Se clasifican como hipertriglicéridemias (aumento de triglicéridos), hipercolesterolemias (aumento de colesterol), hiperlipemias mixtas (aumento de colesterol y triglicéridos). Muchas enfermedades pueden generar hiperlipemia, tales como, la diabetes mellitus descompensada, hipotiroidismo, lupus eritematoso, alcoholismo y anorexia nerviosa. Pero, además, pueden desarrollarse por una alteración propia del metabolismo de las grasas y esto suele ser hereditario.

Un contenido equilibrado de colesterol es, mínimo de 40 mg/dl de HDL (ó 50 para las mujeres) y máximo de 130 mg/dl de LDL. Cuando la suma de los dos es demasiado elevada (> 200 mg/dl), se habla de “colesterol alto”.

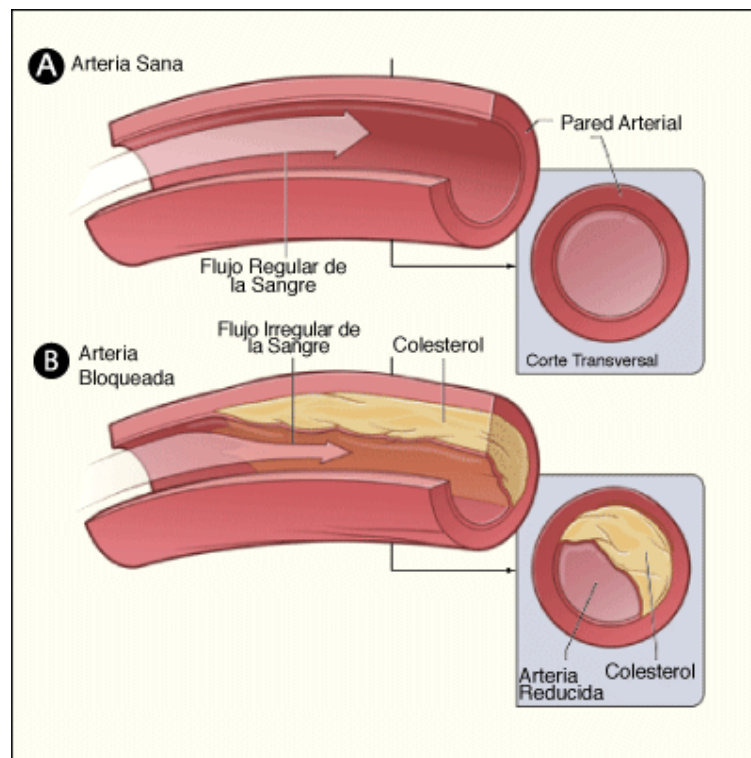


Figura 9. Obstrucciones arteriales por acumulación de colesterol malo

Otras biomoléculas asociadas con los problemas del colesterol son los ácidos grasos omega 3 y 6 los cuales contribuyen a los problemas de salud asociados con el colesterol; así, los países conocidos por tener una dieta desequilibrada a favor de Omega-6 (relación 10/20, Omega-6/Omega-3) se caracterizan por un riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular más alto que cuando el colesterol total aumenta; la relación Omega-6/Omega-3 en sangre sería el único factor independiente que explique la causalidad de muerte por enfermedad cardiovascular en función del colesterol total en sangre, y no la concentración de colesterol total por sí sola.

Existen otros problemas de salud asociados con el contenido de colesterol en el organismo; estudios realizados por investigadores franceses han llegado a la conclusión de que el déficit intelectual de los individuos mayores a 60 años está relacionado al bajo nivel de colesterol “bueno”. Según el Instituto de Investigaciones Médicas (INSERM), este decrecimiento en el nivel de colesterol bueno trae consigo un declive en el nivel cognitivo, el cual junto a otros factores puede conducir a una primera etapa de demencia; este hecho se evidenció cuando se realizó a distintos individuos una serie de test en muestras de sangre (en 1999 y posteriormente en 2004), analizando las imposibilidades que tenían de memorizar 20 palabras (Fernández-Hernando, 2008). También se ha encontrado cantidades apreciables de COPs asociados a la formación de cataratas en humanos, siendo los más frecuentes: 7β -OH, 7α -OH, 7-ceto, α -epóxido, 20α -OH y 25-OH (Girao et al. 1998), así como COPs causantes de otros problemas como la angiotoxicidad y aterogenicidad (Peng et al. 1991).

2.1.6. Tratamientos

El exceso de azúcar, carbohidratos y una dieta muy rica en grasas saturadas, además de una vida sedentaria trae como resultado en la mayoría de los casos, altos niveles de colesterol. Una alimentación rica en verduras, frutas y fibras, unida a prácticas habituales de deporte permite controlar el nivel de colesterol de una forma natural; existen algunas recetas caseras para disminuir los niveles de colesterol: beber a lo largo del día el siguiente preparado: introducir los trozos de una berenjena en un litro de agua dejar la mezcla toda una noche en nevera e incorporar el zumo de dos limones. Otra forma de controlarlo sería beber en ayunas una mezcla obtenida con una cucharada de avena en medio vaso de agua (<http://www.botanical-online.com/medicinalcolesterol.htm>).

La enfermedad Niemann-Pick tipo C (NP-C), mal hereditario que se caracteriza por niveles excesivamente altos de colesterol y otros lípidos en todos los órganos del cuerpo humano, perturba el metabolismo del paciente; éste se vuelve incapaz de metabolizar adecuadamente el colesterol y otros lípidos que terminan acumulándose en órganos como el hígado, el bazo y el cerebro. Las consecuencias son disfunciones hepáticas, demencia y otras enfermedades neurodegenerativas. Suele manifestarse entre los tres y 15 años; la mayoría de los niños diagnosticados con NP-C no llegan a los 20 años, y muchos fallecen antes de los diez. En los adultos, en 10% de los casos se manifiesta con síntomas neurológicos y psicológicos, muy pocos llegan a los 40 años. Un tratamiento para controlar el LDL, conocido como aféresis, consiste en sacar la sangre del paciente y separar el plasma de sus otros componentes, seguidamente, se limpia el colesterol presente en el plasma y finalmente se devuelve la sangre al paciente junto con el resto

de los componentes. La aféresis, es hoy el tratamiento de elección para la hipercolesterolemia, la cual puede ser causada por NP-C familiar congénita (National Institutes of Health).

2.1.7. Regulación biológica del colesterol

La producción de colesterol es regulada directamente por la concentración del colesterol presente en el retículo endoplásmico de las células, existiendo una relación indirecta con los niveles plasmáticos de colesterol presente en las lipoproteínas de baja densidad (LDL por su acrónimo inglés). Una alta ingesta de colesterol en los alimentos conduce a una disminución neta de la producción endógena y viceversa. El principal mecanismo regulador de la homeostasis de colesterol celular reside, aparentemente, en un complejo sistema molecular centrado en las proteínas que se unen a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) que en presencia de una concentración crítica de colesterol en la membrana del retículo endoplásmico, forman complejos con otras dos importantes proteínas reguladoras: SCAP e Insig. Cuando disminuye la concentración del colesterol en el retículo endoplásmico, las proteínas Insigs se disocian del complejo SREBP-SCAP, permitiendo que éste migre al aparato de Golgi; donde, las proteínas SREBP se escinden secuencialmente por los lugares de la proteasa 1 (S1P) y proteasa 2 (S2P) y migran al núcleo celular donde actúan como factor de transcripción uniéndose al sistema del retículo endotelial (SRE) de una serie de genes relevantes en la homeostasis celular y corporal de esteroides, regulando su transcripción. Entre los genes regulados por el sistema Insig-SCAP-SREBP destacan los del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y la HMG-CoA-reductasa, enzima limitante en la vía biosintética del

colesterol. En la **Figura 10** se muestra de forma gráfica el mecanismo de regulación del colesterol (Colpo, 2005).

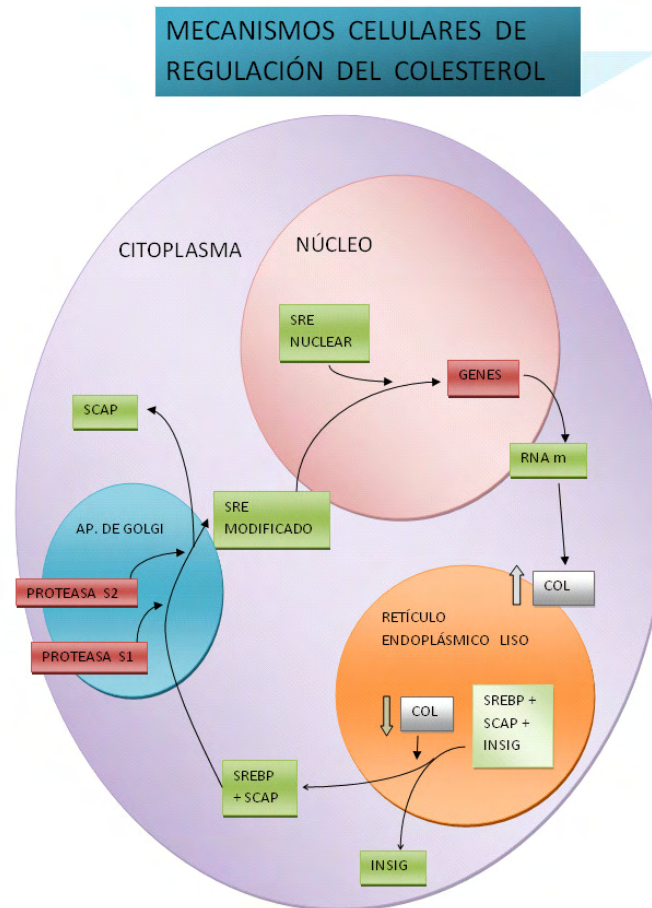


Figura 10. Mecanismo de regulación del Colesterol

Brown M S. y Goldstein J. L. fueron galardonados con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1985 por su estudio sobre los mecanismos celulares de captación endocítica de colesterol lipoproteico; estos autores han participado directamente en el descubrimiento y caracterización de la vía de los SREBPs de regulación del colesterol corporal que ha sido la base para el mejor entendimiento de la fisiopatología de diversas enfermedades humanas, fundamentalmente la enfermedad vascular aterosclerótica,

principal causa de muerte en el mundo occidental a través del infarto agudo de miocardio y de los accidentes cerebrovasculares, además del fundamento de la farmacología de las drogas hipocolesteromiantes más potentes: las estatinas.

En el ser humano no se puede metabolizar la estructura del colesterol hasta CO_2 y H_2O . El núcleo intacto de esterol se elimina del cuerpo convirtiéndose en ácidos y sales biliares las cuales son secretadas en la bilis hacia el intestino para desecharse a través de las heces fecales. Parte de colesterol intacto es secretado en la bilis hacia el intestino el cual es convertido por las bacterias en esteroides neutros como coprostanol y colestanol.

El colesterol, o sus ésteres previamente hidrolizados, que constituyen la principal forma en que el colesterol está presente en nuestra dieta, son absorbidos por las células intestinales junto con los ácidos grasos y monoglicéridos formados por la acción de las lipasas intestinales. En estas células el colesterol es nuevamente esterificado y transportado, en primer lugar, a través de la linfa (vasos linfáticos) y posteriormente en la sangre, hacia el resto de células del organismo, formando parte así de los quilomicrones (QM), los cuales son proteínas de muy baja densidad producidas en el intestino. La utilización de los QM por las células periféricas, (no hepáticas) les permite obtener el colesterol para sus necesidades metabólicas. Por otra parte, el hígado forma constantemente colesterol y lo exporta hacia las células periféricas como parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que al igual que los quilomicrones, cumplen la función de proveer de ácidos grasos y colesterol a las células periféricas. Después de una ingesta de alimentos que contienen grasas y colesterol, los QM constituyen la fuente primaria de lípidos para el organismo. Sin embargo en los

periodos de ayuno fisiológico, el aporte de lípidos, incluido el colesterol, es realizado por el hígado mediante la secreción de las VLDL; estas lipoproteínas son transformadas en el sistema cardiovascular que irriga a las células periféricas, en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y posteriormente en LDL. Las LDL también son utilizadas por las células periféricas y por el hígado, tejidos que las internalizan y las degradan, utilizando con fines metabólicos todos sus componentes (aminoácidos, ácidos grasos y colesterol).

El colesterol es esencial en los recién nacidos y en los niños en edad de crecimiento, ya que ellos requieren formar nuevas células y tejidos. Es importante destacar que la alimentación experimental con dietas totalmente carentes de colesterol en ratas, produce en las crías efectos teratogénicos, como el nacimiento de animales cíclopes o sin abertura buco-nasal.

2.1.8. Contenido de colesterol en alimentos de consumo frecuente

El contenido de colesterol en los alimentos depende de su naturaleza, origen y de los procesos a los cuales son sometidos. En la **Tabla 3** se muestra el contenido de colesterol presente en los alimentos frecuentemente consumidos (Zonadiet.com).

Tabla 3. Contenido de Colesterol en alimentos de consumo frecuente

Contenido de colesterol, mg/100 g		
ALTO	QUESOS	
	Cabrales	100
	Gouda	140
	Manchego	100
	Crema	100
	VISCERAS	
	Panza	150
	Corazón	140
	Hígado de cerdo, cordero, ternera	300-440
	Hígado de pollo	555
	Mollejas	250
	Riñones	404
	Sesos	1500-2000
	OTROS	
Anchoas	120	
Anguila	142	
Caviar	330	
Yema de huevo	252	
Mantequilla	240	
Margarina y manteca de cerdo	100	
Morcillas	115	
MEDIO	AVES	
	Pollo y pavo sin piel ni grasa	72
	Pato	85
	CARNES	
	Buey, vaca, ternera, cerdo, cordero en filete magro a la plancha y sin grasa	70
	Jamón cocido	85
	Conejo	85
	Jamón serrano	92
	Panceta	62
	Salami, chorizo	75
	Salchichas de cerdo	52
	Salchichas tipo Frankfurt	65
	Tocino	86
	PESCADOS Y OTROS MARISCOS	
	Salmon	35
	Mero	50
	Caballa, sardina	70
	Arenques	85
Almejas	38	
Ostiones	50	
QUESOS		
Azul, Emmental	90	
Manchego	70-85	
Parmesano, camembert	70	
Fresco	60	
Requesón	38	
BAJO	ACEITES Y GRASAS	
	Oliva, maíz, girasol, cacahuete, Soya.	0
	Margarina vegetal	7
	AZUCARES	
	Miel	0
	CEREALES	
	Arroz, avena, cebada, maíz, trigo	0
Pan blanco	5	

2.2. Generalidades sobre productos de oxidación del colesterol, COPs

La oxidación del colesterol da lugar a una amplia gama de compuestos secundarios, conocidos como productos de oxidación de colesterol o COPs, potencialmente tóxicos para el organismo. La mayor parte de las técnicas de procesado, especialmente el cocinado y los tratamientos de irradiación, incrementan drásticamente la velocidad de formación de dichos compuestos (Geni, 2006). Hasta el momento se han identificado más de 60 COPs, algunos de ellos presentan actividades biológicas adversas in vivo, además, frecuentemente son detectados en alimentos. Sus efectos sobre el organismo han sido ampliamente detallados y discutidos anteriormente (Finocchiaro y Richardson, 1983; Peng y Taylor 1984; Peng, et al., 1991; Böesinger et al., 1993; Paniangvait et al., 1995; Yin et al., 2000; Poli, et al., 2009). Los COPs con mayor actividad biológica son: α -epoxicolesterol (o colesterol-5 α ,6 α -epóxido) –causante de lesiones ateroscleróticas y con actividad carcinógena (Guardiola et al., 1996), 25-hidroxicolesterol (o 5-colesten-3 β -25-diol) y el colestanoetriol (o colestén-3 β -5 α -6 β -triol) –ambos con actividad citotóxica y angiotóxica (Park y Addis, 1986; Nourooz-Zadeh y Appelquist, 1987; Zhang et al., 1991; Paniangvait et al., 1995;), también se ha encontrado que los COPs están asociados al proceso de producción de leucocitos en el hígado (Haigh et al. 2006).

2.2.1. Estructuras

Las estructuras del colesterol y de sus productos de oxidación no enzimática más comunes, claramente identificados y que se ofrecen comercialmente como estándares o para fines experimentales se muestran en la **Figura 11**.

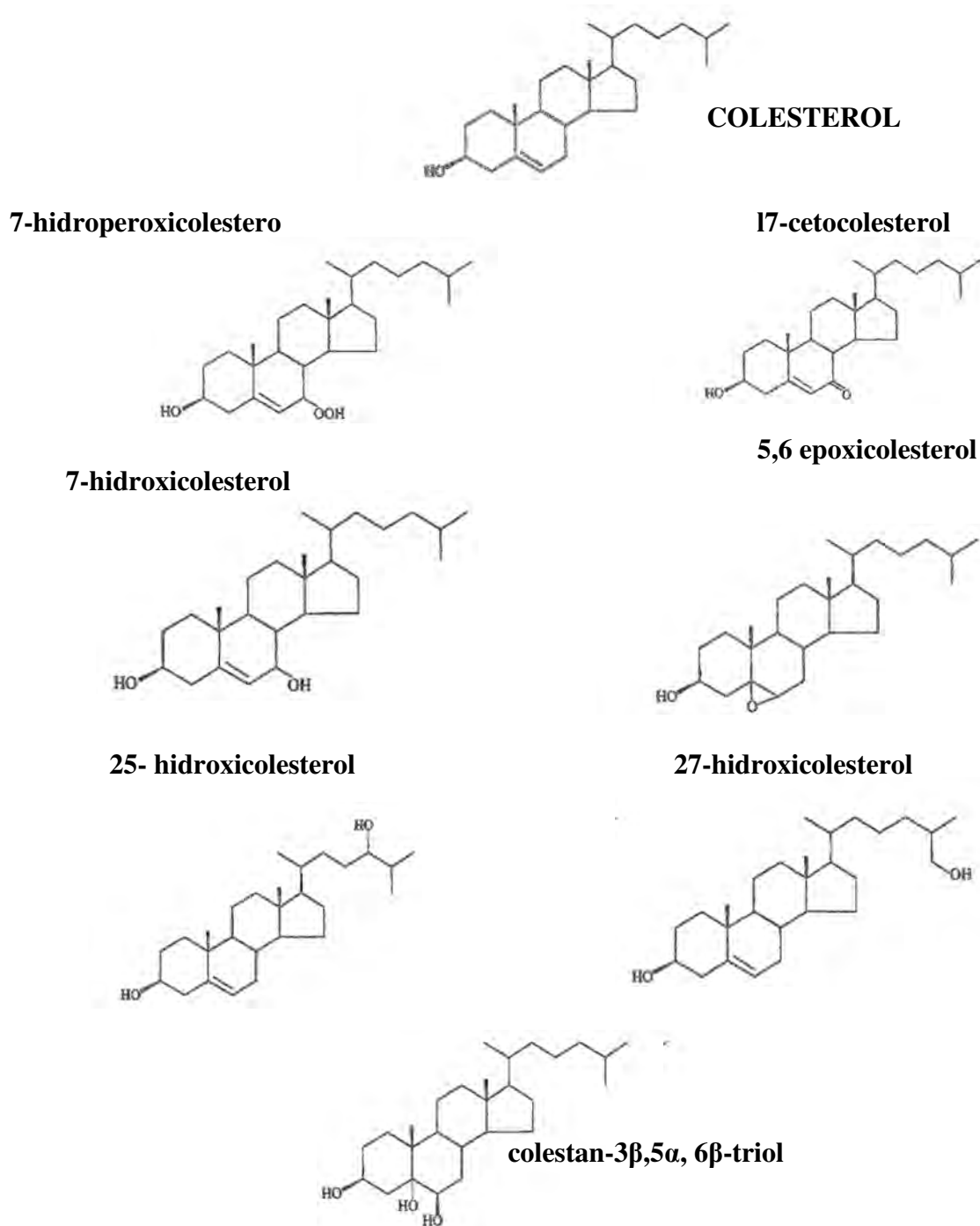


Figura 11. Estructura del colesterol y algunos de sus productos de oxidación

2.2.2. Factores que determinan su formación

Se han publicado estudios sometiendo diversos alimentos a diferentes condiciones para determinar los factores que favorecen la oxidación del colesterol. Los factores más destacados son los siguientes:

2.2.2.1. Temperatura (T)

Algunos alimentos sometidos a altas T durante el proceso de cocinado pueden incrementar la presencia de COPs (Morgan y Armstrong, 1989). La formación de estos óxidos requiere la presencia de abundantes especies reactivas al oxígeno, ácidos grasos insaturados, colesterol, metales de transición y en algunos casos enzimas. Además, la desnaturalización proteica que se produce al cocinar los alimentos puede llevar a la pérdida de la actividad antioxidante de enzimas o a una deficiencia de hierro que es catalíticamente activo sobre metaloproteínas (principalmente mioglobina). También se puede producir la destrucción de membranas celulares que pondrían en contacto ácidos grasos insaturados con especies oxidantes. Por otra parte la descomposición térmica de hidroperóxidos produce especies oxidantes como radicales alcoxilo o hidroxilo; todos estos procesos conllevan un incremento significativo de la oxidación de colesterol y por tanto, la formación de especies oxidadas de los esteroides. Hur et al. (2007) refieren que la cantidad de 7-ceto incrementa linealmente con el tiempo de exposición al calor pero no con cambios en T.

Cuando se realiza tratamiento térmico de productos cárnicos procesados tales como albóndigas, hamburguesas y salchichas, no observan la formación de COPs; solo se observa una alteración en hamburguesas de carne cruda y a la parrilla en la composición

de ácidos grasos expresado como g/100 g de muestra. Los niveles de colesterol se modifican de forma significativa cuando se comparan salchichas y hamburguesas crudas y a la parrilla, siendo los valores superiores en este último caso. El porcentaje de lípidos totales de las hamburguesas a la plancha fueron inferiores a los obtenidos en las muestras a la parrilla y los contenidos de COPs en carnes debido a estos efectos pueden llegar entre el 1 y 10% del contenido de colesterol. El calentamiento de los alimentos no se refiere solamente al uso de ondas infrarrojas, este fenómeno también se presenta cuando se utiliza microondas. La formación de COPs en alimentos por acción del calor depende de T, tipo de ondas que genera el calentamiento, tipo de combustible usado para generar el calor y tiempo de exposición del alimento al proceso; en algunos casos después del calentamiento se han obtenido cantidades de COPs hasta de 80 µg/g de muestra (Bal et al., 1996; Toshiaki et al., 1996; Novelli et al., 1998; Kim et al., 2000; Valenzuela et al., 2000; Morales-Aizpur, 2005; Herzallah, 2005; Baggio y Bragagnolo, 2006b; Vicente y Torres, 2007; Al-Ismail et al., 2007; Saldanha et al., 2008; Broncano et al., 2009).

2.2.2.2. Radiación

Los estudios realizados con implicación de radiación visible y tratamientos de irradiación en alimentos en cuanto a procesos oxidativos muestran distintos resultados. Cuando las moléculas absorben energía ionizante aumenta su reactividad notablemente y forman iones o radicales libres los cuales reaccionan y forman productos radiolíticos estables (Woods y Pikaev, 1994); por ejemplo, en la carne, el hierro iónico libre liberado de macromoléculas puede reaccionar con peróxido de hidrógeno y formar radicales hidroxílicos. La presencia de oxígeno facilita la etapa de propagación de la

oxidación lipídica así como la formación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Diehl, 1995). La luz ultravioleta puede incluso generar radicales libres debido a la fotólisis del agua. La irradiación puede producir gran cantidad de radicales hidroxílicos en productos cárnicos debido a que más del 75% de las células musculares están formadas por agua (Thakur y Singh, 1994).

2.2.2.3. Envasado y almacenamiento

Diversas publicaciones han dejado constancia de la influencia del tipo de envase y de las condiciones de almacenamiento en el incremento de los procesos oxidativos. Los alimentos precocidos y almacenados en condiciones aerobias muestran contenidos superiores en oxisteroles que los alimentos almacenados crudos. Este resultado pone de manifiesto que el procesado previo de los alimentos supone un aumento en la cantidad de COPs (Conchillo et al., 2005). El tipo de material de envasado puede favorecer la oxidación si este material permite el paso de luz o de oxígeno; por ejemplo, cuando se almacena pescado, como la merluza por más de 120 días, se observa la formación de COPs que aumenta cuando los envases son permeables al oxígeno (Saldanha y Bragagnolo, 2008; Baggio y Bragagnolo, 2006a).

2.2.2.4. Naturaleza de la matriz

Al comparar el tipo de lípidos (grasas animales y aceites vegetales) usados para freír hamburguesas de pollo, se observa que los procesos de hidrólisis lipídica (ácidos grasos libres, ácidos grasos totales y diacilglicérols) y oxidación (índice de peróxidos y COPs) en el proceso de cocción se presentan con más frecuencia en los alimentos preparados con grasas animales, aunque estas diferencias disminuyen durante el proceso de cocción

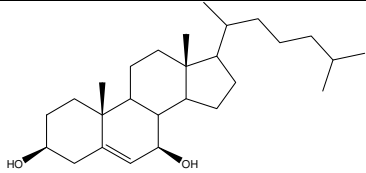
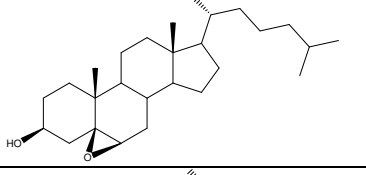
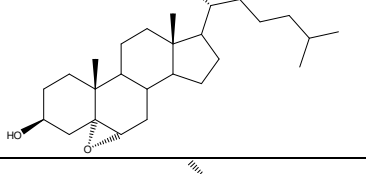
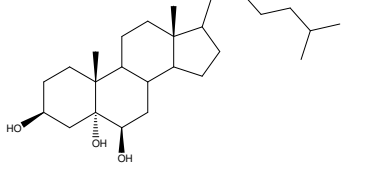
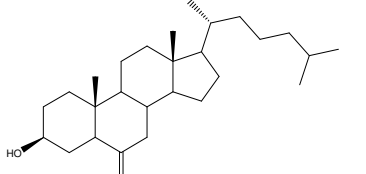
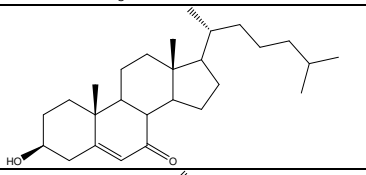
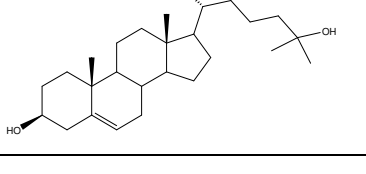
(Bonoli et al., 2007). La composición de la matriz es un factor muy importante que participa en la formación de COPs; alimentos hidratados favorecen la formación de algunos COPs los cuales requieren la presencia de agua y de compuestos ácidos (ácidos grasos libres) como es el caso del triol (Obara et al., 2006).

2.2.3. Características químicas y biológicas

Los COPs, compuestos apolares más hidrosolubles que el colesterol, son inestables. Su absorción a nivel intestinal es similar a la del colesterol siendo esterificados también en forma similar. Se metabolizan vía Citocromo P-450 y se acumulan principalmente en tejidos adiposos, nerviosos, gonadal y en ateromas. Los COPs se eliminan a nivel intestinal como componentes de la bilis, siendo su papel a nivel de las membranas poco conocido; inhiben la síntesis del colesterol y del ADN, y alteran la homeostasis del calcio (Ulberth y Rossler, 1998; Valenzuela et al., 2002a)

En la **Tabla 4** se muestran los nombres completos y abreviados, estructuras, masas moleculares y número de CAS de los COPs estudiados en este trabajo

Tabla 4. Características de los COPs

Nombre completo	Nombre corto	Estructura	Masa molecular	Nº CAS
7 β -hidroxicolesterol	7 β -OH		402,65	566-27-8
Colesterol 5 β ,6 β -epóxido	β -epóxido		402,65	4025-59-6
Colesterol 5 α ,6 α -epóxido	α -epóxido		402,65	1250-95-9
Colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol	triol		420,36	360-68-9
6-cetocolestanol	6-ceto		402,65	1175-06-0
7-cetocolesterol	7-ceto		400,64	566-28-9
25-hidroxicolesterol	25-OH		402,65	2140-46-7

2.2.4. Estudios de Toxicidad

Con el fin de evaluar los problemas de salud asociados con el consumo de COPs se han realizado pruebas *in-Vitro*, *in-Vivo*, bioensayos y estudios médicos de acuerdo a las normas de la Organización Mundial de la Salud, OMS.

2.2.4.1. In-Vivo

Se ha determinado que los COPs en algunos animales y en modelos *In Vitro* tienen efectos mucho más potentes que el propio colesterol. Los COPs perturban varios aspectos de la homeostasis del colesterol celular (incluida la biosíntesis del colesterol, esterificación y el flujo de salida). Estos compuestos ponen en peligro la reactividad vascular, son citotóxicos e inducen a la apoptosis (Malcolm et al., 1999; Lyons y Brown, 1999; Hall, 2006; Poli, et al. 2009; Brown y Jessup, 2009).

Los leucocitos humanos que se activan por la presencia de lipopolisacárido bacteriano son capaces de oxidar el colesterol para producir COPs, incluyendo especies reconocidas como cancerígenas, así como la aparición de formas oxidadas de colesterol (oxisteroles) en los tejidos vivos; estos compuestos han sido asociados con aterogenicidad durante los últimos cuarenta años; el contenido de COPs se correlaciona negativamente con el contenido de colesterol de los cálculos biliares. Se ha demostrado correlaciones entre la presencia de bacterias en los cálculos biliares y el contenido de COPs en los cálculos biliares humanos. También se ha demostrado que la bilis hepática en pacientes con infección biliar contiene niveles significativamente mayores de COPs, a diferencia de la bilis de los pacientes que carecen de infección del sistema biliar (Sathishkumar et al., 2009).

Los COPs que se generan en las LDL ejercen un efecto citotóxico en cultivos de células endoteliales disminuyendo las funciones de la membrana celular, afectando al citoesqueleto y a la malla celular; los COPs causan ruptura de la membrana celular por redistribución de la α -actina, además generan pérdidas de vinculina causando, finalmente, la muerte celular por apoptosis. En las plaquetas ateroscleróticas humanas se presentan muchos lípidos oxidados, los cuales pueden facilitar futuras oxidaciones como es el caso de la paraoxonasa, una LDL que en condiciones normales es una lipoproteína de alta densidad que inhibe los procesos aterogénicos (Palladini et al., 1996; Tavori et al., 2009; Vesa y Hynynen, 2009).

Si se compara los valores de algunos parámetros de pacientes sanos y de pacientes con hemodiálisis la relación de concentración del 7-ceto/colesterol de las LDL es significativamente más alta en estos últimos; sin embargo la relación entre ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados, en las membranas de los eritrocitos, es significativamente menor en estos pacientes. No se observa diferencia significativa en la relación de la concentración del 7-ceto de LDL y la composición de ácidos grasos en las membranas de eritrocitos entre pre y post-intervención de hemodiálisis; se concluye que los pacientes bajo hemodiálisis presentan estrés oxidativo que modifica las membranas de eritrocitos y de LDL, lo cual permite que estas modificaciones participen en el proceso de la aterosclerosis (Leonarduzzi et al., 2002).

Algunas sustancias presentes en productos naturales inhiben la oxidación del colesterol. Esto se ha demostrado en dietas de ratas usando sustancias características del té verde (galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epicatequina, CE, catequina y

epigallocatequina, EGC) y también, sustancias antioxidantes tales como ácido aurrintricarboxílico, vitamina E y metil- β -ciclodextrina que disminuyen de forma significativa la formación de peróxidos y radicales hidroxilos en el plasma sanguíneo (Chang et al., 1998; Osada et al., 2001; Nam, 2003; Vejux et al., 2009). El licopeno es otra sustancia que reduce significativamente el stress oxidativo causado por el 7-cetocolesterol y permite el crecimiento celular normal de los macrófagos humanos. El licopeno evita, también, la apoptosis celular lo que puede ser una buena alternativa como agente antiterogénico; la presencia de esta sustancia no permite que se den reacciones indeseables, así por ejemplo a las 24 horas de tratamiento, el licopeno reduce significativamente el aumento de la producción de oxígeno reactivo oxidativo (ROS) inducido por los oxisteroles, como también la fosforilización redox (Miyuki et al., 2002).

2.2.4.2. In-Vitro

Se ha evaluado la capacidad del colesterol y sus óxidos para inducir apoptosis en células musculares lisas vasculares en cultivo de tejidos; estudios de aterosclerosis en conejos mostraron que 7-cetocolesterol inhibe la proliferación e induce la apoptosis, siendo este compuesto el inhibidor más potente de la proliferación; sin embargo, 25-OH resultó ser el más potente inductor de la apoptosis. Estos datos sugieren que la inhibición de la proliferación y la inducción de apoptosis por los COPs dentro de las células musculares lisas siguen diferentes vías. La presencia de colesterol no tuvo ningún efecto sobre el nivel de apoptosis en la pared de la aorta de conejo; la presencia de COPs, especialmente triol, también produce apoptosis en células que están presentes en etapas de la gestación humana como son las del cordón umbilical, lo que puede generar un

efecto adverso para este proceso, llegando a producir daños o muerte del feto (Phelan y Mahler, 1997; Liao et al., 2009). Los COPs también afectan a las células del sistema nervioso central siendo 25-OH uno de los agentes más citotóxicos. Durante el proceso de muerte celular, los COPs son capaces de potenciar el lipopolisacárido bacteriano (LPS) el cual induce la producción de óxido nítrico en distintos grados. La citotoxicidad de 25-OH podría prevenirse mediante metil- β -ciclodextrina, polímero de glucosa el cual causa eflujo de óxido de colesterol presente en las células. Mucha atención ha merecido la citotoxicidad de COPs en las células inmunes de la sangre tales como, linfocitos y macrófagos; la literatura refiere que estos agentes son tóxicos para las células de la microglia derivadas del sistema nervioso central (Chang y Liu., 1998; Chang et al., 1998).

El 3 β -hidroxi-5-oxo-6-secocolestan-6-al (Secoaldehido Colesterol) induce la agregación de plaquetas y la apoptosis en neuronas del hipotálamo; es citotóxico en concentraciones entre 5 y 20 mg/L, mientras que el colesterol a estas concentraciones no es tóxico; este aspecto se evidencia por la pérdida de ramas axonales y la muerte de estas células; se ha sugerido que se debe a la pérdida de la integridad de las dendritas y de la membrana plasmática, posiblemente como resultado de una mayor producción de especies reactivas de oxígeno. En células diferentes a las neuronas también se ha visto el fenómeno de apoptosis cuando se agrega triol, lo cual se debe a la alteración de las funciones que debe cumplir la mitocondria ya que esta organela es la encargada de la respiración celular y puede participar en otros procesos de oxidación (Sathishkumar et al., 2009; Raghavamenona et al., 2009; Gao et al 2009; Liu et al., 2009).

2.2.5. Presencia en alimentos

Se han identificado más de 60 COPs, los cuales son frecuentemente detectados en alimentos, siendo 7-ceto y 7 β -OH los que se encuentran en mayor proporción; su contenido depende fundamentalmente del tipo de matriz siendo uno de los parámetros determinantes el contenido de agua ya que éste puede interferir en el proceso de análisis y además participa en la formación de algunos COPs. Las carnes frescas son muestras que presentan contenidos relativamente altos de COPs (hasta 1120 ng/g) que pueden variar dependiendo de los procedimientos a los que se somete la muestra; por ejemplo, cuando se tritura la muestra aumenta su área de contacto favoreciendo el proceso de oxidación, lo que puede incrementar el contenido de COPs.

En trabajos realizados con carnes frías como mortadela y salami se han encontrado contenidos de 7 β -OH, α -epóxido, 7-ceto y 25-OH hasta de 18,69 μ g/g, los cuales son relativamente altos (Saqer y Herzallah, 2005); es necesario indicar que esta matriz sufre cambios de T y cambios en su composición durante el proceso de fabricación y almacenamiento (Angulo, et al. 1997).

Existen alimentos que no sufren cambios significativos en T y composición de la matriz dentro del proceso de fabricación como es el caso del jamón Serrano y del Ibérico; sin embargo, el proceso de maduración es relativamente largo y el contenido de grasa es también grande; este hecho explica que se formen contenidos apreciables de COPs de hasta 710 ng/g (Petrón et al., 2003).

Los alimentos lácteos son sometidos a diversos procesos en las etapas de fabricación que pueden conducir a la formación de COPs; los quesos especialmente se someten a largos procesos de maduración, llegando a presentar contenidos de COPs hasta de 180000 ng/g (Terry Finocchiaro et al., 1984).

En matrices acuáticas la formación de COPs es diferente porque su contenido en agua y ácidos grasos son relativamente altos, aspectos que son ambos determinantes en la formación de estos compuestos. Se ha referido que en muestras de salmón ahumado factores como el cocinado y el empaquetado del producto durante su procesamiento influyen notablemente en la formación de COPs encontrando contenidos que llegan hasta 530 ng/g (Al-Saghir et al., 2004).

2.3. Irradiación de alimentos para su conservación

Son muchos los sectores de población que se muestran contrarios ante el empleo de radiaciones ionizantes y más aún cuando el material tratado son alimentos. La solución a este problema pasa por una adecuada información que permita conocer a los consumidores las ventajas e inconvenientes de esta forma de conservar los alimentos.

Los resultados obtenidos en diferentes investigaciones, realizadas en distintas condiciones y países, indican que el consumo de alimentos irradiados carece de efectos nocivos siempre que este tratamiento se realice dentro de ciertos límites y en condiciones controladas. Se ha evaluado, por ejemplo, la formación de 7-ceto, α -epóxido, β -epóxido 4-colesten-3-ona, 4-colesten-3,6-diona y 4,6-colestadien-3-ona en carnes de res, cerdo y ternera, obteniendo un incremento del contenido de estos

compuestos excepto del 4,6-colestadien-3-ona al irradiarse las muestras a 10 kGy en los tres tipos de carne (Hwang y Maerker, 1993; Hammad y El-Mongy, 1992). El gray (Gy) es la unidad empleada para cuantificar la energía absorbida por unidad de masa de alimento (1Gy= Julio/Kg).

2.3.1. Generalidades

La irradiación de alimentos consiste en su exposición a la acción de radiaciones ionizantes; se denominan así porque pueden eliminar electrones de enlace, para energías superiores a 0,5 MeV. El límite superior de 10 MeV, se considera adecuado para evitar la radioactividad inducida con formación de isótopos inestables.

La radiólisis produce la aparición de radicales libres y por tanto aumenta la presencia de sustancias extrañas ajenas al alimento.

2.3.2. Tipos de radiación

Se emplean tres tipos distintos de radiaciones: rayos gamma, Rayos X y electrones acelerados.

2.3.2.1. Rayos gamma

Se obtiene a partir de la desintegración radiactiva de isótopos de Co^{60} y Cs^{137} y se genera mediante instrumentos que funcionan con una energía igual o inferior a 5 MeV.

Este tipo de proceso posee las siguientes características principales:

- Alto poder de penetración.
- Homogeneidad de la radiación.

- Mayor tiempo de irradiación y por tanto mayor posibilidad de eliminación de organismos vivos.
- Constante en el tiempo.

La **Figura 12** muestra el proceso de este tipo de irradiación

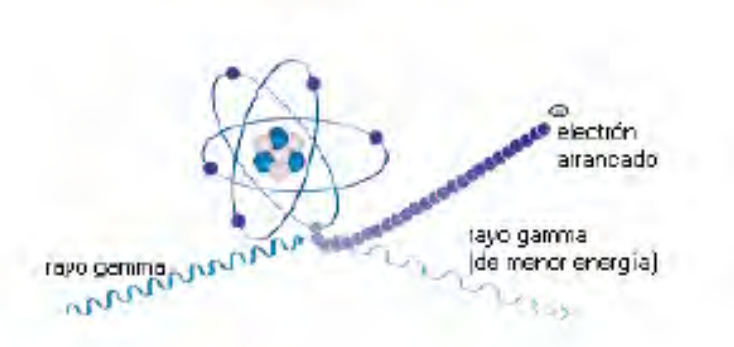


Figura 12. Radiación gamma

2.3.2.2. Rayos X

Se generan mediante instrumentos que funcionan con una energía igual o inferior a 5 MeV. Los rayos X tienen propiedades similares a los rayos gamma, ya que las bandas de frecuencias de radiación coinciden.

2.3.2.3. Electrones acelerados (E-beam)

Se generan mediante instrumentos que funcionan con una energía igual o inferior a 10 MeV (electrones a gran velocidad), **Figura 13**.

Las características fundamentales de la irradiación son las siguientes:

- Fuente eléctrica de producción de electrones controlable en intensidad y energía.
- Poco penetrante.
- Producto esterilizado disponible en pocos minutos.
- Posibilidad de control unitario en cada unidad.
- Ausencia de impacto ambiental.



Figura 13. Dispositivo generador de electrones acelerados

2.3.3. Instrumental para la irradiación

Según la forma de realizar el proceso, las instalaciones de irradiación de alimentos pueden ser de dos tipos: aquellas que permiten un tratamiento discontinuo y las adaptadas para aplicar la irradiación continua. En las primeras, se irradia una cantidad determinada de alimento durante un periodo de tiempo preciso, tras el cual se descarga la instalación para tratar otra partida de alimento. La variable fundamental para regular la dosis de irradiación aplicada es el tiempo de permanencia del producto en la cámara de tratamiento. En las instalaciones de procesado continuo, los alimentos atraviesan constantemente la cámara de irradiación a una velocidad controlada y calculada, ya que ésta es la variable que garantiza la absorción de la dosis requerida; las instalaciones discontinuas son más sencillas, fáciles de manejar y flexibles, mientras que las de irradiación continua se adaptan mejor al tratamiento de grandes cantidades de producto.

2.3.4. Normativa internacional y legislación española

No todos los tipos de radiaciones ionizantes pueden utilizarse en el tratamiento de alimentos. Si los niveles de energía de la fuente radiactiva son elevados podría presentarse un fenómeno de radiactividad inducida por el cual ciertos componentes del

alimento se convertirían en radiactivos. Por ello el Comité Mixto FAO/OIEA/OMS de expertos en irradiación de alimentos, basándose en estimaciones teóricas y estudios experimentales, acordó en 1981 autorizar como fuentes de radiación, para el tratamiento de alimentos, aquellas (rayos gamma, rayos X y haces de electrones de baja energía) cuyos niveles de energía se encuentran muy por debajo de los que pueden producir radiactividad. De esta forma, se garantiza que los alimentos tratados serán, en este aspecto, totalmente seguros.

• **Comisión FAO-OMS:**

- **Norma general CODEX para los alimentos irradiados (Rev. 2003).** Se aplica a los alimentos tratados con radiaciones ionizantes que se utilizan conforme a los códigos de higiene, las normas alimentarias y los códigos de transporte aplicables; no se aplica a los alimentos expuestos a dosis emitidas por instrumentos de medición utilizados a efectos de inspección (CODEX, 2003).

- **Código de prácticas del CODEX** para el tratamiento de los alimentos irradiados. Indica las prácticas que deben aplicarse para que el tratamiento por irradiación resulte eficaz y se efectúe de manera que permita mantener la calidad y obtener productos alimenticios inocuos y aptos para el consumo (CODEX, 2007).

. **Unión Europea**

La normativa europea es muy exhaustiva; pretende armonizar la legislación a escala comunitaria pero es posterior a muchas de las leyes nacionales relativas al tratamiento

de los alimentos. Por ello, en cuanto a la irradiación en la UE sigue habiendo muchas diferencias. A continuación se detallan algunos apuntes al respecto.

- **Directiva de 1999/2/CE y 1999/3/CE del parlamento europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999 sobre la irradiación de alimentos**, incluye en su anexo una lista comunitaria inicial de alimentos e ingredientes alimentarios que pueden tratarse con radiaciones ionizantes, a saber, hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales y fija en 10 kGy la dosis máxima autorizada. Las directivas europeas no son normas directamente aplicables, sino que los Estados deben de transponerlas a sus respectivos ordenamientos jurídicos (Directiva de 1999/2/CE y 1999/3/CE).

- Existe un símbolo internacional aprobado para identificar en el etiquetado los alimentos que han sido sometidos a un proceso de irradiación. Sin embargo, el símbolo no aparece en el etiquetado europeo (**Figura 14**)



Figura 14. Etiqueta de alimento irradiado (Radura)

- En **Europa** debe mencionarse en la etiqueta que el producto o sus ingredientes han sido irradiados (también si han sido pasteurizados o sometidos a otro método de conservación); en los mercados minoristas europeos ya se venden más de 40 tipos de alimentos irradiados. Esto se debe a que algunos Estados dentro de la Unión Europea se

han abierto más a la irradiación que la directiva marco, como Francia, Holanda, Bélgica, Hungría o Gran Bretaña. En Gran Bretaña, por ejemplo, desde los años 60 se irradian alimentos para pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados.

Por el contrario, en Austria y Alemania existe una sensibilidad social que rechaza por principio la aplicación de innovaciones tecnológicas en la elaboración de alimentos. La irradiación se prohíbe expresamente en la producción y conservación de alimentos ecológicos. En España la irradiación oficialmente no se usa. Desde la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAs) se asegura que este sistema de esterilización no se utiliza en nuestro país por la escasa demanda de los fabricantes. Sin embargo, existe demanda para la exportación de productos irradiados. A continuación se detallan algunos apuntes a cerca de la legislación española.

- **Real Decreto 348/2001.** Regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes (Real Decreto 348/2001, España). Se aplica a hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales (10 kGy).

- En **España** debe aparecer el texto “Irradiado” o tratado con radiaciones ionizantes, existen dos empresas autorizadas: en *Ionmed (Cuenca)* donde se irradian alimentos, entre otros productos, mediante un acelerador de electrones, y en *Aragogamma (Barcelona)* donde se realiza la irradiación con radiación gamma (Co^{60}); ambas empresas están autorizadas por el Consejo de seguridad Nuclear (CSN) como instalaciones radiactivas y se encuentran inscritas en el Registro General Sanitario de Alimentos (RGSA).

2.3.5. Efectos de la irradiación

2.3.5.1. Químicos

Para evaluar el efecto de las radiaciones ionizantes utilizadas en el procesado de alimentos es necesario conocer la repercusión que tiene este tipo de radiaciones en cualquier material; los electrones y radiaciones gamma producen ionizaciones y excitaciones en los átomos y/o moléculas de la materia con la que interaccionan, lo que se conoce como *efecto primario de la irradiación*. Como consecuencia de la excitación molecular aparecen nuevos iones y radicales libres, que dan lugar a recombinaciones y dimerizaciones de las que resultan sustancias de composición diferente a la del compuesto inicial, lo que constituye el efecto secundario de la irradiación (Kwon, et al. 2008). Este último efecto se prolonga en el alimento, con formación y desaparición de compuestos, hasta el establecimiento de productos estables. Al conjunto de estos fenómenos se le denomina radiolisis y a los nuevos compuestos originados productos radiolíticos como se representa esquemáticamente en la **Figura 15**.

La intensidad de la radiolisis depende de la composición del alimento tratado, de las condiciones de procesado y de la dosis de irradiación absorbida por unidad de masa (Gy). En un tratamiento de esta naturaleza la dosis absorbida y su distribución dependen de la potencia y del tipo de fuente de irradiación utilizada. El control del tratamiento aplicado se realiza mediante dosímetros que pueden ser calorimétricos, químicos o colorimétricos.

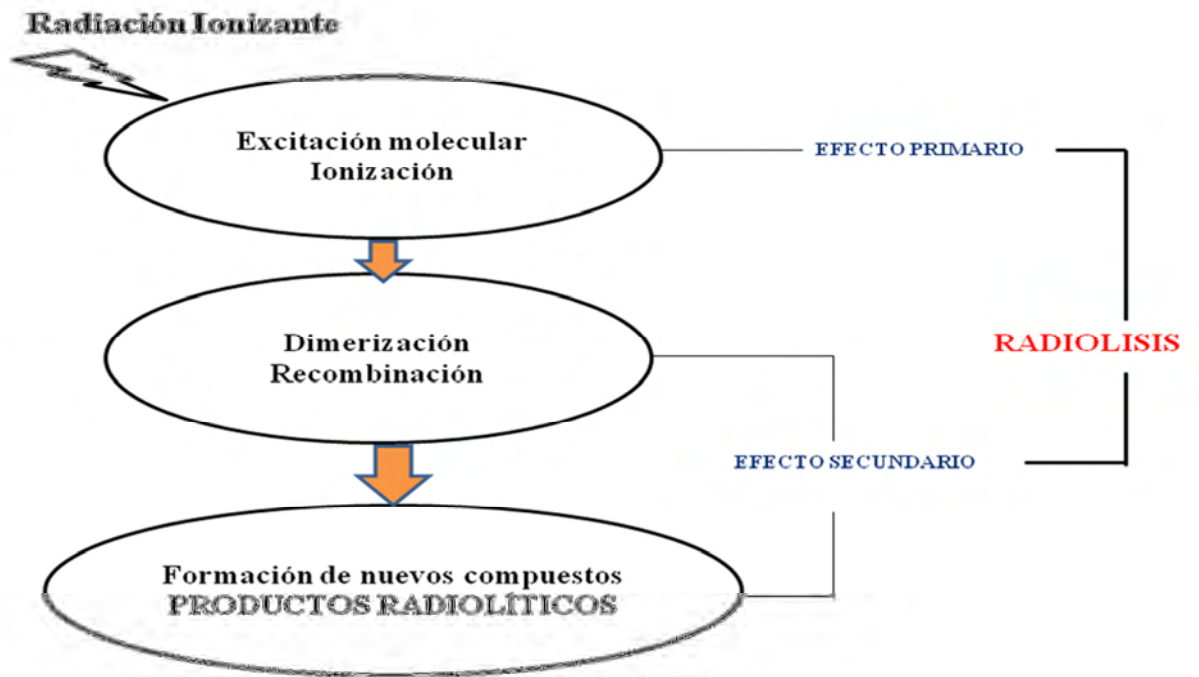


Figura 15. Efectos de radiación ionizante

La extensión y generalización de la radiolisis se debe al efecto secundario, al reaccionar los radicales libres generados con distintas moléculas; en estos procesos cabe destacar el papel del contenido en agua de los alimentos. Como es sabido el agua es el componente mayoritario de los seres vivos y de muchos alimentos, y al ser irradiados, se originan radicales libres, con carácter oxidante o reductor, que poseen elevada capacidad de reacción como se detalla en la **Figura 16**.

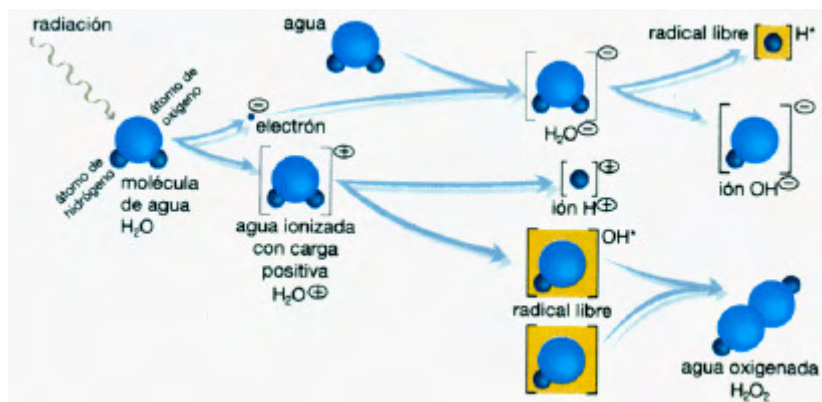


Figura 16. Formación de radicales libres en la radiólisis del agua

Aunque alguno de estos radicales se pierden al formarse de nuevo moléculas de agua, la mayoría de ellos intervienen de forma decisiva en la radiolisis. Su efecto es aún mayor en presencia de oxígeno, por formarse peróxidos y superperóxidos de gran actividad. En conjunto, la presencia de estos radicales va a condicionar las reacciones de oxidación y de reducción, provocando un desequilibrio en los procesos de óxido-reducción enzimática y, en consecuencia, la desestabilización metabólica.

Estudios realizados sobre la influencia de la irradiación en muestras de jamón cocido empacado al vacío, usando como dosis máxima 8 kGy, concluyeron que la irradiación no produce racemización significativa de L-amino acids (Gil-Díaz et al., 2009) y no produjeron aminas heterocíclicas (Rosales-Conrado et al., 2008).

2.3.5.2. Biológicos

Tratamientos específicos de irradiación pueden causar la destrucción de los agentes vivos presentes en los alimentos (insectos, parásitos y algunos microorganismos) o ralentizar los procesos biológicos de algunos vegetales (maduración, crecimiento de brotes y raíces), sin apenas modificación de las características organolépticas y el valor nutritivo derivado de su composición en proteínas, lípidos y carbohidratos (Blank, et al., 1992; Zhu et al., 2005; Cabeza, M.C. et al., 2007). Al ser los ácidos nucleicos los componentes de mayor complejidad a nivel celular, la posibilidad de que el material genético sufra daños directos es muy elevada. De esta forma la dosis letal de irradiación asociada a cada organismo vivo disminuye a medida que aumenta la complejidad de su ADN, como se esquematiza en la **Figura 17**.

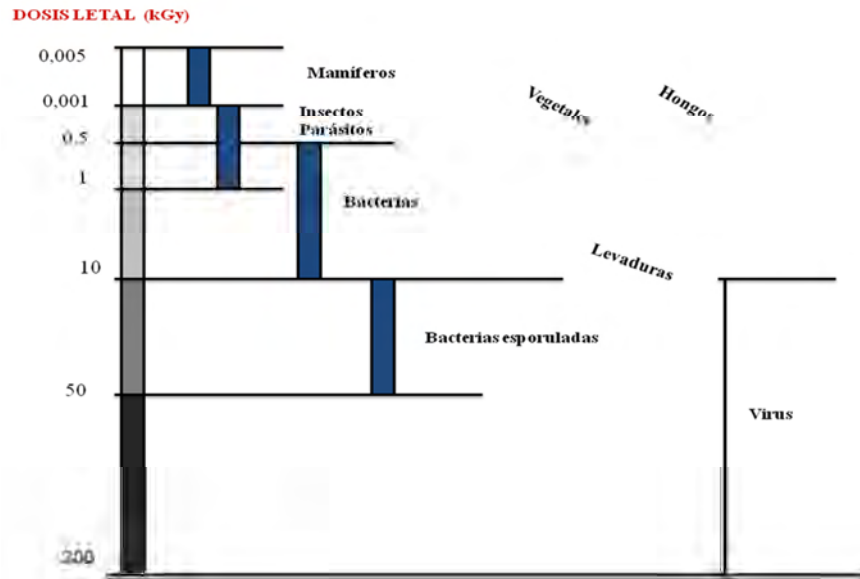


Figura 17. Dosis letal de irradiación para distintos organismos

Otras macromoléculas más sencillas experimentan modificaciones, en especial debido al efecto secundario o indirecto. De esta forma, los polisacáridos (celulosa, pectinas y almidones) pueden ser parcialmente despolimerizados. Las proteínas son relativamente poco afectadas, aunque la reducción de los enlaces disulfuro es la causa de la desactivación y de los cambios de conformación de algunas enzimas. También se ha observado hidrólisis de enlaces peptídicos y oxidación de grupos $-SH$. Entre las moléculas de pequeño tamaño, los monosacáridos pueden oxidarse o hidrolizarse y los aminoácidos pueden ser desaminados, pero son los ácidos grasos poliinsaturados los más afectados, dando lugar a hidroperóxidos inestables y a numerosos productos de degradación.

En consecuencia, el efecto letal de las radiaciones ionizantes en organismos vivos se debe, en primer lugar, a los daños directos ocasionados en el ADN y ARN. Estas alteraciones afectan a la expresión de algunos genes y a la biosíntesis de diversas enzimas e interfieren en la división celular; ésto es válido tanto para impedir la proliferación de microorganismos como para inhibir su proliferación y ralentizar la maduración de ciertos vegetales. En segundo término, los resultados de los tratamientos de irradiación se asocian con las alteraciones que los radicales libres formados originan en los equilibrios enzimáticos de óxido-reducción. El avance de la radiolisis ocasiona, además, lesiones en las membranas celulares que afectan especialmente a su permeabilidad. Este hecho se debe principalmente al efecto secundario de la irradiación sobre el componente lipídico de éstas, en particular de los ácidos grasos poliinsaturados.

En el caso de los microorganismos, la radiorresistencia es muy diversa dependiendo de múltiples factores entre los que se encuentra la especie, e incluso la cepa considerada. El estado fisiológico también condiciona la respuesta; así, la mayor radiosensibilidad se muestra en la fase exponencial del crecimiento; decrece durante la fase estacionaria y es mínima en fase latente (no hay crecimiento visible de la colonia). Otros factores determinantes son la composición del medio en el que se encuentran y las condiciones de tratamiento (T, presencia o ausencia de oxígeno, etc.). De esta forma, T elevadas aumentan la radiosensibilidad y algunos microorganismos resultan más afectados cuando se encuentran en un alimento con un contenido elevado de agua.

La radiosensibilidad inherente de un microorganismo está caracterizada por la dosis necesaria para destruir el 90 % de la población inicial (valor D). En la **Tabla 5** se

muestra que este parámetro puede tomar diferentes valores en función de las distintas condiciones ambientales.

Tabla 5. Radiosensibilidad de diferentes bacterias en determinadas condiciones ambientales

Bacteria	Medio	T _{tratamiento} , °C	D, kGy
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carne de vacuno	2	0.15
<i>Bacillus cereus</i>	Agar nutritivo	Ambiente	3.20
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Solución tampón	0	1.00
<i>Clostridium botulinum</i> A	Solución tampón	Ambiente	3.30
<i>Clostridium botulinum</i> B	Carne de vacuno	Ambiente	1.40
<i>Clostridium perfringens</i> C	Agua	Ambiente	2.10
<i>Clostridium perfringens</i> E	Agua	Ambiente	1.20
<i>Escherichia coli</i>	Carne de vacuno	Ambiente	0.43
<i>Lactobacillus</i> sp.	Carne de vacuno	Ambiente	0.88
<i>Proteus vulgaris</i>	Pescado	5	0.20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Carne de vacuno	Ambiente	0.12
<i>Salmonella enteritidis</i>	Carne de vacuno	Ambiente	0.70
<i>Salmonella oranienburg</i>	Huevo	0	0.32
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Carne de vacuno	Ambiente	0.55
<i>Shigella dysenteriae</i>	Gamba	-10	0.22
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carne de vacuno	Ambiente	0.58
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Pescado	Ambiente	0.04

D, dosis de irradiación; T_{tratamiento}, temperatura del tratamiento

De forma genérica, se puede decir que las bacterias esporuladas son mucho más radiorresistentes que las formas vegetativas. Entre las bacterias Gram negativas, los géneros *Aeromonas*, *Proteus*, *Serratia* y *Vibrio* son muy radiosensibles; *Echerichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* lo son algo menos, siendo los géneros *Acinetobacter* y *Moraxella* los más radiorresistentes de este grupo.

Las bacterias Gram positivas presentan una radiosensibilidad muy variable. Dentro de este grupo se encuentran microorganismos con elevada radiorresistencia como *Streptococcus faecium*, *Clostridium botulinum* y *Micrococcus radiodurans*, siendo este

último el más radiorresistente de las bacterias vegetativas, soportando incluso dosis que destruyen las formas esporuladas.

La flora alterante (en la que son frecuentes las bacterias Gram negativas) se reduce de forma considerable con dosis comprendidas entre 1 y 3 kGy. Los hongos presentan una radiorresistencia similar a las formas vegetativas bacterianas, mientras que las levaduras son más radiorresistentes. Los virus son los microorganismos con mayor radiorresistencia. Sin embargo, dada la mayor complejidad de su material genético, todos los insectos y parásitos que puedan contener los alimentos son muy radiosensibles; por ello, en muchos países se utiliza este tratamiento para la destrucción de agentes como *Trichinella spiralis*.

2.3.5.3. Calidad nutricional y características organolépticas de los alimentos

El efecto de una determinada dosis de irradiación es mucho mayor cuando se aplica sobre compuestos aislados que cuando éstos se encuentran asociados a una matriz compleja y altamente protectora de un alimento (Nanke, et al. 1998). La densidad y viscosidad del medio condicionan el grado de migración de los radicales libres y la posibilidad de reacción con otros compuestos. En un medio fluido, y cuanto mayor es el contenido acuoso, el efecto de la radiación se generaliza con mayor facilidad. La presencia de oxígeno y elevadas T acentúan el efecto de la irradiación. La disminución de T es un excelente procedimiento para disminuir la formación de productos radiolíticos. Todos aquellos factores que pueden modificar la velocidad de las reacciones químicas del efecto secundario, como el pH o la adición de distintos aditivos, tienen que ser considerados. En este contexto, la presencia de protectores de radicales

libres amortigua el efecto de la irradiación, mientras que la existencia de metales y sales (sensibilizantes) potencian el grado de alteración. Por otra parte, la naturaleza del envase o del contenedor es otro aspecto a considerar, puesto que puede modificar la dosis de irradiación aplicada al alimento.

Una buena práctica de irradiación debe compatibilizar su capacidad de prolongar la vida útil de los alimentos con el mínimo efecto de los componentes del mismo (radiolisis) para evitar pérdidas en el valor nutritivo y en la calidad organoléptica de los alimentos. Para asegurar la inocuidad de los alimentos irradiados se han realizados numerosas investigaciones en las que han participado un gran número de países. En estos trabajos se ha estudiado el efecto de dietas irradiadas, a distintas dosis, en animales a lo largo de varias generaciones. A raíz de los resultados obtenidos en estas experiencias, el Comité Mixto de Expertos FAO/OIEA/OMS y la Comisión del Codex Alimentarius consideraron que los tratamientos con dosis iguales o inferiores a 10 kGy no representaban ningún peligro para la salud humana, asegurando la inocuidad de los alimentos así tratados. A estas dosis, los efectos de radiolisis en el alimento son mínimos. Se estima que la cantidad de sustancias de nueva formación que pueden aparecer en un kg de alimento con una composición modelo (80% humedad, 6.6% lípidos, 6.6% glúcidos y 6.6% proteínas), tratado con una dosis de irradiación de 10 kGy es inferior a 20 mg (FAO/OIEA/OMS, 1981).

Las modificaciones químicas inducidas por las radiaciones ionizantes alteran, en mayor o menor grado, la calidad organoléptica y nutritiva de los alimentos (Ahn et al., 2000). La magnitud de estos cambios inducidos por la radiación depende, principalmente, de la

dosis absorbida. Existe una dosis umbral por debajo de la cual los cambios no son detectables, mientras que dosis elevadas de irradiación causan modificaciones en el sabor, color y textura que pueden hacer al alimento inaceptable. Estas alteraciones, sin embargo, pueden minimizarse irradiando el alimento a vacío o en atmósferas modificadas, en estado congelado o en presencia de antioxidantes; es decir, siempre que se reduzca el efecto secundario de la irradiación.

Una de las alteraciones organolépticas más características es la aparición de un olor y/o sabor típico a *radiación* (Cabeza et al., 2007; Kwon et al., 2008; Brewer, 2009). Este hecho se debe, fundamentalmente, al efecto de la radiolisis en lípidos y proteínas. En los primeros, se potencia la formación de peróxidos e hidroperóxidos con la consiguiente producción de aldehídos y cetonas volátiles que modifican el aroma. En cuanto a las proteínas, una de las causas del mal olor deriva de la posible liberación de sulfuro de hidrógeno. Por estos efectos, la irradiación no es conveniente, incluso a dosis bajas para el pescado graso y únicamente serían adecuados tratamientos muy suaves para leche y productos derivados. En el caso de muestras de carne, de acuerdo con Ahn et al. (2001), las condiciones de empaquetamiento ejercen más influencia que la irradiación para inducir a la oxidación de lípidos; en muestras de carne con empaquetamiento aeróbico e irradiadas, el efecto de la rancidez oxidativa (TBARS) fue mayor en carne de cerdo que en la de vacuno, posiblemente por el mayor contenido en grasa de la primera. Este regusto es más pronunciado inmediatamente después de la irradiación y decrece o incluso desaparece durante el almacenamiento o después de cocinar el producto. El color también puede verse afectado (Nanke et al., 1998; Nam y Ahn, 2003; Cabeza et al., 2007). Así, en carnes irradiadas con dosis superiores a 1.5 kGy presentan un cierto

oscurecimiento. Por otra parte, puede intensificar el pardeamiento enzimático como consecuencia de la liberación de enzimas de orgánulos celulares debido a la alteración de sus membranas, lo que facilita que los sustratos fenólicos se pongan en contacto con las polifenoloxidasas.

Al igual que otras modificaciones producidas por la irradiación, la pérdida de nutrientes depende principalmente de la dosis absorbida y de las condiciones en las que se realice el tratamiento. Las investigaciones realizadas hasta la actualidad indican que el valor nutritivo derivado del aporte de macronutrientes no se modifica significativamente en los alimentos irradiados con las dosis recomendadas; así, diversos trabajos afirman que el valor nutritivo de las proteínas en los alimentos irradiados es similar al que tienen cuando reciben un tratamiento térmico equivalente.

La irradiación con haz de electrones aumenta significativamente la oxidación de los ácidos docosahexanoico (tipo omega 3), araquidónico, linolénico, y el colesterol de la yema de huevo en polvo. El contenido de ácido araquidónico se reduce de 4.58% a 3.07%, y el total de COPs aumenta de 11 a 467 $\mu\text{g/g}$ después de la irradiación a 5.0 kGy. También se produce la oxidación durante el almacenamiento pero se reduce significativamente cuando los alimentos se envasan a vacío; el uso de antioxidantes no tiene efecto sobre los ácidos grasos y la oxidación del colesterol durante la irradiación y almacenamiento. La irradiación genera cambio de color en el polvo de yema de huevo; este fenómeno también se presenta durante el almacenamiento; el envasado al vacío y el uso de antioxidantes reducen significativamente los cambios de color (Du y Ahn, 2000, Ahn et al., 2001).

Los datos existentes sobre el efecto de irradiación en micronutrientes son diversos. La vitamina D, riboflavina y niacina son bastante radiorresistentes; sin embargo, las vitaminas A, B₁, E y K son mucho más radiosensibles. Para mitigar estas pérdidas, cuando se utilizan dosis cercanas a los 10 kGy, es necesario tomar medidas como puede ser tratar el producto a baja T y envasado al vacío.

2.3.6. Aplicación en la Industria Alimentaria

El tratamiento mediante irradiación, ya sea sólo o combinado con otros tratamientos, ofrece ciertas ventajas en comparación con los métodos clásicos, entre los que puede destacarse la posibilidad de tratar los alimentos después de envasados y la de conservarlos en estado fresco durante periodos relativamente largos. Este tratamiento requiere, sin embargo, mayores medidas de control y seguridad.

La irradiación de alimentos incrementa sólo ligeramente su T, por lo tanto puede utilizarse para destruir microorganismos en alimentos congelados sin que éstos cambien de estado. Además, la mayoría de los materiales utilizados en el envasado de los alimentos, incluso aquellos que no resisten los tratamientos térmicos, tienen un comportamiento adecuado frente a las radiaciones ionizantes en las condiciones de utilización de la Industria Alimentaria.

Inicialmente, los tratamientos con radiaciones ionizantes se clasificaron comparándolos con los tratamientos térmicos tradicionales, teniendo en cuenta la dosis de irradiación aplicada. De esta forma se definieron los siguientes términos (Narvaiz, 2000).

- a) *Radapertización*, cuando las dosis aplicadas son suficientes para reducir el número y/o actividad de los microorganismos hasta conseguir la esterilidad comercial. Se requieren dosis entre 10 y 50 kGy.

- b) *Radacidación*, cuando las dosis son suficientes para eliminar los microorganismos patógenos no esporulados. Se aplican dosis comprendidas entre 0.1 y 8 kGy.

- c) *Radurización*, consiste en aplicar dosis de radiación ionizante que no alteran el producto y reducen sensiblemente la carga microbiana alterante con el fin de aumentar la vida útil del alimento. Las dosis necesarias están comprendidas entre 0.4 y 10 kGy.

En la actualidad, se prefiere realizar una clasificación de acuerdo con la dosis empleada como se indica en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Clasificación de tratamientos con radiaciones ionizantes

PROPÓSITO	DOSIS, kGy	PRODUCTOS
	REDUCIDA, < 1kGy	
Inhibir germinación	0.05-0.15	Patatas, cebollas, ajos, etc.
Eliminar insectos y parásitos	0.15-0.50	Cereales, legumbres, frutas frescas y secas, pescado y carne
Retrasar procesos fisiológicos (maduración)	0.50-1.0	Frutas y hortalizas frescas
	MEDIA, 1-10 kGy	
Prolongar el tiempo de conservación	1.0-3.0	Pescado fresco, fresas, etc.
Eliminar microorganismos alternantes	1.0-7.0	Marisco fresco y congelado, carne de aves y de animales de abasto cruda o congelada
Mejorar propiedades tecnológicas del alimento	2.0-7.0	Uvas (aumenta la producción de zumo), verduras deshidratadas (disminuye tiempo de cocción)
	ELEVADA, 10-50 kGy	
Esterilización industrial (combinada con calor suave)	30-50	Carne, aves, mariscos, alimentos preparados, dietas hospitalarias estériles
Descontaminar ciertos aditivos alimentarios e ingredientes	10-50	Especias, preparaciones enzimáticas, goma natural

La radapertización, al igual que la aplicación de dosis altas son tratamientos no avalados por las recomendaciones del Comité Mixto de Expertos FAO/OIEA/OMS y la comisión del Codex Alimentarius.

La irradiación permite inactivar ciertos organismos parásitos patógenos tanto para el hombre como para los animales. El nematodo *Trichinella spiralis* se destruye con una

dosis mínima de 0.15 kGy. En la **Figura 18** se puede observar la morfología de este parásito que puede producir importantes afecciones gastrointestinales y que se encuentra presente en la carne de cerdo.

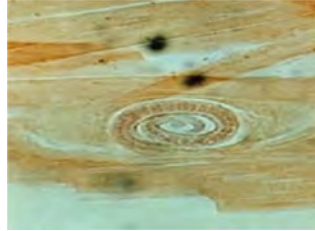


Figura 18. Parásito *Trichinella spiralis*

Otros parásitos, como las tenias del ganado vacuno y del cerdo, el protozoo del cerdo que causa la toxoplasmosis y diversos nematodos que infectan al pescado se eliminan con dosis inferiores a 1 kGy (Zhu, 2005).

Los tratamientos con dosis medias (comprendidas entre 1 y 10 kGy) permiten prolongar considerablemente el tiempo de conservación de diversas frutas, carne, pescado y marisco y mejorar su calidad higiénica. La combinación con otros sistemas de conservación (envasado al vacío, tratamientos térmicos) permite conseguir mejores resultados con dosis inferiores de irradiación. Tratamientos entre 2 y 7 kGy se han utilizado para reducir la tasa de bacterias patógenas no esporuladas (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Yersina*) en carnes de mamíferos, aves, pescado, gambas, ancas de rana, etc; estos productos suelen irradiarse congelados para minimizar las modificaciones organolépticas (Rossi et al., 2009).

2.4. Preparación de muestra para el análisis de COPs mediante técnicas cromatográficas

Desde el año 1956 existen referencias sobre el desarrollo de metodologías para llevar a cabo el análisis de COPs; sin embargo, en el momento de implementar, validar y estandarizar metodologías se ha observado que las etapas críticas para el buen desempeño de los análisis de COPs tienen lugar durante la preparación de muestras (extracción y limpieza), la técnica de separación y, en el caso de usar GC, la etapa de derivatización.

2.4.1. Extracción de la fracción lipídica

2.4.1.1. Lixiviación

Consiste en hacer interaccionar directamente el disolvente con la muestra debidamente homogeneizada, a T ambiente. Teniendo en cuenta que los COPs son sensibles a los cambios de T, generalmente el contacto entre la muestra y el disolvente se mantiene durante tiempos elevados (de 12 a 24 horas).

Se pueden emplear disolventes o mezclas de disolventes siendo el factor más importante a considerar la cantidad de COPs recuperada. Esta etapa preparativa es muy importante debido a su posible contribución a la formación de artefactos, recuperación de óxidos de colesterol, resolución de picos en su determinación cromatográfica, detección, identificación y cuantificación (Ulberth et al., 1998; Penzzi, et al., 1995).

La elección del disolvente juega un papel importante ya que éste debe ser capaz de romper las fuerzas de interacción del colesterol y de los lípidos con la materia no

lipídica en las matrices biológicas. Los sistemas más empleados para la extracción de la fracción lipídica que contiene los productos de oxidación del colesterol son los siguientes:

- Métodos que implican una etapa preliminar de extracción de materia grasa y posterior saponificación.

- a. $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1, V/V); Folch et al., 1957
- b. Hex/ 2-propanol (3:2, V/V); Hara y Radin, 1978
- c. Diclorometano/MeOH (9:1, V/V); Menéndez-Carreño et al., 2008
- d. Método de columna seca; Zubillaga y Maerker, 1991; Hygely et al., 1986

- Métodos de tratamiento directo de la muestra.

- e. Saponificación o transesterificación directa (Dionisi et al., 1998).

Aparte de estos métodos, existen otras posibilidades como el empleo de un único disolvente como el CHCl_3 y extracción en Soxhlet empleando disolventes como MTBE y DCM.

2.4.1.2. Extracción acelerada con disolventes, ASE

Se trata de un sistema de extracción automatizada a presión (P) elevada. Este sistema permite programar: T, P, volumen de disolvente y número de ciclos con que se realiza la extracción de los analitos. Previamente a la extracción se requiere una elevada homogeneización de las muestras sólidas, usando un agente dispersante inerte como es la tierra de diatomeas lo cual permite un contacto muy eficiente en el proceso de extracción entre el disolvente y la muestra; la celda donde se realiza la extracción es un sistema cerrado. Por otro lado el equipo permite mezclar automáticamente varios disolventes; todas estas características son las que permiten realizar extracciones en un

tiempo relativamente corto, hasta 1 h, con elevadas recuperaciones y minimización de los riesgos de contaminar las muestras (Lai et al., 1995; Chang y Liu, 1998).

Esta técnica es frecuentemente empleada para la determinación de lípidos (Spiric et al. 1998); sin embargo sólo ha sido referida para la extracción de COPs en muestras más sencillas como es la de polvo de huevo (Boselli et al., 2001); estos autores seleccionaron 60 °C y 15 MPa para limitar la generación de artefactos, excluyendo el uso de disolventes clorados.

2.4.1.3. Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (SF), sustancia que se encuentra en condiciones de P y T superiores a su punto crítico, presenta propiedades que permiten disolver otros compuestos debido a su elevado poder de penetración por la baja tensión superficial del fluido. El sistema de extracción con fluidos supercríticos (SFE) permite que el fluido interactúe con la muestra; posteriormente, el cambio de las condiciones de P y T ambientales, permiten su evaporación, obteniendo el extracto limpio. Se ha utilizado dióxido de carbono supercrítico para la extracción mediante SFE de oxisteroles en matrices vegetales, posterior saponificación con KOH a reflujo en medio etanólico y extracción con éter de petróleo (Et.P). Los límites de cuantificación (LC) se obtuvieron en el intervalo de concentración 0.007-0.367 µg/L; se utilizó como estándar interno 6-ceto. La precisión de la determinación intra-día e inter-día para los 10 oxisteroles estudiados fue menor de 6% y su recuperación entre 94 y 107%. Este método fue aplicado con éxito para la determinación de los oxisteroles alimenticios de origen vegetal, incluyendo maíz, sésamo, avena y cacahuate (Lu et al., 2007).

2.4.2. Purificación y enriquecimiento

2.4.2.1. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (Solid Phase Extration, SPE) es una técnica de preparación y tratamiento de muestras que está basada en la retención selectiva de los analitos en cartuchos y su posterior elución. Se realiza previamente a la determinación analítica de los mismos. Se puede aplicar a cualquier matriz analítica siempre y cuando se encuentre en medio líquido, siendo sus objetivos fundamentales los siguientes:

- *Enriquecimiento de trazas* (concentración o preconcentración).
- *Limpieza de muestras*
- *Fraccionamiento de la muestra* en diferentes grupos de compuestos, separando cada fracción con un eluyente distinto.
- *Retención /almacenamiento de analitos* inestables en medio líquido o que tienen volatilidad elevada.
- Se pueden llevar a cabo reacciones de *derivatización* entre grupos reactivos del analito y los grupos de la superficie del adsorbente.

La técnica de SPE implica un proceso físico en el que están implicadas una fase sólida con frecuencia químicamente modificada, y una fase líquida. La fase sólida tiene mayor afinidad por los analitos que el disolvente en el que se encuentran disueltos; la muestra disuelta pasa a través del lecho adsorbente, los analitos se concentran en su superficie, mientras que los otros componentes de la matriz no retenidos pasan a su través.

En algunos trabajos se han comparado diferentes métodos para analizar COPs en matrices de tipo y origen biológico, los cuales incluyen generalmente cambios en la

forma de preparar las muestras ya que en esta etapa se incrementan los errores de los métodos. Así, Ulberth y Rössler (1998), compararon diferentes sistemas SPE combinando fases estacionarias (NH_2 , Silica y C_{18}), disolventes de lavado (AcOEt, Hex, Et_2O , DCM, 2-Propanol, MTBE, ACN, MTBE y agua) y disolventes de elución (Acetona y MeOH) para limpiar las muestras después de realizar la extracción lipídica; la mejor combinación que obtuvieron consistía en llevar a cabo dos limpiezas mediante SPE en serie, con cartuchos de silica y NH_2 usando como disolvente de lavado, mezclas de Hex- Et_2O y Hex-AcOEt y como disolvente de elución acetona en ambos casos.

Guardiola et al. (1995) evaluaron tres métodos para analizar COPs en huevos secos mediante SPE con cartuchos de silica utilizando cuatro sistemas de elución diferentes y, variando la polaridad de los disolventes; el sistema de elución que presentó las mejores características analíticas consistió en disolver los residuos de los extractos lipídicos en Hex, haciendo pasar este extracto por el cartucho de sílica acondicionado previamente con Hex. Seguidamente el cartucho se lavó con 10, 25 y 15 mL de las mezclas de Hex: Et_2O (95:5), (90:10) y (80:20), respectivamente.

2.4.2.2. Saponificación

La saponificación se emplea para separar los triglicéridos, ácidos grasos libres e impurezas solubles durante la extracción de oxisteroles, convirtiendo estos productos en derivados solubles en agua, empleando disoluciones de KOH o NaOH. La extracción de oxisteroles se completa con la extracción con un disolvente orgánico adecuado tras añadir agua a la mezcla saponificada. La fracción no saponificada contiene los óxidos de colesterol. Se han empleado dos métodos de saponificación, en frío y en caliente; con

la saponificación en frío a 25 °C durante 18-22 h han obtenido buenas recuperaciones (Saldanha et al., 2006) y escasa formación de artefactos. La saponificación en caliente se realiza a 60 °C durante 45-60 minutos, reduciéndose considerablemente el tiempo de operación, pero con elevada formación de productos de degradación, en especial del 7-ceto y de los epóxidos isómeros (Angulo et al., 1997). Aparte de la desventaja de la posible formación de artefactos, la saponificación tiene algunas desventajas prácticas. Los triglicéridos saponificados forman una disolución jabonosa que impide la correcta separación de la emulsión formada; la formación de micelas da lugar a la pérdida de compuestos de interés (Cela et al., 2002).

Dionisi et al. (1998) ensayaron varios métodos para preparar muestras usando procedimientos de saponificación (directo, sin extracción previa; CHCl₃-MeOH; Hex-2-PrOH y DCM-MeOH), obteniendo por el método directo los mejores resultados (mejor repetibilidad, exactitud, LOD más bajos, menor consumo de disolventes y menor cantidad de artefactos formados).

2.4.2.3. Transesterificación

Durante la reacción de transesterificación los óxidos de colesterol esterificados y los triglicéridos pasan a formar ésteres metílicos de ácidos grasos. La mezcla obtenida se separa mediante SPE eluyendo con mezclas de polaridad creciente. Empleando este método no se ha observado formación de artefactos, aunque este método ha sido de poco interés para fines analíticos, puesto que requiere el uso de ácido cítrico y los COPs presentes en muestras de alimentos de origen animal son muy sensibles a los cambios

de pH; este método puede ser útil para analizar fitosteroles (óxidos de colesterol que se forman en matrices vegetales) (Johnsson y Dutta, 2006).

Ubhayasekera et al. (2004) compararon métodos de saponificación y transesterificación para analizar COPs en muestras de sebo; encontraron que las mejores características analíticas se obtuvieron cuando se disuelve el sebo en DCM, se realiza una saponificación con KOH en etanol y, seguidamente, se realiza una LLE con DCM: agua. Los lavados se llevaron a cabo con agua y KOH y por último, realizan una limpieza mediante SPE con cartuchos de amino propil.

2.4.3. Problemas asociados con la preparación de muestra

Teniendo en cuenta la problemática de los COPs a nivel químico, médico, biológico y sabiendo que aún no existe suficiente claridad sobre su formación, efectos sobre la salud, procesos bioquímicos y fisiológicos en los cuales participan estos compuestos, es necesario realizar estudios que permitan establecer las normas para controlar estos compuestos. Para alcanzar este objetivo es necesario realizar investigaciones para extraer, separar y cuantificar los COPs en matrices complejas como son las de tipo biológico con óptimas características analíticas.

Los análisis de COPs en matrices de tipo biológico especialmente en alimentos presentan grandes retos debido a los siguientes aspectos:

1. Las matrices son muy complejas.
2. Siempre que se encuentren COPs en una muestra va a existir colesterol, teniendo en cuenta que es su precursor; éste es un aspecto que exige una elevada

fiabilidad de los métodos para evitar que una porción del colesterol presente en las muestras se pueda transformar en COPs durante las etapas de preparación de muestra.

3. Los COPs son un grupo numeroso de compuestos y presentan algunas propiedades fisicoquímicas muy similares (peso molecular, estructura molecular, etc); este aspecto requiere que existan técnicas de separación lo suficientemente eficaces para separarlos de una forma adecuada.
4. Los COPs son susceptibles de interaccionar fuertemente con otros compuestos de la matriz, tales como ácidos grasos, compuestos ácido-base, agua y radicales libres.
5. En los procedimientos de preparación de muestras algunos COPs pueden transformarse en otros compuestos de esta misma familia como es el caso de 7-ceto a 7 β -OH y los epóxidos a triol.
6. Los COPs pueden formarse por efecto de la luz, calor, acción enzimática a partir del colesterol, aspectos que pueden afectar los procedimientos de análisis.
7. Los procedimientos de limpieza de muestras deben ser lo suficientemente selectivos para que permitan presentar de manera adecuada la muestra en el equipo de medida, puesto que los extractos grasos son muy densos para ser procesados por los equipos cromatográficos.
8. Se requiere evitar la complejidad de los métodos, teniendo en cuenta la naturaleza de las muestras.
9. Seleccionar de manera cuidadosa reactivos, fases estacionarias y condiciones usadas en el método, teniendo en cuenta la vulnerabilidad del colesterol y los COPs.

La mayoría de los métodos de análisis de COPs presentan las siguientes etapas críticas:

1. Extracción de los COPs: dependiendo de la muestra puede incluir procedimientos de maceración, filtración y lixiviación.
2. Limpieza de los extractos: generalmente se usan sistemas SPE, en ocasiones filtración; en esta etapa se usan agentes desecantes, rotavaporación o eliminación de disolventes con flujo de gases y calentamiento a baja T (40-60 °C).

Separación cromatográfica: es necesario indicar que cuando se usa como técnica GC es necesario emplear una etapa adicional de derivatización con agentes tales como, BTZ (3:2:3 BSA: TMCS: TMSI) o Tri-Sil (2:1:10 HMDS: TMCS: piridina).

La técnica de derivatización de COPs más común consiste en adicionar grupos trimetilsilanos (tms) para activar los hidrógenos sobre los grupos hidroxilos; los grupos ceto y epóxido no son sililados; ocasionalmente se ha observado la enolización de grupos ceto (Park et al., 1996). En el proceso de derivatización no se contempla la formación de artefactos incluso cuando se requiere calentamiento para favorecer la reacción; se dispone de información respecto a algunos derivados habiéndose demostrado la formación de bi- y tri-derivados del triol, así como mono y bi-derivados del 25-OH, dependiendo de las condiciones de derivatización (Brooks et al. 1973; Park et al., 1989; Guardiola et al., 1998; Shan et al., 2003; Guardiola et al., 2004).

2.5. Técnicas Cromatográficas para la determinación de COPs

De las técnicas cromatográficas empleadas, se van a comentar los aspectos específicos que se encuentran relacionados con la determinación de COPs.

2.5.1. Aspectos específicos en HPLC en relación con la determinación de COPs

En cuanto a los análisis de COPs en alimentos mediante HPLC, esta técnica tiene las ventajas de poder trabajar a T ambiente y requerir menos etapas en la preparación de muestra que GC (no requiere derivatización de los COPs); sin embargo, presenta las desventajas de su relativamente baja sensibilidad y menor eficacia que GC; por otra parte, el detector UV, que es el más usado, permite únicamente detectar los COPs sensibles a este tipo de radiación.

2.5.2. Aspectos específicos en GC en relación con la determinación de COPs

Esta técnica presenta las siguientes ventajas: usa una gran variedad de detectores universales como el FID que permite detectar todos los COPs y es altamente eficaz para llevar a cabo su separación; los sistemas de inyección “Split/splitless” permiten mejorar la calidad de los cromatogramas. Sin embargo, presenta la desventaja de que se requiere aplicar una reacción de derivatización de los COPs con reactivos agresivos como el Tri-Sil.

2.5.3. Métodos cromatográficos para la determinación de COPs

Se han desarrollado diferentes métodos haciendo uso de las técnicas HPLC y GC los cuales se presentan resumidos en las **Tablas 7 y 8**. La separación cromatográfica no es una de las etapas que más problemas presente para la determinación de estos compuestos.

Tabla 7. Métodos analíticos para determinar COPs en alimentos mediante HPLC

Referencia bibliográfica	Muestra	Sistema de extracción		Sistema de limpieza	Técnica de separación	Criterios analíticos	Ventajas	Desventajas
		Disolvente	Condiciones					
Mazalli et al. (2006)	Huevos	Et ₂ O / agua	Saponificación con KOH en MeOH	Saponificación con KOH en MeOH	HPLC-APCI-MS	-LOD 0.002 µg/g. -r ² > 0.979	<ul style="list-style-type: none"> • Interfase del MS a T Baja. • Sistema de detección genérico. • Evita exponer la muestra a luz aire y disolventes con peróxidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambia pH del sistema • t largo • No hay limpieza de muestra
Saldaña et al. 2006; Raith et al., 2005	Pescado	Hex/Et ₂ O	Saponificación con KOH en EtOH	Saponificación con KOH en MeOH	HPLC-UV HPLC-IR HPLC-APCI-MS	-R 97-104% -r ² > 0.996 -RL 0.5- 70 µg/mL -LOD 6-70 ng/mL	<ul style="list-style-type: none"> • Interfase MS a T Baja. • Sistema de detección genérico. • Evita exponer la muestra a luz aire y disolventes con peróxidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambia pH del sistema • Tratamiento de muestras largo • No hay limpieza de muestra
Lakritz y Jones, 1997	Estándares	-----	-----	-----	HPLC-ELSD con Silica:Alumina DCM/ACN/Agua Detector ELS	-LOD 75 µg -RL de 0.1-1.0 µg	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema a T_a • Buena sensibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • RL reducido • Requiere solutos menos volátiles que los disolventes
Fillion y Zee, 1991	Estándares	-----	-----	-----	HPLC- UV derivatizan con cloruro de 3,5-Dinitro benzolil	-r ² 0.980-0.999. -b 0.008 -2.095 -E _r < 0.76 %	<ul style="list-style-type: none"> • Buena sensibilidad • Detectan COPs y colesterol simultáneamente 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere derivatización
Lu et al., 2007	Alimento	Hex/ CO ₂ supercrítico	Agitación a T _a Saponificación con KOH en MeOH	SPE cartuchos silica eluyente AcOEt/Hex	UPLC-APCI-MS	-LOQ 0.0076 µg/L -RSD interdia 5 % RSD intradia 6% -R 94-107%	<ul style="list-style-type: none"> • Buena sensibilidad. • Método específico • Eficiente 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere equipamiento adicional. • Puede variar pH
Suvi et al., 2007	Estándares	-----	-----	-----	HPLC-MS espectrómetro trampa ión positivo a P _a	-b (1.36 -2.91) x 10 ¹⁰ -Interc. -2.266 x10 ⁷ - 1.429x10 ⁸ -E _r 2.498x10 ⁸ - 3.611x10 ⁸ -r ² 0.994-0.997	<ul style="list-style-type: none"> • T controlada • No requiere derivatización • Sistema de detección genérico • Sensible • Detección rápida 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere equipamiento sofisticado. • Requiere sistema de limpieza exhaustiva

Careri et al., 1998	Estándares	-----	-----	-----	LC-PB-MS	-RL 4-1000 ng -r ² 0,9953-0,9989 -LOD 2-3 ng	• Sensible • Informan sobre estructura molecular	• Requiere equipamiento sofisticado
Matsumaga et al., 2009	Sangre COPs en Hex LDL	Hex	Digestión a 22 °C durante 2 h	Centrifugación y filtración	Semi micro HPLC-ECD	-RL 12.5-250 pmoles -r>0,999 -RSD< 2.9 -R98%	• Simple • Especifico • Determinación simultánea de varios COPs • No requiere derivatización	• Respuesta lenta • Poco sensible
Daneshfar et al., 2009	-Yema de Huevo -Aceite de oliva -Leche	Agua:ACN	-Filtración agitación centrifugación	LPME	HPLC-UV	-LOD 0.01 µg/L -LOQ 0.03 µg/L -RL 0.03-10 µg/L -RSD intra e interdia 1.0-3.0%	• Rápido • Sensible • Consume pocos reactivos	• Detección limitada
Caboni et al., 1997	Huevo en polvo	CHCl ₃ :MeOH	Saponificación Lixiviación Centrifugación	LLE	HPLC-UV HPLC-ELS	-r ² 0,991-0,999 -LOD 1,2x10 ⁻⁷ 9,6x10 ⁻⁷	• Sensible • Rápido	• Detección limitada • Requiere derivatización

ACN acetónitrilo; MeOH metanol; Hex hexano; Et₂O éter etílico; CHCl₃ cloroformo; KOH hidróxido de potasio; °C grados centígrados; h horas; LLE extracción líquido-líquido SPE extracción en fase sólida; LPME microextracción líquido-líquido; LC-PB-MS Liquid Chromatography Particle Beam Mass Spectrometry; HPLC cromatografía líquida de alta eficacia; ELS detector Evaporative Light-Scattering; HPLC-APCI-MS cromatografía líquida de alta eficacia con detector de masas con ionización a Pa; UV detector ultravioleta visible; UPLC-APCI-MS cromatografía líquida a presión ultra rápida con detector de masas e ionización a Presión atmosférica; IR detector de infrarrojo; ECD detector de captura de electrón; b pendiente del calibrado; E_r error relativo; LOD límite de detección; LOQ límite de cuantificación; R recuperación; RL rango lineal; r; coeficiente de regresión; RSD desviación estándar relativa; LDL lipoproteínas de baja densidad; Pa presión atmosférica; Ta temperatura ambiente; t tiempo; COPs oxisteroles.

Tabla 8. Métodos analíticos para determinar COPs en alimentos mediante GC

Referencia bibliográfica	Muestra	Sistema de extracción		Sistema de limpieza	Técnica de separación	Criterios analíticos	Ventajas	Desventajas
		Disolvente	Condiciones					
Menéndez-Carreño et al., 2008	Suero	CHCl ₃ /MeOH	Agitación a T _a saponificación KOH en MeOH	SPE cartuchos sílica lavado mezclas Hex: Et ₂ O eluyente acetona/MeOH	GC-MS	-r ² 1.0 -RSD para F.R. <1.0 -LOD 5 ng/mL LOQ 10 ng/mL. -R 77.65 a 110.29% RSD 10%	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente. • Detección Versátil 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispendioso. • Cambia pH del sistema • Requiere derivatización
Jonson , 1996	Grasa de alimentos en Hex:DCM	-----	T _a	SPE con LC aminopropil transesterificación y saponificación	GC-MS	-R 87.5-95.0 % RSD 1.5-2.6 %	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente. • Detección Versátil 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispendioso. • Cambia pH del sistema • Requiere derivatización
Petron et al., 2003	Jamón Iberico	CHCl ₃ :MeOH	Lixiviación	SPE cartuchos Sílica y aminopropil Lavados Hex- Et ₂ O y Hex-AcOEt.	GC-MS	-----	<ul style="list-style-type: none"> • Buena sensibilidad. • Eficiente • Detección genérica 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispendioso • Muchas etapas
Lai et al., 1995	Huevo	CHCl ₃	Agitación con el homogeneizador ultraturax	SPE cartucho sílica lavado Hex: Et ₂ O	GC GC-MS	-R 86.8-84.2 % -RSD 2.2-5.2 %	<ul style="list-style-type: none"> • Buena sensibilidad. • Eficiente • Detección genérica 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispendioso • Muchas etapas
García Regueiro y Marachiello, 1997	Carne de Aves	CHCl ₃ :MeOH	Agitación con el homogeneizador ultraturax	SPE y CCF	GC CCF	-R 80-100 % RSD 3-7 % -RL 0.1-1 mg/L	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente • Detección genérica 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispendioso • Muchas etapas
Boselli et al., 2001	Alimentos con huevo	Hex2-PrOH	60 °C y 15 MPa	SPE cartucho amino propil	GC	-----	<ul style="list-style-type: none"> • Consume menos reactivos • t corto • Extracción automatizada • Reactivos poco tóxicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere equipo ASE
Careri et al., 1998	Carne	CHCl ₃ :MeOH (2/1 v/v)	Homogeneización con disolventes T _a Saponificación	SPE carucho sílica	GC	-R 59-74 % -RSD 3.2-15.1 %	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible • Separación eficiente 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambia el pH • Requiere Derivatización

MeOH metanol; Hex hexano; Et₂O éter etílico; CHCl₃ cloroformo; DCM diclorometano; AcOEt acetato de etilo; KOH hidróxido potásico °C grados centígrados; MPa megapascals; SPE extracción en fase sólida; GC cromatografía de gases; GC-MS cromatografía de masas; CCF cromatografía de capa fina; LOD límite de detección; LOQ límite de cuantificación; R recuperación; RL rango lineal; r, coeficiente de regresión; RSD desviación estándar relativa; T_a temperatura ambiente; t tiempo; ASE extracción acelerada con disolventes

2.6. Tratamiento quimiométrico de los datos

Como es sabido, la quimiometría es la disciplina química que desarrolla o aplica métodos matemáticos o métodos basados en formalismos lógicos para diseñar o seleccionar los procesos experimentales y extraer la mayor y más relevante información de datos químicos. Su uso es de gran importancia tanto para la optimización de los métodos analíticos como para el tratamiento de los datos obtenidos sobre diversos analitos en distintas muestras que hayan sido o no sometidas a diferentes tratamientos.

A continuación, se comenta brevemente el fundamento en los que se basan las principales técnicas quimiométricas utilizadas en esta memoria (Miller, 2002; Carlson, 2005; Otto, 2007)

- Análisis de la Varianza
- Diseño experimental
- Análisis de componentes principales

2.6.1. Análisis de la Varianza

El **análisis de la varianza** (ANOVA, **AN**alysis **Of** **V**ariance, según terminología inglesa) permite separar las diferentes fuentes de variación, la debida al error aleatorio de la medida de cualquier otra variación producida al cambiar el factor de control. ANOVA estudia la influencia de un determinado factor o grupo de factores (variables) sobre una variable respuesta (variable continua).

Las técnicas iniciales del análisis de varianza fueron desarrolladas por Fisher en 1920 y utiliza la distribución F de Fisher como parte del contraste de Hipótesis para llevar a cabo las pruebas de significación estadística.

La técnica ANOVA se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación; de esta manera se comprueba si una alteración del factor de control (método, distintas condiciones, analista y laboratorio) ocasiona diferencias significativas entre los valores medios obtenidos; es decir, se utiliza para “analizar medidas que dependen de varios tipos de efectos que operan simultáneamente con el doble fin de decidir cuáles de ellos son importantes y poderlos estimar”. ANOVA compara medias de diversos conjuntos de resultados, no sus varianzas; el nombre de esta técnica proviene del hecho de que utiliza la comparación de parámetros estadísticos, en forma de varianzas, para llegar a la conclusión de las medias en estudio.

Para utilizar ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse tres tipos de hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales:

1. Cada conjunto de datos debe ser independiente.
2. Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal.
3. Las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir de forma significativa.

A continuación, se indica el fundamento de la técnica ANOVA para el caso más sencillo, Anova de un factor que descompone la varianza total de los datos analizados en la contribución debida a los errores aleatorios obtenidos de las repeticiones y la varianza debida al factor controlado. En la **Tabla 9** se muestra la matriz de datos, donde h son los niveles del factor, n el número de experimentos, \bar{x}_i la media del nivel i del factor, y \bar{x} la media global.

Tabla 9. Matriz de ANOVA de un factor

Muestra 1	x_{11}	x_{12}	x_{1j}	x_{1n}	\bar{x}_1
Muestra 2	x_{21}	x_{22}	x_{2j}	x_{2n}	\bar{x}_2
.....
Muestra i	x_{i1}	x_{i2}	x_{ij}	x_{in}	\bar{x}_i
Muestra h	x_{h1}	x_{h2}	x_{hj}	x_{hn}	\bar{x}_h
Media global, \bar{x}							

El problema que se plantea es analizar si los distintos niveles del factor muestra influyen de igual forma en la respuesta. Para ello, se comparan los efectos que los distintos niveles del factor producen en la respuesta utilizando el estadístico F; se siguen los siguientes pasos.

- Se establecen las hipótesis estadísticas

Hipótesis nula, $H_0 : \mu_1 = \mu_2 \dots = \mu_h$

Hipótesis alternativa, $H_1 : \text{no todos los } \mu_i \text{ son iguales}$

- Se obtiene el estadístico F (cociente de varianzas), que seguirá una distribución de probabilidad F de Fisher-Snedecor con $h - 1$ y $h(n - 1)$ grados de libertad según la Ecuación 1

$$F_{cal} = \frac{s_{entre\ muestras}^2}{s_{residual}^2} = \frac{SS_{entre\ muestras}/(h-1)}{SS_{residual}/h(n-1)} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde s^2 representa la varianza y SS la suma de cuadrados

- El valor de F_{cal} se compara con el valor de $F_{Tabulado}$ para el nivel de significación fijado (generalmente 0.05); $F_{Tabulado}$ se busca en las tablas de distribución F de una o dos colas dependiendo del criterio del contraste de hipótesis elegido.

- Por último, se aceptará H_0 cuando $F_{cal} \leq F_{Tabulado[\alpha, (h-1, n-h)]}$ o $\alpha_{experimental} \geq 0.05$,

en este caso, las diferencias entre los distintos niveles del factor no son estadísticamente significativas, siendo errores aleatorios los producidos en los resultados al cambiar el nivel del factor de control.

Los programas estadísticos proporcionan la "Tabla de Análisis de varianza o de ANOVA", que adopta la siguiente forma (**Tabla 10**):

Tabla 10. Términos para calcular los resultados mediante ANOVA de un factor

Tabla ANOVA				
Fuente de variación	SS	v	s^2	F
Entre los niveles del factor	SS_F	$h-1$	$SS_F/(h-1)$	s_F^2/s_R^2
Dentro de un nivel del factor o residual	SS_R	$h*(n-1)$	$SS_R/h*(n-1)$	
Total	SS_T	$h*n-1$		

SS, suma de cuadrados; v, grados de libertad y s^2 , cuadrado medio o varianza

Para el análisis multifactor, el fundamento es el mismo, pero la información obtenida será más amplia, se conocerá la variación de cada factor en la respuesta. En el caso de que se obtuviera más de una respuesta por nivel de cada factor, se podría conocer si existe o no interacción entre los factores de control estudiados.

ANOVA también se utiliza para validar el ajuste de los modelos matemáticos establecidos, bien mediante el estadístico F, o bien mediante el coeficiente de determinación R^2 o el coeficiente de determinación ajustado R^2 , los cuales

proporcionan el porcentaje de ajuste entre las dos variables, dependiente e independiente, del modelo.

Cuando se valida mediante el test F, se plantean las hipótesis:

$$H_0 = \beta_0 = \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{123} = 0$$

$$H_1 = \text{al menos un } \beta_i \neq 0$$

Se determina la región crítica donde se rechaza la hipótesis nula H_0 , y se calcula el valor

$$\text{de } F_{\text{calculado}} = \left(\frac{s_{\text{regresión}}^2}{s_{\text{residual}}^2} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

comparándose con el valor de F_{Tabulado} para el nivel de significación α elegido y los grados de libertad correspondientes.

Si $F_{\text{cal}} > F_{\text{Tabulado}} (\alpha, p, n-p-1)$, se rechaza la hipótesis nula, lo que implica la validez del modelo obtenido; el ajuste será mejor cuanto más alto sea el valor de F_{cal} .

Los gráficos de medias permiten visualizar fácilmente si existen diferencias significativas entre los valores medios de los distintos niveles de cada factor; la **Figura 19** muestra un ejemplo en donde se observa que existen diferencias significativas entre los niveles 1, 2 y 3 del factor puesto que no se solapan los segmentos que representan al intervalo de confianza de los valores medios.

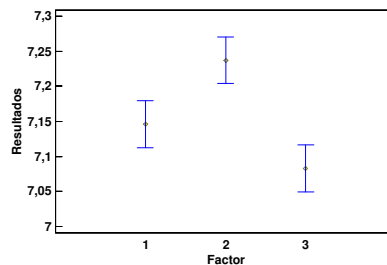


Figura 19. Gráfico de medias de Fisher

2.6.2. Diseño experimental

Antes de establecer y aplicar un método analítico se requiere un planteamiento global del problema, destacando entre las etapas del análisis, la de optimización experimental que puede afectar a diversos parámetros analíticos tales como sensibilidad, selectividad, concentración de reactivos, coste y tiempo de análisis.

La optimización se puede realizar de dos maneras diferentes, mediante un estudio univariante, donde cada factor experimental (variable) a optimizar se modifica sistemáticamente mientras los otros factores se mantienen constantes, o mediante un estudio multivariante que implica optimización simultánea de todos los factores a la vez. En este caso, entre las metodologías estadísticas posibles, los diseños factoriales introducidos por Ronald Fisher en 1920 (Spiegel et al., 2007) consisten en realizar una serie de experimentos definidos a priori, cuyas respuestas permiten evaluar la influencia de varios factores simultáneamente en el proceso de optimización, estudiando el efecto combinado de éstos en la respuesta experimental, ofreciendo un método simple, más eficiente y preciso que las metodogías univariantes, válido estadísticamente y que requiere menos esfuerzos para la optimización de los métodos analíticos; además, permite detectar, en contraposición a la técnica univariante, si existe cualquier interacción entre los factores.

En el proceso analítico, el número de variables que pueden afectar al resultado final suele ser elevado y a veces las variables no actúan independientemente, lo que sugiere que el estudio debe realizarse de forma que todas ellas se modifiquen simultáneamente para optimizar las condiciones del método de trabajo y, así, poder conocer las posibles interacciones entre variables (factores). Para una aplicación concreta será importante establecer los niveles de estos factores; el proceso de búsqueda de estos niveles óptimos

del factor se conoce como optimización. Desde el punto de vista químico-analítico la optimización se define como el proceso de búsqueda y localización del conjunto de los valores de las variables experimentales que producen el mejor resultado posible en un proceso de determinación.

El diseño factorial más simple es un diseño a dos niveles, el número de experimentos requeridos puede ser determinado por la expresión $N = 2^k$, donde N es el número de experimentos y k el número de factores a estudiar; se le conoce como diseño factorial completo 2^k ; por tanto, un diseño factorial a dos niveles para optimizar tres factores requerirá un total de 2^3 o 8 experimentos. Los diseños factoriales son a menudo representados en forma de matriz, conocida como la matriz del diseño. La **Tabla 11** muestra la matriz del diseño estándar para un diseño factorial a dos niveles para 3 factores. En la matriz, los niveles son representados con la notación estándar de -1 ó (-) y +1 ó (+); por lo general, el nivel -1 representa el nivel más bajo del factor mientras que +1 representa el nivel más alto.

Tabla 11. Matriz de experiencias para un diseño factorial 2^3

EXPERIMENTO	FACTOR			RESPUESTA
	Nº	X1	X2	X3
1	-	-	-	Y_1
2	+	-	-	Y_2
3	-	+	-	Y_3
4	+	+	-	Y_4
5	-	-	+	Y_5
6	+	-	+	Y_6
7	-	+	+	Y_7
8	+	+	+	Y_8

La matriz del diseño proporciona una guía para que el analista identifique las condiciones para cada experimento; se tiene que realizar la serie experimentos con los factores y niveles según especifica la matriz del diseño y es importante que los experimentos se lleven a cabo aleatoriamente para eliminar cualquier sesgo experimental; de esta forma, se determina la influencia de la variación de cada factor en la respuesta.

Una vez realizados los experimentos y anotados en la matriz las respuestas obtenidas se lleva a cabo el análisis del diseño, generalmente con ayuda de software estadísticos. Este tipo de diseños se utiliza cuando el número de factores es pequeño ya que el número de experimentos se incrementa drásticamente al aumentar k; en estos casos, se aplica un diseño factorial fraccionado, 2^{k-p} , cuyo número de experimentos se reduce por un número p; este diseño solamente informa acerca de qué factores presentan mayor influencia sobre la respuesta. Estos diseños de base 2 se conocen como diseños de “screening” y el modelo de dependencia de la respuesta sobre los dos niveles del factor se puede describir mediante un polinomio de orden uno, Ecuación 3.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{1 \leq i < j}^k b_{ij} x_i x_j + e \quad \text{Ecuación 3}$$

A modo de ejemplo se representan en un grafico un diseño factorial completo 2^3 y un diseño factorial fraccionado 2^{3-1} ; cada eje representa a un factor y los vértices del cubo son las condiciones de los experimentos a realizar (**Figura 20**).

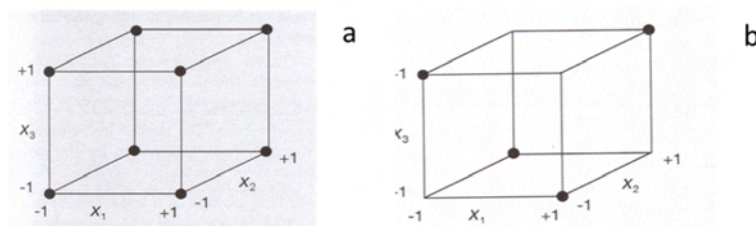


Figura 20. Representación gráfica de diseños de screening. a- 2^3 y b- 2^{3-1}

Para conocer las condiciones óptimas de los factores con los mejores resultados se utilizan diseños de superficie de respuesta como son los diseños 3^k de tres niveles, cuyos modelos matemáticos pueden describir superficies de respuesta que se deben curvar alrededor del óptimo. Estas últimas pueden ser modeladas si los niveles del factor se han investigado al menos a tres niveles, generalmente conocidos como -1, 0 y +1; son diseños que proporcionan mayor información en la respuesta.

Existen otros modelos más complejos, entre ellos los diseños compuestos centrados o de estrella, los cuales se forman por combinación de diseños factoriales completos o fraccionados y un diseño adicional en los que los centros de ambos diseños coinciden.

En la **Figura 21** se representa el diseño a tres niveles más sencillo 3^2 y un diseño compuesto centrado con tres factores

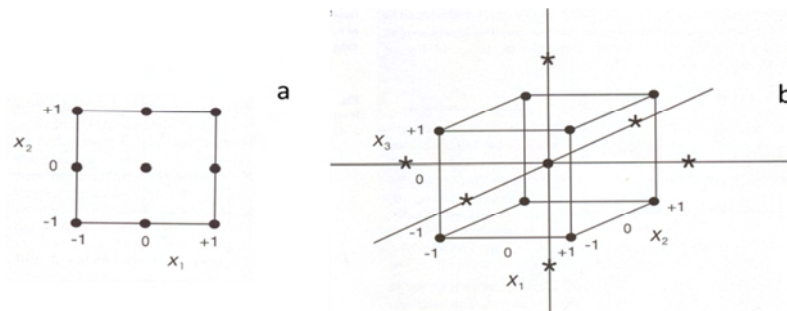


Figura 21. Representación gráfica de diseños de superficie de respuesta. a- 3^2 y b- diseño de estrella

En general, los modelos empíricos de superficie de respuesta son polinomios de orden dos, donde la respuesta (y) se relaciona con los factores (x) mediante la Ecuación 4

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_{ii}^2 + e \quad \text{Ecuación 4}$$

donde k es el número de factores, b_0 el parámetro del intercepto y b_i , b_{ij} , b_{ii} los parámetros de los efectos para la regresión lineal, interacción y factor cuadrático, respectivamente y e es el término del error. La estimación de los parámetros empíricos se realiza mediante mínimos cuadrados. Las pequeñas desviaciones de los niveles de los factores, -1, 0 y +1, no alteran significativamente las propiedades estadísticas del diseño.

En el caso de la preparación de la muestra (como es el de las determinaciones mediante GC presentadas en esta memoria) existen diferentes variables que afectan al análisis como son $t_{\text{reacción}}$, $V_{\text{extractante}}$, $t_{\text{agitación}}$, $V_{\text{reactivo derivatizante}}$, T , tipo de agitación y naturaleza del disolvente; de ahí que las herramientas quimiométricas de este tipo de optimización experimental sean de gran utilidad para diseñar un método de preparación de muestra del cual se obtenga la máxima información con el menor número de experimentos.

En el diseño factorial se deberán seguir los siguientes pasos:

- Definir los factores y su dominio experimental (límites de variación).
- Definir el diseño factorial.
- Seleccionar el criterio adecuado de optimización.
- Establecer condiciones óptimas para la determinación y el modelo matemático.

Utilizando los diseños factoriales, con un número de experimentos relativamente pequeño, se puede evaluar el efecto de cada factor y de sus interacciones en la respuesta, permitiendo establecer un método óptimo de preparación de muestra.

A continuación, se indica el fundamento para los diseños más usados (modelos de primer grado). En particular, para las variables cuantitativas los efectos principales e

interacciones se pueden asociar con los términos de un desarrollo en serie de Taylor de la función respuesta. A menudo, las interacciones de orden superior resultan insignificantes y puede prescindirse de ellas.

En el análisis de resultados se distinguen dos etapas sucesivas.

- Cálculo de los efectos o coeficientes β_i de la ecuación 5.

El objetivo consiste en la determinación de unos estimadores β_i de los coeficientes que multiplican al valor de cada factor y a cada interacción.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{k-1 k} x_{k-1} x_k + \beta_{123 \dots k} x_1 x_2 \dots x_k \quad \text{Ecuación 5}$$

siendo k , el número de factores y $k + 1$, el número de coeficientes del modelo

- Interpretación de los valores obtenidos.

Se relacionan sus valores con el error experimental asociado para definir su significado estadístico, y por tanto llegar a una ecuación simplificada que explique el modelo.

Si en un proceso intervienen 3 factores X_1 , X_2 y X_3 , los cuales toman dos niveles inferior (-) y superior (+), realizando 2^3 combinaciones de estos niveles se obtiene la matriz de experiencias que describe de forma codificada el conjunto de experiencias; esta matriz contiene N filas correspondientes a N experiencias ($N= 2^3$) y 3 columnas correspondientes a los 3 factores como se presenta en la Tabla 11, donde también muestra la respuesta obtenida en cada experiencia.

Los efectos tanto de los factores como de las interacciones son obtenidos, de forma sencilla, teniendo en cuenta los valores de las respuestas y la matriz del modelo

codificada, Tabla 11. Así, para un diseño 2^3 , la matriz estaría formada por una columna con signos positivos, tres columnas de los factores, tres de interacción de dos factores y una columna de interacción de tres factores obtenidas multiplicando algebraicamente los signos de las columnas de los factores entre los que se da la interacción, **Tabla 12**. Los efectos se calculan de forma sencilla, así para el efecto principal X_1 y de interacción $X_1 * X_2$ se realizan mediante las Ecuaciones 6 y 7, respectivamente.

$$\beta_1 = \left(\frac{Y_2 + Y_4 + Y_6 + Y_8}{4} \right) - \left(\frac{Y_1 + Y_3 + Y_5 + Y_7}{4} \right) \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\beta_{12} = \left(\frac{Y_{21} + Y_4 + Y_5 + Y_8}{4} \right) - \left(\frac{Y_2 + Y_3 + Y_6 + Y_7}{4} \right) \quad \text{Ecuación 7}$$

Tabla 12. Matriz del modelo codificada para un diseño factorial 2^3

Experimento Nº	Media I	Factor			Interacción			
		X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$
1	+	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	+	-	-	-
5	+	-	-	+	+	-	-	+
6	+	+	-	+	-	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+

La matriz del diseño ha de ser ortogonal, lo que implica que todas las columnas son diferentes, condición imprescindible del modelo.

El modelo matemático que ajusta la respuesta a los factores x_i mediante los coeficientes β_i viene dado por la expresión matricial (*Ecuación 8*)

$$Y = X\beta + \varepsilon \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde X es la matriz de experiencias, Y la matriz de las respuestas y ε la matriz del error; su expresión en forma polinómica viene dada por la Ecuación 9

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{123}x_1x_2x_3 + \varepsilon$$

Ecuación 9

Los efectos son computados con la respuesta experimental obtenida, Y_i , y el signo que le corresponde en la columna. Cuando ese valor es grande, quiere decir que ese efecto tiene un peso determinante en la función a optimizar y se dice por lo tanto que esa variable o factor es un **factor principal**. Cuando una interacción es grande los correspondientes factores principales tienen poco significado práctico. Es más útil conocer la interacción $X_i * X_j$ que el factor principal. Una interacción significativa oculta, a menudo, el significado de los efectos principales.

La estimación de los β_i se realiza mediante ajuste por mínimos cuadrados obteniendo los valores de los coeficientes del modelo matemático, b_i , mediante la Ecuación 10

$$b = (X^T X)^{-1} X^T Y \quad \text{Ecuación 10}$$

El término $(X^T X)$ proporciona toda la información del modelo matemático y su inversa $(X^T X)^{-1}$ está relacionada con la varianza. La ecuación polinómica viene dada por la Ecuación 11, siendo “e” el término del error.

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + e$$

Ecuación 11

Se utiliza ANOVA para determinar el tamaño del efecto para cada uno de los factores, así como para identificar los factores que tienen efecto estadístico significativo sobre la respuesta; un factor o una interacción será significativa si la F calculada es mayor que la

F_{Tabulada} o el valor de $\alpha < 0.05$. Sin embargo, para la determinación de los niveles óptimos para cada factor, las herramientas más útiles son los gráficos de los datos, tales como los gráficos de efectos principales y los gráficos de interacción.

La **Figura 22 a y b** presenta a modo de ejemplo los gráficos de efectos principales e interacciones para un diseño 2^3 donde se muestra la variación en la respuesta en función de los niveles inferior y superior de cada factor.

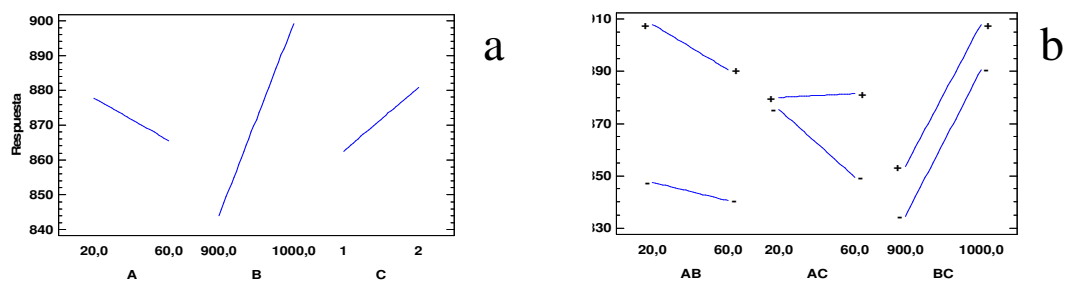


Figura 22. Gráfico de los efectos. a- Efectos principales y b- Efectos de interacción

Se observa si esta influencia es positiva o negativa y la magnitud del efecto según el sentido y el valor de la pendiente; así el factor B es el que presenta mayor efecto (**Figura 22 a**). Por otra parte, existirá efecto de interacción si las líneas representadas para dos factores en dicho gráfico se interceptan; en el caso de la **Figura 22 b**, los efectos de interacción no son significativos.

Otra forma de visualizar los efectos es mediante el gráfico de Pareto que presenta los valores de los efectos principales y de las interacciones en un diagrama de barras; determina cuáles son los factores e interacciones con un peso significativo para el diseño; los efectos del diseño son significativos si superan 2 veces la desviación estándar del diseño dada por la línea de corte a los efectos. En la **Figura 23** se presenta un diagrama de Pareto para tres factores, donde se observa que únicamente el factor B es significativo.

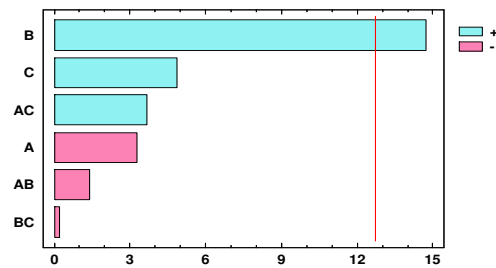


Figura 23. Grafico de Pareto para efectos estandarizados

Cuando existen varios analitos implicados en el análisis, y éstos pueden presentar distinto comportamiento respecto de las condiciones óptimas obtenidas individualmente en el diseño factorial, es útil realizar un diseño factorial de respuesta múltiple que tiene en cuenta cada una de las respuestas individuales obtenidas y maximiza la función de deseabilidad en el dominio experimental elegido, de esa forma, se obtienen las condiciones experimentales más adecuadas, y el modelo obtenido explicará con una cierta calidad el método analítico de determinación cuantitativa simultánea de los analitos, y cuyas condiciones óptimas vendrán reflejadas también en el gráfico de superficie de la función de deseabilidad. La **Figura 24** muestra a modo de ejemplo un gráfico de superficie de respuesta que además de permitir conocer las condiciones óptimas, permite conocer cómo de sensibles son dichas condiciones a variaciones en las variables experimentales, pudiendo hacer una interpretación visual entre las respuestas y las variables experimentales.

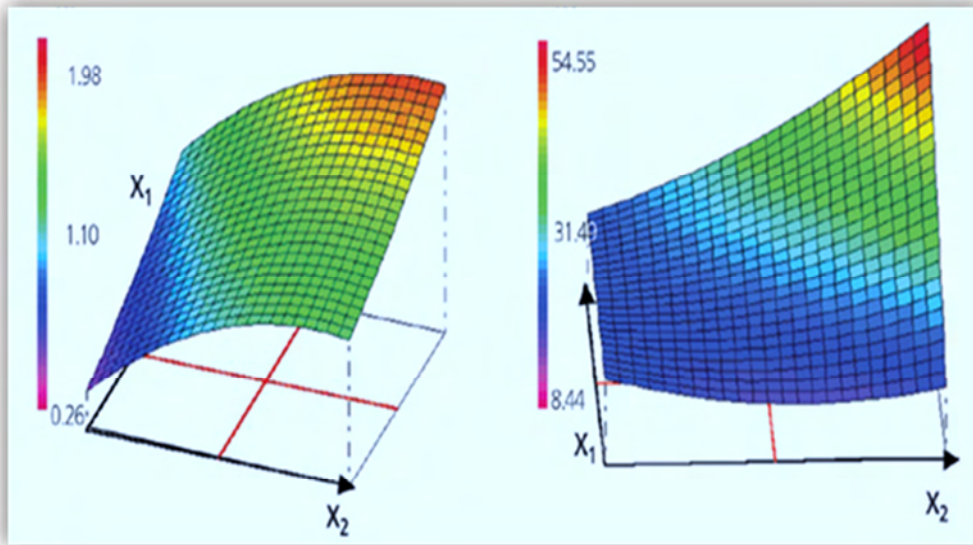


Figura 24. Representación grafica de una superficie de respuesta.

2.6.3. *Análisis de Componentes Principales*

El objetivo del análisis de componentes principales (PCA, del Inglés Principal Component Analysis) es transformar el espacio de representación P en un nuevo espacio P' , en el que los datos no estén correlacionados. Esta técnica fue introducida por Pearson en 1901 (Otto 2007) y trata de encontrar un nuevo conjunto de ejes ortogonales en el que la varianza de los datos sea máxima. Se basa en encontrar componentes principales PC_1, PC_2, \dots, PC_p que sean combinaciones lineales de las variables originales X_1, X_2, \dots, X_p ; esta técnica se utiliza para reducir cantidad de datos cuando existe correlación entre las variables originales.

Los componentes principales han de verificar dos propiedades:

- * Seguir la dirección de máxima variación
- * Ser ortogonales

La primera componente principal, PC_1 , se construye de manera que siga la dirección de la máxima variabilidad de los datos, es decir, “la máxima elongación de la nube de puntos determinada por las p variables ortogonales”.

La segunda componente PC_2 será la variable no correlacionada con la primera (PC_1), que explique el mayor porcentaje de varianza no explicada por la primera. De este modo, se construyen las sucesivas componentes principales no correlacionadas PC_3, \dots, PC_p , en n° igual al de variables originales (dimensión del espacio) y de varianza máxima. Puede considerarse que las últimas componentes no son informativas y se les considera ruido de fondo del problema estudiado

Para evitar que la nube de puntos esté distorsionada por posibles escalas de medida de las variables originales, éstas deben ser normalizadas. Así, la nube de puntos estará centrada en el origen y la varianza de cada variable es uno.

Existen distintas formas de elegir el número de componentes principales significativas; una opción es la retención de autovalores mayores que uno, opción por defecto de muchos paquetes estadísticos que trabajan con datos estandarizados. En la **Figura 25** se representa un gráfico de sedimentación de un problema con seis variables originales, en el que se muestra el autovalor de las seis componentes principales formadas, y que únicamente hay dos componentes principales significativas, es decir que expliquen el problema.

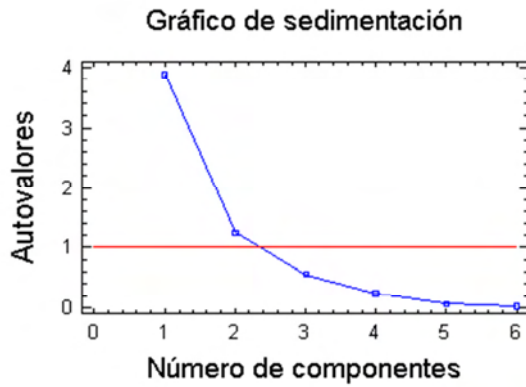


Figura 25. Ejemplo de un gráfico de sedimentación

Desde el punto de vista matemático, la relación entre los nuevos ejes y los antiguos en términos matriciales se indica, en general, como en la Ecuación 12

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \dots \\ Y_d \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varphi_{11} & \varphi_{12} & \dots & \varphi_{1d} \\ \varphi_{21} & \varphi_{22} & \dots & \varphi_{2d} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \varphi_{d1} & \varphi_{d2} & \dots & \varphi_{dd} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_d \end{bmatrix}$$

↓
↘
↘

variable dependiente coeficientes variable independiente **Ecuación 12**

El objetivo cuando se aplica la técnica de PCA es encontrar los coeficientes de transformaciones φ_{ij} con las siguientes restricciones:

- 1-Los ejes que definen P' son ortogonales.
- 2-Los datos en P' no están correlacionados.

A continuación, se describe el proceso de cálculo más sencillo para dos variables originales X_1 y X_2 que presentan una correlación positiva.

La relación entre los nuevos ejes y los antiguos se obtiene según la Ecuación 13:

$$Y = W^T X \quad \text{Ecuación 13}$$

siendo, Y las nuevas variables (componentes principales), X las variables originales y W^T , la matriz de transformación; esta matriz se obtiene teniendo en cuenta el algoritmo de cálculo de W, el cual se lleva a cabo en distintos pasos:

1.- Se calcula la matriz de covarianza global Σ_X

Para este cálculo se utilizan todas las variables originales.

El vector medio \bar{X} y la matriz de covarianza Σ_X , se calculan a partir de las variables originales, X_1 y X_2

La matriz de covarianza, Σ_x , se calcula mediante la Ecuación 14

$$\Sigma_x = \begin{pmatrix} \sigma_{11}^2 & \text{cov}_{12} \\ \text{cov}_{21} & \sigma_{22}^2 \end{pmatrix} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde la covarianza se calcula aplicando la Ecuación 15

$$\text{cov}_{12} = \text{cov}_{21} = \frac{\sum (x_{i1} - \bar{x}_1)(x_{i2} - \bar{x}_2)}{n - 1} \quad \text{Ecuación 15}$$

2.- Se calculan los autovalores λ de Σ_X $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_d$ siendo $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_d$

Como, en este caso, el número de variables originales es 2 habrá dos autovalores asociados a Σ_X : λ_1 y λ_2 , que serán las soluciones a la Ecuación 16

$$\Sigma_x - \lambda I = 0 \quad \text{Ecuación 16}$$

Por otra parte, la matriz de covarianza Σ_y es diagonal y está formada por los autovalores de Σ_x . La varianza total se conserva en las matrices Σ_x y Σ_y

3.- Se calculan los autovectores $\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_d$, asociados a los $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_d$. En este caso, al haber 2 autovalores habrá dos autovectores ϕ_1 y ϕ_2 (asociados a λ_1 y λ_2 , respectivamente), los cuales serán las soluciones a la Ecuación 17:

$$(\Sigma_x - \lambda I) * W = 0 \quad \text{Ecuación 17}$$

4.- Se obtiene la matriz W formada por los autovectores de Σ_x según la Ecuación 18

$$W = [\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_d] \quad \text{Ecuación 18}$$

W es una matriz cuadrada, en este caso de rango 2 x 2, cuyas columnas son los autovectores ϕ_1 y ϕ_2 (Ecuación 19)

$$W = [\phi_1 \quad \phi_2] = \begin{bmatrix} \phi_{11} & \phi_{21} \\ \phi_{12} & \phi_{22} \end{bmatrix} \quad \text{Ecuación 19}$$

5.- Se obtiene la matriz de transformación W^T y, finalmente, se procede a la transformación de coordenadas para expresar las variables originales X en las coordenadas del nuevo espacio, de las componentes principales. La transformación viene dada, como ya se indicó, por la ecuación 13, cuya expresión en términos matriciales viene dada por la Ecuación 20 :

$$\begin{pmatrix} Y_1 \\ Y_2 \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} \phi_{11} & \phi_{12} \\ \phi_{21} & \phi_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \end{bmatrix} \quad \text{Ecuación 20}$$

En la **Figura 26** se muestra la transformación de las variables originales X_1 y X_2 en las nuevas variables, componentes principales, Y_1 e Y_2 .

Los autovalores λ_i representan la varianza de las variables originales en el espacio transformado y están relacionados con el margen de las variables en cada uno de los ejes de este espacio, mientras que los autovectores ϕ_i son vectores ortogonales y determinan la dirección de estos ejes.

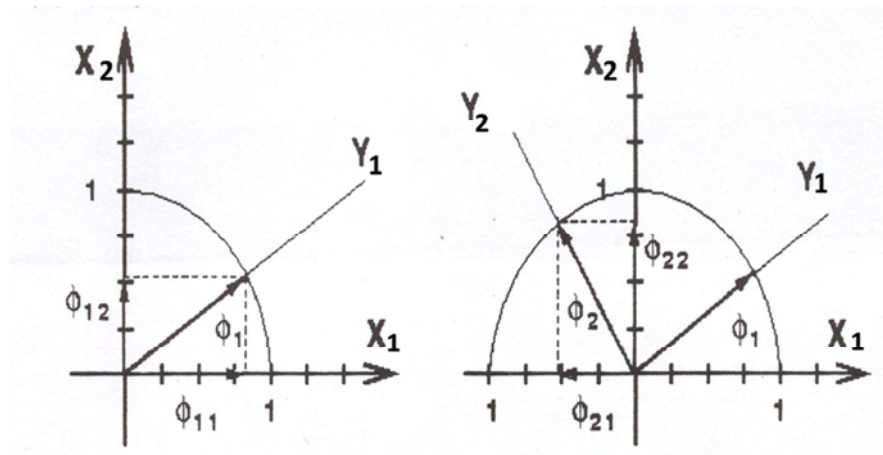


Figura 26. Transformación de las variables originales a componentes principales

El PCA es una herramienta útil en el control de calidad de los alimentos; la adulteración del alimento, su procedencia geográfica o los métodos de producción del mismo son de gran relevancia para establecer la denominación de origen, propia de distintas regiones.

Existen estudios en los que han utilizado PCA para establecer las variaciones producidas en alimentos que han sido sometidos a algún tipo de tratamiento o procesado, tales como tratamientos de secado (Versari et al., 2002; Arvanitoyannis et al., 2003; Héberger et al., 2003; Arvanitoyannis, et al., 2005; Arvanitoyannis y Tzouros, 2005; Arvanitoyannis y Vaitisi, 2007; Versari et al., 2008; Szkudlarz y Jelen,

2008; Oliveira et al., 2009; Shin et al., 2009) y radiación (Liu et al., 2006; Kizil et al., 2006; Seregély et al., 2006) los cuales han sido referidos en la Tesis Doctoral de Guillén-Casla, 2012; en estos estudios, el tratamiento estadístico determinó la correlación entre el tipo de tratamiento y los efectos producidos en el alimento.

En el caso de alimentos listos para el consumo (RTE) en los cuales se necesita una higienización para su conservación, por ejemplo la radiación E-beam, que puede ser útil en este sentido, puede producir dependiendo de la dosis y del tipo de alimento, algunas alteraciones tanto en la composición química como en las propiedades organolépticas de los alimentos. El PCA ha permitido establecer cuáles son los parámetros más afectados de los alimentos tratados con radiación E-beam, así como qué tipo de alimentos son más susceptibles de sufrir modificaciones (Guillén-Casla et al., 2011).

Los gráficos de dispersión de los PCs junto con los gráficos del peso de los componentes principales (bigráficos), bien bidimensionales o en su lugar tridimensionales, proporcionan una información muy significativa de los problemas planteados en muestras procesadas, como sería el caso del tratamiento de higienización de muestras RTE con distintas dosis de irradiación E-beam.

En la **Figura 27** se presenta un ejemplo de una bigráfica, de dos dimensiones, en el que se observa el comportamiento de distintas muestras según su contenido en agua, lípidos colesterol y COPs.

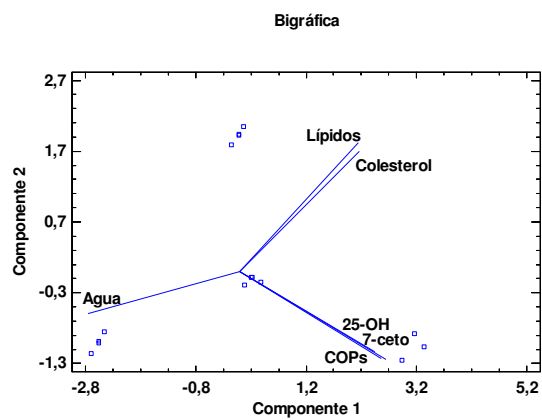


Figura 27. Ejemplo de una bigráfica obtenida mediante PCA.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la información obtenida en la revisión bibliográfica sobre los COPs, su posible formación a partir de colesterol especialmente en alimentos lipídicos procesados y sus posibles transformaciones, y conociendo que estos compuestos juegan un papel importante en aspectos decisivos de la vida humana como la salud, nutrición y producción de alimentos, es necesario poner a punto nuevos métodos analíticos, exactos, robustos y sencillos que permitan el control de los COPs en muestras de alimentos, evitando en lo posible sus transformaciones durante el análisis.

Los objetivos que se pretenden alcanzar dentro del desarrollo de esta tesis doctoral se encuentran dentro de las líneas de actuación más avanzadas en materia de estudio y análisis de contaminantes orgánicos tóxicos para la salud como son los óxidos de colesterol. Actualmente, la investigación avanza hacia la optimización de las distintas etapas del análisis (extracción, purificación, fraccionamiento, detección y cuantificación) con el fin de aumentar la capacidad de respuesta de los laboratorios, minimizar el gasto de reactivos potencialmente peligrosos para el medio ambiente y automatizar el proceso para disminuir la exposición del analista a los mismos, así como en el desarrollo de métodos de medida alternativos a los establecidos.

Los objetivos del trabajo de investigación son:

- Puesta a punto de métodos cromatográficos validados, mediante HPLC-UV y GC-FID, y su comparación, para la determinación de los COPs más frecuentemente encontrados en las muestras de alimentos y que presentan propiedades adversas sobre el

organismo humano tales como 25-OH, 7 β -OH, β -epóxido, α -epóxido, triol, 6-ceto y 7-ceto.

* Optimización mediante diseño factorial de las etapas críticas de preparación de muestra para la determinación de COPs, como son la extracción de la fracción lipídica y la reacción de derivatización de COPs con Tri-Sil, con la consiguiente disminución del número de experimentos.

* Reducción del tiempo de análisis y del volumen de reactivos utilizados en las etapas de extracción y “clean up”, proponiendo el empleo de técnicas alternativas a las convencionales y de automatización del proceso.

• Evaluación de parámetros característicos de las muestras de alimentos, como son agua, lípidos y colesterol y, su influencia sobre la formación de COPs.

• Evaluación de la influencia de la radiación E-beam, a distintas dosis entre 1 y 8 kGy, sobre la formación de COPs en diversos alimentos RTE, empleando los métodos cromatográficos desarrollados, en combinación con las técnicas estadísticas ANOVA y PCA, con el fin de que en el futuro se establezca un criterio sobre el uso de esta radiación, tomando como criterio la transformación de colesterol en alimentos característicos de la dieta de muchas sociedades incluyendo la española, como son jamón serrano, jamón cocido, salmón ahumado, carne picada, queso blando, lomo fresco y lomo adobado.

- Identificación de los diferentes procesos de transformación que sufren los COPs durante la etapa de preparación de muestra y, más concretamente, sobre la etapa de limpieza mediante SPE, y desarrollo de un procedimiento para minimizar las transformaciones de los COPs con el fin de que los nuevos métodos de análisis para alimentos sean más fiables y robustos, evitando en lo posible la generación de artefactos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reactivos

4.1.1 Estándares

- 25-hidroxicolesterol (25-OH) de 98 %, Fluka, Biochemika, USA.
- 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH), colesterol 5 β ,6 β -epoxide (β -epóxido) de 98% de riqueza, colesterol 5 α ,6 α -epoxido (α -epóxido), colestén-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol) y 6-cetocolestanol (6-ceto), 97 %, 7-cetocolesterol (7-ceto), > 90 % y colesterol, 99 %, de Sigma, Sigma-Aldrich, Alemania.
- 9, 10-difenil antraceno (9,10-DFA), 98%, Merck-Schuchardt (Alemania).

4.1.2 Disolventes

- Acetonitrilo (ACN), cloroformo (CHCl₃), éter de petróleo (Et.P) y 2-propanol (2-PrOH) de Scharlau, Scharlau Chemie S.A, Unión europea.
- Metanol (MeOH), hexano (Hex) y acetona de Romil, Teknokroma s. coop Ltda., España.
- Dietil éter (Et₂O) y acetato de etilo (AcOEt) para pesticidas grado Analítico, Carlo Erba RS, Italia.
- Agua ultrapura Milli Q de Millipore, Belford, MA, USA.

4.1.3 Otros reactivos

- Tri-Sil, Termos Scientific (USA).
- Sulfato de sodio anhidro, Panreac PA-ACS-ISO, España.

4.2. Muestras

Las muestras de carne picada, jamón cocido, jamón serrano, queso blando, salmón ahumado y lomo de cerdo fresco e irradiado, fueron obtenidas en supermercados de Madrid (España), envasadas al vacío en bolsas de poliestireno, conteniendo cada bolsa 50 g, cuyo grosor es inferior a 1 cm. Las muestras fueron almacenadas a -18°C y protegidas de la luz hasta su análisis. Parte de estas muestras fueron irradiadas mediante radiación E-beam. Los envases seleccionados para irradiar se llevaron a la planta de irradiación IONMED Esterilización S.A., Tarancón, Cuenca, España, se ubicaron por separado en la cámara y fueron irradiados con una fuente de irradiación E-beam que opera a 10 MeV; el sistema hace rotar las muestras mientras reciben la irradiación lateralmente, las dosis de irradiación aplicadas fueron 1, 2, 3, 4, 6 y 8 kGy a 90 kGy min^{-1} . Las muestras irradiadas a diferentes dosis fueron evaluadas determinando la absorbancia de nitrato de celulosa (ASIM 2000). Los lotes de las muestras empleadas para análisis mediante HPLC y GC no fueron, en general, las mismas debido a la secuencia en el tiempo de los estudios realizados.

4.3. Equipos y Materiales

4.3.1. Equipos cromatográficos

4.3.1.1. Cromatógrafo HPLC

Consta de los siguientes componentes:

Bomba de gradiente Jasco PU-1580 (Tokio, Japón).

Desgasificador en línea Jasco LG-1580- 04 (Tokio, Japón).

Contenedor de fase móvil, isocrática ACN:H₂O (90:10) con un flujo de 1 mL/min.

Válvula de inyección Rheodyne 7125 con loop de 20 μL (Cotati CA, EE.UU.).

Columna tracer excel 120 ODSA C₁₈ (150 x 4.6 mm) y 3 µm de diámetro de partícula (Teknokroma S. Coop. Ltda., España) para el análisis de COPs.

Columna tracer excel C8 (100 x 4.6 mm) y 3µm de diámetro de partícula (Teknokroma S. Coop. Ltda., España) para el análisis de colesterol.

Detector LDC Analytical SpectroMonitor 4100 UV (EE.UU.). La detección se ha llevado a cabo a dos longitudes de onda 205 y 238 nm.

Software ChromaNec XP versión 1.0.4., para adquisición y procesamiento de las señales (Madrid, España).

Termostato P-Selecta Presciterm (Barcelona, España).

El equipo de HPLC utilizado se muestra en la **Figura 28**.

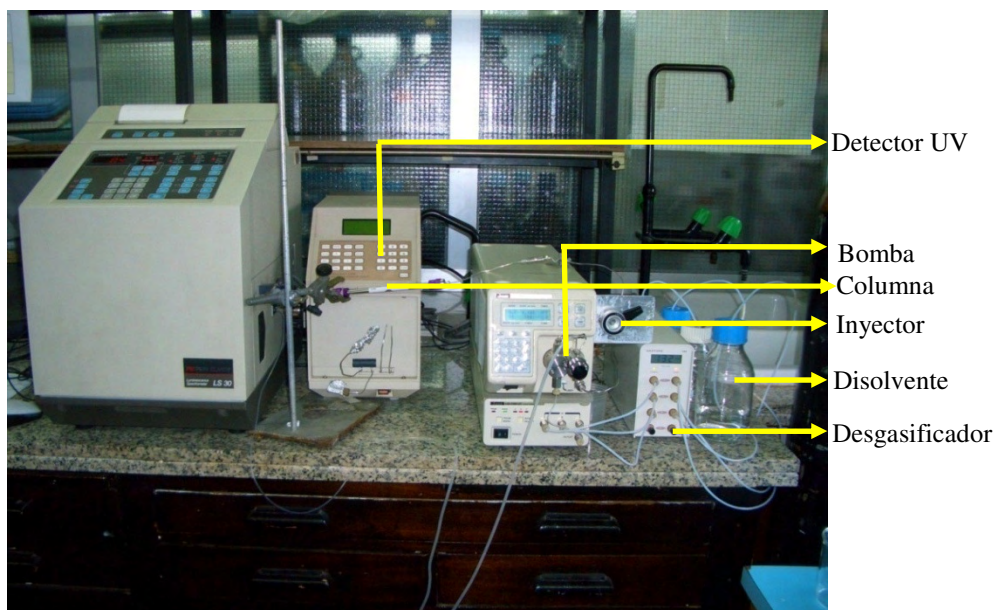


Figura 28. Equipo de HPLC para la determinación de COPs

4.3.1.2. Cromatógrafo de gases

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 formado por:

Botella de gas portador, He.

Inyector Split/Splitless.

Detector FID.

Sistema operativo HPCHEM.

Columnas HP-1 (100% dimetil polixilosano) y HP-5 (5% difenil polixilosano) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película de la fase estacionaria.

Las condiciones de separación cromatográfica fueron las siguientes: T_{inyector} 300 °C; relación de split 3:1; caudal de He 1.6 mL/min; T_{columna} 290°C; T_{detector} 300°C.

4.3.1.3. Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas

Instrumento GC-TOF, formado por:

Cromatógrafo de gases, de Agilent Technologies modelo 7890M.

Inyector automático de CTC Analytics, modelo Combi-Pal.

Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, TOF, de Waters modelo GCT Premier.

Rango de masa: 50-800 uma.

Columna: DB-5 (5% difenil polixilosano) de 30 m de longitud 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película de la fase estacionaria.

Se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas: He como gas portador a un caudal de 1 mL/min. T_{inyector} , 310 °C con una relación de split 10:1, T_{horno} , 220 °C (1min) con una primera rampa de 5°C/min hasta 290 °C (11 min) seguida de otra de 3°C/min hasta 310 °C (28 min). A la fuente de ionización electrónica se le aplicó un potencial de 70 eV Los espectros se obtuvieron en modo scan, identificando las estructuras moleculares por comparación con aquellos espectros de masa que figuran en la librería NIST, segunda edición. La **Figura 29** muestra el sistema GC-MS utilizado.

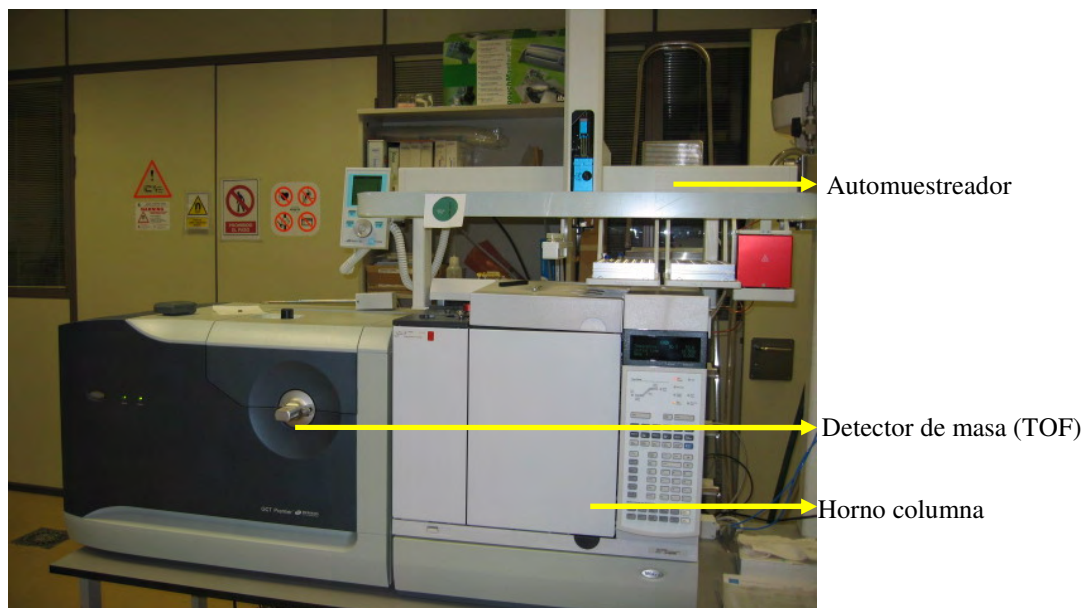


Figura 29. Equipo GC-TOF

4.3.2 Instrumental para la preparación de las muestras

4.3.2.1 Extractor acelerado con disolventes, ASE

Sistema automático ASE 200 de Dionex (Idstein, Alemania) dotado con carrusel para realizar la extracción de lípidos a 24 muestras en serie y software DIONEX con sistema operativo Windows. El tiempo de extracción depende del tipo de muestra y programa usado. La **Figura 30** muestra el sistema ASE utilizado.



Figura 30. Sistema ASE

4.3.2.2. Sistemas de evaporación de disolventes

4.3.2.2 .1. Rotavapor

Sistema de evaporación de pequeños y grandes volúmenes de disolvente Hedolph-Laborota 4000 (USA) usado en el método de lixiviación.

4.3.2.2.2. Evaporador de grandes volúmenes de disolvente

Baño de agua termostatzado Selecta (España) utilizado para eliminar los disolventes de extracción de muestra en los métodos analíticos utilizados para determinar lípidos y COPs en alimentos mediante ASE. Los viales del sistema ASE se introducen en el baño de agua termostatzado a 40 °C y se dirige un flujo de Argón directamente a través de una aguja sobre la muestra evitando que exista oxígeno en el momento de evaporar los disolventes. Un divisor de flujo de vidrio, fabricado en el laboratorio, con ocho vías conectado con válvulas y agujas, permite procesar 8 muestras de manera simultánea, en un tiempo que depende del volumen, punto de ebullición del disolvente y de la $T_{programada}$. En la **Figura 31** se muestra el sistema de evaporación.

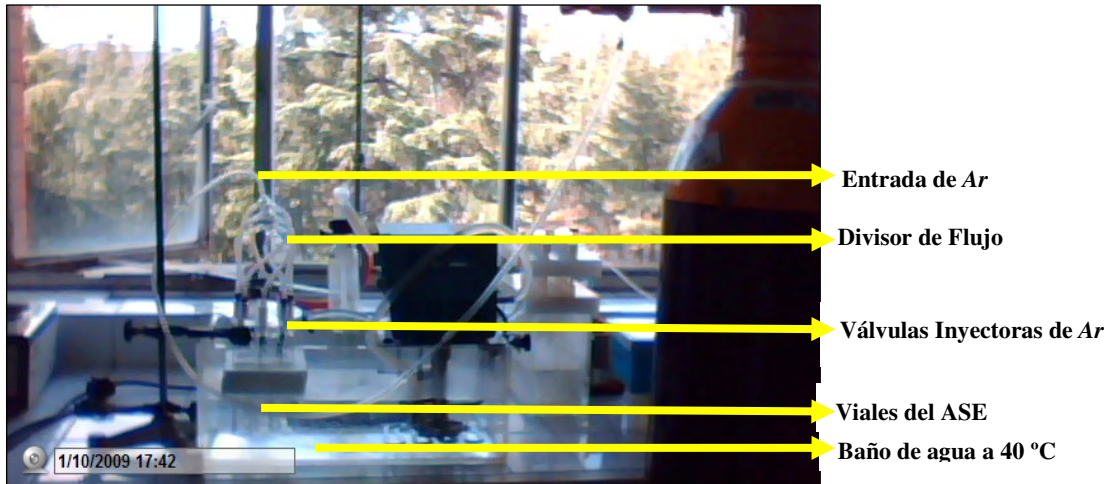


Figura 31. Sistema para evaporar disolventes con flujo de Argón y T controlada

4.3.2.2.3. Evaporador de pequeños volúmenes de disolvente

Sistema calefactor (Tembloc, Selecta, España) conteniendo un bloque calefactor extraíble de T programable con ocho orificios los cuales presentan las dimensiones de los viales de 12 mL. Un divisor de flujo de vidrio, fabricado en el laboratorio, con ocho vías conectado con válvulas y agujas, dirige el flujo de Argón a los viales de forma simultánea y permite evaporar disolventes en ausencia de oxígeno y agua atmosférica. La **Figura 32** muestra el sistema de evaporación de los disolventes de elución de COPs (acetona MeOH y ACN) utilizado.

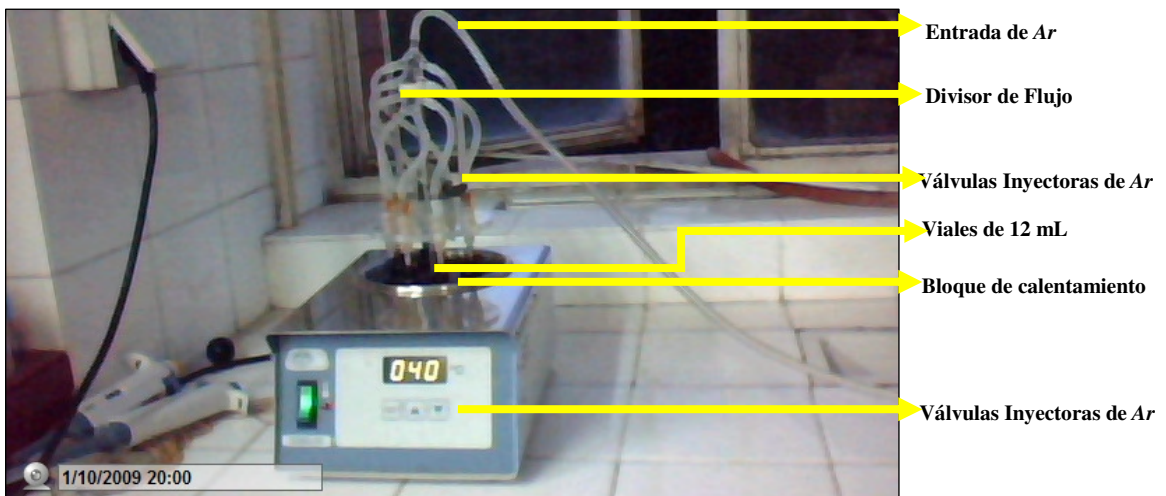


Figura 32. Sistema para evaporar pequeños volúmenes de disolventes a T controlada

4.3.2.3. Sistema de vacío para SPE

Sistema de vacío visiprep de Supelco (USA) utilizado para la limpieza de muestras mediante SPE. El sistema, **Figura 33**, tiene capacidad para 12 muestras con plataformas internas que pueden variar para adaptarse al tamaño del vial cuya capacidad varía entre 4 y 12 ml.



Figura 33. Sistema de vacío para la limpieza de muestras mediante SPE

4.3.2.4. Agitador mecánico

Vibrador mecánico Selecta (España), **Figura 34**, el cual permite agitar los frascos que contienen la mezcla muestra-disolvente para realizar la extracción de la fracción lipídica que contiene los COPs mediante la técnica de lixiviación.



Figura 34. Vibrador mecánico para realizar el proceso de lixiviación

4.3.2.5. Sistema para eliminar el exceso del derivatizante Tri-Sil

Se utiliza el mismo sistema de vacío usado para la limpieza de muestra mediante SPE. El sistema permite insertar Argón a través de la tapa superior la cual se acopla con la tapa inferior del SPE; el Argón incide sobre las muestras por medio de agujas en un sistema cerrado ajustando las tapas con unas bandas de caucho para evitar fugas. El Tri-Sil se elimina a T_a mediante flujo de Argón el cual se regula con las válvulas del sistema de vacío. Los vapores tóxicos de la piridina se recogen en una trampa con mezcla sulfocrómica (**Figura 35**).

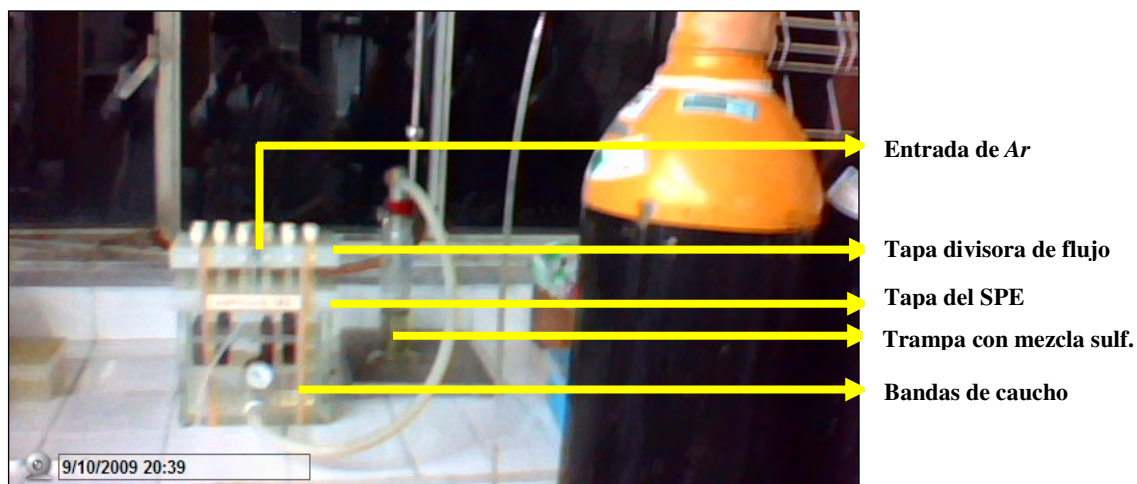


Figura 35. Sistema para eliminar el exceso de Tri-Sil

4.3.3. Otros sistemas

Agitador Vortex selecta (España).

Purificador de agua (grado HPLC), sistema Milli-Q de Millipore, Francia.

Balanza analítica digital Kern Alj 120-4 con precisión 0.0001 g. Alemania.

4.3.4 Materiales

- Cartuchos de silica gel de 500 mg/6 mL, Applied separations (USA).
- Cartuchos C₁₈ y C₈ SPE de 500 mg/3mL, Discovery Supelco (USA).
- Tierras de diatomeas de 30/40 mesh, Cultek S.L.U. (España).
- Filtros de nylon de 4 mm y 0.45 µm, National Scientific (USA).
- Viales ambar de 4 y 12 mL, National Scientific (USA).
- Frascos ISO de vidrio de boca ancha de 25, 100, 250 y 500 mL.
- Mortero de porcelana Staatlich Berlin (Alemania).
- Desecador que contiene CaCO₃ como agente desecante

- Programas Statgraphics Plus 5.0 y Statgraphics Centurion para realizar los diseños experimentales, test ANOVA y análisis de datos mediante PCA.
- Librería de espectros de masas NIST segunda edición para la identificación de los COPs.

4.4. Procedimientos

4.4.1. Preparación de las disoluciones patrón de reserva

4.4.1.1. Disoluciones patrón individuales de COPs

4.4.1.1.1. Disolución patrón de 7 β -OH de 400 mg/L

Se pesaron en una balanza analítica 0.0040 g de 7 β -OH sólido y en un matraz aforado de 10 mL se enrasó con 2-PrOH siendo la concentración final de esta disolución 400 mg/L; se trasvasó a un vial ámbar de 12 mL y se conservó en congelador a -18 °C.

4.4.1.1.2. Disoluciones patrón individuales de 1000 mg/L de los siguientes estándares: colesterol, β -epóxido, α -epóxido, triol, 6-ceto, 7-ceto, 25- OH

Se pesaron 0.0100 g de cada sólido y en matraces aforados de 10.0 mL se disolvieron y se enrasó cada disolución con 2-PrOH siendo su concentración final de 1000 mg/L. Las respectivas disoluciones se transvasaron a viales ámbar de 12 mL, conservándose en congelador a -18 °C.

4.4.1.2. Disolución patrón de 1000 mg/L del IS, 910-DFA

Se pesaron 0.0100 g 910-DFA sólido, se disolvieron en 2-PrOH y en un matraz aforado de 10.0 mL se enrasó con dicho disolvente, siendo la concentración final de esta

disolución 1000 mg/L; se transvasó a un vial ámbar de 12 mL y se conservó en congelador a -18 °C.

4.4.2. Preparación de las disoluciones de trabajo

4.4.2.1. Disoluciones de trabajo de 7 β -OH de 5 y 50 mg/L

Se tomaron alícuotas de 125 y 1250 μ L de la disolución de 400 mg/L y se llevaron a matraces aforados de 10.0 mL enrasando con 2-PrOH; se trasvasaron a viales ámbar de 12 mL y se conservaron a -18 °C.

4.4.2.2. Disoluciones de trabajo individuales de 5 y 50 mg/L de los siguientes estándares: colesterol, β -epóxido, α -epóxido, triol, 6-ceto, 7-ceto, 25-OH

Se tomaron alícuotas de 50 y 500 μ L de cada una de las disoluciones individuales de 1000 mg/L de cada compuesto y se llevaron a matraces aforados de 10.0 mL enrasando con 2-PrOH; se trasvasaron a viales ámbar de 12 mL y se conservaron en congelador a -18 °C.

4.4.2.3. Disolución de trabajo de estándar interno de 50 mg/L

Se tomaron alícuotas de 500 μ L de las disoluciones individuales de 1000 mg/L de 910-DFA y 6-ceto, se llevaron a matraces aforados de 10.0 mL y se enrasaron con 2-PrOH; se trasvasaron a viales ámbar de 12 mL y se conservaron en congelador a -18 °C.

4.4.3 Disoluciones para el calibrado de COPs mediante HPLC

Se prepararon disoluciones de 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mg/L de 25-OH, 7-ceto y 6-ceto a partir de sus disoluciones de reserva individuales de 1000 mg/L y se enrasaron con ACN en matraces de 10 mL.

4.4.4. Determinación de parámetros característicos de las muestras

4.4.4.1. Agua

Se utilizó el método oficial de la AOAC (1998) que se detalla a continuación: pesar 3 g de muestra, calentar en una estufa a 135 °C durante 3 h, dejar durante 8 h en un desecador y pesar la muestra seca. El contenido de agua se determina por diferencia de peso, hasta peso constante.

4.4.4.2. Lípidos

Se determinó el contenido de lípidos en las muestras mediante los métodos de Lixiviación y ASE que se detallan a continuación. En ambos casos se calculó el porcentaje de lípidos por gravimetría aplicando la siguiente ecuación

$$G (\%) = w_{\text{lípidos}} * 100 / w_{\text{muestra}} \quad \text{Ecuación 21}$$

Donde: G (%) porcentaje de lípidos; $w_{\text{lípidos}}$ peso del extracto lipídico y w_{muestra} peso inicial de muestra.

Método de lixiviación. Se tomaron 5.0 g de muestra macerada previamente, se realizó la extracción con CHCl_3 agitando con el agitador mecánico durante 18 h; se eliminó el disolvente con rotavapor a 60 °C y se pesó el extracto lipídico hasta peso constante..

Método ASE. Se empleó el método seleccionado para carnes pescado y quesos recomendado por los distribuidores DIONEX (2000) que consiste en tomar 5.00 g de muestra, triturar con 6.00 g de tierra de diatomeas en mortero hasta completa homogeneización. La mezcla homogénea obtenida se depositó dentro de las celdas ASE de 22 mL y se realizó la extracción, con 35 mL de Et.P. a una T de 80 °C y una P de

2000 psi, recojiéndose los extractos en los viales de 60 mL del equipo (previamente pesados). Se realizaron dos ciclos de extracción siendo cada ciclo de 5 min; se eliminó el disolvente a 80 °C con el evaporador indicado en 4.3.2.2.2. Se dejaron los viales con el extracto lipídico dentro de el desecador durante 8 h hasta peso constante y por diferencia de peso se calculó el peso del extracto lipídico; para el caso del salmón ahumado y queso blando, la extracción se llevó a cabo en las mismas condiciones excepto el disolvente que se utilizó una mezcla de Hex:2-PrOH (90:10).

Para el empleo del método, teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante, el contenido en extracto lipídico no debe exceder 800 mg de lípidos en estas condiciones experimentales.

4.4.4.3. Colesterol

Primeramente se obtuvo el extracto lipídico utilizando el método ASE para lípidos; se evaporó el disolvente de extracción, se disolvió en 5 mL de Hex y se hizo pasar por el cartucho de silica. Se recogieron en el mismo recipiente todas las fracciones eluidas de los lavados realizados de acuerdo a la metodología seguida para la limpieza de los COPs según se indicará en 4.4.6.3.1. Se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en 1 mL de 2-PrOH; de esta disolución se tomó 1 mL y a continuación se inyectó en el sistema HPLC en las siguientes condiciones: Columna tracer excel C₈ (100 x 4.6 mm) y 3 µm de diámetro de partícula; fase móvil isocrática, ACN:agua (80:20) con un flujo de 1 mL/min (Daneshfar et al., 2009). El contenido de colesterol en las muestras, expresado en mg/100 g, se determinó mediante calibrado externo, midiendo a una longitud de onda de 205 nm.

4.4.5. Irradiación de las muestras

Las muestras, cuyo espesor fue de menos de un centímetro, fueron empaquetadas en unidades a vacío, en bolsas de poliestireno, y transportadas a la planta de irradiación (IONMED esterilización SA. Tarancón. Cuenca, España). Las bolsas de las muestras fueron colocadas independientemente dentro del compartimento de irradiación y fueron irradiadas bajo una fuente de radiación E-beam que opera a 10 MeV. Las bolsas son giradas mientras reciben radiación lateral. Las dosis de radiación absorbida fueron: 1, 2, 3, 4, 6 y 8 kGy a de 90 kGy/min. Esta dosis absorbida por cada muestra se evaluó mediante la determinación de la absorbancia del triacetato de celulosa (ASTM. 2000) simultáneamente irradiado con la muestra; el aumento de T en las bolsas de muestra durante el tratamiento fue menos de 2 °C. Seguidamente, las bolsas de las muestras fueron almacenadas a -18 °C hasta su análisis.

4.4.6. Preparación de muestra para la determinación de COPs

4.4.6.1. Lixiviación

La muestra a T_a se troceó con una tijera, se trituró y homogeneizó por medio de un mortero de porcelana. Se pesaron entre 3 y 6 g y se introdujo en un frasco ISO de vidrio de 100 mL con tapón de rosca y se añadieron 70 mL de CHCl_3 ; en el caso del jamón serrano, se utilizaron unos 3 g de muestra y 30 mL de CHCl_3 . El recipiente fue protegido de la luz con papel de aluminio y fue sometido a agitación mecánica a 780 rpm durante 18 h a la temperatura ambiente. El líquido sobrenadante se hizo pasar por un cartucho conteniendo 10 g de Na_2SO_4 anhidro y seguidamente por un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro, situado en línea con el cartucho. Se lavó el residuo dos veces con porciones de 10 mL de CHCl_3 y se recogieron todas las

fracciones de CHCl_3 en un matraz de 250 mL, el cual se colocó en el rotavapor a 40 °C evaporando el CHCl_3 hasta sequedad. El residuo fue disuelto en 6 mL de Hex mediante agitación en vortex.

4.4.6.2. Extracción acelerada con disolventes. ASE

Entre 2 y 5 g de muestra, previamente macerada y homogeneizada en un mortero de porcelana, fueron exactamente pesados; esta muestra junto con 6 g de tierra de diatomeas de 30/40 mallas fue transferida al mortero y triturada hasta homogeneización completa de la mezcla. La mezcla resultante fue transferida a una célula ASE de 22 mL, la cual se rellenó completamente con tierra de diatomeas. La célula fue colocada en el carrusel ASE. Los COPs fueron extraídos usando Et.P: CHCl_3 (85:15). Las condiciones optimizadas fueron las siguientes: presión, P, 1500 psi; T, 40 °C; precalentamiento, 5 min; calentamiento, 5 min; volumen de flujo, 120 %; tiempo de purga, 60 s; número de ciclos, 2. El volumen de extracto de lípidos totales fue 45 mL y el tiempo de análisis total de 20 min. El extracto fue recogido en un vial de vidrio de 60 mL el cual fue colocado en el sistema de calentamiento Tembloc a 40 °C, burbujeando una corriente de Argón hasta sequedad. El residuo fue disuelto en 6 mL de Hex mediante agitación vortex.

4.4.6.3. Extracción en fase sólida SPE

4.4.6.3.1. Clean up para HPLC

El extracto ASE de 6 mL de Hex se limpió mediante SPE; se hizo pasar a través de un cartucho de sílica de 500 mg (6 mL), previamente acondicionado con 5 mL de Hex. Los analitos retenidos en el cartucho se lavaron sucesivamente con 10 mL de una mezcla de Hex: Et_2O (95:5. v/v), 25 mL de Hex: Et_2O (90:10) y 15 mL de Hex: Et_2O (80:20).

Seguidamente, se eliminó el disolvente del cartucho, haciendo pasar aire a su través mediante vacío durante 20 min. Los COPs fueron eluidos con 10 mL de acetona (5 x 2 mL) la cual fue recogida en un vial ámbar de 12 mL. La acetona fue evaporada con flujo de Argón a 40 °C hasta la obtención del residuo.

4.4.6.3.2. Clean up para GC

Se aplicó el mismo procedimiento que para HPLC adicionando una etapa final de limpieza. El residuo obtenido en la etapa de clean up para HPLC se disolvió con 3 mL de la mezcla Hex:AcOEt (90:10) y se hizo pasar por un cartucho de amino propil previamente acondicionado con 3 mL de la misma mezcla Hex:AcOEt. Seguidamente, el cartucho se lavó con 16 mL de la mezcla Hex-AcOEt y se secó con flujo de aire. Los COPs fueron eluidos con 10 mL de acetona (5 x 2 mL) la cual fue recogida en un vial ámbar de 12 mL y evaporada con flujo de Argón a 40 °C hasta sequedad.

4.4.7. Separación de COPs mediante HPLC-UV en patrones

Se inyectaron 20 µL de una disolución patrón mezcla de COPs de 25 mg/L en el sistema cromatográfico, utilizando la columna C₁₈ (150 x 4.6 mm y 3 µm de tamaño de partícula) y como fase móvil ACN:agua., 90:10 (v/v) a un caudal de 1 mL/min; la detección se realizó simultáneamente a dos longitudes de onda 205 y 238 nm. Los tiempos de retención y áreas de pico cromatográficos fueron usados con fines de identificación y cuantificación, respectivamente.

4.4.7.1. Calibrados de COPs mediante HPLC

Se obtuvieron calibrados de 25-OH, 7-ceto y 6-ceto utilizando las disoluciones de calibrado. 4.4.3. en el intervalo de concentración de 0.5 a 100 mg/L, aplicando el método del calibrado externo tras la separación indicada en 4.4.7.

El límite de detección o concentración más pequeña que se puede detectar con un cierto nivel de confianza se calculó mediante la expresión.

$$\text{LOD} = 3 * N/b \qquad \qquad \qquad \text{Ecuación 22}$$

Siendo N la media del ruido de 10 medidas de la señal del blanco obtenida midiendo la altura de la línea base a los tiempos de retención de cada COP, y b la pendiente del calibrado de las alturas de los picos cromatográficos con respecto a la concentración expresada, por tanto, en unidades de altura/concentración.

El límite de cuantificación se calcula mediante la expresión

$$\text{LOQ} = 10 * N/b \qquad \qquad \qquad \text{Ecuación 23}$$

El ruido se calculó inyectando ACN.

4.4.8. Determinación de COPs mediante HPLC en muestras de alimentos

El residuo obtenido en la etapa de limpieza (4.4.6.3) se disolvió con 250 μL de ACN. Se inyectaron 20 μL de esta disolución en el sistema cromatográfico a través de un filtro de membrana de teflón, de 0.5 μm y 4 mm, situado entre el cuerpo y la aguja de la jeringa; se aplicó el método de separación 4.4.7., determinando cada COP por interpolación en su respectivo calibrado.

Las diferencias en el contenido de COPs en muestras irradiadas y no irradiadas fueron evaluadas mediante ANOVA de dos vías al nivel de significación de 0.05 utilizando el programa Statgraphics Plus 5.0.

4.4.9. Validación del método de determinación de COPs mediante HPLC

La precisión del método de determinación de COPs se evaluó calculando el valor de RSD (%) de 6 las muestras sin irradiar enriquecidas al nivel de concentración de 2 µg/g.

La exactitud del método se evaluó mediante estudios de recuperación. Inicialmente, se analizaron 10 muestras sin irradiar no enriquecidas y luego 6 muestras sin irradiar enriquecidas adicionando alícuotas de 16 µL de cada disolución de COPs de 5 mg./L sobre la muestra sólida homogeneizada, la cual fue entonces mantenida durante 30 min a Ta. Se aplicó el método de preparación de muestra descrito en 4.4.6.1. y 4.4.6.3. y se determinaron los COPs a 205 y 238 nm.

El porcentaje de recuperación (R, %) se calculó por medio de la ecuación:

$$R = \frac{[COP]_2}{[COP]_1} * 100 \quad \text{Ecuación 24}$$

Siendo, [COP]₂, concentración de COP recuperada después del enriquecimiento, (5 mg/L), [COP]₁, concentración de COP determinada antes del enriquecimiento.

$$[COP]_2 = [COP]_{Detectada} - [COP]_1 \quad \text{Ecuación 25}$$

4.4.10. Separación de COPs mediante GC-FID en patrones

4.4.10.1. Derivatización con Tri-Sil

En un vial ámbar de 12 mL conteniendo 40 µL de cada disolución estándar de COPs o de sus mezclas de 50 mg/L en 2-PrOH se evaporó el disolvente mediante flujo de Argón. Sobre el residuo fueron añadidos 400 µL de Tri-Sil y la mezcla se agitó vigorosamente durante 2 min en vortex. Seguidamente, la reacción fue llevada a cabo a 60 °C durante 45 min dentro del sistema de calentamiento Tembloc. Después de alcanzar la T_a, el exceso de Tri-Sil fue eliminado mediante flujo de Argón. A continuación, se añadieron al residuo 400 µL de Hex agitando vigorosamente durante 2 min en vortex. El extracto fue filtrado a través de un filtro de membrana de 4 mm y 0.45 µm de tamaño de poro.

4.4.10.2. Selección del patrón interno (IS)

Se seleccionaron como IS el 9-10-DFA, para el estudio con patrones y el COP 6-cetocolestanol, compuesto similar a los compuestos analizados, no identificado por GC-MS en las muestras.

4.4.10.3. Selección del caudal de la fase móvil (He)

Se obtuvo mediante el gráfico de Van Dèmmter, representando la altura de plato teórico frente al caudal o velocidad lineal media del gas portador, He.

4.4.10.4. Calibrados de COPs mediante GC-FID

Se prepararon calibrados de los COPs aplicando el método del patrón interno a partir de las disoluciones de trabajo de 5 y 50 mg/L. En viales con tapa de rosca de 5 mL se añadieron alícuotas de cada COP para obtener disoluciones mezclas de sus derivados a 0.1. 0.5. 1.0. 5.0. 10.0 y 20 mg/L. A continuación se añadió a cada disolución una alícuota de 16 µL de 50 mg/L de 9.10-DFA (IS) y se agitó en vortex. Se evaporó el disolvente con flujo de Argón, realizándose la reacción de derivatización y la separación cromatográfica de los derivados de acuerdo a los procedimientos referidos en 4.4.10.

Los valores de LOD y LOQ se calcularon inyectando 6 veces una disolución del blanco Hex, conteniendo el IS, 9.10-DFA (5 mg/L), en Hex, utilizando las expresiones indicadas en 4.4.7.1.

4.4.11. Identificación de los derivados de COPs mediante GC-MS

4.4.11.1. Patrones

Se identificaron los Tri-Sil derivados por GC-MS (4.3.1.3.) a partir de una mezcla de estándares de COPs de 5 mg/L previa obtención de los Tri-Sil derivados aplicando el procedimiento 4.4.8.2. Al extracto obtenido en Hex se añadieron 40 µL de la disolución de 50 mg/L del IS (9.10-DFA), inyectando 1µL de esta mezcla en el equipo GC-TOF. La separación cromatográfica se realizó utilizando la columna DB-5 con el siguiente programa de T: T_{inicial}, 220 °C (1min), seguido de una rampa de 5°C/min hasta 290 °C (11 min), y otra de 3°C/min hasta 310 °C (28 min). Se utilizó un inyector split-splitless con una relación de split de 10:1, a 310 °C y como gas portador He a un flujo de 1 mL/min. La ionización electrónica se realizó a 70 eV, obteniéndose los cromatogramas

en modo scan. Las identificaciones y se llevaron a cabo mediante comparación con los espectros de masa presentes en la librería NIST.

4.4.11.2. Muestras

Inicialmente, la identificación de los COPs se realizó por comparación de los t_R de los cromatogramas de las muestras con aquellos obtenidos a partir de patrones en las mismas condiciones cromatográficas. Adicionalmente, cada COP fue confirmado comparando los espectros de masas obtenidos en las muestras y los espectros disponibles en la librería NIST; cuando el espectro no estuvo disponible en esta librería, la identificación y confirmación se realizó por medio de los espectros de masa obtenidos a partir de los derivados Tri-Sil de los patrones individuales.

La preparación de muestra de alimentos y derivatización de los COPs se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos 4.4.8.2. a 4.4.8.4. Al extracto conteniendo los Tri-Sil derivados de los COPs se añadieron 40 μ L de la disolución de trabajo de 50 mg/L del IS (9, 10-DFA) inyectando 1 μ L de esta mezcla al equipo GC-TOF. Las condiciones cromatográficas aplicadas en el sistema GC-MS están indicadas en 4.4.11.1.

4.4.12. Estabilidad de los COPs-Tri-Sil-derivados

Se realizaron ensayos para conocer la estabilidad de los Tri-Sil-COPs-derivados; los cuales se obtuvieron a partir de una disolución mezcla de COPs de 5 mg/L, aplicando el método de determinación indicado en 4.4.13.

4.4.13. Determinación de COPs mediante GC-FID en muestras de alimentos

La cuantificación de los COPs se realizó mediante GC-FID previa preparación de la muestra utilizando los procedimientos de extracción de lípidos descritos en 4.4.6.1 y 4.4.6.2., el método de limpieza de muestra 4.4.6.3, la reacción de derivatización mediante Tri-Sil. 4.4.10.1, y aplicando el método de calibrado del estándar interno, 6-ceto, referido en el apartado 4.4.10.2. La separación cromatográfica se realizó utilizando la columna HP-1 en modo isoterma a 290 °C, con He como gas portador a un flujo de 1.6 mL/min. Tdetector y Tinyector de 300 °C; se inyectaron 2 µL del extracto de los Tri-Sil derivados en el inyector split-splitless a una relación de split de 3:1. Todas las mediciones se hicieron por triplicado. En la Figura 36 se presenta un esquema del método seguido para la determinación de COPs mediante GC-FID en muestras de alimentos RTE. Se realizaron ensayos para conocer la estabilidad de los COPs-Tri-Sil-derivados; los cuales se obtuvieron a partir de una disolución mezcla de COPs de 5 mg/L, aplicando el método de determinación indicado en 4.4.12.

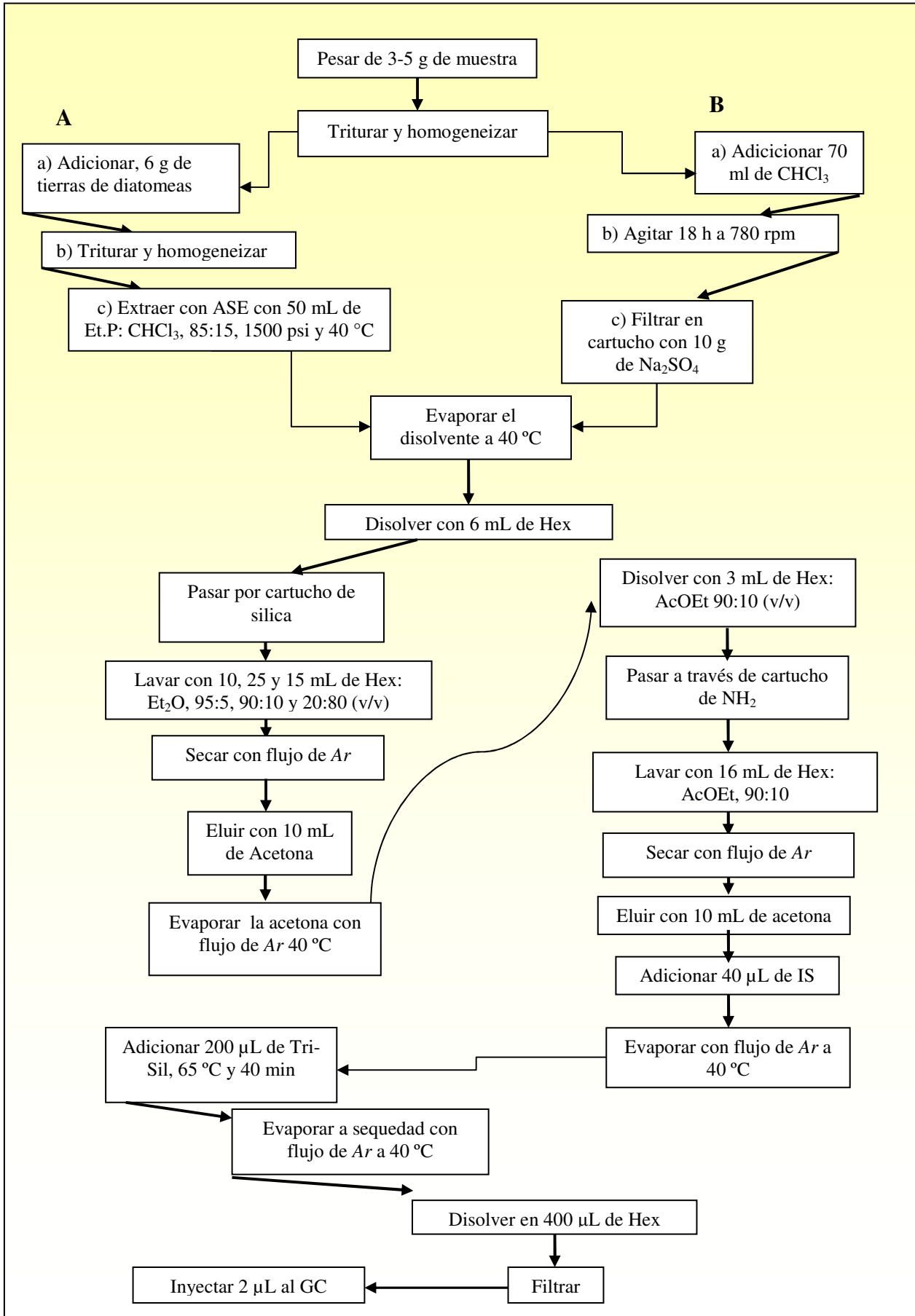


Figura 36. Diagrama de preparación de muestra para determinar COPs utilizando distintos métodos, A-ASE; B-lixiviación

4.4.13. Validación del método de determinación de COPs mediante GC

La precisión del método de determinación de COPs se evaluó calculando el valor de RSD (%) de 6 muestras enriquecidas al nivel de concentración de 2 µg/g.

La exactitud del método se evaluó mediante estudios de recuperación. Se llevaron a cabo réplicas de cada tipo de muestra sin irradiar (n=6), no enriquecidas y enriquecidas, e irradiadas (n=3), añadiendo a estas últimas 16 µL de la disolución mezcla de COPs de 50 mg/L y 40 µL de una disolución del IS (6-ceto) de 50 mg/L, justo antes de realizar el proceso de derivatización de los COPs. Se aplicó el método de preparación de muestra descrito en 4.4.12.

4.4.14. Influencia de los parámetros característicos de las muestras en la formación de COPs

Se llevó a cabo un tratamiento estadístico de los datos, contenido de agua, lípidos, colesterol y COPs totales, obtenidos mediante HPLC-UV y GC-FID. El análisis de cada parámetro se realizó por triplicado en las muestras sin irradiar de carne picada, jamón cocido, jamón serrano, queso fresco y salmón ahumado, teniendo en cuenta, por cada técnica, los COPs analizados para ver la influencia que presentan los parámetros característicos de las muestras en la formación de COPs.

En primer lugar, se obtuvo la matriz de correlación, para conocer si existe o no correlación entre las variables; lo que viene indicado por los valores de los coeficientes de correlación de Pearson $1 < \rho > 0$; cuando se encontró correlación entre las variables, valores de ρ próximos a 1, se aplicó a los datos un PCA utilizando el programa

Statgraphics; este análisis proporcionó gráficos de dispersión y del peso de los distintos parámetros estudiados en la contribución de las componentes principales obtenidas en cada caso.

4.4.16. Identificación y minimización de transformaciones de COPs durante la preparación de muestra para análisis cromatográfico por GC

4.4.16.1. Detección de transformaciones de COPs durante el clean up mediante SPE

4.4.16.1.1. Modo de elución total

En un vial ámbar de 5 mL se añadieron alícuotas de 10 µL de cada disolución de COP estándar de reserva 1000 mg/L y de colesterol de 1000 mg/L. Se agitó en vortex durante 30 s evaporando el disolvente mediante flujo de Argón con el sistema de evaporación fabricado en el laboratorio. Los residuos fueron redisueltos en los disolventes apropiados, según la naturaleza del cartucho utilizado, llevándose a cabo la etapa de limpieza. La disolución se pasó a través de un cartucho previamente acondicionado; los COPs retenidos fueron lavados y el cartucho se secó mediante flujo de Argón; la **Tabla 13** particulariza el proceso utilizado para cada cartucho.

Tabla 13 . Tratamiento de limpieza de muestra mediante SPE

Cartucho	Vinicial [COPs], 2 mg/L	Disolvente Acondicionamiento	Lavado	Eluyente
Silica	Hexano, 5mL	Hexano, 5mL	Hex:Et ₂ O, (80:20), 15 mL	acetona, 10 mL
Amino Propil		Hexano, 5mL	Hex:AcOEt, (90:10), 15 mL	Acetona 10 mL
C ₈	ACN:H ₂ O (70:30), ¹ 1mL	ACN:H ₂ O (50:50), 3 mL	ACN:H ₂ O, (70:30), 2 mL	ACN:H ₂ O (80:20), 8 ml
C ₁₈	ACN:H ₂ O (80:20) 5mL,	ACN, 3 mL	ACN, 5 mL	MeOH, 10 mL

¹10 mg/L

Se pasó por el cartucho el eluyente adecuado y cada eluato fue colectado en un vial de 12 mL. El disolvente fue evaporado mediante flujo de Argón a 40°C, el residuo fue disuelto en Hex y los COPs fueron derivatizados con Tri-Sil antes de su determinación mediante GC-FID, según se describe en los procedimientos 4.4.6.3.2.

4.4.16.1.2. Modo colección de fracciones

El procedimiento fue similar al del modo elución total. Los COPs fueron eluidos en viales de 1 mL, colectando fracciones de 0.5 y 1 mL a diferentes tiempos sin secar el cartucho, usando el volumen de elución adecuado. Se colectaron fracciones hasta la completa elución de los COPs, evitando la elución del colesterol; en cada fracción el disolvente fue evaporado haciendo burbujear flujo de Argón a 40 °C. A continuación, el residuo fue disuelto en Hex y derivatizado con 200 µL de Tri-Sil como en el modo elución total antes de su análisis por GC.

4.4.17. Método propuesto para la determinación de COPs en muestras de alimentos mediante GC-FID con minimización de transformaciones.

Unos 2 ó 3 g de la muestra, previamente macerada y homogeneizada en un mortero de porcelana, fueron exactamente pesados. Esta muestra, junto con 6 g de tierra de diatomeas de 30/40 mallas, fue transferida al mortero y triturada hasta completa homogeneización. La mezcla resultante fue transferida a una celda ASE de 22 mL y se aplicó el método propuesto ASE para la extracción de lípidos, usando Et.P: CHCl₃, 85:15 a 40 °C y 1500 psi. El extracto fue recogido en un vial de vidrio del equipo ASE de 60 mL el cual fue colocado en el calefactor Tembloc a 40°C (hasta ocho viales), evaporando el disolvente hasta sequedad mediante flujo de Argón, utilizando el sistema evaporador fabricado en el laboratorio. El residuo fue disuelto en 6 mL de Hex mediante agitación vortex. Después, se llevó a cabo la limpieza de la muestra de COPs por SPE en modo elución total, usando el cartucho C₁₈ previamente acondicionado con 3 mL de ACN. A continuación, el cartucho fue lavado con 5 mL de ACN y secado mediante flujo de Argón. Los COPs retenidos se eluyeron con 10 mL de MeOH. El eluato fue colectado en el vial a pH controlado con 300 µL de una disolución reguladora, antes de llevar a cabo la reacción de derivatización. Se añadieron 40 µL de 6-ceto como IS. El disolvente fue evaporado mediante flujo de Argón. Sobre el residuo se añadieron 200 µL de Tri-Sil y se realizó la reacción de derivatización siguiendo el procedimiento indicado en 4.4.10.1, separando los Tri-Sil derivados aplicando el procedimiento 4.4.10.3. En la **Figura 37** se presenta un esquema del método seguido para la determinación de COPs mediante GC-FID en muestras de alimentos RTE.

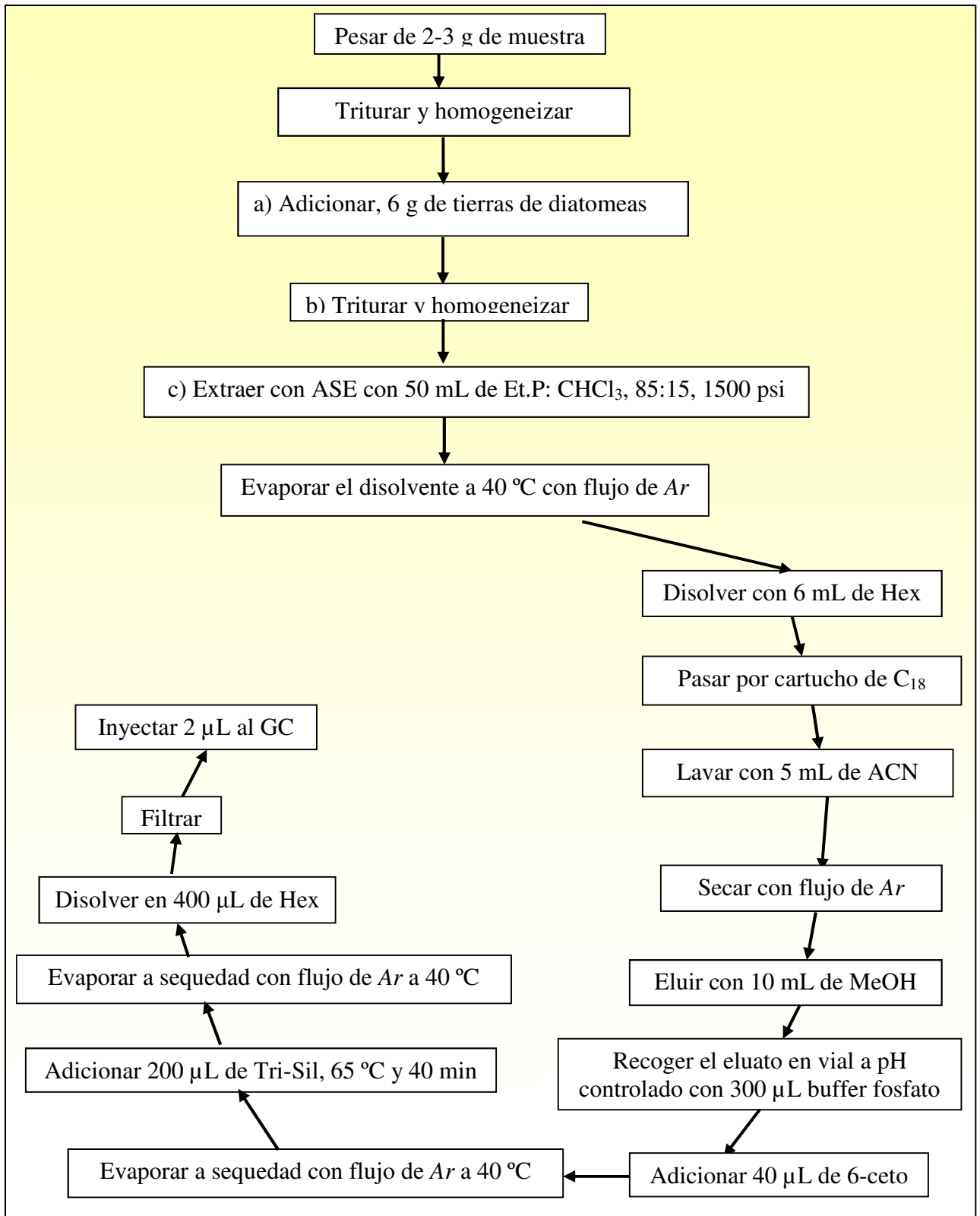


Figura 37. Diagrama de preparación de muestra para determinar COPs mediante el método de minimización de transformaciones

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS DE COPS MEDIANTE HPLC

5.1. Análisis de COPS mediante HPLC con detección ultravioleta

Se emplearon para el estudio los COPS, 25-OH, 7-ceto que habitualmente se encuentran en muestras de alimentos y 6-ceto, ya que presentan propiedades de absorción en la región del espectro UV. El análisis de estos compuestos en muestras de alimentos por HPLC, requiere la aplicación de distintas etapas de preparación de la muestra, extracción de la fracción lipídica y clean up de la muestra de COPS, antes de su inyección en el sistema de HPLC. En primer lugar se realizaron ensayos para determinar distintos parámetros característicos de las muestras.

5.1.1. Determinación de los parámetros característicos de las muestras

Se determinaron algunos parámetros característicos de los alimentos tales como agua, lípidos y colesterol, en muestras no irradiadas; los COPS están incluidos en la fracción lipídica y su formación pudiera estar relacionada con el contenido de lípidos y colesterol.

5.1.1.1. Agua

El contenido de agua es un parámetro importante en la determinación de COPS ya que podría intervenir en el proceso de formación de los COPS durante el procesado o almacenamiento. Este parámetro fue determinado siguiendo el procedimiento indicado en 4.4.4.1. En la **Tabla 14** se muestra el porcentaje de agua en las muestras de carne picada, jamón cocido, jamón serrano, queso blando y salmon ahumado. En todas las muestras el porcentaje es superior al 30%.

Tabla 14. Contenido de agua en muestras de alimentos

Muestra	Agua, %	RSD, %
Carne picada	31.8	2.0
Jamón cocido	73.1	0.6
Jamón serrano	38.7	3.9
Queso blando	45.2	1.4

RSD, Desviación estándar relativa (n=3)

5.1.1.2. Lípidos

Este parámetro fue determinado siguiendo el procedimiento indicado en 4.4.4.2. utilizando el método ASE. En la **Tabla 15** se muestra el porcentaje de lípidos en las muestras de carne estudiadas. En todas las muestras estudiadas se obtuvieron valores entre 3 y 32%.

Tabla 15. Contenido de lípidos en muestras de alimentos.

Muestra	Lípidos, %	RSD, %
Carne picada	25.8	3.1
Jamón cocido	2.9	0.3
Jamón serrano	20.1	0.4
Queso blando	31.9	1.9

RSD, desviación estándar relativa (n=3)

5.1.1.3. Colesterol

Debido a que el colesterol es el precursor de los COPs se llevó a cabo su determinación aplicando el procedimiento referido en 4.4.4.3. En la **Tabla 16** se muestra los contenidos de colesterol los cuales dependen del tipo de alimento; las cantidades más elevadas se encontraron en el queso blando procedente de la leche, producto que presenta un contenido

elevado de este compuesto, pues los organismos requieren de esta sustancia para formar las células en sus primeras etapas de vida.

Tabla 16. Contenido de colesterol en muestras de alimentos

Muestra	Colesterol		RSD, %
	mg/L	mg/100g	
Carne picada	81.1	45.5	2.4
Jamón cocido	55.1	17.5	4.1
Jamón serrano	92.6	30.9	1.3
Queso blando	150.8	50.3	0.5

RSD, desviación estándar relativa (n=3)

5.1.2. Separación de los COPs mediante HPLC en patrones

La separación de los tres óxidos de interés, 25-OH, 7-ceto y 6-ceto, se llevó a cabo mediante HPLC-UV, utilizando la columna C₁₈ tracer Excel (termostatizada a 30 °C) en las condiciones cromatográficas mencionadas en la parte experimental 4.4.7. La fase móvil óptima fue ACN: agua (V:V), 90:10 a un caudal de 1 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL. La **Figura 38** muestra los cromatogramas obtenidos a las dos longitudes de onda (λ) estudiadas; 205 nm para la detección de 25-OH, 7-ceto y 6-ceto, y 238 nm para la detección de 7-ceto, puesto que presentan máximos de absorción a diferentes λ ; se puede observar la separación de los COPs hasta línea base en un tiempo entre 9 y 22 min, siendo su orden de elución, de acuerdo a su disminución de polaridad, 25-OH, 7-Ceto y 6-Ceto. Para la identificación de los COPs se emplearon sus t_R.

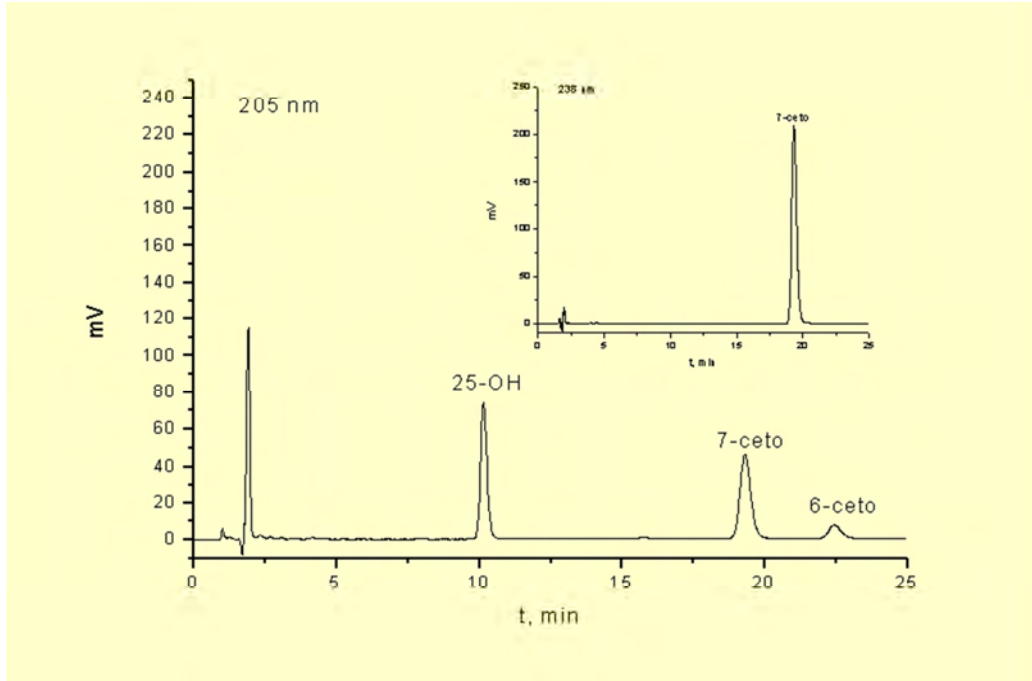


Figura 38. Cromatogramas de una mezcla de patrones de COPs mediante HPLC-UV. [COPs], 25 mg/L a λ , 205 y 238 nm

5.1.3. Características analíticas

Para la cuantificación se ha empleado el método del calibrado del patrón externo. En la **Tabla 17** se muestran los valores obtenidos, área (A), ecuación de calibrado (EC) y coeficiente de determinación (R^2). Los valores de R^2 , en el intervalo 0,9995 - 0,9998, indican el grado de ajuste entre las variables $A/[COPs]$ presentando, por tanto, un comportamiento lineal en el intervalo de concentración entre 1.0 a 100.0 mg/L para 25-OH; de 1.0 a 100.0 para 7-ceto a 205 nm; de 5.0 a 100.0 para 6-ceto y de 0.5 a 100.0. para 7-ceto a 238 nm.

Tabla 17. Calibrados de áreas mediante HPLC

[COPs], mg/L	$A_{\lambda, 205 \text{ nm}}$			$A_{\lambda, 238 \text{ nm}}$
	25-OH	7-ceto	6-ceto	7-ceto
0,5	-----	-----	-----	39,7
1,0	17,3	73,3	-----	73,3
5,0	90,9	-----	19,2	320,9
15,0	267,6	293,9	45,0	1008,9
25,0	404,4	442,8	-----	1561,2
50,0	809,3	851,7	153,7	3077,9
75,0	1196,2	1283,2	229,0	4521,7
100,0	1606,8	1713,8	303,8	6030,9
EC	$y=15,9x+11,5$	$y=16,6x+40,7$	$y=3,0x+2,2$	$y=60,0x+43,7$
R^2	0,9998	0,9995	0,9998	0,9998

A, área, u.a.; λ , longitud de onda; EC, ecuación de calibrado; R^2 , coeficiente de determinación

La **Figura 39** muestra el calibrado obtenido para cada COP a las dos λ estudiadas.

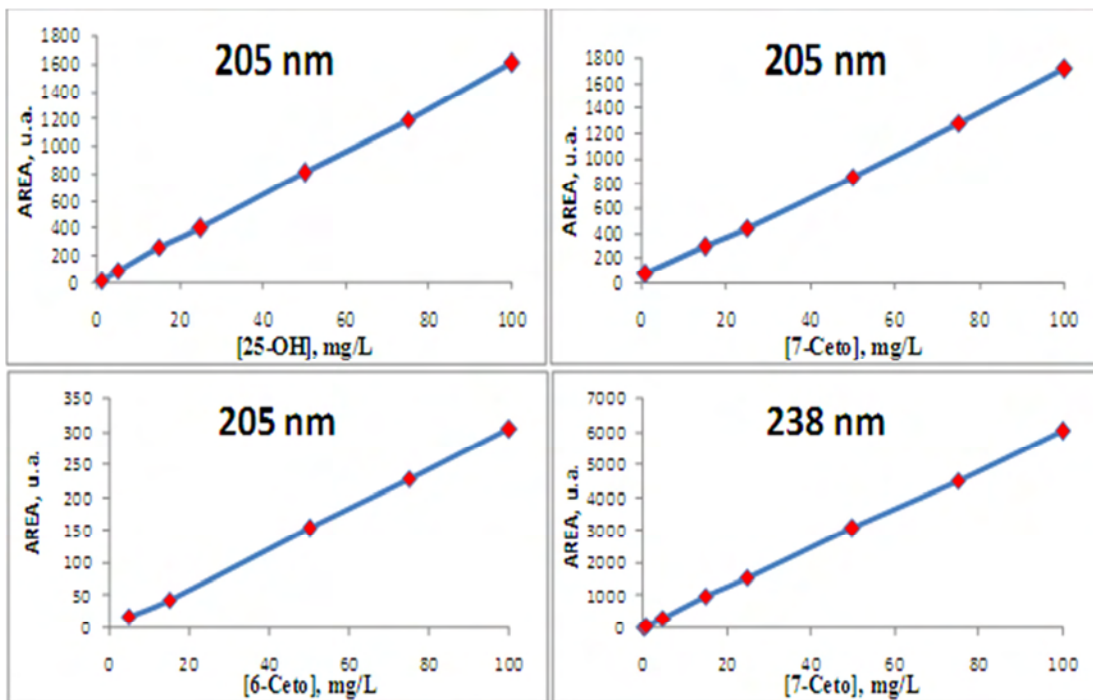


Figura 39. Calibrados de áreas mediante HPLC-UV

La precisión de los COPs respecto de A y t_R se determinó por medio de la repetibilidad evaluada en un mismo día y la reproducibilidad evaluada en tres días diferentes, utilizando disoluciones estándar de **75 mg/L**.

En la **Tabla 18** se presenta los valores obtenidos para la precisión, en términos de repetibilidad, donde se observa que la desviación estándar relativa (RSD) en los diferentes días es inferior a 2% para el parámetro cromatográfico A e inferior a 1.7 % para t_R .

Tabla 18. Evaluación de la repetibilidad de los COPs mediante HPLC-UV

Día		25-OH		7-ceto		6-ceto	
		A	t _R	A	t _R	A	t _R
1		1209.0	9.81	1155.3	18.51	260.7	21.56
		1221.6	10.04	1174.3	19.09	268.6	22.21
		1232.8	10.04	1139.4	19.15	265.5	22.19
		1208.0	10.04	1162.7	19.19	257.7	22.23
		1235.8	10.06	1170.9	19.21	268.2	22.27
	s	12.8	0.11	13.9	0.29	4.8	0.30
	X	1221.3	10.00	1160.5	19.03	264.1	22.09
	RSD	1.0	1.10	1.2	1.55	1.81	1.35
2		1214.9	9.92	1200.0	18.7	229.2	21.72
		1214.9	9.97	1201.7	18.7	218.5	21.77
		1224.7	10.00	1212.7	18.9	218.3	21.90
		1224.5	10.00	1208.6	18.9	223.5	21.91
		1217.7	10.02	1218.2	18.9	223.1	21.97
	s	5.1	0.04	7.5	0.08	4.6	0.10
	X	1219.2	9.98	1208.2	18.8	222.5	21.85
	RSD	0.42	0.39	0.63	0.4	2.0	0.48
3		1192.9	10.12	1220.5	19.25	228.0	22.38
		1192.1	10.13	1214.1	19.30	226.4	22.40
		1200.4	10.12	1213.3	19.27	232.7	22.36
		1188.4	10.09	1215.1	18.93	225.1	21.93
		1214.6	9.91	1205.6	18.61	225.1	21.59
	s	10.4	0.09	5.3	0.30	3.1	0.35
	X	1197.7	10.07	1213.7	19.07	227.5	22.13
	RSD	0.9	0.92	0.44	1.57	1.4	1.63

A, área, u.a; t_R, tiempo de retención, min; s, desviación estándar; X, media y RSD (%), desviación estándar relativa.

Los valores de la precisión en términos de reproducibilidad para estos tres días respecto de A y t_R se muestra en la **Tabla 19**, donde se observa que los valores de RSD son inferiores a 3% en ambos casos, excepto para el 6-ceto el cual presenta un valor de 9.6 %, posiblemente debido a que la absorbancia a 205 nm de este compuesto es baja y al ser el más retenido por la columna proporciona el pico cromatográfico más ancho lo que puede influir en su integración.

Tabla 19. Evaluación de la reproducibilidad mediante HPLC-UV

Día	25-OH		7-ceto		6-ceto	
	A	t_R	A	t_R	A	t_R
1	1221.3	10.00	1160.5	19.03	264.1	22.09
2	1219.2	9.98	1208.2	18.82	222.5	21.85
3	1197.7	10.07	1213.7	19.03	227.5	22.13
s	13.1	0.05	29.3	0.12	22.7	0.15
X	1212.75	10.02	1194.2	18.96	228.0	22.02
RSD	1.08	0.47	2.4	0.64	9.55	0.69

A, área, u.a.; t_R , tiempo de retención, min; X, media; s, desviación estándar; RSD, desviación estándar relativa, %

Para calcular los límites de detección y de cuantificación, se utilizaron las expresiones indicadas en 4.4.7.1. La pendiente se obtuvo a partir de las rectas de calibrado de altura de pico versus concentración usando como blanco el disolvente de las disoluciones estándar, ACN y midiendo el ruido en el intervalo de tiempo al cual emerge el pico (AOAC, 1998).

La **Tabla 20** muestra los valores de LOD y LOQ obtenidos. Los valores de LOD de los COPs indican que el equipo detecta concentraciones por debajo de los mg/L; el compuesto 7-ceto a λ 238 nm es el que presenta menor límite de detección, 0.015 mg/L, siendo el 6-ceto el compuesto menos sensible, 0.360 mg/L.

Tabla 20. Evaluación de LOD y LOQ del método de determinación de COPs mediante HPLC-UV

λ nm	COP	N/b	LOD, mg/L	LOD, ng	LOQ, ng
205	25-OH	0.0287	0.086	1.72	5.75
	7-Ceto	0.0278	0.083	1.66	5.56
	6-Ceto	0.119	0.360	7.20	23.6
238	7-ceto	0.049	0.015	0.3	0.985

b, pendiente del calibrado de alturas, mV*L/mg; N, ruido, mV; LOD, límite de detección, mg/L; LOQ, límite de cuantificación, mg/L

5.1.4. Optimización de preparación de la muestra

El análisis cromatográfico de COPs conlleva serias dificultades debido a la necesidad de aislar muy bajas concentraciones de COPs de grandes cantidades de lípidos y de colesterol. Además, los COPs pueden ser oxidados y degradados durante la etapa de extracción de lípidos (Park et al., 1996; Angulo et al., 1997). Para la elección de esta etapa se realizaron ensayos previos con objeto de seleccionar el procedimiento más adecuado de extracción y purificación de COPs. Se utilizó una muestra de jamón cocido homogeneizada en un mortero de ágata; la muestra una vez pesada fue enriquecida con una disolución mezcla de patrones de COPs y se llevó a cabo la extracción de la fracción lipídica después de un tiempo de contacto de 30 min. Se evaluaron diferentes métodos de extracción; la saponificación directa siguiendo el protocolo descrito por Dionisi et al., (1998) dio lugar a emulsiones difíciles de manejar. Se ensayaron también los procedimientos de preparación de muestra descritos por Folch et al. (1957), Razzazi-Fazeli et al. (2000), Hiesberg y Luf (2000), Petron et al. (2003) y Al-Saghir et al. (2004). Dado que la etapa de lixiviación difería notablemente de unos métodos a otros, en cuanto a la naturaleza y volumen de disolvente, tipo y tiempo de agitación, se llevaron a cabo ensayos en el paso de lixiviación

utilizando distintos tipos de agitación, mecánica, ultrasónica, Ultra-Turrax y vortex, tanto a tiempos cortos como largos, observando que la agitación mecánica a tiempos largos proporcionaba mayor recuperación. Los mejores resultados se obtuvieron mediante el procedimiento de Razzazi-Fazeli, que utiliza cloroformo en la etapa de lixiviación seguido por un paso de limpieza mediante SPE con cartuchos de sílice. En todos los ensayos se utilizó el mismo procedimiento para la limpieza de la muestra y las condiciones cromatográficas descritas en la Parte experimental (4.4.7.).

5.1.4.1. Extracción de la fracción lipídica

El método de lixiviación se optimizó en base al procedimiento de Razzazi-Fazeli et al. (2000) mediante la aplicación de diseños factoriales; en primer lugar, para conocer los factores más importantes implicados en el proceso de lixiviación, se realizó un diseño factorial de screening 2^3 (dos niveles y tres factores) con un punto central, realizado en dos bloques. Los factores fueron tiempo de extracción, volumen de disolvente y tiempo de agitación ultrasónica previo a la agitación mecánica utilizada y como respuesta la recuperación, R,%. Los factores, niveles y su dominio experimental se presentan en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Factores, dominio experimental y niveles del diseño factorial del screening 2^3

FACTORES	DOMINIO EXPERIMENTAL		
	NIVEL (-)	PUNTO CENTRAL	NIVEL (+)
t_u , min	0	5	10
V_{CHCl_3} , mL	50	70	90
t_a , h	14	18	22

t_u , tiempo agitación ultrasonidos, min; V_{CHCl_3} , volumen de extractante, mL; t_a , tiempo de agitación, h

La respuesta del diseño de screening (porcentaje de recuperación) indicó que los factores más influyentes fueron el tiempo de agitación mecánica y el volumen de disolvente. El

tiempo de agitación mediante ultrasonido adicionado previamente al tiempo de agitación mecánica no fue significativo, por lo que se eliminó este paso en el proceso de lixiviación. Para conocer los valores óptimos de los factores significativos se aplicó un diseño factorial 3^2 , cuyos factores, niveles y dominio experimental se muestran en la **Tabla 22**. Asimismo, se consideró el porcentaje de recuperación como respuesta.

Tabla 22. Factores, dominio experimental y niveles del diseño factorial de superficie de respuesta 3^2

FACTORES	DOMINIO EXPERIMENTAL		
	NIVEL (-)	NIVEL 0	NIVEL (+)
V_{CHCl_3} , mL	40	70	100
t_a , h	6	12	18

V_{CHCl_3} , volumen de extractante, mL; t_a , tiempo de agitación, h

La **Tabla 23** presenta los valores de las respuestas obtenidas para cada COP estudiado, en términos de recuperación, al llevar a cabo el análisis del diseño mediante el programa Statgraphics.

Tabla 23. Respuestas del diseño factorial 3^2

Experimento Nº	Bloque	Factores		R, %		
		V, mL	t, h	25-OH	7-ceto	6-ceto
1	1	70	6	60	62	51
2	1	40	6	48	51	46
3	1	70	18	81	77	84
4	1	100	6	52	62	60
5	1	40	18	62	55	58
6	1	100	18	79	71	77
7	1	70	12	77	75	80
8	2	70	6	58	63	53
9	2	40	6	50	55	44
10	2	70	18	83	81	85
11	2	100	6	50	62	65
12	2	40	18	55	54	60
13	2	100	18	75	68	75
14	2	70	12	79	77	80

R, recuperación, %

La **Figura 40** presenta los diagramas de Pareto obtenidos para los COPs, donde se observa que tanto el tiempo de agitación, como el volumen de extractante ejercen una influencia positiva, al nivel de significación 0.05, sobre la respuesta; se observa, además, la influencia significativa negativa sobre la respuesta de la interacción del término cuadrático lo que explica la curvatura de los gráficos de superficie. En la **Figura 41** se presentan los gráficos de superficie obtenidos para los COPs mediante HPLC aplicando el diseño factorial 3^2 . Un mayor tiempo de extracción dio lugar a una mejor recuperación, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre 70 y 90 ml. Por lo tanto, un volumen de

extracción de 70 ml de cloroformo y 18 h de tiempo de agitación fueron elegidas como las mejores condiciones.

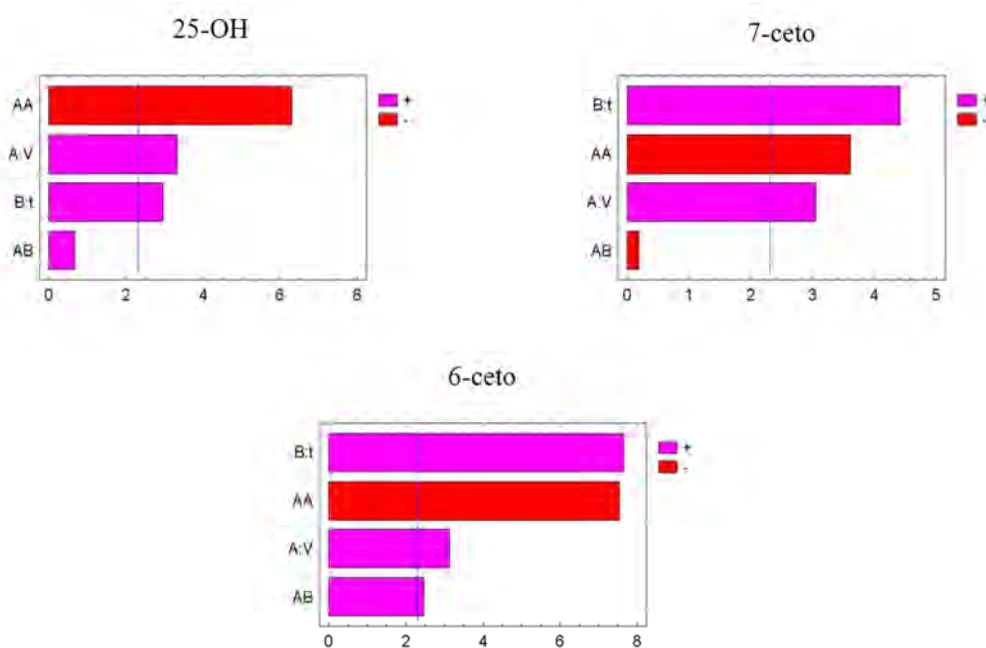


Figura 40. Gráficas de Pareto estandarizadas para el diseño factorial 3^2

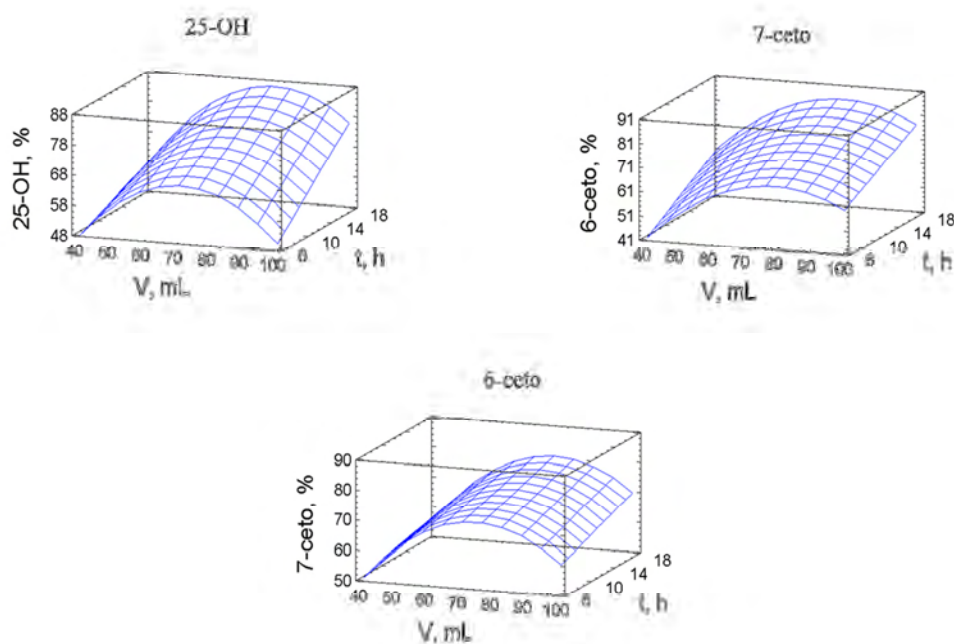


Figura 41. Gráficas de superficie de respuesta estimada para el diseño factorial 3^2

En la **Tabla 24** se presenta los coeficientes de regresión y la ecuación del modelo matemático ajustado para cada COPs aplicando el diseño factorial 3^2 .

Tabla 24. Coeficientes de regresión y ecuación del modelo ajustado para COPs aplicando el diseño factorial 3^2 .

COP	Ecuación del modelo
25-OH	$R = -31,86 + 2,63*V + 0,12*t - 0,019*V^2 + 0,021*V*t$
7-ceto	$R = -29,07 + 2,65*V + 0,24*t - 0,018*V^2 + 0,0062*V*t$
6-ceto	$R = -47,13 + 2,63*V + 1,82*t - 0,017*V^2 - 0,0028*V*t$

R, recuperación, %

En resumen, respecto del método de Razzazi y Fazeli (2000) que aplicaron la metodología completa de extracción y clean up a muestras más sencillas como es la de polvo de huevo, cabe comentar las siguientes modificaciones: por lo que se refiere a la extracción de lípidos: la agitación se realizó mediante vibrador mecánico durante 18 horas (prácticamente una noche) con el fin de asegurar que la extracción en las muestras complejas de alimentos fuera completa; se utilizó un volumen de extractante de 70 mL de $CHCl_3$, cuando se partió de 5 g (muestras de carne picada, jamón cocido y queso) y de 30 mL de $CHCl_3$ para 3 g de jamón serrano frente a 30 mL para 1 g de la muestra de polvo de huevo. La evaporación con rotaevaporador se llevó a cabo a una T algo más baja, 40 °C frente a 45 °C empleada en dicho método, para minimizar riesgos de formación de COPs a partir del colesterol. En cuanto a la etapa de clean up se utilizó el mismo procedimiento.

5.1.4.2. Clean up y preconcentración de COPs mediante SPE

El extracto lipídico obtenido fue disuelto en 6 mL de hexano, los COPs, se retuvieron en un cartucho de sílica al hacer pasar el extracto lipídico en Hex. a su través, aplicando el método descrito en 4.4.6.3.1., referido por Razzazi-Fazeli, E. et al. (2000), el cual elimina la parte lipídica de la muestra lavando el cartucho con diferentes volúmenes de mezclas disolventes Hex:Et₂O en distintas proporciones. Se eliminó el disolvente del cartucho haciendo pasar aire a vacío durante 20 min utilizando el sistema para evaporar pequeños volúmenes de disolventes a T controlada descrito en 4.3.2.2.3., el cual permite la evaporación simultánea en ocho muestras. Los COPs fueron eluidos del cartucho con 10 mL de acetona (5 x 2 mL) que fue recogida en un vial ámbar de 12 mL; se modificó respecto al método de Razazy Fazely el volumen de elución de COPs a 10 mL de acetona para garantizar la elución completa de estos compuestos. La acetona fue evaporada con flujo de Argón a 40 °C hasta la obtención de un residuo el cual fue disuelto en ACN.

5.1.5. *Determinación de COPs mediante HPLC en muestras de alimentos*

El contenido de 25-OH, 7-ceto y 6-ceto fue determinado en diferentes muestras lipídicas de alimentos, carne picada, jamón cocido, jamón serrano y queso fresco, usando el método indicado en 4.4.6.1, llevando a cabo el clean up de la muestra según se describe en 4.4.6.3.1. y aplicando el método de separación cromatográfica 4.4.7. En todos los casos se verificó su reproducibilidad entre días; la identificación de los COPs en las muestras se llevó a cabo por comparación de los t_R con los de una disolución patrón mezcla de COPs y/o con muestras enriquecidas. La cuantificación se realizó mediante el calibrado externo, 4.4.7.1; la cuantificación de 25-OH y 6-ceto fue llevada a cabo a 205 nm y la del 7-ceto fue realizada a

238 nm, ya que a esta λ , los valores de las áreas de pico aumentan por un factor de cuatro, proporcionando, por tanto, un aumento notable de sensibilidad.

Para las muestras de queso blando, teniendo en cuenta el grado de complejidad de la matriz, se incluyó la filtración del extracto en ACN, obtenido para su inyección en el sistema cromatográfico, con filtro de membrana de teflón, de tamaño de poro de 0.50 μm .

5.1.5.1. Carne picada

En la **Figura 42** se presenta el cromatograma de las muestra sin irradiar a las dos λ , 205 y 238 nm, donde se observa únicamente los COPs 25-OH (140 ng/g) y 7-ceto (190 ng/g) con valores de RSD inferiores a 4 %, no detectándose 6-ceto. La existencia de COPs en estas muestras da cuenta de la complejidad de las matrices cárnicas ya que estos COPs pre-existentes estarán sujetos al igual que el colesterol a procesos de degradación por las

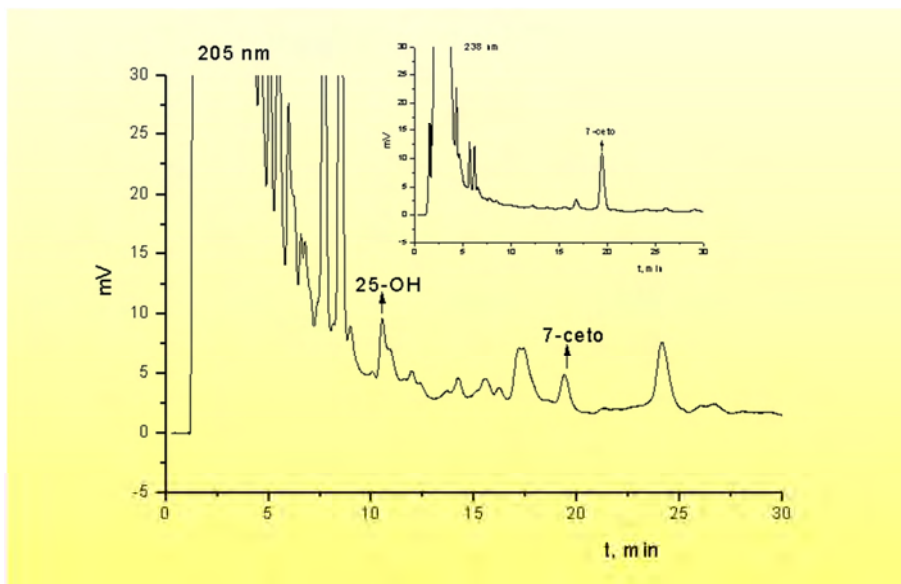


Figura 42. Cromatogramas mediante HPLC-UV de carne picada sin irradiar, a 205 y 238 nm

distintas vías explicadas en la revisión bibliográfica. Otros estudios mostraron la presencia de una cantidad de 7-ceto significativa en muestras de carne fresca (Lercker y Rodriguez-Estrada, 2000; Rodriguez-Estrada et al.,1997).

5.1.5.2. Jamón cocido

En las muestras de jamón cocido sin irradiar no se detectaron ninguno de los COPs estudiados, posiblemente su formación no se vea favorecida, puesto que esta muestra presenta bajo contenido de grasa (5.2 %) y colesterol (19.6 mg/100 g). En la **Figura 43** se presenta los cromatogramas obtenidos a 205 y 238 nm de una muestra enriquecida con una disolución de COPs.

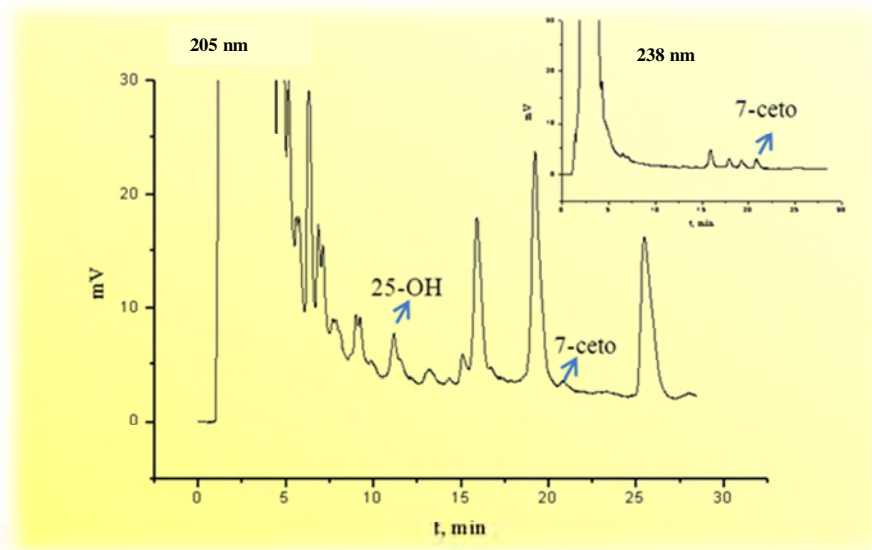


Figura 43. Cromatogramas mediante HPLC-UV de jamón cocido sin irradiar enriquecido con 25 mg/L (1:1) a 205 y 238 nm

5.1.5.3. Jamón serrano

Los cromatogramas obtenidos para las muestras de jamón serrano a las dos λ se presentan en la **Figura 44**; estas muestras generan cromatogramas bastante complejos, presentando al inicio del cromatograma una gran cantidad de picos, lo cual indica que corresponden a compuestos de una polaridad relativamente alta dentro de los cuales se encuentran los ácidos grasos; estos compuestos pueden coeluir con los COPs, teniendo en cuenta que la limpieza de las muestras se realiza mediante SPE fase normal, lo cual hace más difícil la integración y cuantificación de los picos. El contenido de 7-ceto detectado fue de 110 ng/g con un valor de RSD de 3.6 %, sin embargo, su contenido fue menor que el encontrado por Petron et al. (2003) en muestras de jamón ibérico (570-710 ng/g).

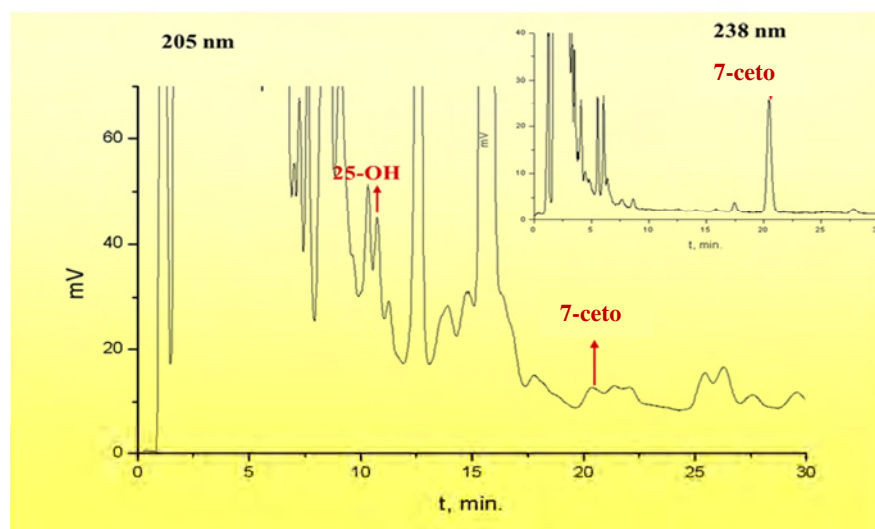


Figura 44. Cromatogramas HPLC–UV de muestras de jamón serrano sin irradiar enriquecidas con 25 mg/L (1:1); a 205 y 238 nm

5.1.5.4. Queso blando

Una vez procesadas e inyectadas las muestras de queso blando sin irradiar, se verificó la reproducibilidad entre días de los cromatogramas y se evidenció la ausencia de los COPs en las muestras, por lo que éstas se enriquecieron con una disolución patrón de COPs de 25

mg/L en la proporción 1:1 con fines de comprobación y se compararon con muestras de queso blando sin enriquecer. La **Figura 45** presenta los cromatogramas obtenidos a 205 y 238 nm de la muestra de queso enriquecida.

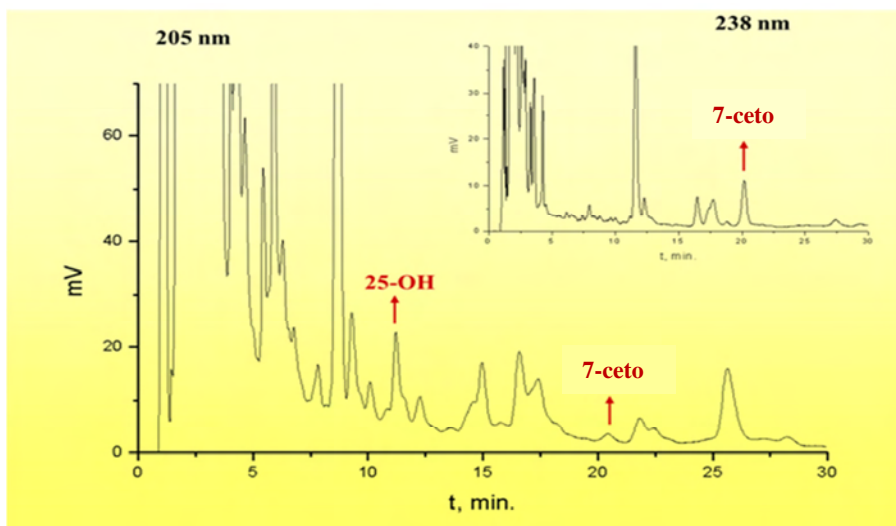


Figura 45. Cromatogramas HPLC-UV de muestras de queso sin irradiar enriquecida con 25 mg/L (1: 1) a 205 nm y 238 nm

5.1.6.. Validación del método de determinación de COPs mediante HPLC

La exactitud del método de HPLC para la determinación de COPs se evaluó mediante estudios de recuperación; las muestras se enriquecieron con una disolución de la mezcla de COPs a tres niveles de concentración diferentes 0.2, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/g}$. Para calcular la precisión del método en términos de repetibilidad se realizaron cuatro réplicas para obtener la precisión intra-día. La variación entre días se evaluó realizando ensayos durante cinco días hábiles consecutivos, después de enriquecer la muestra con 2.0 $\mu\text{g/g}$. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 25**; el valor medio de recuperación obtenido fue entre 56 y 94% al nivel de concentración de 0.2 $\mu\text{g/g}$. A los niveles de concentración de 1.0 y 2.0 $\mu\text{g/g}$, las recuperaciones fueron superiores al 62 y 68%, respectivamente. En general, la

precisión intra-día e inter-día mostraron valores de RSD inferiores a 10%, excepto para las muestras de jamón cocido los cuales estuvieron en el intervalo 6.7 a 13.1%. El jamón serrano presentó valores de RSD intra-día superior al 10% en el nivel de concentración menor (0.2 µg/g). Aunque este método requiere tiempo notable para la extracción de COPs, en comparación con otros métodos descritos anteriormente es simple y suave, y minimiza la formación de artefactos.

Tabla 25. Precisión y exactitud del método de HPLC para analizar COPs en muestras de alimentos

Alimento	COP	R, %			RSD intra-día ^a , %			RSD inter-día ^b , %
		0.2 ^c	1.0	2.0	0.2	1.0	2.0	2.0
Jamón cocido	25-OH	73.2 ^d	74.1	85.3	11.1	11.2	7.2	9.0
	7-ceto	85.8	77.1	84.7	12.7	12.1	10.2	10.3
	6-ceto	81.0	80.1	81.9	13.7	13.1	6.7	9.2
Jamón serrano	25-OH	90.8	70.6	75.8	13.7	8.9	2.9	4.5
	7-ceto	72.1	85.3	87.1	1.6	4.9	3.4	3.5
	6-ceto	66.8	71.6	81.1	18.4	9.9	4.2	5.2
Carne picada	25-OH	94.1	86.0	96.3	5.8	5.2	2.6	7.5
	7-ceto	79.8	73.3	89.3	2.5	8.4	3.4	3.3
	6-ceto	56.0	89.9	94.6	3.2	5.2	5.1	6.3
Queso	25-OH	90.8	68.9	85.0	9.2	7.3	3.7	5.2
	7-ceto	92.7	86.4	83.1	2.3	5.0	3.8	4.9
	6-ceto	83.4	62.3	68.3	9.5	7.6	3.0	3.1

RSD, desviación estándar relativa ^a n=4; ^b n=5; ^c niveles de concentración de enriquecimiento de las muestras, 0.2, 1.0 y 2.0 µg/g; ^d valores medios

5.1.7. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de alimentos. Estudios estadísticos

Puesto que el colesterol puede ser oxidado durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, dando lugar a COPs, fue estudiada la influencia de las dosis de irradiación de 0 a 8 kGy en la formación de COPs mediante ANOVA al 95 % de probabilidad. La **Tabla 26** muestra las concentraciones medias y valores RSD de 25-OH y 7-ceto en las muestras no irradiadas e irradiadas.

Tabla 26. Contenido de COPs (ng/g) y su RSD (%) en alimentos RTE

Muestra	COP	Dosis de irradiación, kGy													
		0		1		2		3		4		6		8	
		X	RSD	X	RSD	X	RSD	X	RSD	X	RSD	X	RSD	X	RSD
JC	25-OH	nd		nd		nd		nd		nd		nd		27.8	2.4
	7-ceto	nd		nd		2.9	9.7	3.3	4.1	4.1	2.5	9.1	1.3	13.3	4.8
JS	25-OH	nd		254.2	2.5	na		na		292.3	6.9	373.0	8.1	361.4	6.5
	7-ceto	110.1	3.6	320.6	7.2	na		na		296.8	3.7	501.7	2.1	467.2	2.9
CP	25-OH	139.2	3.9	na		177.9	12.8	232.3	6.8	224.2	2.5	193.3	1.0	342.8	1.6
	7-ceto	193.2	3.1	na		203.6	4.9	181.9	7.3	295.1	1.7	269.4	11.1	278.4	3.2
QB	25-OH	nd		293.0	5.6	320.1	9.1	na		379.2	5.8	556.1	6.6	562.1	7.1
	7-ceto	nd		130.3	7.3	134.0	3.6	na		139.2	1.0	203.0	11.5	196.0	3.5

X, valores medios, ng/g; RSD, Desviación estándar relativa, %; nd, no detectado; na, no analizado

El contenido de COPs obtenido a partir de los cromatogramas de las muestras irradiadas también presentó, en general, una precisión inferior al 10%. En el caso de la muestra de queso, el 25-OH aparece junto con otro compuesto, no resolviéndose hasta línea base, lo cual hizo difícil su integración; su identificación se llevó a cabo inyectando una disolución obtenida mezclando el extracto de la muestra con una disolución de COPs de 25 mg/L en la relación 1:1.

Los cromatogramas a 238 nm confirmaron la presencia del compuesto 7-ceto.

A modo de ejemplo, se presentan en la **Figura 46** los cromatogramas de los COPs de la muestra de carne picada sin irradiar e irradiada a la dosis de 8 kGy a las longitudes de onda, 205 y 238 nm; además, se compara, en la misma figura, con el cromatograma de un patrón de 25 mg/L.

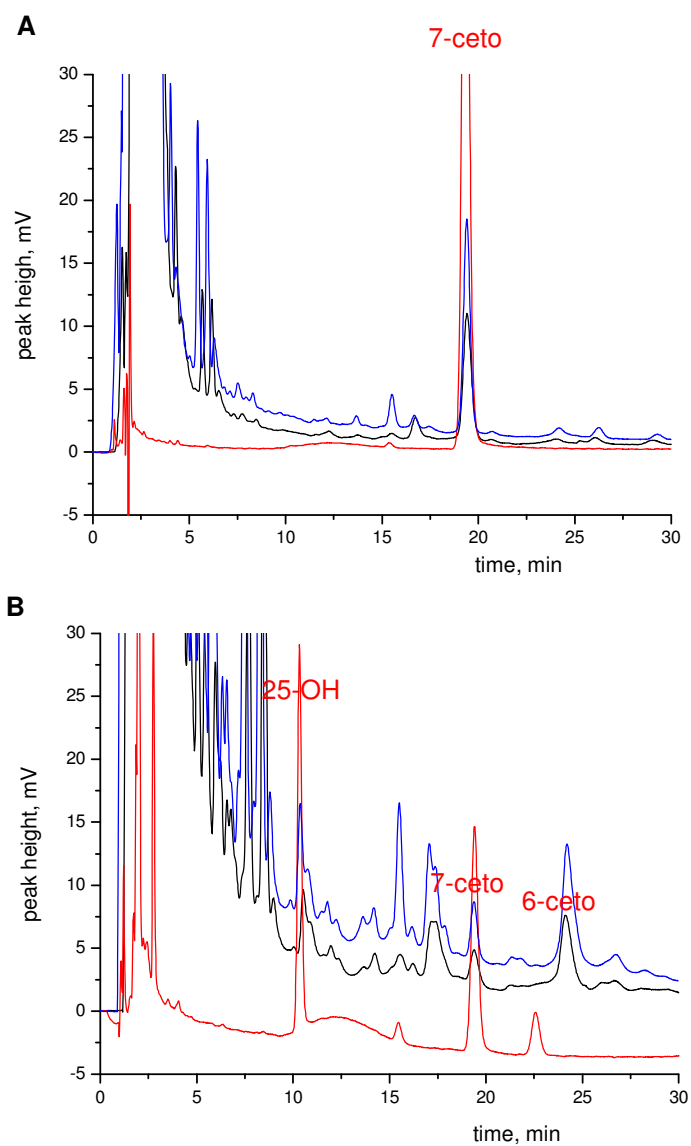


Figura 46. Comparación de cromatogramas de HPLC-UV. (—), patrones a 25 mg/L; (—), carne picada sin irradiar; (—), carne picada irradiada a 8 kGy. A) 238 nm; B) 205 nm

5.1.7.1. Análisis de la varianza, ANOVA

Para detectar posibles efectos debido al proceso de irradiación, se compararon los resultados de COPs obtenidos en las muestras no irradiadas e irradiadas a distintas dosis mediante un test ANOVA de un factor; en términos generales, los contenidos de COPs fueron superiores a aquellos obtenidos con las muestras no irradiadas; el test ANOVA proporcionó diferencias significativas entre las concentraciones medias de COPs, indicadas por los valores de α inferiores a 0.05. Se comenta el estudio realizado para cada muestra individualmente.

5.1.7.1.1. *Carne picada*

Los resultados obtenidos para las muestras de carne no irradiada e irradiadas a 2, 3, 4, 6 y 8 kGy se presentan en la **Tabla 27**. Se observa un incremento de los COPs, excepto para las muestras de 4 y 6 kGy para 25-OH y de 3 y 4 kGy para 7-ceto que presentan un valor inferior respecto a las muestras de menor irradiación.

Tabla 27. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de carne picada

Dosis irradiación , kGy	25-OH, ng/g	7-ceto, ng/g
0	136.6	190.7
0	145.4	200.0
0	135.6	188.9
	189.9	214.7
2		
2	151.6	195.8
2	192.1	200.2
	238.7	196.6
3		
3	244.0	178.1
3	214.3	171.0
	230.0	290.0
4		
4	223.7	300.0
4	219.0	295.2
	192.6	301.7
6		
6	192.2	242.7
6	195.0	263.8
	338.4	271.6
8		
8	341.0	288.5
8	349.2	275.0

Una comparación mediante ANOVA indica que el contenido de los COPs, 25-OH y 7-ceto, se incrementa al aumentar la dosis de irradiación. La **Figura 47 A** muestra los intervalos de Bonferroni's (95.0 %) y los contenidos medios para el 25-OH; estos contenidos se incrementaron moderadamente cuando las dosis de irradiación aumenta de 2 a 6 kGy, mientras los contenidos más altos fueron obtenidos a 8 kGy; por otro lado, la dosis de irradiación de 3 kGy no incrementa significativamente el contenido de 7-ceto, la concentración más alta fue detectada a 4 kGy y las concentraciones obtenidas a las dosis 4, 6 y 8 kGy fueron similares, **Figura 47 B**; Nam et al. (2001) encontraron cantidades considerables de COPs en carne de res fresca irradiada, estos autores estudiaron la oxidación del colesterol en este alimento irradiado con diferentes envases y variando los tiempos de

almacenamiento, detectando la existencia de un efecto sinérgico entre la irradiación y la oxidación del colesterol.

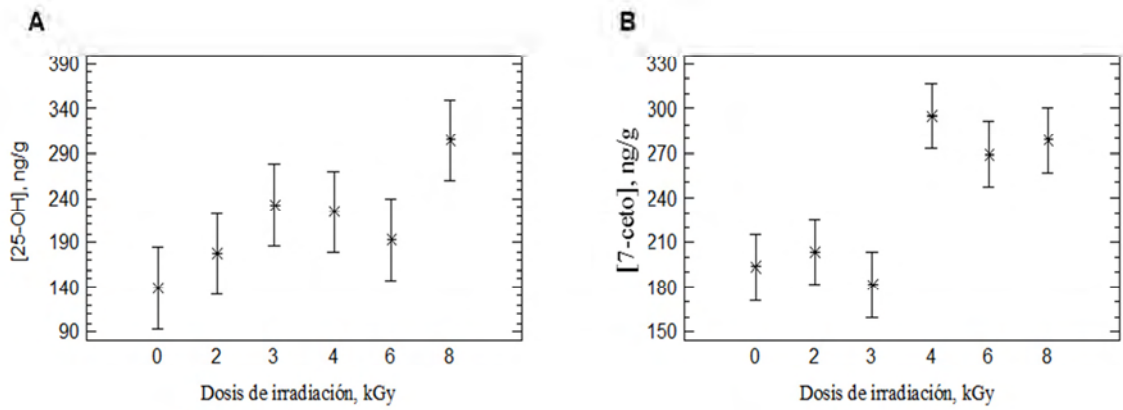


Figura 47. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en muestras de carne picada. A) 25-OH; B) 7-ceto

5.1.7.1.2. Jamón cocido

En estas muestras se presentó el nivel más bajo de COPs, probablemente debido a que su contenido de lípidos es el menor. En la **Tabla 28** se presentan los valores obtenidos del 25-OH y 7-ceto para muestras de jamón cocido sin irradiar y muestras irradiadas a distintas dosis (2 a 8 kGy).

Tabla 28. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de jamón cocido

Dosis irradiación, kGy	25-OH, ng/g	7-ceto, ng/g
0	nd	nd
0	nd	nd
0	nd	nd
0	nd	nd
	nd	2.7
2		
2	nd	2.8
2	nd	3.2
	nd	3.3
3		
3	nd	3.4
3	nd	3.2
	nd	4.6
4		
4	nd	4.1
4	nd	4.0
4	nd	3.9
	nd	9.0
6		
6	nd	9.2
6	nd	9.1
	27.4	15.5
8		
8	28.8	15.3
8	27.7	11.2
8	27.4	12.2

Se observa que el 25-OH se encontró por debajo del límite de cuantificación en todas las dosis de irradiación excepto a 8 kGy (27.8 ng/g) que fue mayor que el contenido de 7-ceto (13.5 ng/g) a la misma dosis de irradiación. El COP 7-ceto fue detectado a 2 kGy aumentando su contenido con la dosis de irradiación, **Figura 48**. Cabe resaltar que el 7-ceto es el compuesto que más comúnmente se encuentra en los alimentos.

En cuanto al uso de esta irradiación para la desinfección microbiana en muestras RTE de jamón cocido Cabeza et al. (2007) llegaron a la conclusión de que con el tratamiento entre 1 y 2.5 kGy se obtiene la inocuidad de los alimentos cuando el objetivo es eliminar la *Listeria*

monocytogenes de acuerdo a las directrices formuladas por la UE y los EE.UU. Como se ha indicado por los autores, estas dosis no producen cambios en las propiedades sensoriales de los alimentos que puedan ser detectados por los consumidores salvo que se detectó un ligero olor cuando se aplicaron 2.5 kGy.

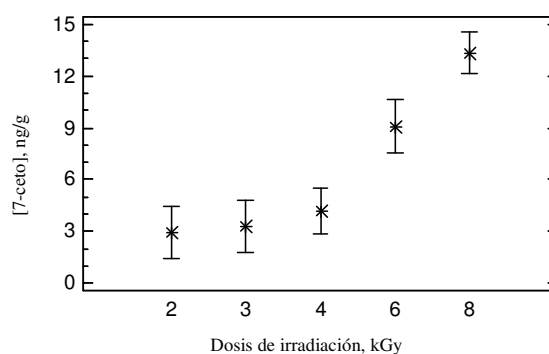


Figura 48. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en jamón cocido para el 7-ceto

5.1.7.1.3. Jamón serrano

Los resultados obtenidos para las muestras de jamón serrano no irradiadas e irradiadas a 1, 4, 6 y 8 kGy se presentan en la **Tabla 29**. En estas muestras se detectó y cuantificó el 7-ceto; el compuesto 25-OH se detectó únicamente en las muestras irradiadas lo cual evidencia que el proceso de irradiación participa en la formación de este compuesto

Tabla 29. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de jamón Serrano

Dosis irradiación , kGy	25-OH, ng/g	7-ceto, ng/g
0	nd	115.5
0	nd	106.0
0	nd	109.2
0	nd	109.6
	257.8	334.8
1		
1	247.0	299.1
1	240.8	345.8
1	271.1	302.7
	307.9	299.0
4		
4	311.4	285.4
4	271.5	291.6
4	278.5	311.3
	407.8	505.5
6		
6	334.4	500.8
6	376.3	513.1
6	373.3	487.6
	334.4	482.1
8		
8	376.3	464.2
8	373.3	455.4

Se obtuvieron concentraciones de 7-ceto entre 106 y 513 ng/g. Se observó un incremento no lineal con la dosis de irradiación, alcanzando los valores más altos a 6 kGy; los contenidos en las muestras irradiadas fueron de 240 y 408 ng/g de muestra.

El análisis de los intervalos de Bonferroni's (95.0 %) y las concentraciones medias del 25-OH mostró que las concentraciones a las dosis entre 1 y 4 kGy fueron significativamente más bajas que las obtenidas a las dosis entre 6 y 8 kGy (**Figura 49 A**). Un comportamiento similar fue observado para el 7-ceto; la irradiación induce a un incremento significativo del 7-ceto obteniéndose concentraciones similares a las dosis entre 1 y 4 kGy mientras que los niveles más altos fueron detectados a las dosis de irradiación entre 6 y 8 kGy (**Figura 49 B**). Otros autores (Hoz et al., 2008) estudiaron los mismos alimentos RTE para optimizar el

tratamiento de esterilización microbiana y concluyeron que una irradiación de 1.12 kGy es suficiente para lograr este objetivo de acuerdo al criterio de la USDA.

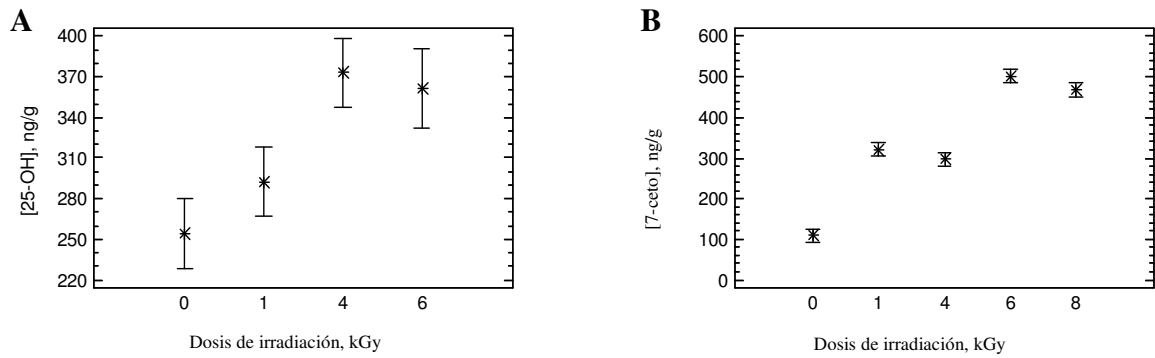


Figura 49. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en jamón serrano. A) 25-OH; B) 7-ceto

5.1.7.1.4. Queso blando

Se determinaron los COPs en muestras de queso sin irradiar e irradiadas a diferentes dosis de irradiación, 1, 2, 4, 6 y 8 kGy. Se realizaron 4 réplicas (preparación de muestra y medida), por cada dosis de irradiación, los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de queso blando

Dosis irradiación , kGy	25-OH, ng/g	7-ceto, ng/g
0	nd	nd
0	nd	nd
0	nd	nd
0	nd	nd
1	311.6	137.2
1	280.0	119.4
1	287.5	134.2
2	277.9	140.5
2	326.0	131.3
2	331.7	129.5
2	345.0	134.6
4	356.9	140.4
4	396.2	138.9
4	364.1	139.0
4	399.6	138.6
6	596.1	173.7
6	578.0	220.8
6	524.8	222.6
6	525.4	195.0
8	605.3	186.4
8	557.7	202.2
8	509.7	195.4
8	575.6	199.8

Cada COP se identificó en el cromatograma por su tiempo de retención correspondiente, si bien se corroboró inyectando una muestra enriquecida con una disolución patrón mezcla de los COPs de 25 mg/L, en la relación 1:1.

Las concentraciones de los COPs en las muestras de queso se presentan en la Tabla 30; no se detectaron los COPs en las muestras de queso no irradiadas; sin embargo, en todas las muestras irradiadas desde 1 a 8 kGy se observa la presencia de 25-OH y 7-ceto no obteniendo en ninguna muestra la presencia de 6-ceto.

Para el 25-OH se detectan valores hasta de 605 ng/g de muestra en las muestras de 8 kGy; sin embargo, no existe una relación lineal entre las dosis de irradiación y la concentración de este compuesto. El valor de concentración más elevado para el 7-ceto fue de 223 ng/g de muestra en las muestras de 6 kGy; de forma análoga, que en el caso del 25-OH, no se obtiene una relación lineal entre las dosis de irradiación y la concentración para este compuesto.

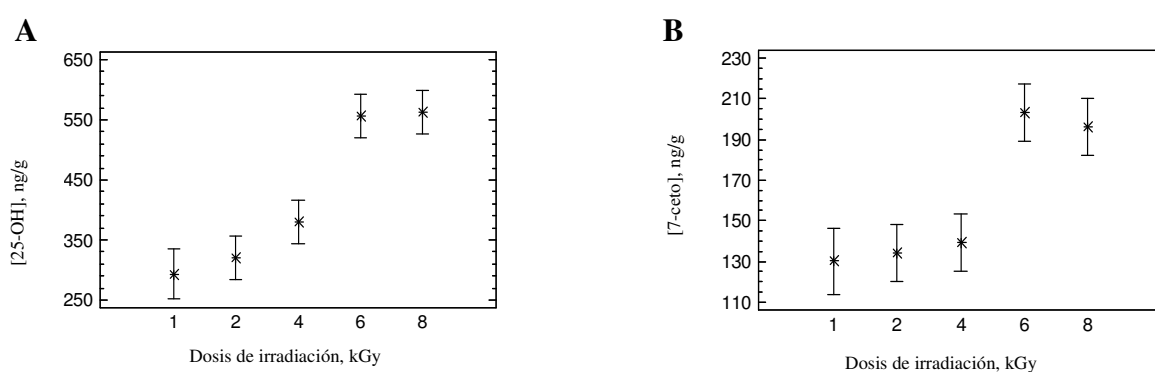


Figura 50. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en queso blando A) 25-OH; B) 7-ceto

Estas muestras una vez se irradian producen grandes cantidades de 25-OH (hasta de 408 ng/g) siendo más altas las del 7-ceto (455 ng/g). El contenido de 25-OH a bajas dosis de irradiación, 1 y 2 kGy, fue similar que a 4 kGy, y se incrementa considerablemente a 6 y 8 kGy (**Figura 50 A**); por otro lado, los contenidos de 7-ceto encontrados en las muestras irradiadas a las dosis de 1 y 4 kGy fueron similares y significativamente más bajos que los encontrados a las dosis de 6 y 8 kGy (**Figura 50 B**). En un estudio de queso cheddar irradiado con E-beam, Blank et al. (1992) encontraron que una dosis baja, 0.95 kGy, fue suficiente para eliminar contaminación microbiana; sin embargo, existen evidencias de que no solamente el proceso de irradiación puede generar COPs en productos lácteos; la

temperatura es otro factor que puede desencadenar la formación de estos compuestos (Nourooz-Zadeh et al. 1988).

Se puede resumir que el contenido de los COPs, en general, se incrementa a medida que aumenta la dosis de irradiación, no encontrándose una relación lineal entre estas dos variables, reseñando que de acuerdo a estudios de toxicidad referidos en la bibliografía (Bösinger et al., 1993; Yin et al., 2000 y Zanardi et al., 2009), las concentraciones de 25-OH y 7-ceto encontradas en alimentos enlatados fueron al menos de un orden de magnitud más bajo que aquellas que producen efectos tóxicos en experimentos realizados in vivo e in vitro. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, la técnica de irradiación E-beam podría ser útil para de higienización de alimentos RTE envasados al vacío.

5.1.7.2. Análisis de correlación

Los valores de los coeficientes de correlación lineal de Pearson (**Tabla 31**) presentan para cada par de variables valores próximos a cero, lo que indica que no existe correlaciones entre irradiación y los COPs 25-OH y 7-ceto. Estos resultados vienen corroborados por los valores de $\alpha < 0.05$ que indican que existe diferencias significativas entre cada par de variables.

Tabla 31. Matriz de correlación con los datos de irradiación de las muestras analizadas mediante HPLC

	Dosis irradiación	25-OH	7-ceto
Dosis irradiación		0.4322 0.0001 ^a	0.3272 0.0027
25-OH	0.4322 0.0001		0.6564 0.0000
7-ceto	0.3272 0.0027	0.6564 0.0000	

^a valores de α

Cabe indicar que en este caso en que no existe correlación entre las variables en estudio, no es posible aplicar un PCA.

La **Figura 51** presenta los gráficos de dispersión de los parámetros medidos, en los que se observa que no existe linealidad entre los pares de variables mostrados, corroborando así los datos encontrados en la **Tabla 30**.

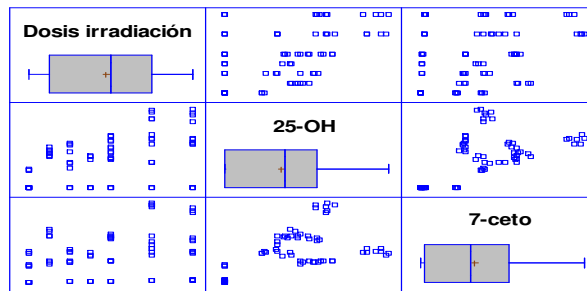


Figura 51. Gráfica de dispersión de la matriz de correlación con los datos de irradiación de las muestras analizadas mediante HPLC

5.2. ANÁLISIS DE COPS MEDIANTE GC

5.2. Análisis de COPs mediante GC

Se estudiaron aquellos COPs que más frecuentemente se encuentran en los alimentos, 7β -OH, α -epóxido, β -epóxido, triol, 7-ceto y 25-OH, además del 6-ceto. El análisis de estos compuestos en muestras de alimentos por GC se realizó según se indica en 4.4.12. El procedimiento requiere la aplicación de distintas etapas de preparación de la muestra, extracción de la fracción lipídica y clean up de la muestra de COPs y, además, la etapa de derivatización para transformar los analitos en compuestos más volátiles, antes de su inyección en el cromatógrafo de gases. Recordando la aplicación de la metodología a muestras de distinta naturaleza, se realizó, en primer lugar, el análisis de distintos parámetros característicos de los alimentos RTE en muestras de uso frecuente en la alimentación tales como, carne picada, jamón cocido, jamón serrano, queso fresco y salmón ahumado, las cuales se habían empaquetado a vacío y conservado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.1. Determinación de los parámetros característicos de las muestras

5.2.1.1. Agua

El contenido de agua fue determinado pesando unos 3 g de muestra y siguiendo el procedimiento indicado en 2.4.7. En la **Tabla 32** se presenta el porcentaje de agua en las muestras analizadas; los valores obtenidos estuvieron en el intervalo de 29 a 72 mg de agua por cada 100 mg de muestra, encontrándose su RSD comprendido en el intervalo 1.6 a 7 %.

Tabla 32. Contenido de agua en muestras de alimentos

Muestra	^a Agua, mg/100 g	^b RSD, %
Carne Picada	28.9	3.5
Jamón Cocido	72.4	1.6
Jamón Serrano	36.8	4.2
Queso Blando	40.3	7.0
Salmón Ahumado	62.3	2.6

^a Valor medio; ^bRSD, desviación estándar relativa (n=3)

5.2.1.2. Lípidos

En primer lugar, el contenido lipídico se determinó en muestras de carne picada mediante ASE (4.4.6.2.), usando como disolvente Et.P, y el resultado se comparó con el obtenido mediante el método de lixiviación que utiliza CHCl_3 (4.4.6.1.). En la **Tabla 33** se muestra los resultados obtenidos; el contenido por ASE fue menor que aquel obtenido mediante lixiviación; posiblemente porque el CHCl_3 es un disolvente más polar que el Et.P, y en el extracto lipídico pueden estar presentes otros compuestos, a nivel de trazas, con polaridades similares al CHCl_3 , como proteínas e hidratos de carbono; este efecto fue evidente, ya que los extractos en CHCl_3 presentaban aspecto más sucio que los extractos en Et.P. En ambos casos se obtuvieron resultados reproducibles.

Los extractos más limpios obtenidos mediante ASE, junto con el corto tiempo requerido para su obtención, llevaron a plantear el posible uso de esta técnica de extracción de lípidos para llevar a cabo la determinación posterior de COPs en todas las muestras de alimentos, en vez de utilizar la técnica de lixiviación, empleada habitualmente.

Tabla 33. Contenido de lípidos en muestras de carne picada

Método	$w_{\text{lípido}}$, g	w_{muestra} , g	Lípidos, %	\bar{x} , %	RSD, %
ASE	0.3102		10.3		
	0.3210	3.00	10.7	10.4	2.6
	0.3054		10.2		
Lixiviación	0.5888		11.8		
	0.5980	5.00	12.0	11.9	1.1
	0.6010		12.0		

\bar{x} , valor medio de lípidos, %; RSD, desviación estándar relativa; $w_{\text{lípidos}}$, peso de lípidos y w_{muestra} , peso de muestra (n=3)

Dado que el fabricante del equipo ASE recomienda trabajar con muestras cuyo contenido en lípidos no sea superior a 800 mg, se realizaron ensayos para seleccionar la cantidad de muestra (w_{muestra}) adecuada para realizar posteriormente el análisis de COPs, teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- Métodos referenciados
- Cantidad de grasa presente en la muestra
- Calidad de los cromatogramas
- Contenidos de COPs en alimentos (Finocchiaro y Richardson, 1983; Terry Finocchiaro et al., 1984; Zhang et al., 1991; Addis y Warner, 1991; Huber et al., 1995; Paniangvait et al., 1995; Ohshima et al., 1996; Bal et al., 1996; Novelli et al., 1998; Kim et al., 2000; Morales-Aizpur et al., 2005; Herzallah, 2005; Boselli et al., 2005; Conchillo et al., 2005; Bagio et al., 2006; Baggio y Bragagnolo, 2006; Bonoli et al., 2007; Hur et al., 2007; Saldanha y Bragagnolo, 2008; Saldanha et al., 2008; Broncano et al., 2009; Derewiaka y Obiedziński, 2010; Cardenia et al., 2012).

La **Tabla 34** presenta el peso adecuado para cada tipo de muestra analizado, el cual varía entre 2 y 5 g dependiendo del tipo de muestra.

Tabla 34. Contenido de lípidos en muestras de alimentos. Cantidad de muestra seleccionada para analizar los COPs

Muestra	Lípidos, %	RSD, %	w_{Muestra}, g
Carne picada	10.4	2.6	5.00
Jamón cocido	5.2	4.5	5.00
Jamón serrano	34.0	4.4	2.00
Queso blando	25.9	5.9	3.00
Salmón ahumado	11.4	5.4	5.00

RSD, desviación estándar relativa (n=3); w_{Muestra}, peso de muestra

El extracto de los COPs obtenido representó del 0.2 al 0.4% (w/w) del extracto lipídico. Cabe hacer notar que las cantidades de muestra empleadas que se citan en las diferentes metodologías varían desde menos de 1 g hasta más de 50 g (Soupas et al., 2007; Copesi et al., 2002; Chang et al 1997; Chang et al., 1998; Colpo, 2005).

5.2.1.3. Colesterol

Se llevó a cabo la determinación de colesterol aplicando el procedimiento referido en 4.4.4.3. El análisis se realizó mediante HPLC-UV con una columna C8 y fase móvil ACN:agua (80:20), a una longitud de onda de 205 nm. En la **Tabla 35** se muestra los contenidos de colesterol los cuales dependen del tipo de alimento; las cantidades más elevadas se encontraron en el queso blando procedente de la leche, producto que

presenta un contenido elevado de este compuesto, pues los organismos requieren de esta sustancia para formar las células en sus primeras etapas de vida.

Tabla 35. Contenido de colesterol en muestras de alimentos

Muestra	Colesterol, mg/L	Colesterol, mg/100g	^a RSD, %
Carne Picada	61.5	34.5	12.3
Jamón Cocido	61.7	19.6	2.8
Jamón Serrano	111.2	37.1	3.4
Queso Blando	156.8	52.3	5.3
Salmón Ahumado	115.0	38.3	6.9

^a RSD, desviación estándar relativa (n=3)

5.2.2. *Reacción de derivatización de COPs patrón con Tri-Sil.*

En los ensayos previos realizados de los COPs seleccionados para el estudio, los Tri-Sil-derivados del triol, 7-ceto y 25-OH, además del 6-ceto se encuentran a t_R próximos, formando pares críticos. En consecuencia, se requiere optimizar la separación de dichos pares críticos.

Se estudiaron, de forma simultánea, las condiciones óptimas para la reacción de derivatización de COPs y separación de los trisil derivados aplicando el método de cuantificación mediante calibración con estándar interno. Se utilizó como IS 9,10-DFA, puesto que este compuesto no presenta grupos OH y por tanto no reacciona con el reactivo. Para llevar a cabo la optimización, se realizó un diseño experimental de

“screening”, fraccionado 2^{4-1} , de dos niveles y cuatro factores, cuyos valores del dominio experimental se presentan en la **Tabla 36**.

Tabla 36. Factores, dominio experimental y niveles del diseño factorial de screening 2^{4-1}

FACTORES	DOMINIO EXPERIMENTAL	
	NIVEL (-)	NIVEL (+)
t, min	30	60
T, °C	55	65
t _a , min	2	8
Disolvente	Hex	ACN

t, tiempo, minutos; T, temperatura, °C; t_a, tiempo de agitación, minutos

Las variables respuesta fueron el áreas relativa, $A_{\text{relativa}} (A_r)$, de cada pico respecto al IS, la relación señal/ruido (S/N) a los tiempos en los que eluyen los picos cromatográficos y la resolución (R_s) de los pares críticos encontrados, triol:6-ceto; 6-ceto:7-ceto y 7-ceto: 25-OH, las cuales se expresan como resolución R_{1-2} , R_{2-3} y R_{3-4} , respectivamente.

Las respuestas del diseño experimental fraccionado indicaron que el factor más significativo fue el cambio de disolvente; Hex fue el disolvente más favorable para la reacción de derivatización. El tiempo de agitación no fue significativo, por tanto, su valor se fijó en 2 min. Las respuestas indicaron que T influye positivamente en la reacción y t tiene un efecto positivo o negativo dependiendo de cada COP particular.

Para conocer los valores de los factores T y t, no fijados en el diseño factorial fraccionado, se realizó un nuevo diseño factorial de superficie de respuesta, 3^2 completo, de tres niveles y dos factores, adicionando un experimento central replicado. La **Tabla 37** muestra los factores y los valores del dominio experimental estudiado. Las

respuestas fueron, como en el diseño fraccionado, el A_r , de cada pico con respecto al IS, la relación señal/ruido (S/N) y la resolución de los pares críticos (R_s).

Tabla 37. Factores, dominio experimental y niveles del diseño factorial de superficie de respuesta 3^2

FACTORES	DOMINIO EXPERIMENTAL		
	NIVEL (-)	NIVEL (0)	NIVEL (+)
t, min	15	45	75
T, °C	25	45	65

t, tiempo, minutos; T, temperatura, °C

Los valores de las respuestas del diseño factorial 3^2 se muestran en la **Tabla 38**. El análisis del diseño fue llevado a cabo mediante el programa Statgraphics, proporcionando las gráficas de los efectos principales mostrados en la **Figura 52**.

Tabla 38. Respuestas del diseño experimental 3^2

EXPERIMENTO Nº	COPs										
	Triol		6-ceto			7-ceto			25-OH		
	A_r	S/N	R_{1-2}	A_r	S/N	R_{2-3}	A_r	S/N	R_{3-4}	A_r	S/N
1	0.82	13.3	2.7	0.47	34.4	2.4	0.52	8.6	2.4	0.57	15.9
2	0.69	14.8	2.7	0.39	8.6	2.5	0.42	5.5	2.3	0.47	25.6
3	0.71	15.3	2.7	0.43	10.9	2.4	0.45	5.7	2.4	0.50	19.2
4	0.80	61.0	2.6	0.53	24.7	2.4	0.50	12.1	2.3	0.74	37.0
5	0.74	61.8	2.7	0.49	22.5	2.4	0.41	13.9	2.4	0.67	48.6
6	0.68	45.9	2.8	0.45	18.8	2.4	0.42	11.1	2.3	0.58	45.5
7	0.99	104.8	2.8	0.68	25.0	2.4	0.64	14.2	2.3	0.94	56.9
8	0.98	132.4	2.7	0.70	36.1	2.4	0.57	22.7	2.4	1.00	68.2
9	0.60	25.8	2.8	0.37	8.3	2.4	0.35	7.2	2.4	0.36	14.1
10	0.80	58.6	2.7	0.56	22.6	2.3	0.47	20.6	2.4	0.67	60.4
11	0.70	39.2	2.7	0.50	18.7	2.4	0.48	14.2	2.3	0.61	43.0

A_r , área relativa; S/N, relación señal-ruido; R_{1-2} , R_{2-3} y R_{3-4} , resolución para los respectivos pares

En los gráficos de efectos principales se puede observar que altas T favorecen la relación S/N; sin embargo, con respecto a t no se observaron diferencias significativas entre los COPs.

El comportamiento del efecto de T sobre R_s fue inverso a aquel obtenido para A_r y la relación S/N. En general, las respuestas sólo mostraron pequeñas variaciones después de cambiar T, obteniendo valores de R_s superiores a 1.5.

En las gráficas de efectos principales se puede observar, también, que existe una relación directa entre T y A_r ; las mejores respuestas se obtuvieron a 65° C; sin embargo, t tiene un efecto muy pequeño en A_r , por lo tanto se seleccionó un tiempo de 40 min.

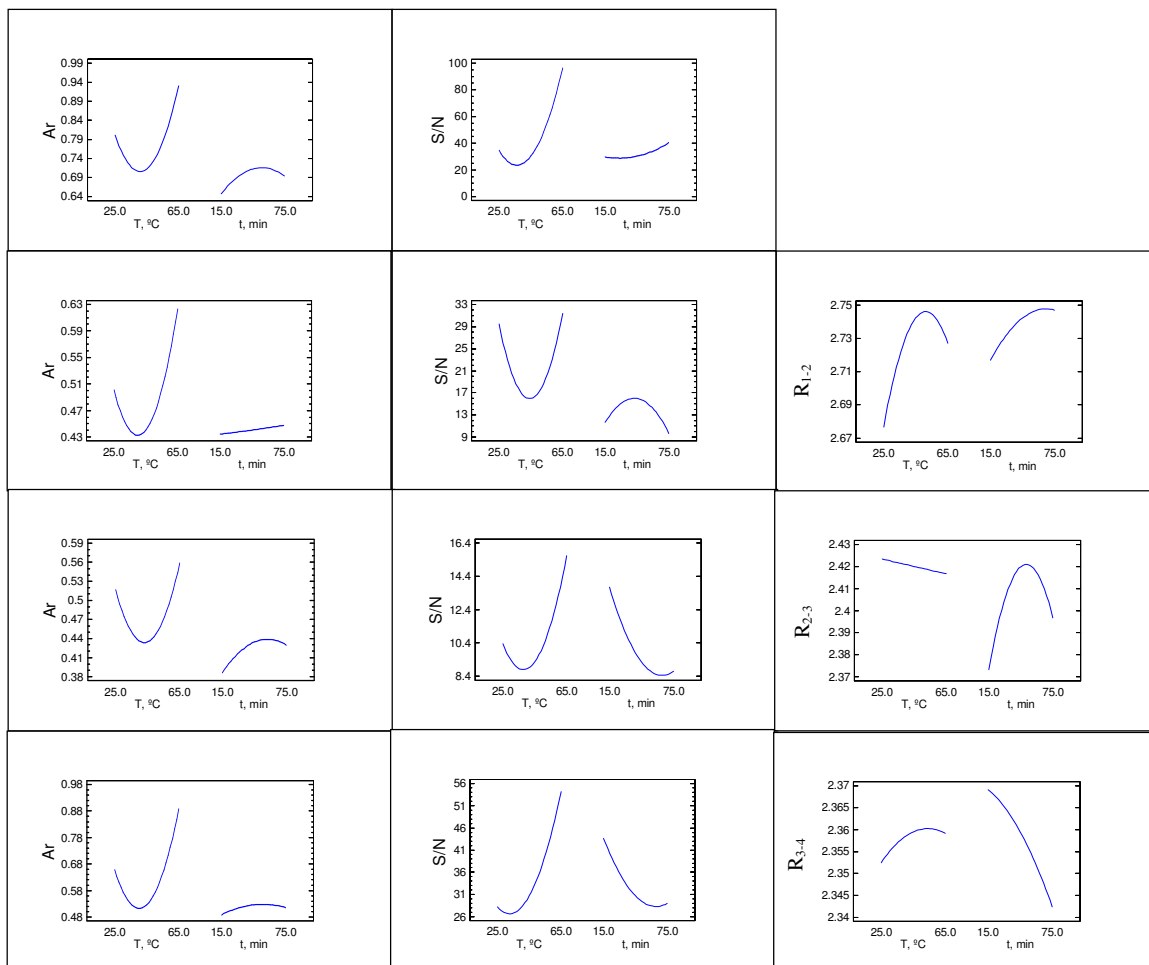


Figura 52. Gráficos de efectos principales obtenidos a partir del diseño factorial 3^2
 Respuestas: A) A_r y S/N, para triol; B) A_r , S/N, para 6-cet; C) A_r , S/N, para 7-ceto y D) A_r , S/N para 25-OH; R_{1-2} , R_{2-3} y R_{3-4} pares críticos respectivos

Las gráficas de superficie de respuestas (**Figura 53**) indican que para T y t elevadas se incrementan los valores de A_r y de la relación S/N, aunque se observó un efecto menor de t. Para el Tri-Silil ester del 6-ceto, A_r también aumenta a alta T y para t largos; sin embargo, la relación S/N fue la más alta a T altas o bajas y t intermedios. El mejor valor de R_{1-2} se encontró para la T más alta y t largos. En cuanto a 7-ceto, A_r aumenta con T y t, mientras que la relación S/N aumenta a alta T y bajo t pero no a valores intermedios. Para R_{2-3} (R_s entre 6-ceto, 7-ceto) los valores medios son los mejores. En el caso del 25-OH, A_r se ve favorecida por la T, y las variaciones en t no fueron significativas. Sin embargo, los mejores valores de S/N se obtuvieron, al igual que para 7-ceto, para alta T y bajo t de reacción. Es necesario señalar que las variaciones de R_s fueron muy pequeñas y sus valores son adecuados para una buena separación de los COPs hasta línea base.

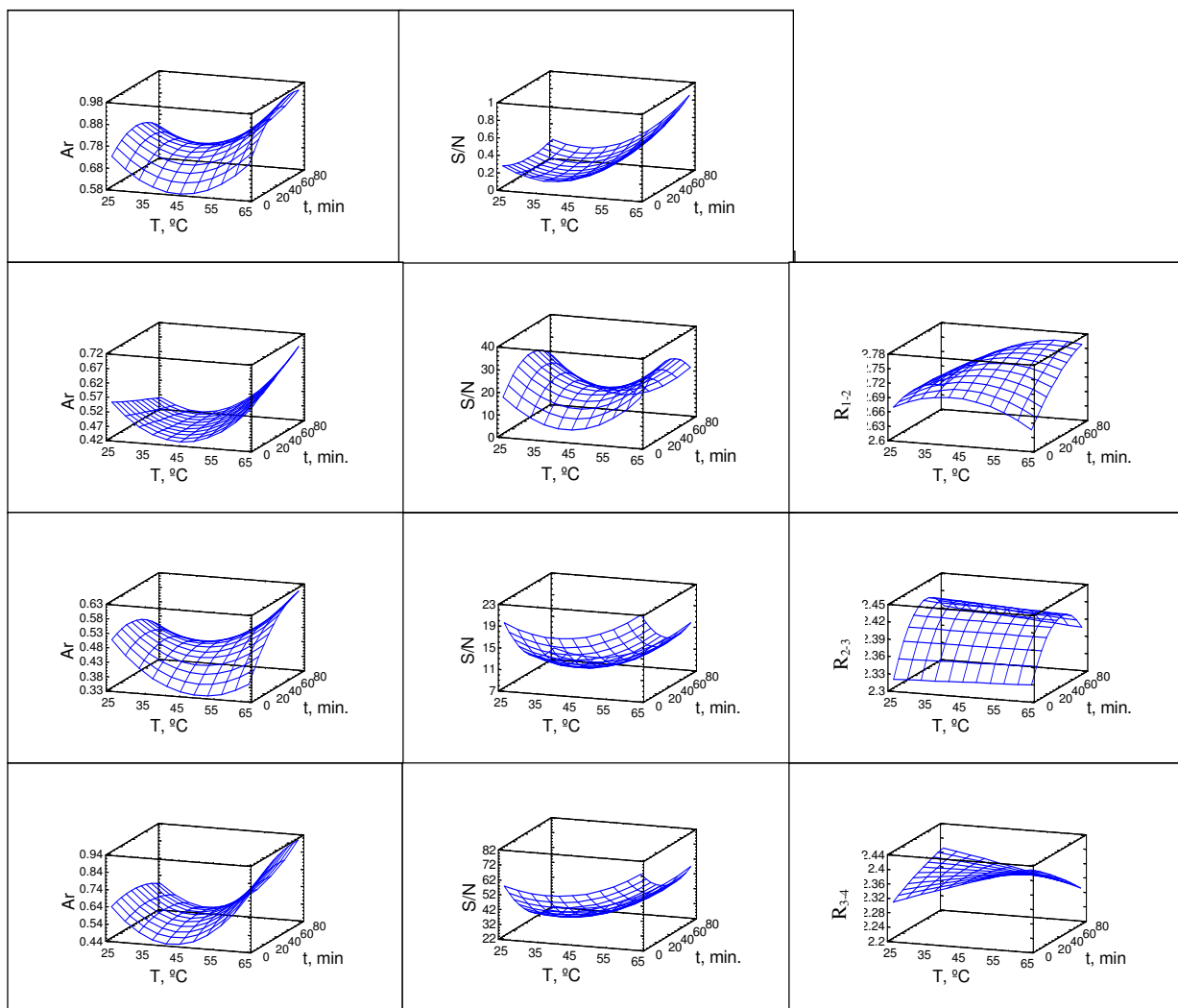


Figura 53. Gráficas de superficies de respuestas de COPs obtenidas por medio del diseño experimental 3^2 : Respuestas: A) Ar y S/N, para triol; B) Ar, S/N, para 6-ceto; C) Ar, S/N, para 7-ceto y D) Ar, S/N para 25-OH; R_{1-2} , R_{2-3} y R_{3-4} pares críticos respectivos

Por tanto, se eligieron como valores óptimos de T y t, 65 °C y 40 min, respectivamente.

En la **Tabla 39** se muestra las ecuaciones del modelo ajustado para A_r y S/N y R_s de las gráficas de superficie de respuesta para los COPs que forman los pares críticos.

Tabla 39. Coeficientes de regresión y ecuación del modelo ajustado

COP	Ecuación del modelo ajustado
Triol	$A_r=1.4-3.44*10^{-2}*T+2.1*10^{-3}*t+3.9*10^{-4}*T^2+6.4*10^{-5}*T*t-4.7*10^{-5}*t^2$
	$S/N=160.4-6.8*T-0.7*t+8.8*10^{-2}*T^2+8.8*10^{-3}*T*t+5.3*10^{-3}*t^2$
6-ceto	$A_r=1.0-2.7*10^{-2}*T-2.7*10^{-3}*t+3.1*10^{-4}*T^2+6.4*10^{-5}*T*t+7.4*10^{-7}*t^2$
	$S/N=73.6-3.1*T+0.6*t+3.6*10^{-2}*T^2-1.4*10^{-3}*T*t-5.9*10^{-3}*t^2$
	$Rs_{1-2}=2.5+8.4*10^{-3}*T-3.5*10^{-4}*t-1.0*10^{-4}*T^2+4.2*10^{-5}*T*t-1.1*10^{-5}*t^2$
7-ceto	$A_r=1.0-2.6*10^{-2}*T-5.6*10^{-4}*t+2.6*10^{-4}*T^2+8.6*10^{-5}*T*t-2.9*10^{-5}*t^2$
	$S/N=32.5-0.7*T-0.3*t+9.3*10^{-3}*T^2+1.0*10^{-3}*T*t+2.2*10^{-3}*t^2$
	$Rs_{2-3}=2.3+2.1*10^{-4}*T+4.3*10^{-3}*t+0.0*T^2-8.3*10^{-6}*T*t-3.9*10^{-5}*t^2$
25-OH	$A_r=1.6-5.3*10^{-2}*T+2.2*10^{-4}*t+6.2*10^{-4}*T^2+5.9*10^{-5}*T*t-2.7*10^{-5}*t^2$
	$S/N=90.4-2.0*T-1.1*t+2.6*10^{-2}*T^2+6.0*10^{-3}*T*t+6.3*10^{-3}*t^2$
	$Rs_{3-4}=2.2+3.8*10^{-3}*T+2.7*10^{-3}*t-9.2*10^{-6}*T^2-6.2*10^{-5}*T*t-4.1*10^{-6}*t^2$

Ar, area relativa; S/N, relación señal/ruido; Rs, resolución

5.2.3. Optimización de parámetros cromatográficos para la separación de los COP-Tri-Sil-derivados mediante GC-FID.

5.2.3.1. Selección del patrón interno, IS

Se eligió el hidrocarburo 9.10-Difenil antraceno (9.10-DFA) como IS para la cuantificación de los COPs mediante GC-FID en el estudio con patrones; ya que es un compuesto volátil y por tanto no requiere derivatización.

Para el estudio de COPs en las muestras, teniendo en cuenta que 6-ceto ha sido utilizado por otros autores como IS y que no fue identificado en las muestras mediante GC-MS, se selecciono 6-ceto como IS ya que es un compuesto similar a los analitos determinados y eluye a un t_R que se encuentra entre los analitos a analizar.

5.2.3.2. Selección del caudal de la fase móvil (He).

El caudal óptimo de la columna fue obtenida mediante curvas de Van Deemter, a partir de una disolución patrón de tetradecano como soluto de prueba. La **Figura 54** muestra el gráfico obtenido $H = f(u)$ para las columnas ensayadas, HP-1 y HP-5, utilizando He como fase móvil, donde se observa que la altura de plato H de la columna es mínima, y por tanto, el número de platos de la columna será máxima a caudal de 1.6 y 1.2 mL/min, respectivamente.

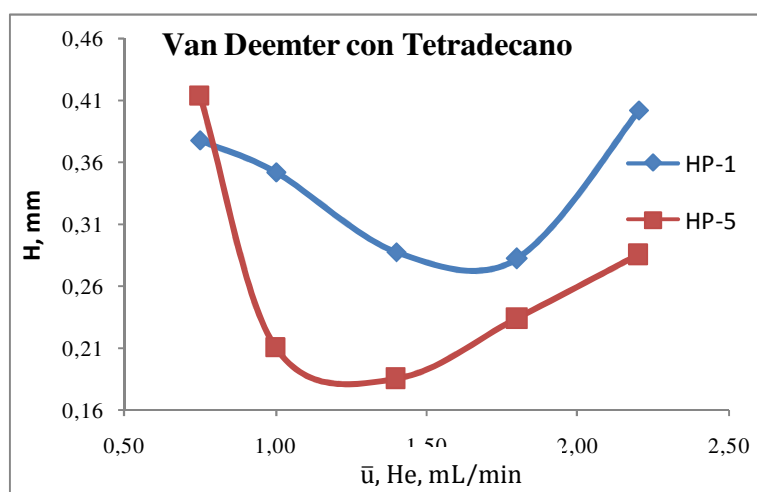


Figura 54. Curva de Van Deemter usando n-tetradecano (10 mg/L). T_{columna} 125 °C; T_{inyector} , 175 °C ; T_{detector} , 250 °C

5.2.3.3. Separación de COPs en patrones mediante GC-FID

En primer lugar, se evaluaron programas de T propuestos por otros autores para la separación de los COP-Tri-Sil-derivados objeto de estudio por GC-FID, pero resultaron insatisfactorios (Maerker, 1987) presentando los siguientes pares críticos; 6-ceto/7-ceto and 7-ceto/25-OH. Se ensayaron las columnas capilares HP-5 y HP-1 con fase estacionaria no polar y diferentes programas de T. Las condiciones cromatográficas, tales como caudal, T_{inyector} y T_{detector} también se optimizaron.

Los resultados de la **Tabla 40** mostraron que ambas columnas separaron los COPs a línea base en condiciones isotérmicas. Sin embargo, la columna HP-5 no fue adecuada para la separación de los COP-Tri-Sil-derivados en un tiempo razonable ($k > 35$) aunque se obtuvo buena resolución; sin embargo, la columna HP-1 mostró valores de R_s superiores a 1.5 en un tiempo de análisis menor de 22 min, siendo sus factores de retención menores de 15. Hay que tener en cuenta que la columna HP-1 se deteriora más fácilmente necesitando llevar a cabo ajustes en las condiciones de separación.

Tabla 40. Condiciones para la separación de los COPs mediante GC-FID

Columna	T_{inyector} , °C	Split relac.	T_{horno} , °C	Caudal He, mL/min	T_{detector} , °C	t_R	k	R_s
HP-1	300	3	290	1.6	300	< 21	< 15	> 2.0
HP-5	300	3	245	1.2	300	> 45	> 35	> 1.5

T_{inyector} , temperatura del inyector, °C; T_{horno} , temperatura de la columna, °C; T_{detector} , temperatura del detector, °C; t_R , tiempo de retención, min; k, factor de retención; R_s , resolución

Se utilizó 9,10-DFA como IS para obtener los calibrados, los cuales permitieron calcular los parámetros analíticos usando las áreas y alturas como respuesta de los picos cromatográficos para cada estándar (**Tabla 41**).

Por tanto, la separación de los Tri-Sil ésteres derivados en presencia de IS, se llevó a cabo utilizando la columna capilar HP-1 en las siguientes condiciones experimentales: T_{detector} y T_{inyector} , 300 °C; T_{horno} , isoterma a 290 °C; $V_{\text{inyección}}$, 2 μL de una disolución mezcla de los Tri-Sil derivados de los COPs de 5 mg/L; relación de split (3:1) y He como gas portador a una velocidad de flujo de 1.6 mL/min.

La **Figura 55** muestra un cromatograma, obtenido en las condiciones óptimas, de una disolución estándar de COPs para una concentración de 50 mg/L conteniendo los siete Tri-Silil ésteres de los COPs. El pico del 9,10-difenil antraceno presenta un t_R a 9.630 min y el 6-ceto eluye a 19.184 min, siendo el tiempo de análisis menor de 22 min.

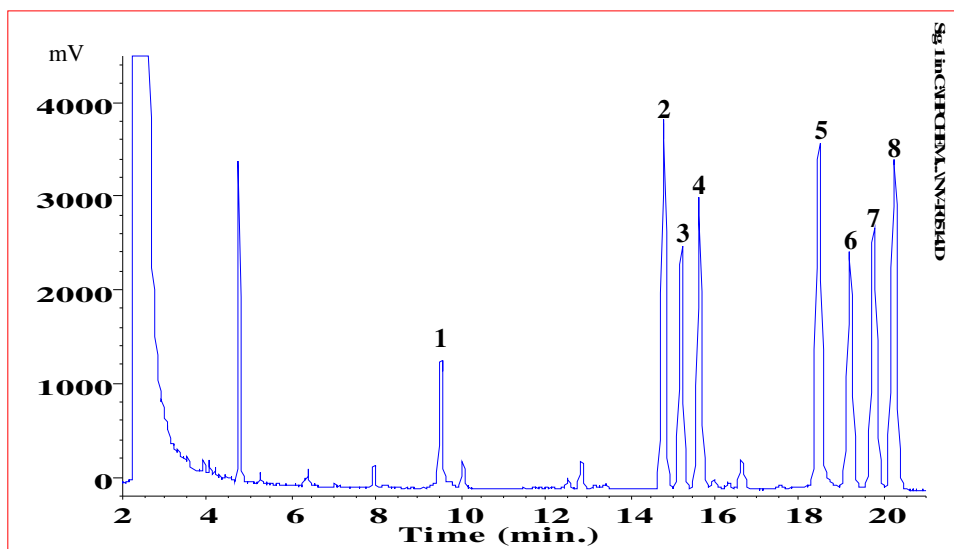


Figura 55. Cromatograma mediante GC-FID de COP-Tri-Sil derivados. COP, 50 mg/L; picos, **1**) 9,10-DFA (IS); **2**) 7 β -OH; **3**) β -epóxido; **4**) α -epóxido; **5**) triol; **6**) 6-ceto; **7**) 7-ceto y **8**) 25-OH

5.2.4. Características analíticas

Tabla 41. Determinación de parámetros cromatográficos mediante GC-FID

Exp.	9,10-DFA		7β-OH		β-epóxido		α-epóxido		triol		6-ceto		7-ceto		25-OH	
	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A
1	9.47	6100	14.65	235	15.05	125	15.47	186	18.22	201	18.99	199	19.54	220	20.00	255
2	9.47	6576	14.66	609	15.06	390	15.48	467	18.27	885	18.99	532	19.58	525	20.03	756
3	9.44	3265	14.64	769	15.04	643	15.47	587	18.23	863	18.99	698	19.52	650	19.99	826
4	9.55	8725	14.81	7652	15.22	5266	15.65	6396	18.47	9994	19.20	6001	19.77	7325	20.25	8267
5	9.55	8218	14.80	15120	15.22	10034	15.65	12532	18.47	16947	19.20	12092	19.76	14568	20.25	17977
6	9.53	7019	14.98	27364	15.20	18518	15.64	23087	18.46	32079	19.18	22735	19.76	26101	20.24	32462

t_R, tiempo de retención, min; A, área de pico cromatográfico, mV* mg*/L

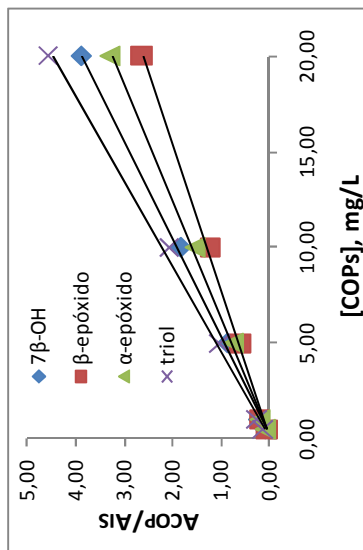


Figura 56. Calibrados para los estándares 7 β-OH; β-epóxido α-epóxido y triol usando como IS 9,10-DFA. A_{COP}, área de los estándares; A_{9,10-DFA}, área del IS

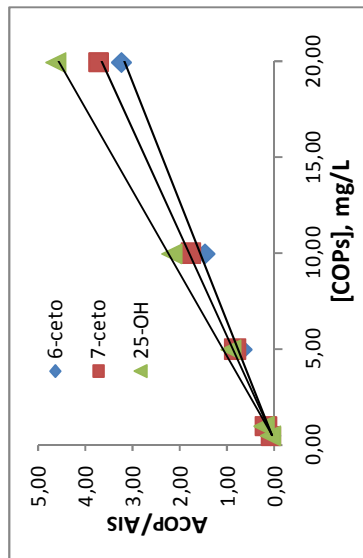


Figura 57. Calibrados para los estándares 6-ceto; 7-ceto y 25-OH usando como IS 9,10-DFA. A_{COP}, área de los estándares; A_{9,10-DFA}, área del IS

Tabla 42. Ecuaciones de los calibrados con áreas

COPs	EC	R ²
7β-OH	y=0.19x-0.03	0.9983
β-epóxido	y=0.13x-0.01	0.9968
epóxido	y=0.17x-0.04	0.9980
triol	y=0.23x-0.04	0.9965
6-ceto	y=0.16x-0.03	0.9956
7-ceto	y=0.19x-0.03	0.9989
25-OH	y=0.23x-0.06	0.9971

EC, ecuación de la recta; R², coeficiente de determinación

Las gráficas de calibrado de las áreas se obtuvieron usando 9,10-FDA como IS. La **Tabla 41** presenta los valores de los parámetros obtenidos de los cromatogramas de disoluciones mezcla de los COP-Tri-Sil derivados en el intervalo de concentración 0.1 - 20 mg/L. Las ecuaciones de calibrado y sus coeficientes de determinación se muestran en la **Tabla 42**. En las **Figuras 56 y 57** se representan los calibrados de los COPs estudiados; los cuales fueron lineales en el intervalo de concentración, 0.5 - 20 mg/L de COP. La precisión de los COPs respecto de A y t_R se determinó por medio de la repetibilidad evaluada en un mismo día y la reproducibilidad evaluada en tres días diferentes, utilizando disoluciones estándar de 5 mg/L. En la **Tabla 43** se observa que el valor de RSD dentro de cada día es inferior a 7.7% para A e inferior a 0.67% para t_R , indicando que la precisión en cuanto a repetibilidad es adecuada.

Los valores de precisión en cuanto a reproducibilidad para estos tres días respecto de A y t_R se muestra en la **Tabla 44**, donde se observa que los valores de RSD son inferiores a 11.2 y 1.3 % para A_r y $t_{R,r}$, respectivamente.

Tabla 43. Evaluación de la repetibilidad de los COPs mediante GC-FID

Día	7 β OH		5,6 β		5,6 α		Triol		7-ceto		25-OH	
	A	t _r	A	t _r	A	t _r	A	t _r	A	t _r	A	t _r
1	7652	14,81	5266	15,22	6396	15,65	8994	18,47	7325	19,77	8267	20,25
	8022	14,80	4774	15,22	5679	15,65	8269	18,47	7465	19,76	7669	20,25
	7433	14,98	4539	15,20	5865	15,64	7765	18,46	6965	19,76	8066	20,24
	s	0,08	371	0,01	372	0,01	618	0,01	258	----	304	0,01
X	7702	14,86	4860	15,21	5980	15,65	8343	18,47	7252	19,76	8000	20,25
RSD	3,9	0,56	7,6	0,07	6,2	0,04	7,4	0,03	3,6	0,02	3,8	0,03
2	6214	14,65	5298	15,05	5214	15,47	8230	18,22	8229	19,54	7282	20,00
	6615	14,66	6052	15,06	5719	15,48	7118	18,27	7818	19,58	7618	20,03
	6824	14,64	5413	15,04	6018	15,47	7919	18,23	7618	19,52	7818	19,99
	s	0,01	406	0,01	406	----	573	0,03	311	0,03	271	0,02
X	6551	14,65	5587	15,05	5650	15,47	7756	18,24	7889	19,55	7573	20,01
RSD	4,7	0,08	7,3	0,06	7,2	0,03	7,4	0,14	3,9	0,15	3,6	0,12
3	7253	14,42	4233	15,03	4927	15,38	7928	18,18	6727	19,48	8127	19,88
	6612	14,41	4689	15,02	4227	15,37	8577	18,14	6656	19,46	7726	19,84
	6835	14,40	4311	15,02	4533	15,36	7532	18,12	7132,	19,42	7533	19,82
	s	0,01	244	0,01	351,	0,01	527	0,03	257	0,03	303	0,03
X	6900	14,41	4411	15,02	4562	15,37	8012	18,15	6830	19,45	7795	19,85
RSD	4,7	0,07	5,5	0,04	7,7	0,07	6,6	0,17	3,8	0,16	3,9	0,15

A, área de pico; t_r, tiempo de retención, min; s, desviación estándar; X, valor medio y RSD, desviación estándar relativa % (n=3)

Tabla 44. Evaluación de la reproducibilidad de los COPs mediante GC-FID

Día	7 β OH		5,6 β		5,6 α		Triol		7-ceto		25-OH	
	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R
1	7702	14,86	4860	15,21	5980	15,65	8343	18,47	7252	19,76	8000	20,25
2	6551	14,65	5587	15,05	5650	15,47	7756	18,24	7889	19,55	7573	20,01
3	6900	14,41	4411	15,02	4562	15,37	8012	18,15	6830	19,45	7795	19,85
X	7051	14,64	4953	15,09	5397	15,50	8037	18,29	7324	19,59	7789	20,04
s	482	0,18	485	0,08	606	0,12	240	0,13	435	0,13	174	0,16
RSD	6,8	1,3	9,8	0,6	11,2	0,7	3,0	0,7	5,9	0,7	2,2	0,8

A, área de pico; t_R, tiempo de retención, min; s, desviación estándar; X, valor medio y RSD, desviación estándar relativa % (n=3)

A partir de la información de la **Tabla 44** se calcularon los t_R promedio para cada COP, sus valores de RSD y sus intervalos de confianza obteniendo valores de RSD para t_R entre 0.59 y 1.3 %, lo que indica que t_R se podría considerar como parámetro de identificación de los COPs; los intervalos de confianza de los t_R encontrados estuvieron entre 0.10 y 0.22 min (European Unión Directives, 1999).

Los valores de LOD y LOQ se calcularon mediante las expresiones indicadas en 4.4.7.1. y se muestran en la **Tabla 45**; el ruido, N, fue obtenido en cada intervalo de los t_R

Tabla 45. Medidas de los blancos para calcular la precisión del t_R , LOD y LOQ mediante GC-FID

COP	t_{Rp} min	t_1 , min	t_2 min	N/b	LOD, mg/L	LOD, ng	LOQ, ng
7β-OH	14.75	14.69	14.81	0.004	0.012	0.024	0.08
β-epóxido	15.13	15.07	15.14	0.021	0.063	0.126	0.42
α-epóxido	15.56	15.50	15.62	0.005	0.015	0.030	0.10
Triol	18.35	18.28	18.43	0.004	0.012	0.024	0.08
7-ceto	19.66	19.58	19.73	0.018	0.054	0.109	0.36
25-OH	20.13	20.05	20.21	0.005	0.015	0.030	0.10

t_{Rp} , tiempo de retención medio; t_1 , límite inferior del t_R ; t_2 , límite superior del t_R ; N, ruido en el intervalo de t_{Rp} ; b, pendiente del calibrado de alturas; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; n= 6

Los valores de LOD fueron entre 0,024 ng y 0,126 ng y los factores de respuesta calculados con respecto al IS 6-ceto: 1,19 (7 β -OH); 0,80 (β -epóxido); 0,95 (α -epóxido); 1,36 (triol); 1,09 (7-ceto) y 1,35 (25-OH), lo cual indica que la respuesta generada por el

detector es muy similar para los derivados de los COPs, puesto que sus valores son cercanos a 1,00.

5.2.5. Optimización de la extracción de la fracción lipídica

Como se ha indicado, el análisis de COPs en muestras de alimentos de origen animal mediante GC resulta laborioso porque los COPs tienen que ser aislados de matrices complejas. Además, estos compuestos se encuentran presentes en muy bajas concentraciones, siendo necesario llevar a cabo etapas de clean up y preconcentración para facilitar su determinación cuantitativa (Lozada-Castro, et al. 2011).

Teniendo en cuenta que la extracción de la fracción lipídica es una de las etapas críticas en el análisis de COPs en muestras de alimentos, se evaluó el método automático de extracción con disolventes a alta presión, comparándolo con el método habitual de lixiviación con CHCl_3 para el análisis de carne picada, cuyos procedimientos se indican en experimental, 4.4.6.1. y 4.4.6.2.

Se ensayaron diferentes condiciones en el sistema ASE (**Tabla 46**), utilizando distintas mezclas disolventes usados en la literatura (Et.P, Et.P: CHCl_3 y CHCl_3 : MeOH), en el intervalo de T 40 a 80 °C y valores de P de 1500 y 2000 psi, para obtener las condiciones óptimas de extracción de lípidos a las cuales los COPs no sufran transformaciones y el colesterol no experimente procesos de oxidación. Se evaluaron los valores de recuperación, limpieza de los extractos y limpieza de los cromatogramas (Dionex, 2000).

Tabla 46. Parámetros estudiados en la optimización de muestra para la determinación de COPs mediante ASE y GC-FID

Muestra 5 g	T, °C	Disolvente	V Disolvente, mL	Número Extracciones	COPs encontrados
Carne picada	40	Eter petróleo	34	1	7 β -OH, β -epóxido, α - epóxido y 7-ceto
			34	2	epóxido y 7-ceto
			34	3	----
Carne picada	40	Eter petróleo	45	1	7 β -OH, β -epóxido, α - epóxido y 7-ceto
	80		34		7 β -OH, β -epóxido, α - epóxido y 7-ceto
Carne picada + COPs	40	Eter petróleo /cloroformo 85/15	45	1	7 β -OH, β -epoxy, α - epoxy, 25-OH, 6-ceto and 7-ceto
	60		45		7 β -OH, β -epóxido, α - epóxido, 25-OH, 6- ceto, 7-ceto y triol

Los extractos obtenidos mediante el método ASE fueron más limpios; además, mediante este procedimiento mejoró significativamente la homogeneización de la muestra al requerir una etapa adicional mediante mezcla con tierra de diatomeas que además proporcionó el secado de la muestra (**Figura 58**); al presentar la muestra mayor área superficial mejoró el contacto disolvente-muestra; además, puesto que el sistema permite controlar T y P, aumenta la eficacia de extracción. Los mejores valores de recuperación se obtuvieron usando éter de petróleo conteniendo una pequeña proporción de cloroformo, Et.P: CHCl₃, 85:15 (V:V); utilizando sólo Et.P, las recuperaciones de los COPs polares (triol y 25-OH) fueron bajas.



Figura 58. Muestra de jamón serrano homogeneizada con tierra de diatomeas

El tiempo de extracción disminuyó drásticamente de 18 horas (método de lixiviación) a 20 minutos (método de ASE) y el consumo de disolventes disminuyó en un 50 %. Por otro lado, el éter de petróleo conteniendo una pequeña cantidad de cloroformo es más fácil de evaporar que el cloroformo puro, siendo innecesario el uso del rotavapor. Además, el Et.P es menos tóxico que el CHCl_3 , y el sistema, al ser cerrado, evita posibles procesos de oxidación por contacto con el oxígeno del aire en el momento de la extracción.

Debido a que los COPs pueden sufrir oxidación a alta T, se seleccionaron las condiciones de 40 °C y 1500 psi, las cuales son más suaves que las de Boselli et al. (2001), y evitan que el colesterol reaccione para producir COPs. Las recuperaciones mediante el método ASE fueron superiores a las obtenidas con el método de lixiviación (**Figura 59**) con valores de RSD similares (en general, inferior al 10%). Se probaron también otras mezclas de disolventes; las mezclas de metanol-cloroformo proporcionaron extractos muy sucios, posiblemente porque aumenta la solubilidad de biomoléculas solubles en agua, Por esta razón, la metodología de Boselli, basada

también en la extracción de ASE, que se aplicó a muestras de polvo de huevo conteniendo un bajo porcentaje de agua (4%), no fue adecuada para las muestras de este trabajo, puesto que contienen cantidades altas de agua y muchos compuestos polares endógenos eluyen obteniéndose cromatogramas muy sucios e interfiriendo con el tratamiento de la muestra; además, esta metodología utiliza un paso de saponificación con KOH en metanol y algunos COPs (triol y epóxidos) son sensibles a los cambios de pH del medio (Nielsen et al., 1996); también triol (compuesto ácido) en un medio básico podría transformarse en su especie disociada que es insoluble en disolventes apolares.

Los criterios y resultados anteriores permitieron seleccionar el método propuesto, ASE, como el método de extracción de los COPs.

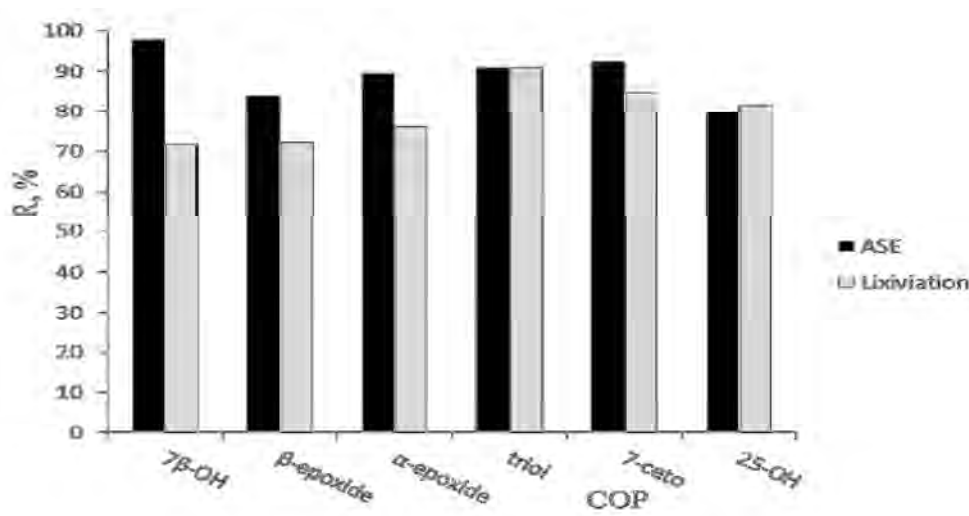


Figura 59. Recuperación de COPs al aplicar diferentes métodos de extracción. ASE; Lixiviación. Muestras de carne picada

5.2.6. Identificación de COPs mediante GC-MS en muestras de alimentos

Los Trisil derivados de los COPs estudiados fueron identificados mediante GC-MS usando la librería NIST excepto en los casos de α - and β -epóxidos y 6-ceto, cuyos

espectros de masas se compararon con los espectros experimentales obtenidos a partir de los respectivos estándares.

Teniendo en cuenta los valores de las relaciones m/z fue posible establecer cuántos grupos Trimetil-Silil (TMS) contienen los derivados de los COPs. Las estructuras iniciales de los COPs, 7β -OH, 25 -OH, conteniendo 2 radicales $-OH$, dieron lugar a derivados con dos grupos TMS, mientras triol, el cual contiene 3 radicales $-OH$, dio lugar a un derivado con dos grupos TMS. Los otros derivados de los COPs, β -epóxido, α -epóxido, 7 -ceto y 6 -ceto solamente contienen un grupo TMS.

Los COPs identificados en las muestras fueron los siguientes: 7β -OH, β -epóxido, α -epóxido y 7 -ceto en todos los casos y 25 -OH en algunos casos. Debido a que 6 -ceto no se encontró en ninguna muestra, este COP fue seleccionado como estándar interno. La **Tabla 47** muestra la relación m/z de los Tri-Sil derivados de los COPs y sus iones de fragmentación obtenidos de los espectros de masas.

Tabla 47. Relaciones m/z de los iones formados mediante GC-MS de los COPs-Tri-Sil-derivados

Compuesto	Relación m/z	Iones de fragmentos
7β-OH	546	465, 368, 329, 281, 129, 75
β-epóxido	474	458, 384, 368, 329, 281, 129, 75
α-epóxido	474	415, 368, 329
7-ceto	472	382, 367, 269, 174, 129, 75
triol	564	456, 441, 403, 367, 321, 129
6-ceto	474	445, 75
25-OH	546	456, 366, 327, 295, 271, 131, 95

m/z, relación masa/carga, uma

En el espectro de masas del derivado del 7 β -OH se observa una relación m/z a 546 uma, lo cual indica que este compuesto ha reaccionado con dos moléculas de TMS. Este ion sufre a, 456 uma una pérdida de 90 unidades de masa, posiblemente debido a la pérdida de los 6 radicales metilos de los dos grupos TMS. El ión de masa 73 uma se debe a la presencia del grupo TMS. Por comparación del espectro obtenido de la muestra, **Figura 60 A**, con aquel obtenido de la librería NIST, **Figure 60 B**, se identifica la estructura molecular del derivado del 7 β -OH.

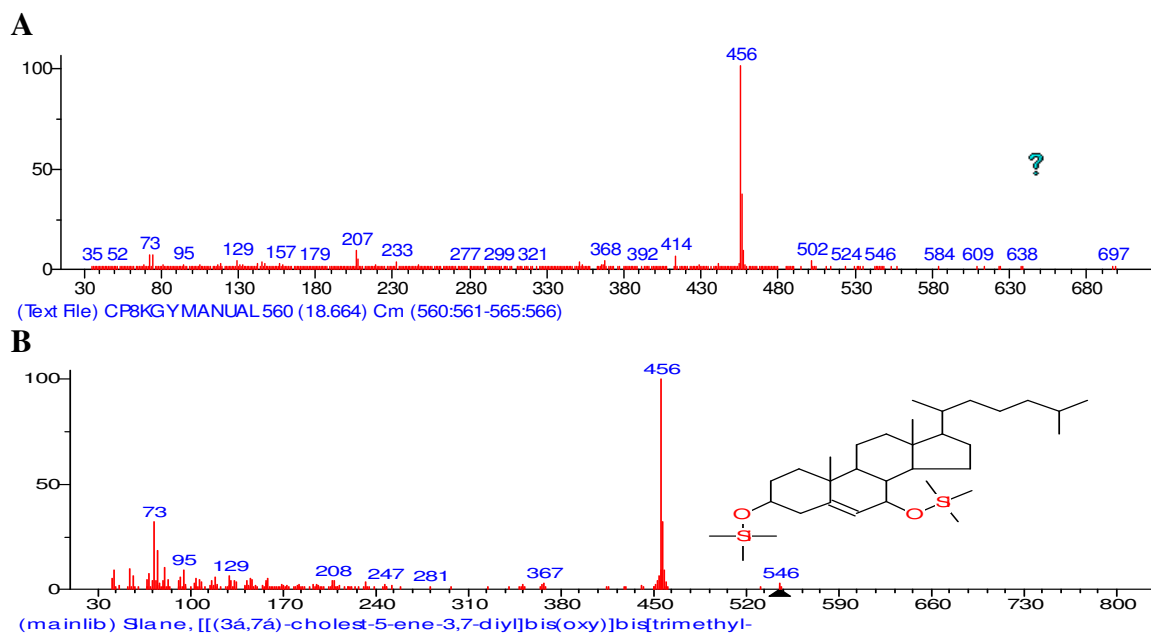


Figura 60. Espectros de masa del 7 β -OH-Tri-Sil derivado. A) Muestra de carne picada; B) Disolución patrón de 7 β -OH

La identificación del derivado del β -epóxido se realizó por comparación de los espectros de masa de sus muestras y aquellos obtenidos de una disolución patrón de este compuesto (**Figura 61**). Se detectan los iones de masa a 458, 384, 368, 356, 329 y 75, además de la presencia del ión de masa 474 que corresponde al ión molecular, lo que indica que la formación de este derivado tiene lugar por la reacción con un solo grupo TMS.

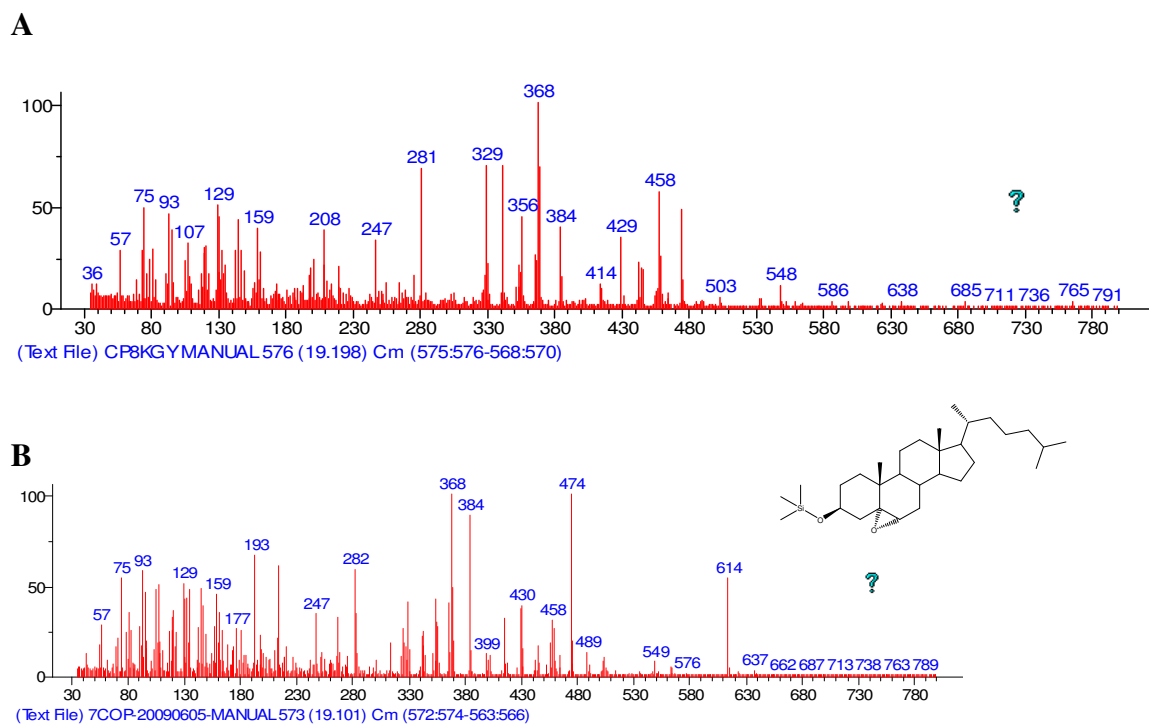
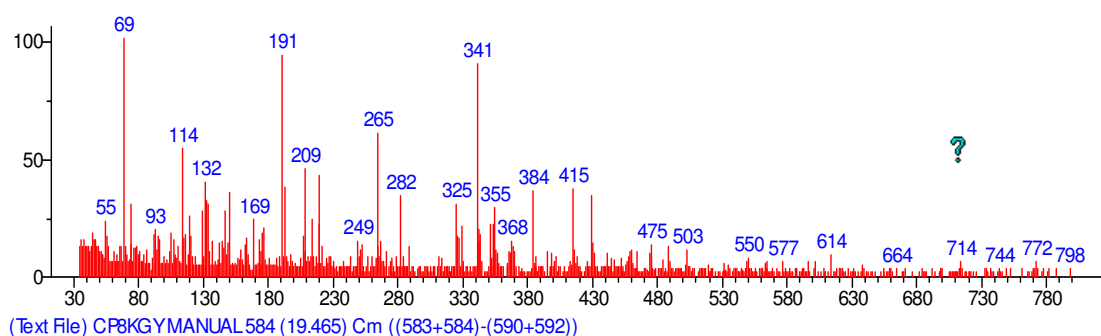


Figura 61. Espectro del β -epóxido-Tri-Sil- derivado. A) Muestra de carne Picada; B) Disolución patrón de β -epóxido

El derivado del α -epóxido en la muestra fue identificado de la misma manera (**Figura 62**). Existe similitud en las fragmentaciones; se formaron los iones de masa 415, 384 y 368, además del ión de masa 474 que corresponde al ión molecular, indicando que el derivado se forma por la reacción con un solo grupo TMS. Los espectros de los compuestos β y α -epóxidos son muy similares porque son isómeros.

A



B

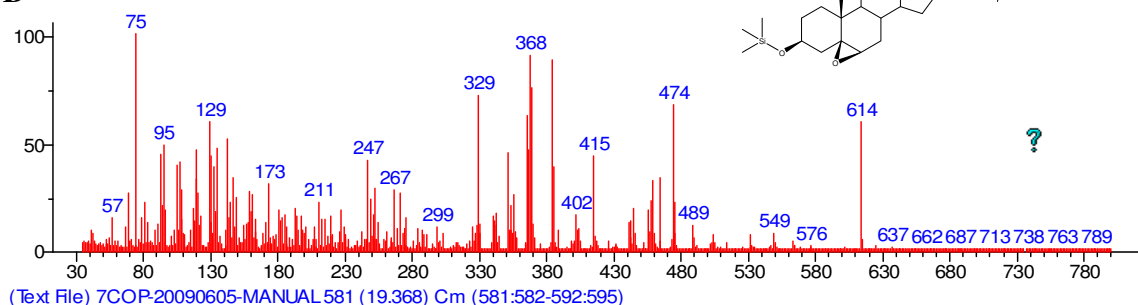
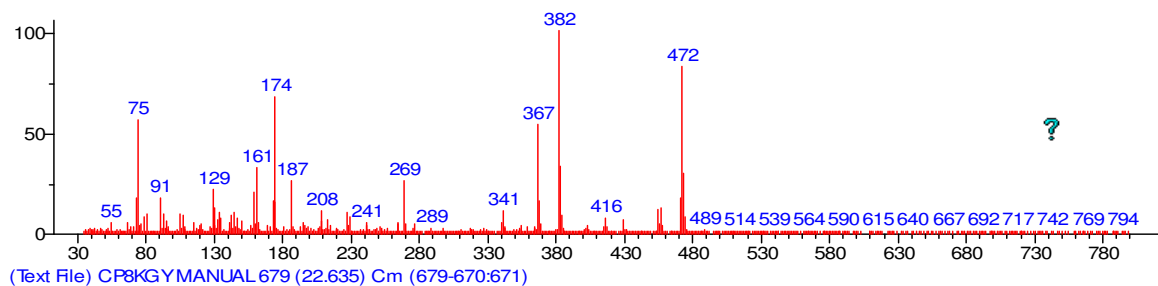


Figura 62. Espectro del α -epóxido-Tri-Sil-derivado. A) Muestra de carne picada; B) Disolución patrón de α -epóxido

Los espectros obtenidos a partir del derivado del 7-ceto en las muestras de carne y del estándar son similares y sus señales características están claramente definidas (**Figura 63**). Además, dichos espectros fueron confirmados por comparación con aquellos referidos por la librería NIST; el ión a 472 uma, que corresponde al ión molecular, indica que este COP solamente reacciona con un grupo TMS.

A



B

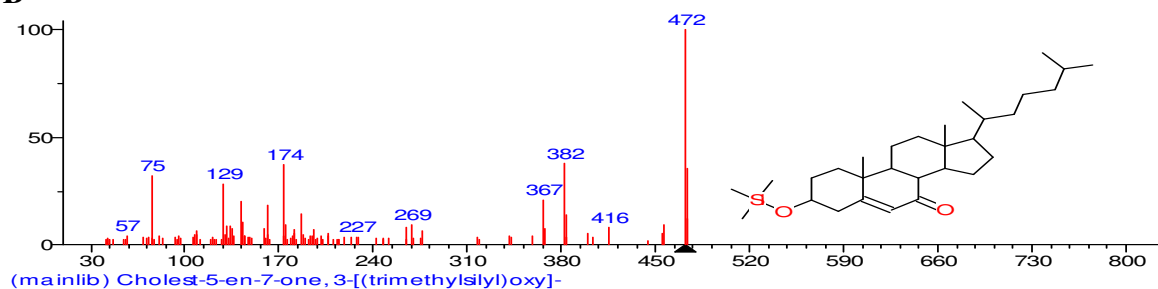


Figura 63. Espectro del 7-ceto-Tri-Sil-derivado. A) Muestra de carne picada; B) Espectro y estructura propuestos por la librería NIST

El 6-ceto no se identificó en las muestras y se seleccionó como estándar interno para todas las muestras en estudio.

La identificación del derivado del triol se realizó por comparación de los espectros obtenidos en una disolución patrón con el de la librería NIST; el ión a 564 uma que aparece en este espectro corresponde al ión molecular del derivado de este COP, indicando que reacciona con dos grupos TMS en las posiciones que se definen en la estructura de la **Figura 64**, no obteniendo señales correspondientes al derivado con tres grupos TMS como los observados en la bibliografía (Brooks et al. 1973; Park et al., 1989; Guardiola et al., 1998; Shan et al., 2003; Guardiola et al., 2004).

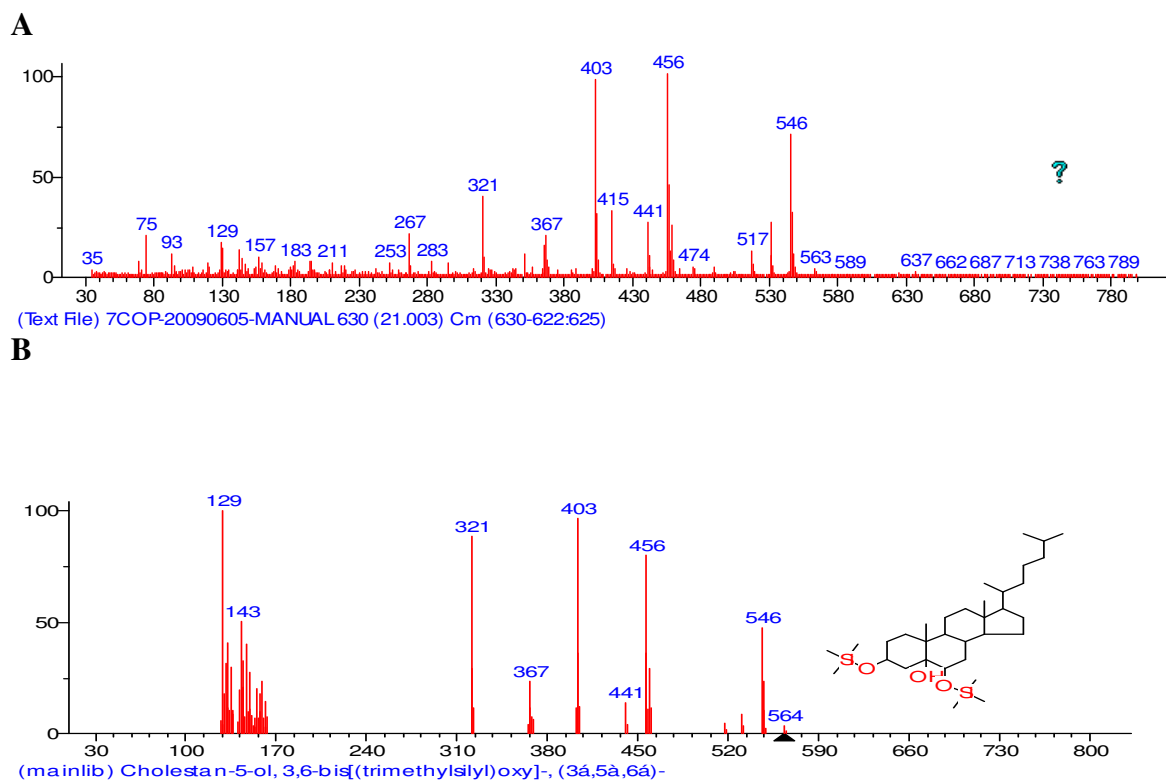


Figura 64. Espectro del triol-Tri-Sil-derivado. A) Disolución patrón; B) Espectro y estructura propuestos por la librería NIST

Al comparar los espectros del patrón del Tri-Sil-derivado del 6-ceto y la librería NIST se determinó la estructura de este compuesto (**Figura 65**) encontrándose en el espectro de la disolución patrón una señal que corresponde a un ión de masa 474, el cual equivale al ión molecular de este derivado.

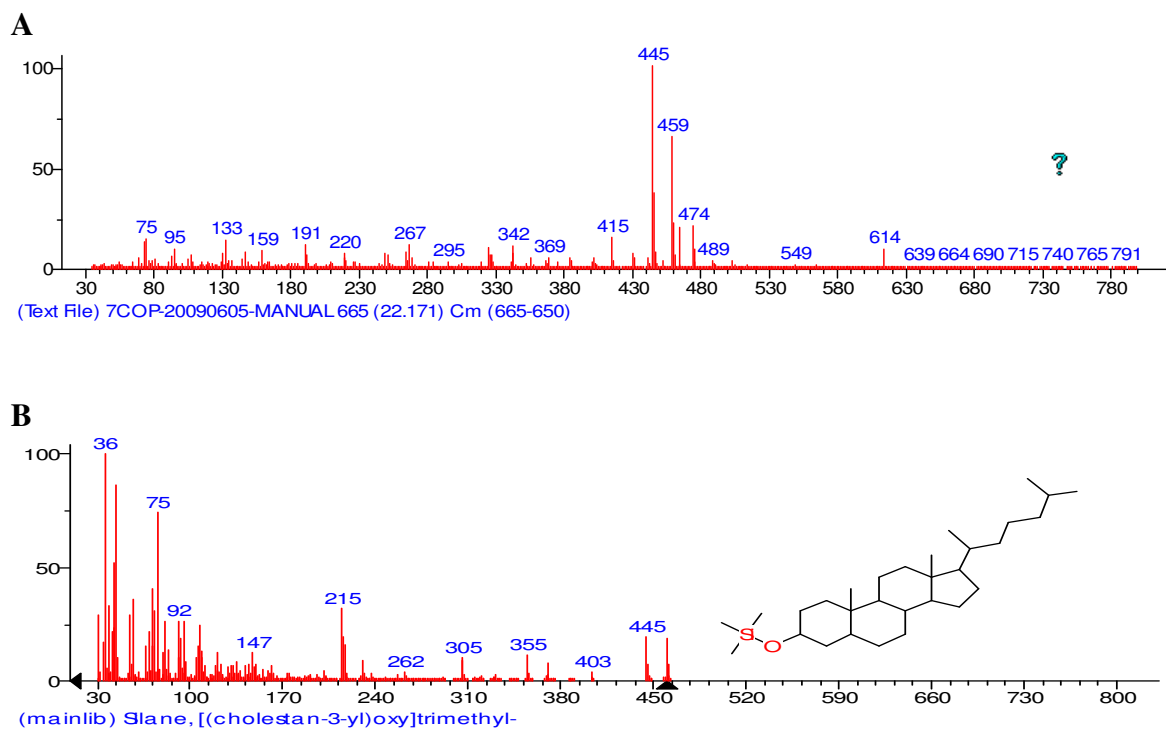


Figura 65. Espectro del 6-ceto-TriSil-derivado. A) Disolución patrón; B) Estructura propuesta por la librería NIST

La identificación del derivado del 25-OH se realizó por comparación entre el espectro obtenido a partir de una disolución patrón y el referido por la librería NIST; se observa claramente una señal a 546 la cual corresponde al ión molecular (estructura **Figura 66**); además, se observa que el resto de señales presentan un grado notable de concordancia, no obteniendo señales correspondientes al derivado mono-tms como los observados en la bibliografía (Brooks et al. 1973; Park et al., 1989; Guardiola et al., 1998; Shan et al., 2003; Guardiola et al., 2004).

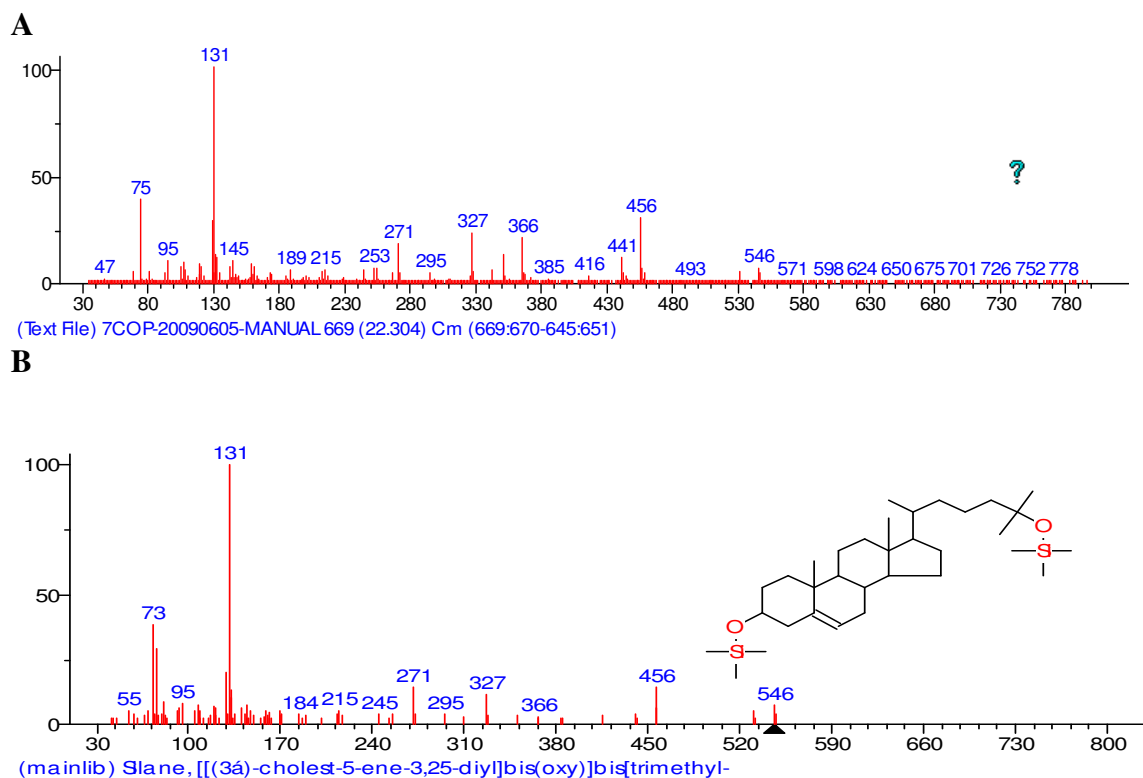


Figura 66. Espectro del 25-OH-Tri-Sil-derivado. A) Disolución patrón; B) Estructura propuesta por la librería NIST

5.2.7. Estudios de la estabilidad de los Tri-Sil-COPs-derivados

Los ensayos de estabilidad de los COPs-Tri-Sil-derivados se realizaron a partir de una disolución mezcla de COPs de 5 mg/L, aplicando el método de determinación 4.4.12. e indicaron que estos derivados son estables al menos durante 5 días, mantenidos a -18°C cuando se utiliza un volumen del reactivo derivatizante, Tri-Sil, de 200 μL .

La **Tabla 48** presenta los valores medios obtenidos de los ensayos realizados durante ocho días consecutivos.

Tabla 48. Estabilidad de los Tri-Sil derivados

Día	7 β -OH		β -epóxido		5 α -epóxido		triol		7-ceto		25- OH	
	A	R, %	A	R, %	A	R, %	A	R, %	A,	R, %	A	R, %
1	7652	100,0	5266	100	6396	100	8994	100	7325	100	8267	100
2	7421	97,0	5107	97,0	6307	98,6	8567	95,3	7309	99,8	8002	96,8
3	6987	91,3	4908	93,2	6187	96,7	8147	90,6	7188	98,1	7999	96,8
4	6323	82,6	4645	88,2	5843	91,4	7926	88,1	7092	96,8	7789	94,2
5	5798	75,8	4173	79,2	5391	84,3	7325	81,4	6934	94,7	7455	90,2
6	4966	64,9	3589	68,2	4642	72,6	7005	77,9	6848	93,5	7267	87,9
7	4033	52,7	3076	58,4	3866	60,4	6543	72,7	6627	90,5	6933	83,9
8	3649	47,7	2589	49,2	2986	46,7	5699	63,4	6387	87,2	6729	81,4

A, área de pico; R, recuperación

5.2.8. Determinación de COPs mediante GC-FID en muestras de alimentos

El contenido de COPs en diferentes muestras lipídicas de alimentos, carne picada, jamón cocido, jamón serrano, queso fresco y salmon ahumado, fue determinado usando el método ASE indicado en 4.4.6.2, llevando a cabo el clean up de la muestra según se describe en 4.4.6.3 y aplicando el método de separación cromatográfica 4.4.7. La cuantificación de los COPs se realizó mediante el calibrado de estándar interno, 4.4.7.1, utilizando 6-ceto como IS y los valores medios de sus factores de respuesta (R_f) a diferentes concentraciones de los COPs (**Tabla 49**) calculados usando la información de la **Tabla 41**.

Tabla 49. Factores de respuesta (R_f) calculados a diferentes concentraciones

COP, mg/L	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	6-ceto	7-ceto
0.5	1.18	0.63	0.93	1.01	1.11	1.28
1.0	1.14	0.73	0.88	1.66	0.99	1.42
5.0	1.10	0.92	0.84	1.24	0.93	1.18
10.0	1.28	0.88	1.07	1.50	1.22	1.38
20.0	1.25	0.83	1.04	1.40	1.20	1.49
X	1.19	0.80	0.95	1.36	1.09	1.35

X, promedio de los factores de respuesta

5.2.8.1. Carne picada

Las muestras fueron analizadas por triplicado usando ambos métodos de extracción, ASE y lixiviación. En el análisis de la muestra sin irradiar, se obtuvo un cromatograma, **Figura 67**, que muestra la presencia de 7 β -OH, β -epoxide, α -epoxide y 7-ceto, los cuales fueron identificados mediante GC-MS, de acuerdo a la sección 5.3.5. En análisis de alimentos se refieren contenidos de estos compuestos que difieren de una forma significativa entre diferentes tipos y dentro de un mismo tipo de alimento; los contenidos de COPs en carne picada se encuentran dentro del intervalo que generalmente se refieren en alimentos (Folch et al., 1957; Terry Finacchiaro et al., 1984; Johnson, 1996; Ulberth y Rossler, 1998; Chang y Liu, 1998; Novelli et al., 1998; Tsuzukia et al., 2000; Petrón et al., 2003; Valenzuela et al., 2004; Al-Saghir et al., 2004; Busch y King, 2009).

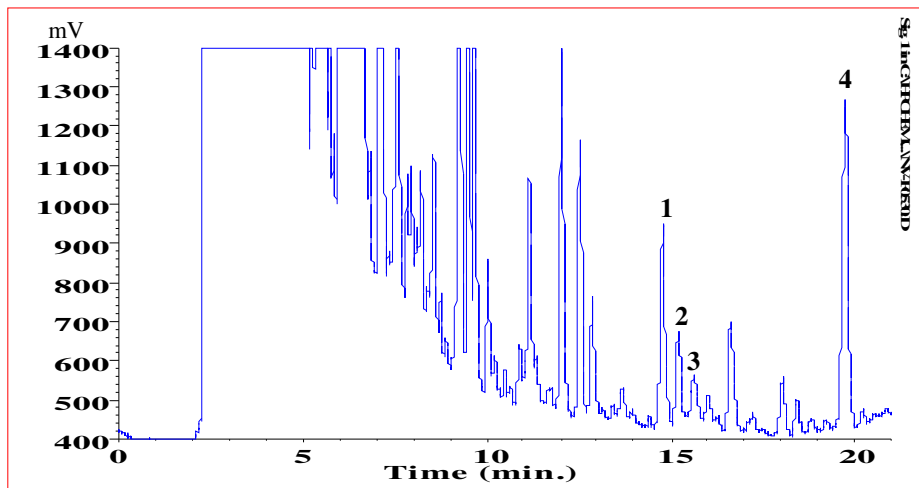


Figura 67. Cromatograma mediante GC-FID de los Tri-Sil derivados para carne picada sin irradiar. Picos, 1) 7-β-OH; 2) β-epóxido; 3) α-epóxido y 4) 7-ceto

5.2.8.2. Jamón cocido

En este caso, se detectaron todos los COPs estudiados, aunque el triol y 25-OH se encontraron en cantidades no cuantificables. Las cantidades encontradas en las muestras de Jamón cocido sin irradiar (**Figura 68**) fueron relativamente pequeñas, siendo el valor más alto para el 7-ceto (226 ng/g muestra); cabe resaltar que este compuesto es el que más frecuentemente se encuentra en los alimentos.

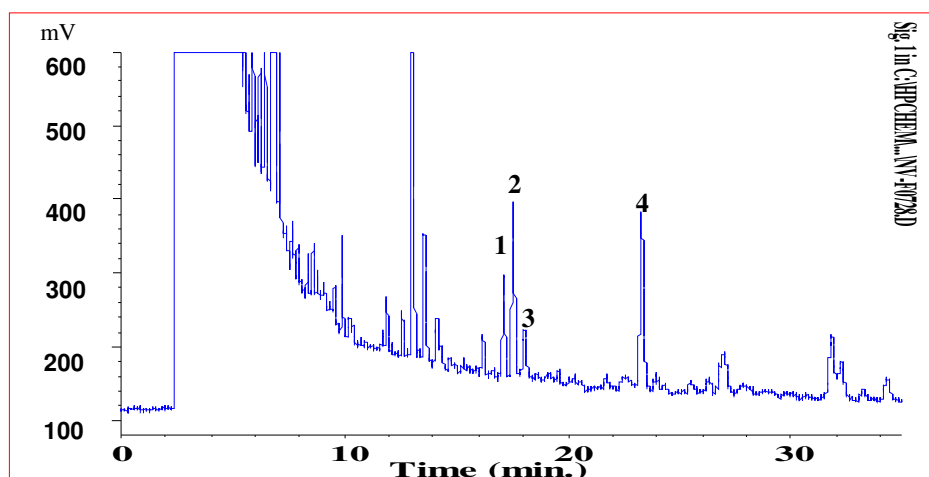


Figura 68. Cromatograma GC-FID de los COPs-Tri-Sil-derivados para jamón cocido sin irradiar. Picos, 1) 7-β-OH, 2) β-epóxido, 3) α-epóxido y 4) 7-ceto.

5.2.8.3. Jamón serrano

Todos los COPs estudiados fueron detectados, excepto 25-OH; el COP 7-ceto mostró el valor más alto de 531 ng/g. Estudios referidos en la bibliografía indican la presencia de una cantidad de 7-ceto significativa en jamón ibérico, (570-710 ng/g), aunque también detectaron 7β -OH, β -epóxido, α -epóxido, triol y 25-OH. En nuestro caso, las concentraciones fueron más bajas que las citadas en este estudio (Petrón et al., 2003). La **Figura 69** muestra el cromatograma de los Tri-Sil derivados obtenidos para una muestra sin irradiar de jamón serrano.

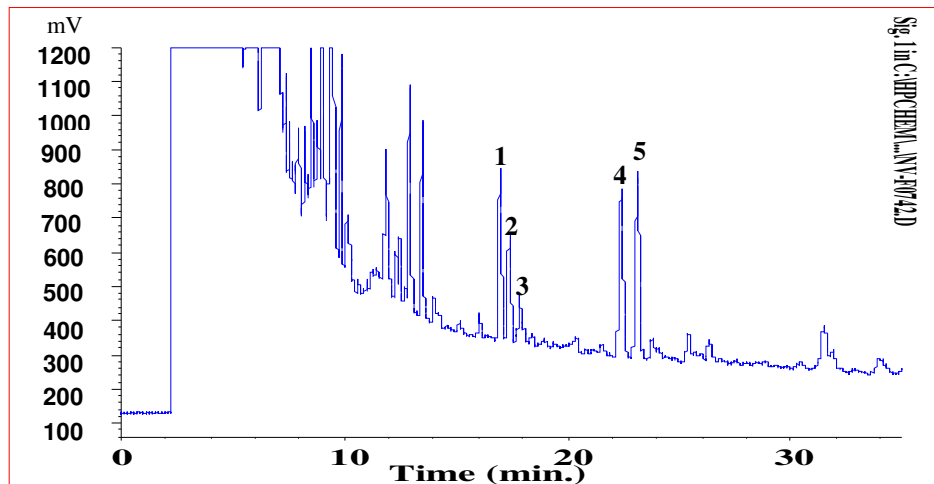


Figura 69. Cromatograma GC-FID de los COPs-Tri-Sil-derivados para jamón serrano sin irradiar. Picos, 1) 7β -OH, 2) β -epóxido, 3) α -epóxido y 4) SI (6-ceto) y 5) 7-ceto

5.2.8.4. Queso blando

En las muestras de Queso Blando sin irradiar se detectaron 4 de los 6 COPs objeto de este estudio, presentando el 7-ceto el contenido más alto, hasta de 259 ng/g; triol y 25-OH no fueron detectados. En la bibliografía se ha referido la identificación de los COPs

7 β -OH, β -epóxido, α -epóxido y 7-ceto en muestras de queso (Kristensen et al, 2001). La **Figura 70** muestra un cromatograma de la muestra de queso blando sin irradiar.

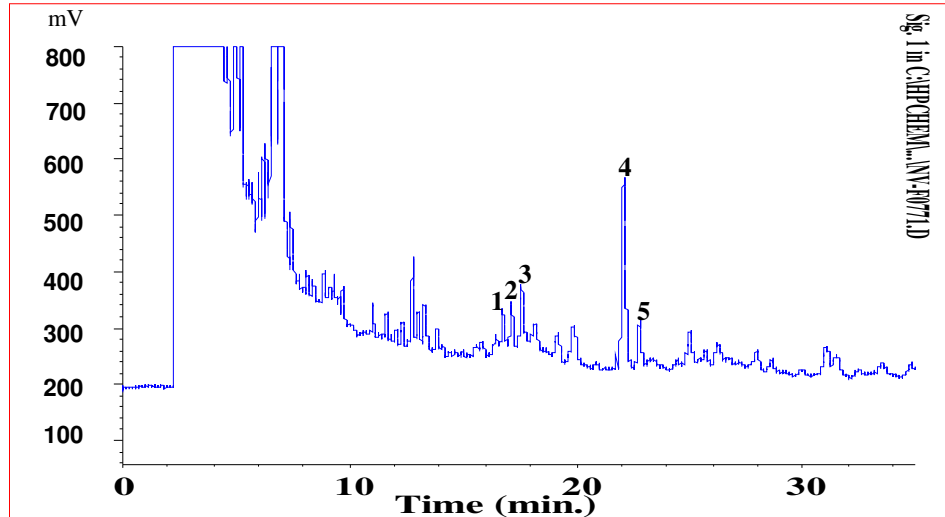


Figura 70. Cromatograma GC-FID de los COPs-Tri-Sil-derivados para queso blando sin irradiar. Picos, 1) 7 β -OH, 2) β -epóxido, 3) α -epóxido y 4) IS (6-ceto) y 5) 7-ceto

5.2.8.5. Salmón ahumado

Las muestras de salmón ahumado presentan unas características muy diferentes a las de las otras muestras estudiadas. El contenido de COPs en estas muestras tiene diferencias con los otros alimentos; en las muestras sin irradiar se observan los COPs 7 β -OH, β -epóxido y 25-OH; sin embargo el COP 7-ceto el cual aparecía en todas las muestras estudiadas no se detecta en muestras de salmón, **Figura 71**. En general, las cantidades de COPs en muestras de salmón son relativamente pequeñas obteniendo la cantidad mayor para 25-OH (116 ng/g). En un trabajo anterior se refiere la presencia de los COPs 7 β -OH, β -epóxido, α -epóxido, triol y 7-ceto en muestras de salmón sin ahumar sometidas a diferentes procedimientos de cocinado, lo cual indica que este alimento es susceptible a la formación de estos compuestos.

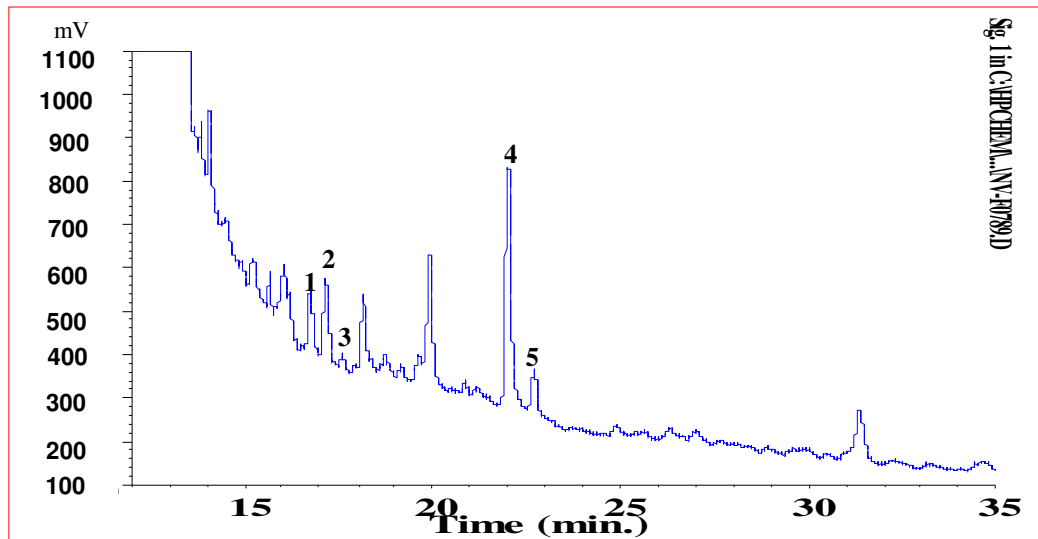


Figura 71. Cromatograma GC-FID de los COPs-Tri-Sil-derivados para Salmón ahumado sin irradiar. Picos, 1) 7β-OH; 2) β-epóxido; 3) α-epóxido; 4) IS (6-ceto) y 5) 25-OH

5.2.9. Validación del método para la determinación de COPs mediante GC

La precisión del método se evaluó determinando la desviación estándar relativa (RSD) ($n=3$) de muestras enriquecidas al nivel de concentración de 2 $\mu\text{g/g}$; asimismo, la exactitud se determinó mediante estudios de recuperación (R , %) de muestras enriquecidas con alícuotas de 16 μL de las disoluciones individuales de trabajo de 50 mg/L y aplicando el procedimiento total por triplicado. Se siguió el protocolo indicado en la parte experimental y las concentraciones de COP se determinaron utilizando los valores medios de los factores experimentales de respuesta (**Tabla 49**) para cada COP con respecto al 6-ceto, IS.

Para el cálculo se utilizó el factor de respuesta según la siguiente ecuación:

$$R_f = [\text{COP}] * A_{6\text{-Ceto}} / [6\text{-Ceto}] * A_{\text{COP}} \quad \text{Ecuación 26}$$

Donde:

[COP], concentración de cada COP; $A_{6\text{-Ceto}}$, área del pico del IS, 6-Ceto; [6-Ceto], concentración del IS, 6-Ceto; y A_{COP} , área de pico de cada COP

Los resultados mostrados en la **Tabla 50** indican que el método ASE propuesto es adecuado para la preparación de muestras lipídicas de alimentos mediante GC-FID. Para los COPs más polares, triol y 25-OH, se obtuvieron las recuperaciones más bajas (62-71 %) y, generalmente, valores de RSD más altos e inferiores al 12 %; esto indica, posiblemente, que la eficiencia del método dependa de la polaridad de los COPs.

Tabla 50. Recuperaciones de COPs en muestras de alimentos

Muestra	7 β -OH		β -epóxido		α -epóxido		triol		7-ceto		25-OH	
	R, %	RSD	R, %	RSD	R, %	RSD	R, %	RSD	R, %	RSD	R, %	RSD
Carne picada	89.0	10.2	84.0	13.1	89.5	9.2	91.0	6.6	92.5	6.0	85.4	12.6
Jamón cocido	85.2	5.7	94.0	9.9	80.2	8.1	62.5	10.7	95.2	20.0	67.4	11.4
Jamón serrano	81.4	7.9	81.9	10.9	74.5	9.1	66.9	10.2	81.1	7.8	67.0	11.1
Queso blando	75.3	11.3	78.8	2.1	82.0	5.2	63.2	13.0	88.0	8.3	70.1	12.9
Salmón ahumado	79.9	6.1	82.7	6.8	86.2	4.8	64.2	14.3	86.8	3.8	65.5	14.5

R, recuperación; RSD, desviación estándar relativa a nivel de 2 mg/L (n=3)

5.2.10. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en las muestras de alimentos. Estudios estadísticos

5.2.10.1. Análisis de la varianza, ANOVA

Para detectar posibles efectos debido al proceso de irradiación, se analizaron muestras no-irradiadas e irradiadas a diferentes dosis, hasta 8 kGy. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 51 a 56. La comparación de resultados para cada tipo de muestra se llevó a cabo mediante test ANOVA de un factor; el test ANOVA proporcionó diferencias significativas entre las concentraciones medias de COPs, indicadas por los valores α inferiores a 0.05 entre muestras no irradiadas e irradiadas, como se detalla en las muestras descritas a continuación.

5.2.10.1.1. Carne picada

Los valores medios del contenido de COPs en muestras de carne picada a diferente dosis de irradiación (0-8 kGy) se presentan en la **Tabla 51**. Los contenidos de COPs fueron comparativamente más altos que aquellos encontrados en las otras muestras estudiadas, probablemente debido a la mayor superficie de contacto de la carne picada lo cual facilita las reacciones de oxidación. El COP 7-ceto es el compuesto que se encuentra en mayor proporción, seguido por 7- β OH; β -epóxido se encuentra en cantidades apreciables y α -epóxido en cantidades relativamente pequeñas, los otros compuestos no fueron detectados por las dos técnicas usadas en este estudio (GC-FID y GC-MS).

Estos resultados indican que los COPs se formaron durante la irradiación de las muestras; en general, el contenido de COP aumenta cuando la dosis de irradiación aumenta, aunque no existe una relación lineal entre dosis de irradiación y concentración

de COP detectada. Se encontraron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95.0% para 7 β -OH, β -epóxido, α epóxido y 7-ceto, con valores de $\alpha < 0.05$.

Tabla 51. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de carne picada

<u>Dosis Irradiación, kGy</u>	<u>COPs, ng/g</u>					
	<u>7β-OH</u>	<u>β-epóxido</u>	<u>α-epóxido</u>	<u>triol</u>	<u>7-ceto</u>	<u>25-OH</u>
0	648	227	147	nd	1642	nd
0	678	207	162	nd	1668	nd
0	722	246	182	nd	1755	nd
1	836	867	228	nd	2191	26
1	891	932	235	nd	1917	24
1	939	1005	262	nd	2001	21
2	951	795	196	nd	2176	29
2	1041	859	178	nd	2029	36
2	996	824	183	nd	2315	32
4	1012	847	201	nd	2118	63
4	966	712	250	nd	1955	57
4	951	781	199	nd	2029	70
6	1067	1019	336	nd	2456	55
6	1250	773	305	nd	2705	63
6	1137	916	406	nd	2848	49
8	831	745	251	nd	2018	16
8	924	702	262	nd	2272	22
8	885	637	248	nd	2124	19

nd, no detectado

El test Tukey HSD se utilizó para determinar cuáles de estas dosis de irradiación eran diferentes. La **Figura 72** presenta las gráficas del test Tukey, las cuales visualizan las concentraciones medias de los intervalos al 95% para 7 β -OH, β -epóxido, α - epóxido y 7-ceto obtenidos a partir de las muestras de carne picada para cada dosis de irradiación.

Con respecto a las muestras irradiadas (dosis de irradiación de 1 a 8 kGy) no hubo diferencias significativas entre ellas a excepción de la dosis de 6 kGy que presenta el valor mayor. Por lo tanto, estas diferencias encontradas pueden atribuirse al sesgo en el análisis de muestras de carne picada.

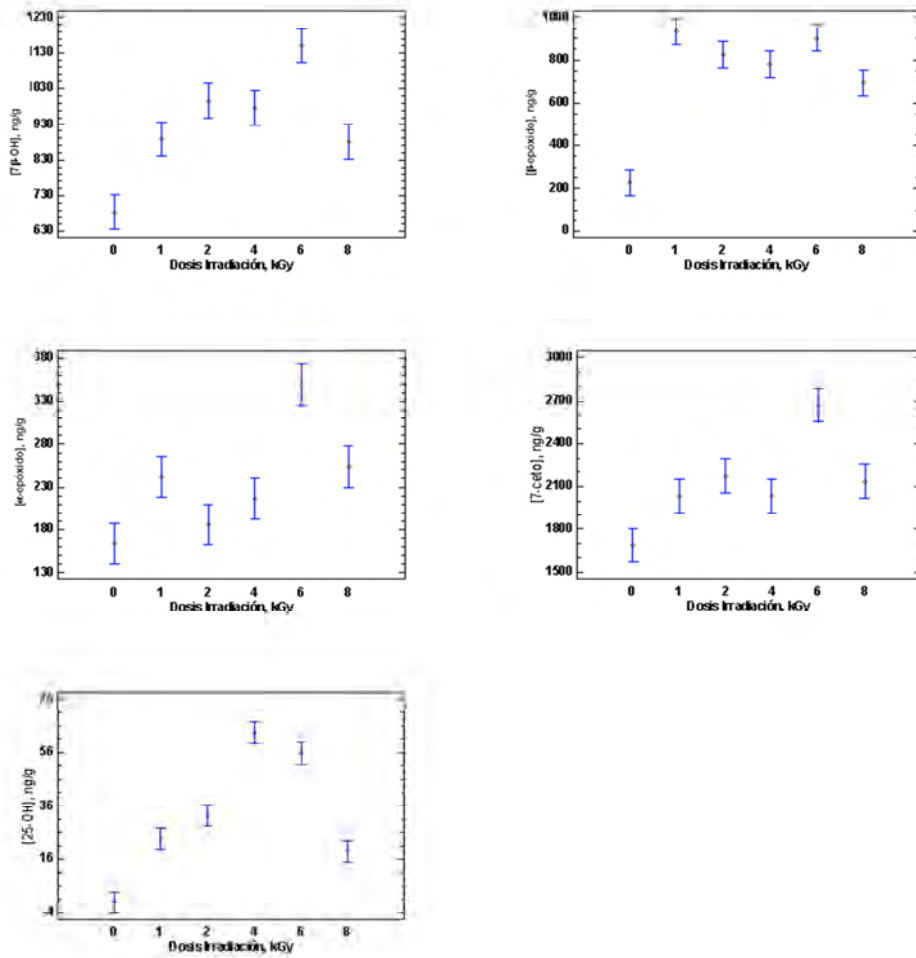


Figure 72. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en muestras de carne picada

Resumiendo, en general, el contenido de COPs aumenta cuando aumenta la dosis de irradiación, si bien no se obtuvo una relación lineal entre la dosis de irradiación y

concentración de COP. Los contenidos de COPs se multiplicaron por un factor de 1.2 a 1.7 en muestras irradiadas a 8 kGy con respecto a las no irradiadas. Varios autores han referido la presencia de COPs en otro tipo de alimentos procesados (Hwang y Maerker, 1993; Diehl, 1995; Du y Ahn, 2000; Ahn et al., 2001; Nam et al., 2001; Zanardi et al., 2009). Por otra parte, en relación a la esterilización microbiana, dosis de E-beam de hasta 2 kGy son eficaces para eliminar la bacteria *Listeria monocytogenes*, no produciendo cambios organolépticos significativos (Cabeza et al., 2007). Los niveles de COPs detectados fueron unas 100 veces inferiores a los niveles tóxicos in vitro e in vivo (Phelan y Mahler, 1997; Chang et al., 1997; Chang et al., 1998; Yin et al., 2000; Gheli et al., 2002;), por lo que la irradiación E-beam puede ser considerada como una técnica útil para esterilizar alimentos RTE de carne picada, al no estar afectada su seguridad química. Conclusiones similares se han obtenido para otros alimentos proteicos, como los productos lácteos, pescado y semillas de loto (Kim et al 2000; Gil et al., 2004; Morrissey y Kiely, 2006).

Como complemento se incluyen los resultados obtenidos empleando los dos métodos de preparación de muestra de carne picada (**Tabla 52**).

Tabla 52. Influencia del procedimiento de extracción y de la irradiación en la formación de COPs en muestras de carne picada

Dosis Irradiación, kGy	COP, ng/g (RSD, %), lixiviación					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
0	704(3.6)	302(11.9)	95(11.6)		1715(2.8)	
1	927(4.1)	384(5.9)	103(5.8)		1741(6.2)	
2	908(8.1)	473(4.8)	114(6.1)		1933(5.5)	
4	972(4.8)	420(8.3)	104(8.6)	nd	1779(2.0)	nd
6	1000(0.7)	420(3.3)	159(2.0)		1978(5.0)	
8	898(7.0)	457(3.3)	115(7.8)		2030(6.8)	
	[COP], ng/g (RSD, %), ASE					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
0	743(6.0)	644(4.2)	194(9.4)		1955(4.2)	
1	1186(5.8)	1216(7.4)	315(7.4)		2648(6.9)	
2	1296(4.5)	1074(3.9)	242(5.0)		2825(6.6)	
4	1270(3.3)	1015(8.7)	284(13.4)	nd	2644(4.0)	nd
6	1496(8.0)	1175(13.7)	454(14.9)		3470(7.4)	
8	1145(5.3)	904(7.8)	330(2.8)		2779(6.0)	

nd, no detectado; RSD, desviación estándar relativa

La **Figura 73** presenta el gráfico de dispersión para los COPs, contenidos encontrados para el 7-ceto frente aquellos obtenidos para β -epóxido, que son los COPs con contenidos más diferentes; se verifica que existen diferencias significativas entre las muestras irradiadas y no irradiadas tras análisis por los dos métodos de extracción (lixiviación y ASE). Además, las muestras irradiadas están correlacionadas en cada uno de los métodos con excepción de la dosis de 1 kGy para el método de lixiviación y 6 kGy para el método ASE, cuyos valores están dispersos.

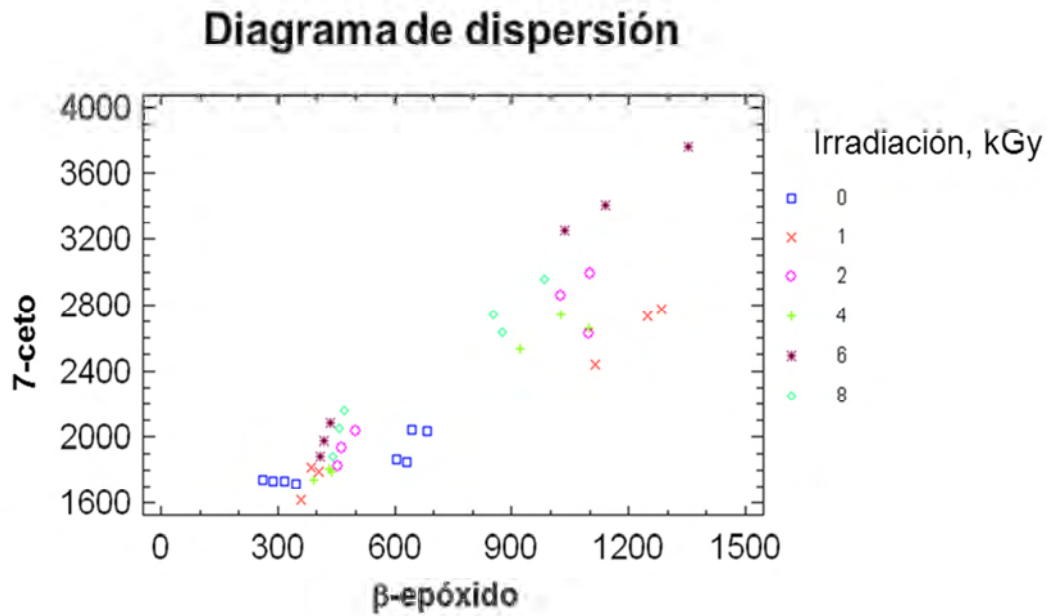


Figura 73. Gráfico de Dispersión para los COPs, 7-ceto/β-epóxido

5.2.10.1.2. Jamón cocido

En la **Tabla 53** se presentan los contenidos de COPs en muestras no-irradiadas e irradiadas de jamón cocido. Los valores más elevados fueron para 7β-OH, β-epóxido y 7-ceto, con cantidades máximas de 152, 287 y 522 ng/g respectivamente; en otros trabajos realizados con carnes frías como mortadela y salami se han determinado concentraciones de 7β-OH, α-epóxido, 7-ceto y 25-OH hasta de 18.69 μg/g, equivalente a más de 30 veces las cantidades obtenidas en este trabajo (Novelli et al., 1998).

Tabla 53. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de jamón cocido

Dosis Irradiación, kGy	COPs, ng/g					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
0	111	131	95	nq	188	nq
0	119	132	100	nq	190	nq
0	115	135	79	nq	226	nq
1	144	134	68	55	232	81
1	130	118	59	44	217	105
1	138	126	82	62	245	103
2	122	134	130	61	240	71
2	146	117	137	88	274	69
2	137	143	160	84	261	82
4	161	156	104	50	338	121
4	123	146	137	58	419	121
4	152	170	130	69	522	124
6	130	297	139	58	379	113
6	114	252	144	42	268	89
6	123	229	134	53	241	81
8	140	297	110	58	379	113
8	121	252	102	42	268	84
8	132	229	113	53	241	81

nq= no cuantificado

Los resultados del test ANOVA para los COPs presentes en esta matriz se muestran en la **Figura 74**; en general se observa un incremento en su contenido en las muestras irradiadas si bien los compuestos 7 β -OH, 7-ceto y 25-OH presentan los valores más altos y significativos cuando las muestras se irradian a 4 kGy.

En el caso del β -epóxido, el incremento es bastante significativo para las irradiaciones de 6 y 8 kGy; para las otras irradiaciones no se observan diferencias significativas. Sin embargo, en los contenidos de α -epóxido en las muestras, aunque se observa un incremento significativo cuando las muestras son irradiadas a partir de 2 kGy, las variaciones son muy dispersas, sin experimentar cambios significativos entre las

irradiaciones 2, 4, y 6. Por otra parte, el triol presenta los menores contenidos en las muestras irradiadas y se observa un incremento significativo a 2 kGy; tanto triol como 25-OH presentan un contenido no cuantificable en las muestras sin irradiar, si bien, en ambos casos, el aumento en su contenido en las muestras irradiadas es significativo siendo la diferencia más significativa a 2 y 4 kGy, respectivamente.

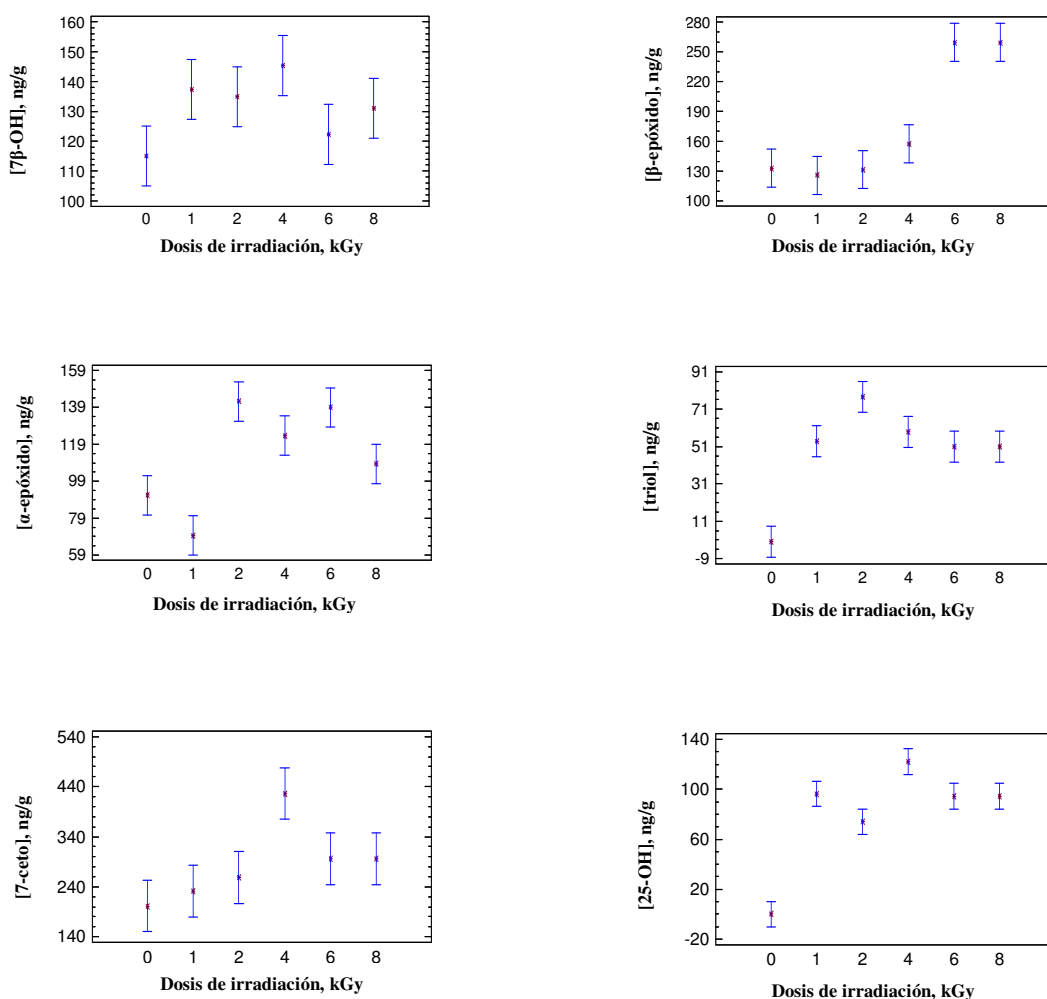


Figura 74. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en muestras de jamón cocido

5.2.10.1.3. Jamón Serrano

La **Tabla 54** presenta los contenidos de COPs para la muestra de jamón serrano. Los valores más altos se obtuvieron en muestras sin irradiar e irradiadas para el 7-ceto con contenidos que llegan a los 805 ng/g; para los isómeros β -epóxido y α -epóxido se obtuvieron alrededor de los 300 ng/g.

Tabla 54. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de jamón serrano

Dosis irradiación, kGy	COPs, ng/g					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
0	285	207	151	nq	473	nq
0	292	167	147	nq	437	nq
0	272	181	170	nq	531	nq
1	305	215	178	55	538	110
1	317	236	214	70	576	134
1	282	254	187	73	495	105
2	278	217	184	70	576	131
2	295	211	180	62	530	137
2	312	253	212	67	619	124
4	302	264	197	39	613	71
4	253	222	185	33	660	90
4	287	244	236	54	765	124
6	297	225	175	31	717	179
6	308	237	196	38	717	196
6	325	229	220	47	805	202
8	236	172	159	12	499	138
8	257	194	141	10	519	154
8	277	229	177	53	511	172

nq, no cuantificado

El test ANOVA indica que en todos los casos incrementa el contenido de COPs de forma significativa entre muestras no irradiadas e irradiadas excepto para el 7 β -OH que no existe diferencias significativas entre ellas. Para los COPs 7 β -OH, 7-ceto y 25-OH el mayor contenido se obtuvo cuando las muestras se irradiaron a 6 kGy; el β epóxido

presenta un comportamiento similar a su isómero, α -epóxido, en esta matriz, obteniéndose un valor máximo a 4 kGy; en el caso del 7-ceto se observa un incremento gradual de su contenido hasta 6 kGy y luego disminuye bruscamente cuando se irradian las muestras a 8 kGy; sin embargo, el contenido de 25-OH se incrementa de una manera irregular con la irradiación obteniéndose el valor mayor a 6 kGy.

El triol es el COP que presenta el menor contenido aumentando significativamente con las dosis de irradiación, siendo sus valores más altos para las irradiaciones 1 y 2 kGy.

Todos estos efectos se observan en la **Figura 75**.

En general, existe una tendencia a disminuir el contenido de COPs cuando las muestras se irradian a 8 kGy, a la que no se encuentra explicación, por el momento.

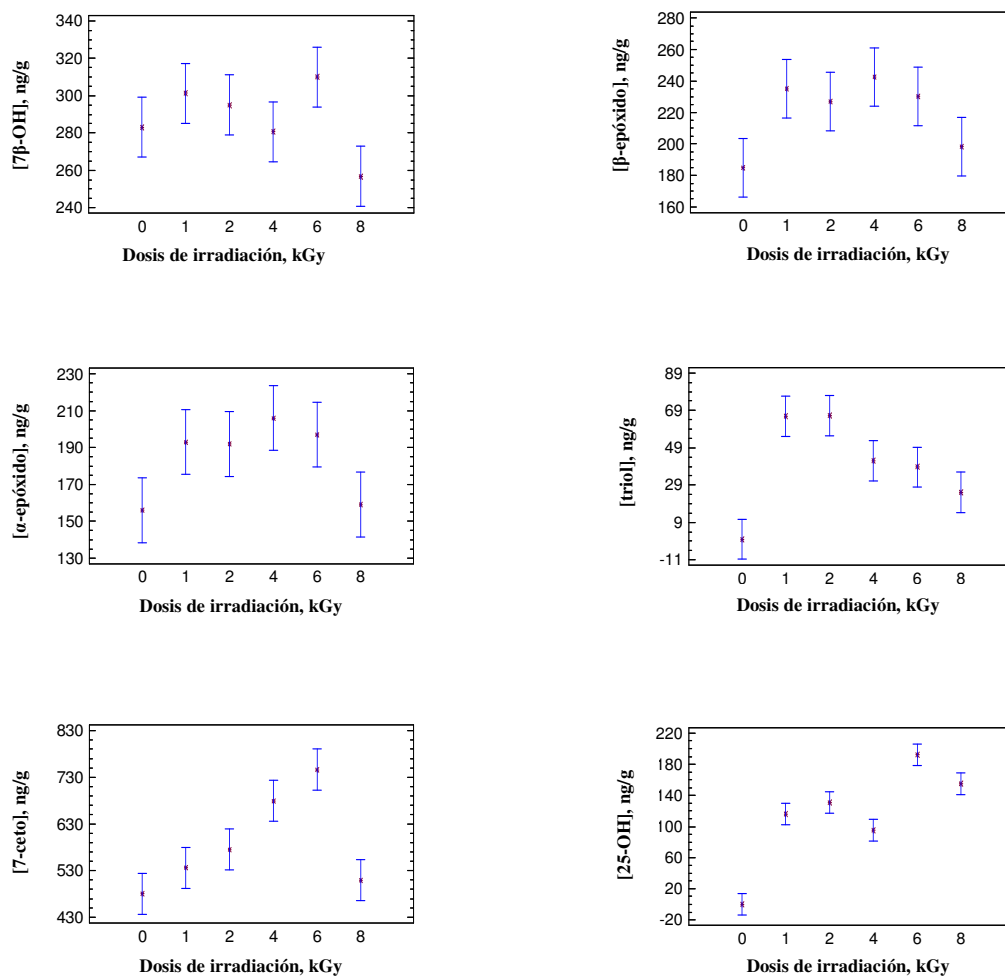


Figura 75. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en muestras de jamón serrano

5.2.10.1.4. Queso blando

La **Tabla 55** presenta los contenidos de COPs en muestras de queso no irradiadas e irradiadas.

Tabla 55. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de queso blando

Dosis irradiación, kGy	COP, ng/g					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
0	137	100	146	nd	189	nq
0	145	126	154	nd	181	nq
0	136	104	182	nd	199	nq
1	129	101	139	nd	242	96
1	138	100	139	nd	241	105
1	125	103	142	nd	205	122
2	139	91	156	nd	223	138
2	130	83	151	nd	234	113
2	146	81	146	nd	227	120
4	110	88	163	nd	179	153
4	111	86	159	nd	182	140
4	97	94	170	nd	188	138
6	150	110	189	nd	247	186
6	170	110	187	nd	278	170
6	170	98	184	nd	280	160
8	264	118	193	nd	254	125
8	265	145	205	nd	395	107
8	240	121	220	nd	388	132

nq, no cuantificado; nd, no detectado

Los resultados del test ANOVA indican que el contenido de 7 β -OH y 7-ceto se incrementa significativamente al irradiar las muestras a 6 y 8 kGy y no se observan diferencias significativas entre las muestras sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy.

El 7 β -epóxido presenta un comportamiento especial en donde se observa inicialmente una disminución con las dosis de irradiación 1, 2 y 4 kGy pero se incrementa significativamente a la irradiación de 8 kGy; algo muy similar ocurre con el α -epóxido aunque aquí el efecto se observa únicamente en las irradiaciones 1 y 2 kGy presentando a las dosis de irradiación 6 y 8 kGy el contenido más alto. El 25-OH se incrementa

significativamente con la irradiación a todas las dosis y alcanza el contenido más alto a 6 kGy. En la muestra de queso a partir de una cierta dosis de irradiación (en general 4, 6 y 8 kGy) parece que existe una correlación con el contenido de COPs. En la **Figura 76** se presentan los gráficos de medias obtenidos para cada COP en la muestra de queso blando.

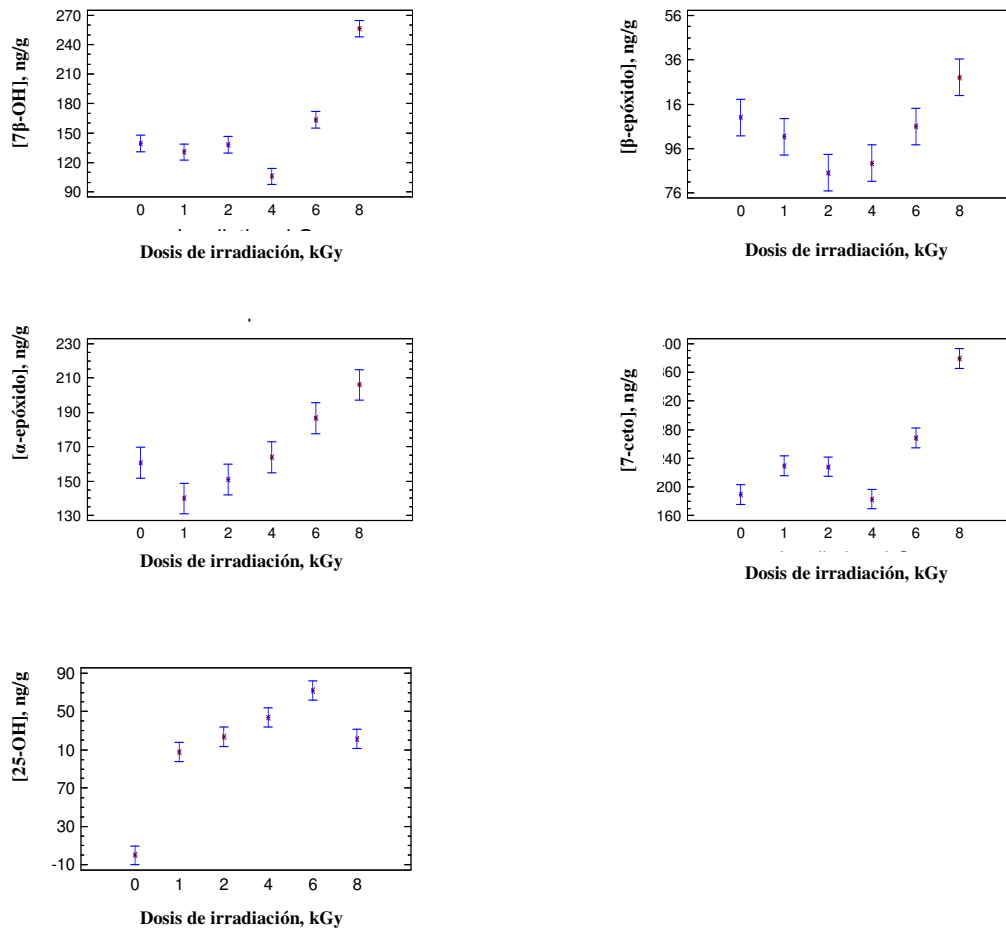


Figura 76. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en muestras de queso blando

5.2.10.1.5. Salmón ahumado

Estas muestras cuando son irradiadas presentan cambios organolépticos y de su textura; las sustancias que producen el color característico del salmón ahumado desaparecen de

manera progresiva con la dosis de irradiación y cambia el olor de las muestras. La **Tabla 56** presenta los contenidos de COPs en muestras de salmón ahumado a las distintas dosis de irradiación.

Tabla 56. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de salmón ahumado

Dosis Irradiación, kGy	COP, ng/g					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
0	31	59	nq	nq	nq	99
0	46	46	nq	nq	nq	116
0	53	41	nq	nq	nq	92
1	160	201	36	34	41	153
1	192	242	38	36	40	200
1	149	187	29	31	48	172
2	163	167	29	46	47	101
2	144	156	24	52	48	75
2	141	146	23	36	56	81
4	151	220	29	27	36	145
4	86	199	22	27	34	154
4	119	242	37	31	33	196
6	151	222	29	27	36	183
6	136	266	33	21	30	218
6	153	220	27	29	33	200
8	163	167	29	46	16	101
8	144	156	24	52	16	75
8	141	146	23	36	19	81

nq, no cuantificado

El test ANOVA indica que, en general, el contenido de COPs se incrementa significativamente al irradiar las muestras, pero su contenido no tiene un comportamiento lineal con las dosis de irradiación; 7 β -OH, β -epóxido y 25-OH son los que muestran mayor incremento, si bien este último presenta un comportamiento bastante disperso con la irradiación incrementándose significativamente su contenido

con la irradiación de 6 kGy a la cual se alcanzaron valores superiores a 200 ng/g; sin embargo, a las dosis de 2 y 8 kGy no hubo diferencias significativas en su contenido con la muestra sin irradiar. α -epóxido, triol y 7-ceto no fueron encontrados en las muestras sin irradiar y el aumento de su contenido, aunque significativo, no fue muy alto. La tendencia general fue un aumento significativo de su contenido en las muestras irradiadas, aunque el valor más alto no fue a la misma dosis de irradiación, **Figura 77**.

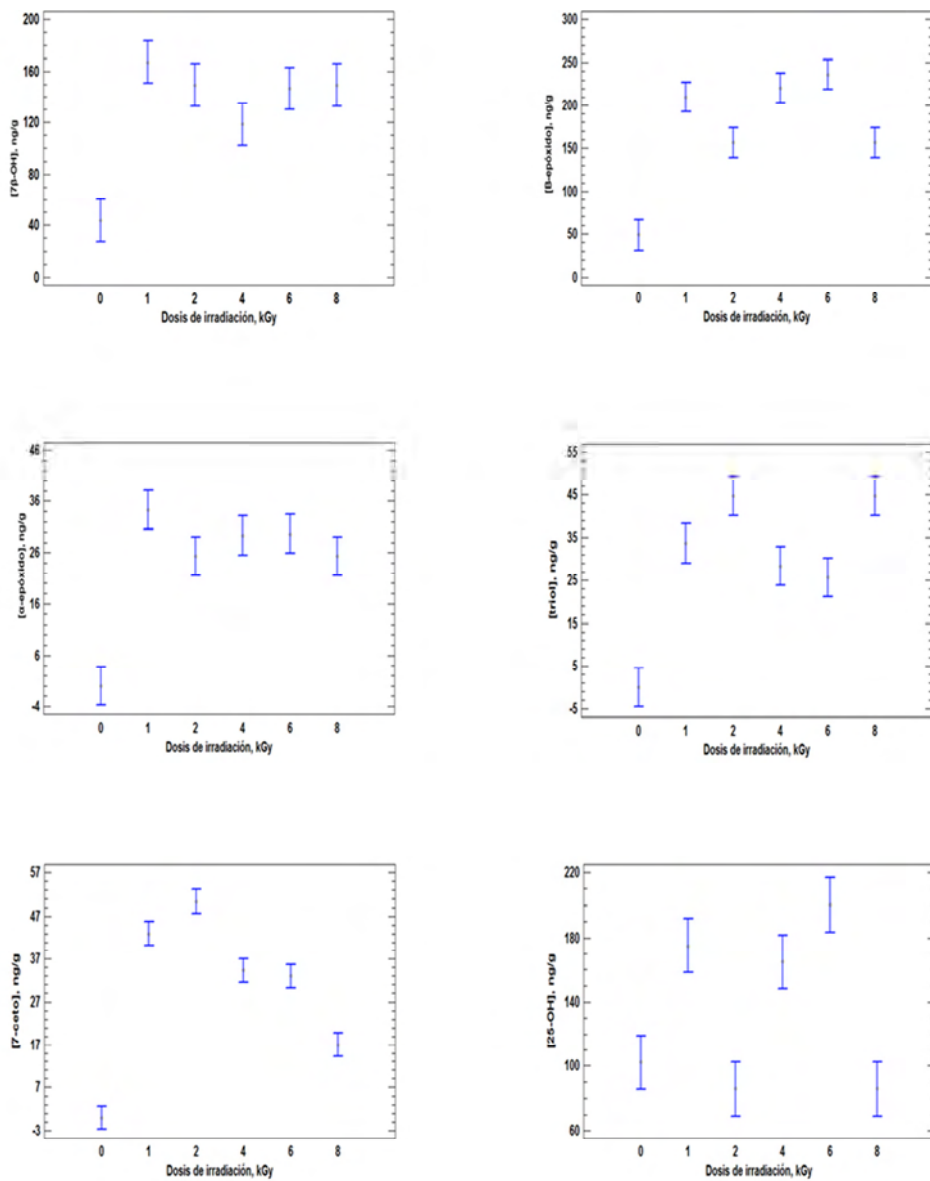


Figura 77. Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en muestras de salmón ahumado

Se aplicó también a los datos obtenidos en la **Tablas 51 a 56** el test ANOVA de dos factores (irradiación y muestra); mostrando además, diferencias significativas al nivel de confianza del 95% entre los valores medios obtenidos para cada COP en las distintas muestras.

A modo de ejemplo, la **Figura 78** presenta los cromatogramas obtenidos de las muestras de jamón serrano, no-irradiada e irradiada a 8 kGy.

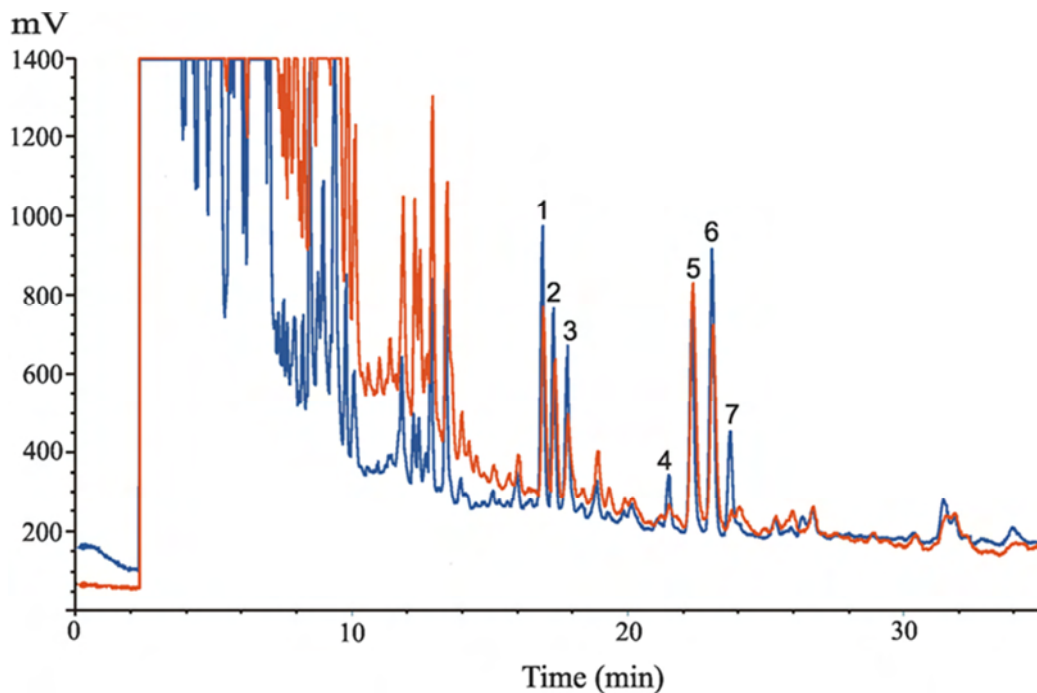


Figura 78. Cromatogramas obtenidos con muestras de jamón serrano no irradiada (—) e irradiada a 8 kGy (—). Picos cromatográficos: 1) 7 β -OH; 2) β -epóxido; 3) α -epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto (IS); 6) 7-ceto; 7) 25-OH

Se puede concluir que el comportamiento de cada COP depende del tipo de muestra.

Teniendo en cuenta que el análisis ANOVA no ha proporcionado una información completa sobre el efecto de la irradiación en la formación de COPs y la naturaleza de la muestra, se ha llevado a cabo un estudio multivariante de los datos mediante análisis de

componentes principales, si bien en primer lugar se comprueba si existe correlación entre las variables originales para la posible aplicación de dicha técnica quimiométrica.

5.2.10.2. Análisis de correlación

Con los datos obtenidos para las distintas irradiaciones en las diferentes muestras analizadas se llevó a cabo un análisis multivariado para ver las correlaciones existentes entre las diferentes variables estudiadas y con las dosis de irradiación. En la **Tabla 57**, se muestra la matriz de correlación en la que se observa que entre 7-OH y β -epóxido, 7-OH y 7-ceto, así como β -epóxido y 7-ceto los valores del coeficiente lineal de Pearson son próximos a la unidad ($\alpha < 0.05$). También se encuentran correlacionadas las variables 7-OH con α -epóxido, α -epóxido con 7-ceto y β -epóxido con α -epóxido; en todos los casos con correlación positiva.

Tabla 57. Matriz de correlación con los datos de las cinco muestras analizadas mediante GC-FID

	Irradiación	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
Irradiación		0,0759	0,1359	0,1877	0,1024	0,0793	0,3784
		0,4772	0,2014	0,0765	0,3369	0,4575	0,0002
7 β -OH	0,0759		0,9268	0,6886	-0,3783	0,9841	-0,4530
	0,4772		0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000
β -epóxido	0,1359	0,9268		0,5983	-0,2773	0,9050	-0,3705
	0,2014	0,0000		0,0000	0,0081	0,0000	0,0003
α -epóxido	0,1877	0,6886	0,5983		-0,2508	0,7398	-0,2847
	0,0765	0,0000	0,0000		0,0171	0,0000	0,0065
triol	0,1024	-0,3783	-0,2773	-0,2508		-0,3628	0,3431
	0,3369	0,0002	0,0081	0,0171		0,0004	0,0009
7-ceto	0,0793	0,9841	0,9050	0,7398	-0,3628		-0,4755
	0,4575	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004		0,0000
25-OH	0,3784	-0,4530	-0,3705	-0,2847	0,3431	-0,4755	
	0,0002	0,0000	0,0003	0,0065	0,0009	0,0000	

En la **Figura 79** se presenta el gráfico de dispersión de la matriz de correlación, en la que se confirma, por la tendencia de los puntos, las correlaciones observadas en la matriz. En ambos casos, se muestra claramente que los distintos COPs estudiados no

están correlacionados linealmente con la variable dosis de irradiación junto con el tipo de correlación, positivo o negativo, entre las distintas variables.

Teniendo en cuenta que existen correlaciones entre algunas variables estudiadas y que, además, el análisis ANOVA no ha proporcionado una información completa sobre el efecto de la irradiación y de la naturaleza de la muestra en la formación de COPs, se ha llevado a cabo un estudio multivariante de los datos mediante análisis de componentes principales.

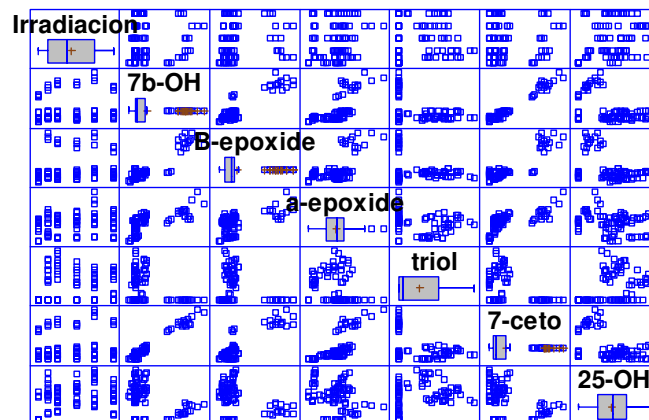


Figura 79. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las cinco muestras analizadas mediante GC-FID

Análisis de Componentes Principales, PCA.

Teniendo en cuenta las variables especificadas en la **Tabla 52**, y los datos recogidos en las **Tablas 51 a 56**, se realizó un estudio mediante PCA acerca de la influencia de la irradiación en la formación de los COPs para cada tipo de muestra. Teniendo en cuenta que se estudian seis variables originales, 7β -OH, β -epóxido, α -epóxido, triol, 7-ceto y 25-OH, podrían obtenerse hasta seis componentes principales. En general, se obtuvieron

dos componentes principales que explican un porcentaje de varianza acumulada superior al 70% para todas las muestras, excepto para carne picada (cuyo autovalor de PC2 fue inferior a la unidad). En el nuevo espacio, cada variable, componente principal, está formada por la combinación lineal de las seis variables originales cuyos autovectores son los coeficientes de cada una de las variables e indican el peso de las mismas en el componente principal. En la **Tabla 58** se presentan los resultados del autovalor del primer y segundo componente, PC1 y PC2, para cada tipo de muestra; sus ecuaciones tienen en cuenta los autovectores correspondientes a dichos autovalores así como el porcentaje de varianza explicada y acumulada.

Tabla 58. Estudio de la influencia de la irradiación de las muestras de alimentos mediante PCA

Muestra	PC	Autovalor	Ecuación	Varianza %	
				explicada	acumulada
CP	1	4.10	0.33 * irradiación +0.46 *7β-OH + 0.39 * α-epóxido + 0.41 * β-epóxido + 0.45* 7-ceto + 0.39 * 25-OH	68.3	82,22
	2	0.84		13.9	
JC	1	3.52	0.39 *irradiación +0.30 *7β-OH + 0.31 *β-epóxido + 0.31 *α-epóxido + 0.41 * Triol + 0.42 *7-ceto + 0.47 *25-OH -0.45*irradiación +0.54*7b-OH - 0.57 *β-epóxido - 0.19 *α-epóxido + 0.31 * Triol + 0.10 *7-ceto + 0.17 *25-OH	50.3	74.2
	2	1.67		23.9	
JS	1	3.65	-0.10 *irradiación - 0.34 *7β-OH - 0.44 *β-epóxido - 0.47 *α-epóxido - 0.41 * Triol - 0.40 * 7-ceto - 0.35 *25-OH 0.72 *irradiación - 0.37*7-OH - 0.15 *β-epóxido - 0.14 *α-epóxido - 0.16* Triol + 0.20 * 7-ceto + 0.48 *25-OH	52.2	77.1
	2	1.74		24.9	
QB	1	4.01	0.45 *irradiación + 0.46 *7β-OH + 0.36 *β-epóxido + 0.45 * α-epóxido + 0.47 *7-ceto + 0.17 *25-OH 0.33 *irradiación -0.21*7β-OH - 0.49 *β-epóxido + 0.03 * α-epóxido - 0.04 *7-ceto + 0.79 *25-OH	66.8	89.6
	2	1.37		22.8	
SA	1	4.32	0.23 *irradiación0.45 *7b-OH + 0.44 * β-epóxido + 0.47 *α-epóxido + 0.37 *Triol + 0.38 *7-ceto + 0.23 *25-OH -0.34*irradiación - 0.16*7-OH + 0.28 * β-epóxido + 0.075 *α-epóxido - 0.50 *Triol - 0.04 *7-ceto + 0.72*25-OH	61.7	81.1
	2	1.36		19.4	
CP	1	3.86	0,0284152*Irradiación + 0,493563*7β-OH + 0,461557*β-epóxido + 0,395328*α-epóxido - 0,24094*Triol +	55,1	
JC			0,496925*7-ceto - 0,285101*25-OH		
JS	2	1,41	0,741365 *Irradiación+ 0,0632389 *7β-OH + 0,135596 *β-epóxido + 0,202093*α-epóxido - 0,30655 *Triol +	20,1	75,2
QB			0,0651085 *7-ceto - 0,53753 *25-OH		
SA					

5.2.10.2.1. Carne picada

Se aplicó la técnica de PCA a los datos obtenidos para las muestras sin irradiar e irradiadas de carne picada mostrados en la **Tabla 51**. El programa Statgraphics sólo mostró, de los seis posibles componentes principales, una PC1, según el criterio de $\text{autovalor} > 1$, la cual explica un 68.3% de la variabilidad de los datos. Este hecho indica que no es posible visualizar los datos en el nuevo espacio de las componentes principales.

5.2.10.2.2. Jamón cocido

Para las muestras de jamón cocido, aplicando la técnica de PCA a los datos de la **Tabla 52**, se obtienen dos componentes principales cuyo diagrama bigráfico, dispersión y peso de los componentes, PC2 frente a PC1, se muestra en la **Figura 80**. Se observa que las muestras no irradiadas son claramente diferentes a las irradiadas a 4, 6 y 8 kGy. Las muestras irradiadas a dosis de 1 y 2 kGy se encuentran en una posición intermedia, lo cual puede indicar una transición de las muestras no-irradiadas a muestras con altas dosis de irradiación.

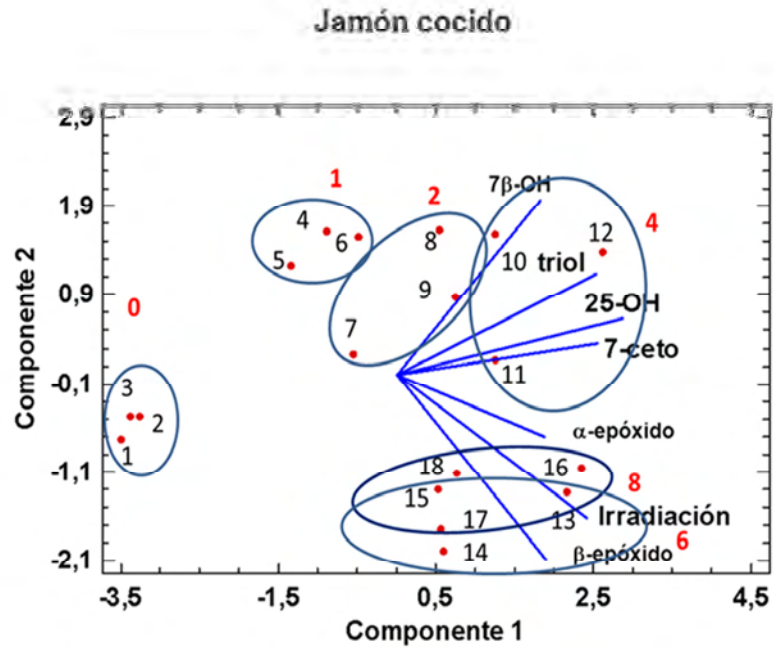


Figura 80. Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en muestras de jamón cocido

Se pueden sacar otras conclusiones para las muestras de jamón cocido; a las dosis de irradiación de 6 y 8 kGy el contenido de α - y β -epóxidos es alto y a las dosis de irradiación más bajas fue más favorable la formación de los compuestos menos apolares, tales como 25-OH y triol. El alto contenido en agua en esta muestra (Tabla 32) puede favorecer la formación de estos COPs. Las muestras sin irradiar se caracterizan por ausencia de COPs; al aumentar la irradiación, las muestras quedan caracterizadas por la presencia de 7β -OH y triol, y para dosis altas se caracterizan por la presencia de epóxidos. Este comportamiento se podría asociar con alto contenido en agua y bajo en colesterol; sin embargo, muestras con relaciones similares se comportan de forma

diferente (como se verá en las Figuras 111 y 113); en consecuencia otros componentes de la muestra están involucrados en la formación de COPs.

5.2.10.2.3. Queso blando

Asimismo, con los datos de la muestra de queso (Tabla 55) se obtuvieron, mediante PCA, dos componentes principales, cuyo diagrama bigráfico, dispersión junto a peso de los componentes PC2 vs PC1 se presenta en la **Figure 81**. Puede observarse también un tipo de transición. Las diferencias entre muestras no-irradiadas e irradiadas no aparecen hasta dosis de irradiación altas, 6 y 8 kGy, como indica la formación de α -epóxido, 7-ceto y 7β -OH.

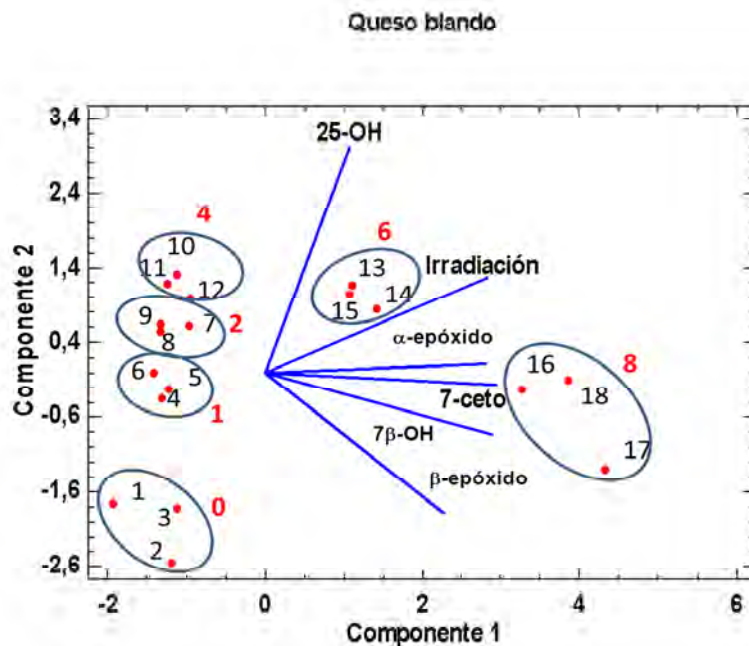


Figura 81. Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en muestras de queso blando

Para dosis de irradiación bajas, el alto contenido en grasa (Tabla 34) podría proteger la formación de COPs. Este comportamiento es claramente diferente al del jamón cocido que tiene un bajo contenido en grasa, resultando obvia la correlación entre contenido en grasa y formación de COPs. Comparando las muestras de jamón cocido y queso blando muy diferentes en lípidos, ambas quedan caracterizadas a altas irradiaciones por la aparición de 7-ceto.

5.2.10.2.4. Jamón Serrano

La aplicación del PCA a los datos de la muestra de jamón serrano (Tabla 54) proporcionó dos componentes principales, cuyo diagrama bigráfico, dispersión junto a peso de los componentes PC2 vs PC1 se presenta en la **Figure 82**. Se presentan efectos similares a aquellos observados en las muestras de queso hasta dosis de irradiación de 6 kGy, disminuyendo la concentración de COPs a 8 kGy, hecho para el que no se ha encontrado explicación hasta el momento. Las muestras quedan caracterizadas por la formación de α -epóxido, β -epóxido y 7-ceto a dosis de irradiación intermedias; esto

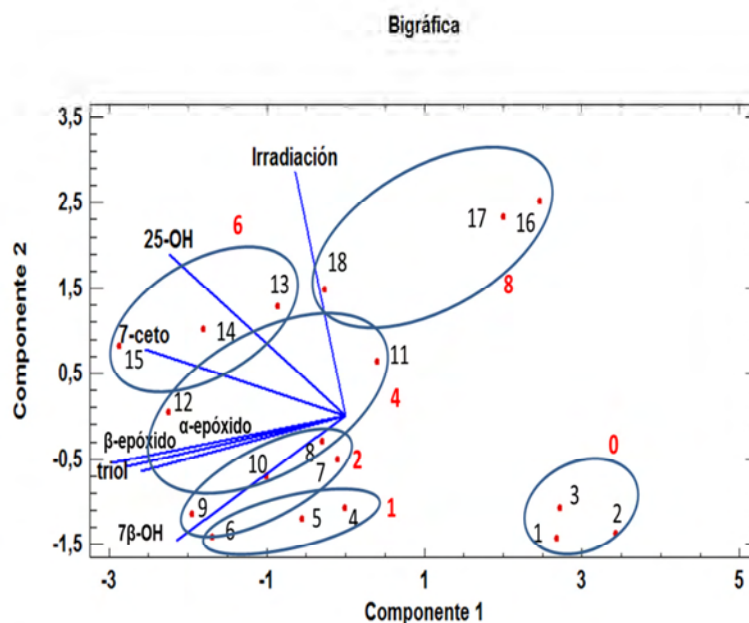


Figura 82. Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en muestras de jamón serrano

podría ser debido a que presentan un contenido de lípidos y agua similar, pero su contenido en sal es diferente. A dosis de irradiación bajas, 1 y 2 kGy, fueron detectados contenidos de 7-OH y triol lo que podría justificar las diferencias observadas.

5.2.10.2.5. *Salmón ahumado*

Al aplicar el PCA a los datos de las muestras de salmón ahumado (**Tabla 56**) se observó un comportamiento similar a las muestras de queso pero únicamente a dosis de irradiación bajas, formando α -epóxido, 7-keto and 7-OH. El alto contenido en agua de estas muestras (Tabla 32) pudiera explicar el contenido de 25-OH encontrado inicialmente, si bien no sufre cambios apreciables después de la irradiación a todas las dosis; a 2 y 8 kGy disminuye su contenido. De otra parte, a dichas dosis, se mostró el triol como el compuesto que más se modifica. La **Figura 83** muestra los efectos comentados.

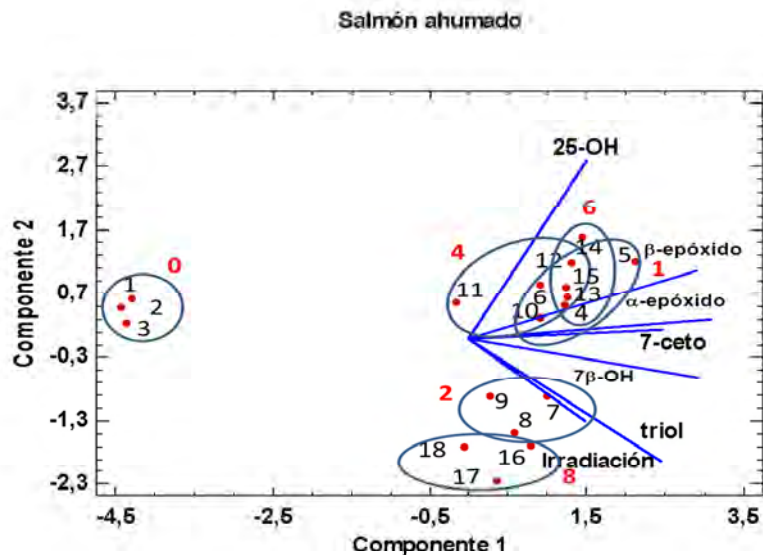


Figura 83. Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en muestras de salmón ahumado

En general, se puede concluir que se observaron diferencias significativas entre las muestras no-irradiadas e irradiadas. Se encontraron las mayores diferencias para las muestras de jamón serrano y salmón ahumado a todas las dosis de irradiación estudiadas, por lo que existe un claro efecto debido a la irradiación y al tipo de muestra sobre la formación de COPs. Además, la formación de 25-OH puede verse favorecida en las muestras con alto contenido en agua. Sin embargo, para las otras muestras estudiadas, el contenido de 25-OH no parece ejercer influencia.

El análisis de PCA realizado a todas las muestras en conjunto proporcionó la gráfica de la **Figura 84**; se observa una clara diferencia entre las muestras sin irradiar e irradiadas, así como una agrupación según el tipo de muestra y dosis de irradiación. El componente PC1 proporciona la variabilidad de los COPs, en general, según aumenta el contenido en agua de las muestras y el PC2 explica la variabilidad en cuanto al incremento de la dosis de irradiación.

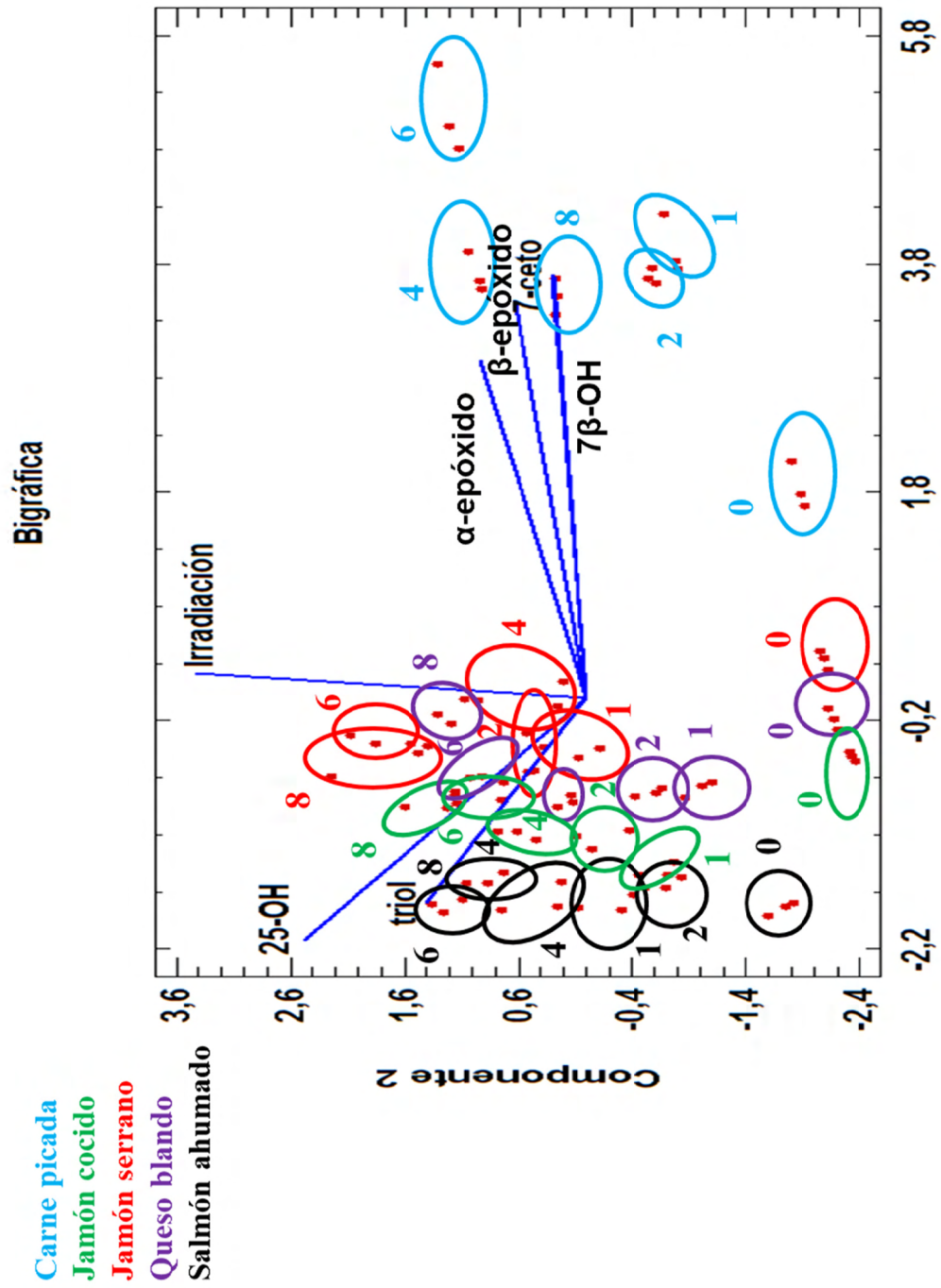


Figura 84. Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en las muestras de alimentos estudiadas

5.3. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE LAS MUESTRAS, CONTENIDO EN AGUA, LÍPIDOS Y COLESTEROL SOBRE LA FORMACIÓN DE COPs

5.3. Influencia de los parámetros característicos de las muestras, contenido en agua, lípidos y colesterol sobre la formación de COPs

Los óxidos de colesterol de origen animal en alimentos pueden estar presentes en muestras frescas debido a que su formación puede estar asociada a procesos enzimáticos. Además, los COPs están incluidos en la fracción lipídica y su formación podría estar relacionada con el contenido de lípidos y colesterol; por ello, estos parámetros fueron previamente determinados en muestras no irradiadas como se indica en 4.4.14.

Las muestras incluidas en este estudio han sido sometidas a diferentes tipos de procesos durante los cuales, en algunas de ellas, se agregan o se extraen algunos componentes de la matriz original. Así, en los procesos de fabricación de las carnes frías además de someter el alimento a cambios de T, se agregan algunos productos como almidón lo cual hace variar significativamente su composición inicial; en el caso del queso, el alimento inicial (leche) sufre cambios de pH y de T, además de perder sustancias significativas como es agua y sales, entre otros componentes, de ahí que existan diferencias en el comportamiento de los COPs con otros alimentos que han sido menos manipulados como es el jamón serrano y el salmón ahumado; estos aspectos condicionan que las cantidades de colesterol que se oxiden para formar COPs varíen en los diferentes tipos de alimentos; en consecuencia, conocer las relaciones colesterol/lípidos y COPs/colesterol presenta interés evidente.

En este estudio se tiene en cuenta tanto las muestras analizadas mediante HPLC-UV como aquellas analizadas mediante GC-FID, si bien la información suministrada mediante GC será más amplia ya que esta técnica permite determinar todos los COPs

en forma de derivados, mientras que mediante HPLC se han determinado, únicamente, aquellos COPs que presentan propiedades de absorción en la región del espectro UV.

5.3.1. Análisis mediante HPLC-UV

En la **Tabla 59** se resume el contenido de agua, lípidos, colesterol y de cada COP en las muestras analizadas y se incluye también el contenido total de COPs (COP_{ST}) y las relaciones colesterol/lípidos y COP_{ST} /colesterol para las muestras estudiadas mediante HPLC-UV. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado siendo los valores de RSD para COP_{ST} inferiores al 3 %. El contenido de agua en todas las muestras fue superior a 30 %. El menor contenido en lípidos y colesterol fue obtenido para las muestras de jamón cocido, 2.5 y 13.2% respectivamente, y el contenido mayor se encontró en la muestra de queso blando, 33.9 y 50.7% respectivamente; sin embargo, en ninguna de las dos muestras se detectaron COPs. La relación colesterol/lípidos fue similar en todas las muestras excepto en jamón cocido que fue del orden de tres veces mayor. La relación COP_{ST} /colesterol obtenida fue más alta en la muestra de carne picada, posiblemente debido a que este alimento presenta mayor área superficial y sea más fácil su oxidación.

La matriz de correlación, **Tabla 60**, presenta los coeficientes bivariados de Pearson, indicando que existe correlación positiva entre las variables 25 OH-7 ceto, 7 ceto- COP_{ST} y lípidos- COP_{ST} y correlación negativa entre las variables 7 ceto-agua, agua-lípidos y agua-colesterol, como cabía esperar. Dichas correlaciones se pueden visualizar mediante la linealidad de las variables en el gráfico de dispersión de la matriz de correlaciones (**Figura 85**).

Tabla 59. Influencia de los parámetros característicos de los alimentos sobre la formación de COPs. Análisis mediante HPLC-UV

Muestra	25-OH		7-ceto		Agua		Lip ^b		Col ^d		Col/lip		COPs _T ^f		COPs _T /Col, x10 ³	
	ng/g	*	ng/g	*	mg/100 g	*	%	*	mg/100 g	*	mg/g	*	ng/g	*	ng/mg	*
CP	137	139 ^d	191	193	33.9	31.8	28.4	25.8	46.8	45.5	1.6	1.8	328	333	7.0	7.3
CP	145	(2.9) ^e	200	(2.5)	31.5	(5.1)	26.5	(9.7)	47.1	(4.4)	1.8	(5.9)	345	(2.6)	7.3	(3.4)
CP	136		189		30		22.4		42.7		1.9		325		7.6	
JC	nd ^a		nd		72.8	73.1	2.5	2.9	17.8	17.6	7.1	6.2	nd		--	--
JC	nd		nd		72.6	(0.73)	2.9	(8.7)	21.4	(16.6)	7.4	(20.7)	nd		--	--
JC	nd		nd		74		3.2		13.2		4.1		nd		--	--
JC	nd		nd		73.1		2.9		17.8		6.1		nd		--	--
JS	nd		115		34.2	38.7	19.8	20.0	30.3	30.7	1.5	1.5	115	110	3.8	3.6
JS	nd		106		37.1	(8.6)	20.4	(1.3)	30	(3.0)	1.5	(3.6)	106	(2.9)	3.5	(4.3)
JS	nd		109		40.6		19.9		32.3		1.6		109		3.4	
JS	nd		110		42.9		19.9		30.3		1.2		110		3.6	
QB	nd		nd		44	45.2	33.9	3.,8	50.4	50.3	1.5	1.6	nd		--	--
QB	nd		nd		44.7	(2.6)	31.5	(4.4)	50.7	(0.73)	1.6	(3.9)	nd		--	--
QB	nd		nd		47.1		30		49.7		1.7		nd		--	--
QB	nd		nd		44.9		31.8		50.4		1.6		nd		--	--

^a no detectado; ^b lípidos; ^c colesterol; *: ^d valor medio, ^e (desviación estándar relativa %, n=3); ^f COPs totales

Tabla 60. Matriz de correlación de las muestras cárnicas analizadas mediante HPLC-UV

	7-ceto	Agua	Lípidos	Colesterol	COP _{ST} ^c
7-ceto		-0.9521 0.0000	0.9708 0.0000	0.9530 0.0000	0.9588 0.0000
Agua	-0.9521 ^a 0.0000 ^b		-0.9741 0.0000	-0.8947 0.0002	-0.8323 0.0015
Lípidos	0.9708 0.0000	-0.9741 0.0000		0.9279 0.0000	0.8743 0.0004
Col	0.9530 0.0000	-0.8947 0.0002	0.9279 0.0000		0.9197 0.0001
COP _{ST}	0.9588 0.0000	-0.8323 0.0015	0.8743 0.0004	0.9197 0.0001	

^aCorrelación; ^b Valor-P; ^c COPs totales

Todos los coeficientes de correlación de Pearson son próximos a la unidad, valor $P < 0.05$, lo que indica que todas las variables están muy correlacionadas. La **Figura 85** presenta el gráfico de dispersión que corrobora la linealidad entre las variables.

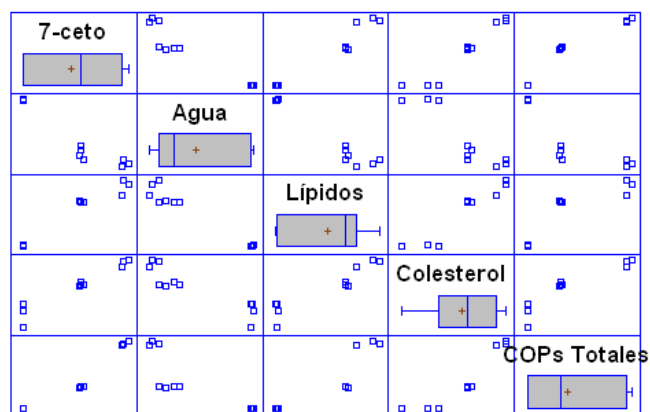


Figura 85. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con las muestras cárnicas analizadas mediante HPLC-UV

Teniendo en cuenta los datos de las cuatro muestras estudiadas (tres muestras cárnicas y una de queso) cuya procedencia es en todas ellas de origen animal se obtuvo de forma similar la matriz de correlación y su gráfico de dispersión, cuyos resultados se presentan en la **Tabla 61** y **Figura 86**, respectivamente.

Tabla 61. Matriz de correlación con los datos de las cuatro muestras analizadas mediante HPLC-UV

	25-OH	7-ceto	Agua	Lípidos	Colesterol	COPs_T^c
25-OH		0.8038 0.0003	-0.5194 0.0472	0.2717 0.3273	0.3744 0.1692	0.9311 0.0000
7-ceto	0.8038^a 0.0003 ^b		-0.7426 0.0015	0.2791 0.3138	0.2896 0.2952	0.9654 0.0000
Agua	-0.5194 0.0472	-0.7426 0.0015		-0.8072 0.0003	-0.7588 0.0010	-0.6830 0.0050
Lípid	0.2717 0.3273	0.2791 0.3138	-0.8072 0.0003		0.9561 0.0000	0.2902 0.2941
Col	0.3744 0.1692	0.2896 0.2952	-0.7588 0.0010	0.9561 0.0000		0.3416 0.2127
COPs_T	0.9311 0.0000	0.9654 0.0000	-0.6830 0.0050	0.2902 0.2941	0.3416 0.2127	

^a Correlación; ^b Valor-P; ^c COPs totales

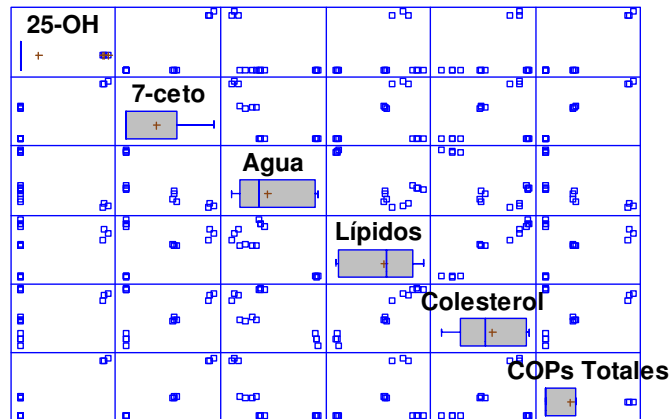


Figura 86. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las cuatro muestras analizadas mediante HPLC-UV

En este caso, en el que hay una muestra que no es de naturaleza cárnica, como es la muestra de queso, existen menos variables correlacionadas, pero se puede aplicar también la técnica de PCA.

Con el objeto de estudiar la relación que existe entre las distintas muestras y sus parámetros característicos en la formación de COPs, se llevó a cabo un estudio mediante PCA de las muestras sin irradiar procedentes de productos cárnicos y también del conjunto de las muestras estudiadas cuya procedencia es en todas ellas de origen animal. Para ello se consideran todas las variables estudiadas y el contenido de COPs_T. Teniendo en cuenta que se estudian seis variables originales, contenidos de 25-OH, 7-ceto, agua, lípidos, colesterol y COPs_T, podrían obtenerse hasta seis componentes principales.

En el caso de las muestras cárnicas (CP, JC y JS), mediante PCA, sólo se obtuvo una componente principal con autovalor 4.70 que explica una alta variabilidad de los datos, concretamente el 94.1%; el análisis de los datos correspondiente a las cuatro muestras proporcionó dos componentes principales, cuyos autovalores fueron: 4.03 y 1.59, que

explicaron el 67.2 y 26.5%, respectivamente de la variabilidad de los datos, siendo 93.7% el porcentaje de varianza acumulada. En la **Tabla 62** se presenta los resultados del autovalor de cada componente principal, sus ecuaciones (cada PC viene dado por la combinación lineal de las seis variables originales cuyos autovectores son los coeficientes de cada una de las variables indicando el peso de las mismas en el componente principal), así como el porcentaje de varianza explicada y acumulada.

La **Figura 87** presenta el bigráfico obtenido (gráfico de dispersión más el gráfico de peso de los componentes).

Carne picada
Jamón cocido
Jamón serrano
Queso blando

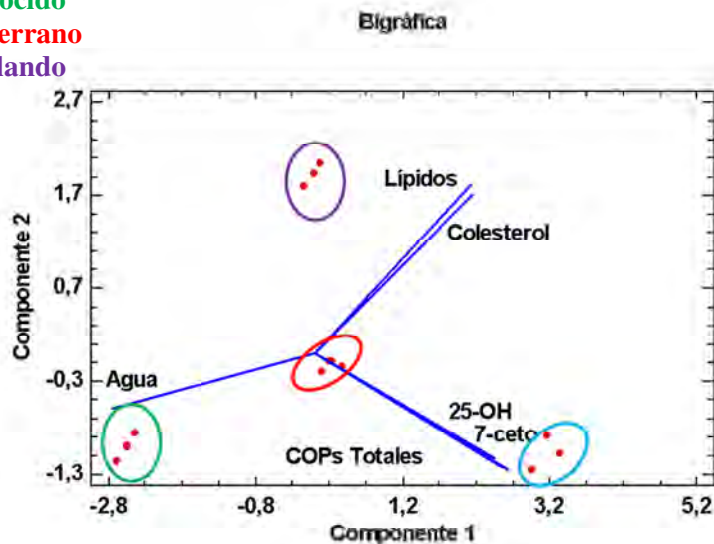


Figura 87. Bigráfica de la influencia de los parámetros característicos de las muestras en la formación de COPs; análisis mediante HPLC-UV

La gráfica indica que un contenido alto de colesterol y lípidos está más relacionado con la muestra de queso. El agua presenta un gran efecto en sentido contrario al de los lípidos; la muestra de jamón cocido está más relacionada, como cabía esperar, con el contenido en agua (Tabla 32) por su alto porcentaje en esta variable (73%).

Tabla 62. Estudio de la influencia de los parámetros característicos de las muestras sobre la formación de COPs mediante PCA

Muestras	PC	Autovalor	Ecuación	Varianza %		
				Explicada	Acumulada	
Muestras analizadas mediante HPLC						
CP	1	5,40	0,36*25-OH + 0,43*7-ceto - 0,40*Agua + 0,41*Lípidos + 0,43*Coolesterol + 0,42*COP _{ST}	90	99,2	
JC	2	0,55		9,2		
JS						
CP	1	4,01	0,41*25-OH + 0,42*7-ceto - 0,46*Agua + 0,36*Lípidos + 0,36*Col + 0,44*COP _{ST} -0,34*25-OH - 0,37*7-ceto - 0,18*Agua + 0,55*Lípidos + 0,52*Col - 0,37*COP_{ST}	66,8	26,8	
JC						
JS	2	1,61				
QB						
Muestras analizadas mediante GC						
CP	1	6,03	0,39*7β-OH + 0,38*β-epóxido + 0,35*α-epóxido + 0,37*7-ceto - 0,37*agua + 0,068*Lípidos + 0,39*col + 0,38*COP _{ST}	75,4		
JC						
JS	2	1,78	-0,19*7β-OH + 0,038*β-epóxido + 0,33*α-epóxido - 0,28*7-ceto - 0,28*agua + 0,80*Lípidos + 0,067*col - 0,22*COP_{ST}	22,2	97,6	
CP	1	4,72	0,44*7β-OH + 0,39*β-epóxido + 0,33*α-epóxido + 0,43*7-ceto - 0,39*agua + 0,031*Lípidos + 0,127*col + 0,44*COP _{ST}	59,0		
JC						
JS	2	2,67	-0,17*7β-OH - 0,20*β-epóxido + 0,39*α-epóxido - 0,22*7-ceto - 0,31*agua + 0,54*Lípidos + 0,55*col - 0,19*COP_{ST}	33,4	92,4	
QB						
CP	1	5,39	0,40*7β-OH + 0,40*β-epóxido + 0,37*α-epóxido + 0,39*7-ceto - 0,30*25-OH - 0,36*agua + 0,01*Lípidos + 0,04*col + 0,40*COP _{ST}	59,9		
JC						
JS	2	2,13				-0,19*7β-OH - 0,12*β-epóxido + 0,23*α-epóxido - 0,24*7-ceto - 0,06*25-OH - 0,29*agua + 0,61*Lípidos + 0,58*col - 0,20*COP_{ST}
QB						
SA	3	1,10	0,23*7β-OH - 0,19*β-epóxido - 0,33*α-epóxido + 0,26*7-ceto + 0,64*25-OH - 0,28*agua - 0,13*Lípidos + 0,42*col + 0,23*COP_{ST}	12,2	95,8	

5.3.1. Análisis mediante GC-FID

Se llevó a cabo un estudio similar para las muestras analizadas mediante GC-FID. En la **Tabla 63** se resume el contenido de agua, lípidos, colesterol y el de cada COP analizado, Se incluye también el contenido total de COPs, así como las relaciones colesterol/lípidos y COPs_T/colesterol para las muestras estudiadas. Los análisis fueron realizados por triplicado y en todos los casos, los valores de RSD obtenidos fueron menores del 10%. Como cabía esperar, los resultados de las muestras analizadas mediante GC fueron similares a aquellos obtenidos mediante HPLC; el contenido de agua en las todas las muestras fue superior a 31 %. El contenido de lípidos y colesterol menor fue obtenido para las muestras de jamón cocido, aunque su relación colesterol/lípidos fue similar a aquella obtenida para las muestras de salmón ahumado.

En la **Tabla 64** se presenta la matriz de correlaciones para las tres muestras cárnicas, donde se observa que existen 19 variables correlacionadas por su valor $p < 0.05$, bien positivamente o bien negativamente.

Tabla 63. Contenido total de COPs y relación COP_{S_T}/colesterol en muestras de alimentos sin irradiar. Análisis mediante GC-FID

Muestra	COPs, ng/g										COPs ^f /Col, ng/mg *
	7 β -OH *	β -epóxido *	α -epóxido *	7-ceto *	25-OH *	Agua, mg/100 g *	Líp ^b , % *	Col ^c , mg/100g *	Col/Líp, mg/g *	COPs ^f , ng/g *	
CP	648	227	147	1642	nd	29.5	10.5	30.1	2.9	2664	88.5
CP	678	683 ^d	207	1668	1688	27.7	10.6	10.4	3.3	2715	77.8
CP	722	(4.4)	246	(7.0)	182	(8.8)	1755	(2.9)	nd	2905	75.3
JC	111	131	95	188	nd	72.7	5.4	19	3.5	525	27.6
JC	119	115	132	133	100	91	190	201	nd	541	27.2
JC	115	(2.8)	135	(1.3)	79	(9.8)	226	(8.7)	nd	555	27.7
JS	285	207	151	473	nd	38.6	32.2	38.6	1.2	1116	28.9
JS	292	283	167	185	147	156	437	480	nd	1043	29.4
JS	272	(8.3)	181	(9.0)	170	(6.4)	531	(8.1)	nd	1154	32.0
QB	137	100	146	189	nd	39.3	26.7	53.8	2	572	10.6
QB	145	139	126	110	154	161	181	190	nd	606	12.5
QB	136	(4.0)	104	(10.4)	182	(9.6)	199	(3.9)	nd	621	11.9
SA	31	59	nd ^a	nd	99	62.5	11.2	41.1	3.7	189	4.6
SA	46	42	46	49	nd	116	102	63.8	62.3	208	5.5
SA	53	(9.2)	41	(15.6)	nd	92	(9.8)	60.6	(2.1)	186	5.2

^a no detectado; ^b lípidos; ^c colesterol; ^{*}; ^d valor medio, ^e (desviación estándar relativa %, n=3); ^f COPs totales

Tabla 64. Matriz de correlación con los datos de las muestras cárnicas analizadas mediante GC-FID

	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	7-ceto	Agua	Lip	Col	COPs _T ^c
7 β -OH		0.9099 0.0007	0.7591 0.0177	0.9913 0.0000	-0.8306 0.0056	-0.0608 0.8764	0.6207 0.0745	0.9977 0.0000
β -epóxido	0.9099 ^a 0.0007 ^b		0.8611 0.0029	0.8739 0.0021	-0.8906 0.0013	0.2055 0.5959	0.7922 0.0109	0.9022 0.0009
α -epóxido	0.7591 0.0177	0.8611 0.0029		0.6880 0.0405	-0.9447 0.0001	0.5316 0.1407	0.9353 0.0002	0.7360 0.0238
7-ceto	0.9913 0.0000	0.8739 0.0021	0.6880 0.0405		-0.7627 0.0168	-0.1745 0.6535	0.5219 0.1496	0.9973 0.0000
Agua	-0.8306 0.0056	-0.8906 0.0013	-0.9447 0.0001	-0.7627 0.0168		-0.5006 0.1699	-0.9147 0.0005	-0.8044 0.0089
Lip	-0.0608 0.8764	0.2055 0.5959	0.5316 0.1407	-0.1745 0.6535	-0.5006 0.1699		0.7073 0.0331	-0.1065 0.7850
Col	0.6207 0.0745	0.7922 0.0109	0.9353 0.0002	0.5219 0.1496	-0.9147 0.0005	0.7073 0.0331		0.5820 0.1001
COPs _T	0.9977 0.0000	0.9022 0.0009	0.7360 0.0238	0.9973 0.0000	-0.8044 0.0089	-0.1065 0.7850	0.5820 0.1001	

^a Correlación; ^b Valor-P; ^c COPs totales

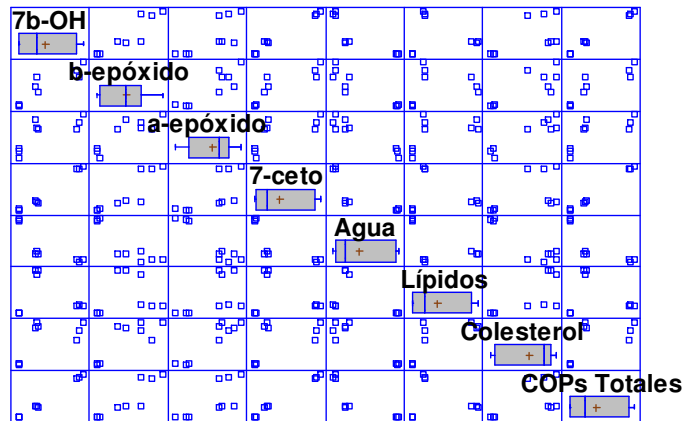


Figura 88. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las muestras cárnicas analizadas mediante GC-FID

Este mismo efecto se visualiza en el gráfico de dispersión (**Figura 88**), por la presencia de linealidad entre las variables.

En la **Tabla 65** se presenta la matriz de correlación para cuatro muestras (tres muestras cárnicas más la muestra de queso blando). Se observa que existen 13 variables correlacionadas (valor $P < 0.05$).

Tabla 65. Matriz de correlación de las muestras cármicas y muestras de queso analizadas mediante GC-FID

	7β-OH	β-epóxido	α-epóxido	7-ceto	Agua	Lip	Col	COPs^c
7β-OH		0.8920 0.0001	0.4991 0.0986	0.9927 0.0000	-0.6803 0.0149	-0.1988 0.5356	0.0049 0.9878	0.9980 0.0000
β-epóxido	0.8920 ^a 0.0001^b		0.3781 0.2256	0.8665 0.0003	-0.5497 0.0641	-0.0842 0.7947	-0.1755 0.5853	0.8855 0.0001
α-epóxido	0.4991 0.0986	0.3781 0.2256		0.4410 0.1513	-0.9112 0.0000	0.5555 0.0608	0.7679 0.0035	0.4843 0.1106
7-ceto	0.9927 0.0000	0.8665 0.0003	0.4410 0.1513		-0.6199 0.0315	-0.2961 0.3500	-0.0492 0.8794	0.9977 0.0000
Agua	-0.6803 0.0149	-0.5497 0.0641	-0.9112 0.0000	-0.6199 0.0315		-0.5115 0.0892	-0.6667 0.0179	-0.6585 0.0199
Lip	-0.1988 0.5356	-0.0842 0.7947	0.5555 0.0608	-0.2961 0.3500	-0.5115 0.0892		0.6750 0.0160	-0.2377 0.4570
Col	0.0049 0.9878	-0.1755 0.5853	0.7679 0.0035	-0.0492 0.8794	-0.6667 0.0179	0.6750 0.0160		-0.0140 0.9655
COPs^t	0.9980 0.0000	0.8855 0.0001	0.4843 0.1106	0.9977 0.0000	-0.6585 0.0199	-0.2377 0.4570	-0.0140 0.9655	

^a Correlación; ^b Valor-P; ^c COPs totales

Este mismo efecto se visualiza en el gráfico de dispersión (**Figura 89**), por la presencia de linealidad entre las variables.

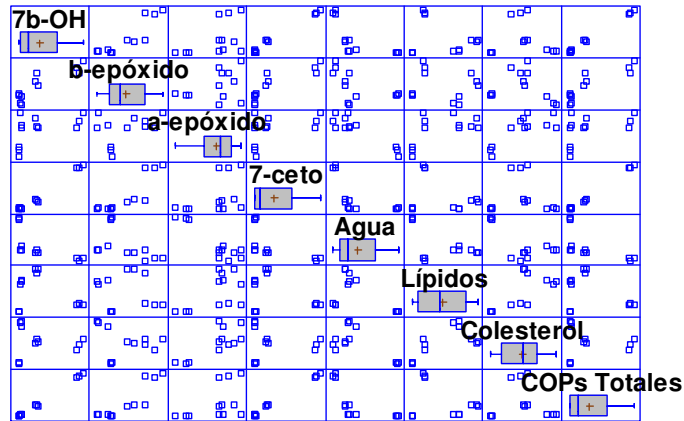


Figura 89. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los de las muestras cárnicas y muestras de queso analizadas mediante GC-FID

La matriz de correlación, **Tabla 66**, presenta los coeficientes bivariados de Pearson para los datos de todas las muestras que fueron analizadas mediante GC. Existen 19 variables correlacionadas, es decir con valores de $P < 0.05$.

Este mismo efecto se visualiza en el gráfico de dispersión (**Figura 90**), por la presencia de linealidad entre las variables.

Tabla 66. Matriz de correlación correspondiente a las cinco muestras analizadas mediante GC-FID

	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	7-ceto	25-OH	Agua	Lip	Col	COPs _T
7β-OH									
β-epóxido	0.8709 ^a 0.0000 ^b	0.7712 0.0008	0.6082 0.0162	0.9932 0.0000	-0.454 0.0890	-0.7424 0.0015	-0.0437 0.8771	-0.0425 0.8805	0.9982 0.0000
α-epóxido	0.6082 0.0162	0.7712 0.0008	0.6082 0.0162	0.9932 0.0000	-0.454 0.0890	-0.7424 0.0015	-0.0437 0.8771	-0.0425 0.8805	0.9982 0.0000
7-ceto	0.9932 0.0000	0.8405 0.0001	0.5561 0.0313	0.9932 0.0000	-0.4181 0.1209	-0.6881 0.0046	-0.1419 0.6139	-0.0858 0.7610	0.9969 0.0000
25-OH	-0.4542 0.0890	-0.7305 0.0020	-0.8865 0.0000	-0.4181 0.1209		0.4304 0.1092	-0.2723 .3261	0.0996 0.7240	-0.4614 0.0834
Agua	-0.7424 0.0015	-0.6501 0.0087	0.4304 0.1092	-0.6881 0.0046			-0.5614 0.0294	-0.5522 0.0328	-0.7256 0.0022
Lip	-0.0437 0.8771	0.1484 0.5976	0.6155 0.0146	-0.0737 0.7941					
Col	-0.0425 0.8805	-0.1854 0.5083	0.6155 0.0146	-0.0737 0.7941					
COPs_T^c	0.9982 0.0000	0.8714 0.0000	0.6084 0.0161	0.9969 0.0000	-0.4614 0.0834	-0.7256 0.0022	-0.0737 0.7941	-0.0583 0.8365	0.9982 0.0000

^aCorrelación; ^b Valor-P; ^c COPs totales

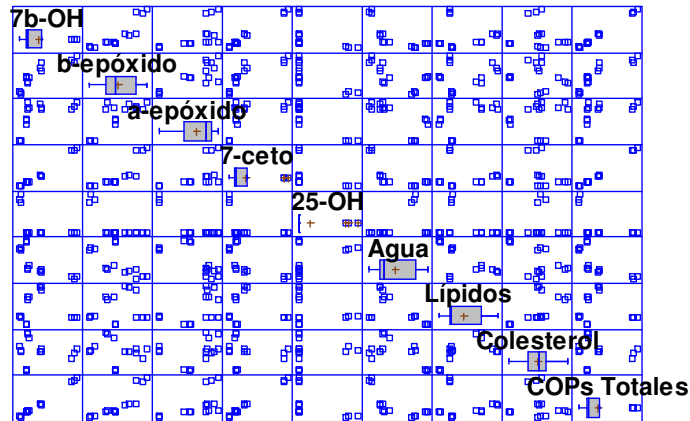


Figura 90. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de todas las muestras estudiadas mediante GC-FID.

Dada la alta correlación entre las variables originales se realiza un estudio mediante PCA para evaluar la influencia tanto de los parámetros característicos de las muestras, como de su naturaleza en la formación de COPs. Teniendo en cuenta que se estudian nueve variables originales (Tabla 63), 7β -OH, β -epóxido, α -epóxido, 7-ceto, 25-OH, agua, lípidos, colesterol y $COPs_T$, podrían obtenerse hasta nueve componentes principales.

Se aplica primero a las tres muestras de procedencia cárnica, después a cuatro muestras (tres muestras cárnicas y una muestra de queso) de forma similar a como se realizó mediante HPLC y por último al total de las cinco muestras de origen animal estudiadas mediante GC (muestras cárnicas, de queso blando y de salmón ahumado); en los dos primeros casos se obtienen dos componentes principales cuyas bigráficas obtenidas se presentan en las **Figuras 91 y 92**, respectivamente; en el caso de las muestras cárnicas mediante PCA, el modelo se puede explicar con dos componentes principales con autovalores 6.03 y 1.78 que incluyen el 75.4 y 22.2%, respectivamente de los datos, siendo 97.6% el porcentaje de varianza acumulada; el análisis de los datos

correspondiente a las cuatro muestras proporcionó, asimismo, dos componentes principales, cuyos autovalores fueron: 4.72 y 2.67, que explicaron el 59.0 y 33.4%, respectivamente de la variabilidad de los datos, siendo 92.4% el porcentaje de varianza acumulada (Tabla 62).

Carne picada
Jamón cocido
Jamón serrano

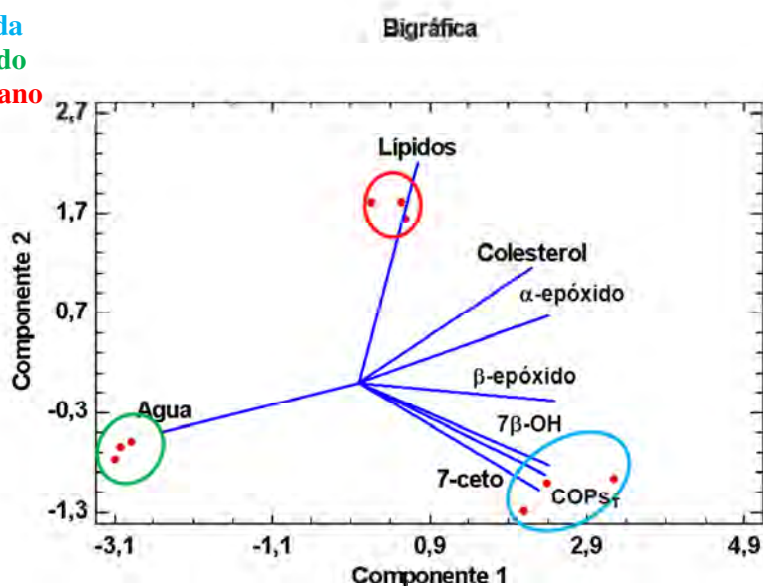


Figura 91. Influencia de los parámetros característicos de las muestras cárnicas sobre la formación de COPs; análisis mediante GC-FID

Carne picada
Jamón cocido
Jamón serrano
Queso blando

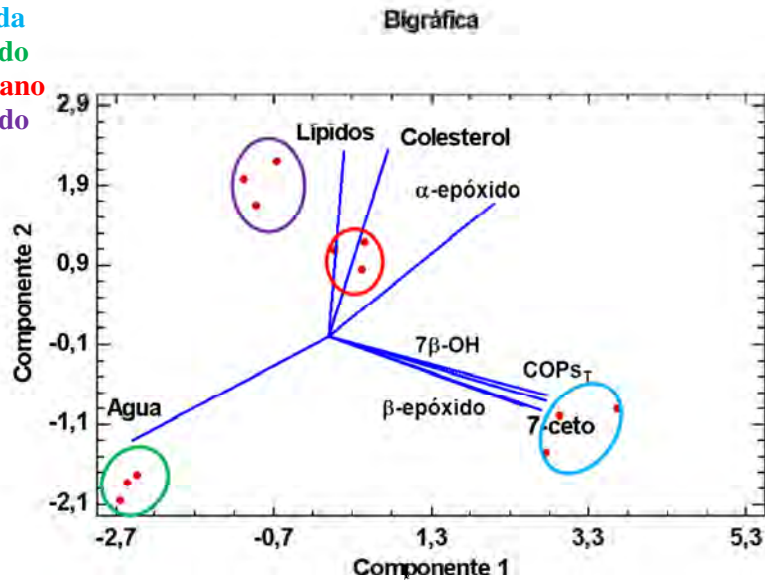
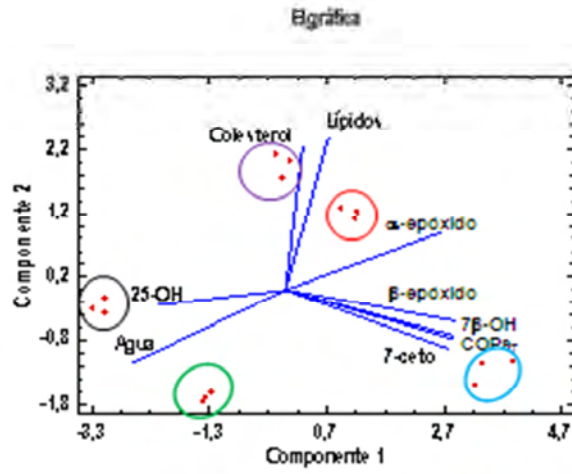


Figura 92. Influencia de los parámetros característicos de las muestras cárnicas y de queso sobre la formación de COPs; análisis mediante GC-FID

En el tercer caso se obtienen tres componentes principales cuyos autovalores fueron 5.39, 2.13 y 1.10 que explicaron, respectivamente el 59.9, 23.7 y 12.2% de la variabilidad de los datos, siendo 95.8% el porcentaje de varianza acumulada. En la **Figura 93** se presenta la bigráfica PCA para el conjunto de todas las muestras analizadas, tanto del componente dos frente al uno como la representación de los tres componentes, observándose los siguientes efectos:

Un contenido alto de colesterol está más relacionado con la muestra de queso. Los lípidos tienen mayor influencia sobre el contenido de los COPs 7-ceto, β -epóxido y α -epóxido.

El agua presenta un gran efecto en sentido contrario al de los lípidos; la muestra de jamón cocido está más relacionada, como cabía esperar, con el contenido en agua (73%) y el 25-OH presenta un efecto opuesto al α -epóxido.



Carne picada
Jamón cocido
Jamón serrano
Queso blando
Salmón ahumado

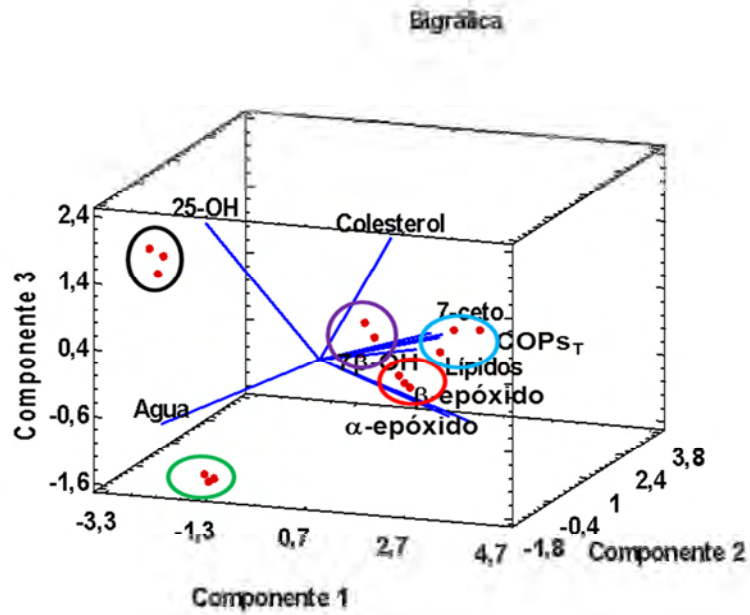


Figura 93. Influencia de los parámetros característicos del total de las muestras estudiadas sobre la formación de COPs; análisis mediante GC-FID

A continuación se comentan aspectos particularizados en cada muestra estudiada:

5.3.3. *Carne picada*

Este alimento a pesar de presentar contenidos de lípidos relativamente pequeños, muestra los contenidos más elevados de colesterol y COPs, siendo la relación $COP_{sT}/\text{colesterol}$ la más alta de los alimentos estudiados; esta relación parece favorecer que una parte relativamente grande del colesterol se oxide para formar los COPs.

5.3.4. *Jamón cocido*

Las muestras de jamón cocido presentan el contenido más bajo de lípidos y colesterol; sin embargo, el contenido de los COPs formados a partir del colesterol fue relativamente alto y también la relación $COP_{sT}/\text{colesterol}$; esto puede ser debido a los cambios de T en el proceso de fabricación del alimento, así como a la presencia de otros componentes.

5.3.5. *Jamón serrano*

El contenido de COPs en esta muestra resultó ser proporcional a su contenido en lípidos; como es sabido, este alimento se somete a envejecimiento en presencia de sal durante un tiempo relativamente largo, indicando que este proceso podría ser un factor importante en la formación de COPs.

5.3.6. Queso blando

Estas muestras presentan un contenido en colesterol muy alto; sin embargo, el contenido en lípidos fue inferior a las de las muestras de jamón serrano, lo cual sugiere que la formación de COPs no solamente está asociada a la presencia del colesterol sino que también otros componentes grasos participan en las reacciones de formación de estos compuestos. Durante su proceso de fabricación, se usan grandes cantidades de agua las cuales podrían influir en la cantidad total de los COPs porque la polaridad de estos compuestos es ligeramente mayor que la del colesterol.

5.3.7. Salmón ahumado

Las muestras de salmón ahumado presentan un contenido de colesterol alto; sin embargo, su contenido de COPs fue pequeño, siendo la relación $COPs_T/colesterol$ también relativamente pequeña. Como su contenido en lípidos es pequeño, es posible que en la matriz de este alimento estén presentes otras sustancias como vitamina B₃ y algunos carotenoides, que proporcionan el color rosado del salmón, y que pueden proteger de la oxidación del colesterol.

5.4. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS HPLC-UV Y GC-FID PARA LA DETERMINACIÓN DE COPs EN ALIMENTOS

5.4. Comparación de los métodos cromatográficos HPLC-UV y GC-FID para la determinación de COPs en alimentos

Los métodos cromatográficos desarrollados haciendo uso de las técnicas HPLC y GC para la determinación de COPs en alimentos permiten, por una parte, corroborar algunos aspectos ya mencionados en la bibliografía y, por otra parte, detectar que la etapa más crítica de estos métodos radica en la preparación de la muestra.

Las metodologías que utilizan la técnica de HPLC presentan las desventajas de su menor sensibilidad y eficacia que aquellas que emplean como técnica GC con detector FID; el detector UV permite detectar únicamente los COPs en mayores concentraciones.

De otra parte, las metodologías que emplean la técnica de GC con columnas HP-5 y HP-1 en modo isoterma permiten separar pares críticos referidos en la bibliografía y detectar todos los COPs. La alta capacidad de picos de esta técnica junto con su mayor sensibilidad la hacen muy adecuada para la determinación de COPs en muestras complejas; sin embargo, presenta la desventaja de que se requiere aplicar una reacción de derivatización de los COPs con reactivos agresivos como el Tri-Sil.

Cabe mencionar que el método mediante GC-FID es más sensible; los valores más bajos de LOD obtenidos mediante GC-FID mostrados en 5.2.4., respecto de aquellos obtenidos mediante HPLC-UV (5.1.3.), indican un incremento de sensibilidad; así, para el 7-ceto el incremento fue por un factor de 5 y para el 25-OH por un factor de 113. En la **Tabla 67** se indica una comparación de las metodologías empleadas y los intervalos de LOD y R de los COPs, encontrados en las muestras analizadas.

Tabla 67. Comparación de las metodogías propuestas para la determinación de COPs en muestras de alimentos

Muestra	Analito	Extracción	Clean-up	Técnica	Detector	LOD ^a , ng	R ^b , %
CP JC JS QF	25-OH 7-ceto 6-ceto	Lixiviación CHCl ₃ , 70 mL; T _a ; t _a , 18 h	Cartucho sílica; V _{extracto} , 6 mL de HEX.	HPLC; C ₁₈ ; FM ^c ACN:agua, 90:10 q ^d , 1.2 mL/min	UV, λ, 205 y 238 nm	0.54- 3.4	56-94
CP JC JS QF SA	7-OH β-epóxido α-epóxido triol 6-ceto(IS) 7-ceto 25-OH	ASE EtP:CHCl ₃ , 85:15 (42 mL); T, 40 °C; P, 1500 psi t _a , 20 min	Cartucho sílica, V _{extracto} 6 mL HEX Cartucho aminopropil, V _{extracto} , 3 mL Hex:AcOEt, 90:10	GC, HP-1; T _{inyector} 300°C, T _{horno} , 290 °C; q, 1.6 mL/min	FID T _{detector} , 300 °C	0.024- 0.126	62-95

^a Límite de detección; ^b Recuperación; ^c Fase móvil; ^d caudal de la fase móvil;

La composición de la matriz es un factor muy importante que participa en la formación de COPs; alimentos hidratados favorecen la formación de algunos COPs los cuales requieren la presencia de agua y de compuestos ácidos (ácidos grasos libres) como es el caso del triol.

Algunos resultados como la baja recuperación de triol y 25-OH, hace pensar en una posible descomposición y/o transformación de estos COPs lo que justifica la realización de estudios al respecto.

5.5. IDENTIFICACIÓN Y MINIMIZACIÓN DE TRANSFORMACIONES DE COPs DURANTE LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA SU DETERMINACIÓN MEDIANTE GC-FID

5.5. Identificación y minimización de transformaciones de COPs durante la preparación de muestra para su determinación mediante GC-FID

Con objeto de situar el tema, en este punto se recuerdan algunos aspectos bibliográficos relevantes. Desde 1956 se ha propuesto una gran cantidad de metodologías analíticas que han permitido conocer parcialmente el comportamiento de estos compuestos, siendo común a la mayoría de ellas, el sistema de limpieza de muestra, que se realiza por SPE (Lai et al., 1985; Johnson et al., 1996; García Regueiro y Marachiello, 1997; Careri et al., 1998; Boselli, et al., 2001; Petron et al., 2003; Lu et al., 2007; Menéndez-Carreño et al., 2008). Comparaciones en el contenido de COPs son a menudo difíciles de interpretar debido a las diferencias en las metodologías y a la presencia de artefactos. Algunas reacciones de transformaciones de COPs han sido descritas en estudios de laboratorio; sin embargo, no están asociadas al proceso de preparación de muestra para el análisis de COPs (Nielsen et al., 1996).

La preparación de muestra para la determinación de los COPs mediante GC implica diversas etapas siendo las más críticas, extracción, clean up y derivatización en donde pueden tener lugar transformación de COPs. Las condiciones aplicadas deben ser suaves durante la extracción de lípidos, generalmente por lixiviación, pero no se dispone de información al respecto. En particular, el clean up de la muestra más frecuentemente usado es SPE; sin embargo, pérdidas y/o transformaciones de COPs pueden tener lugar dependiendo de la naturaleza del empaquetamiento del cartucho, naturaleza de la muestra, disolvente de elución y condiciones de los procedimientos, no existiendo datos que permitan identificar los aspectos críticos del clean up de muestras.

Por una parte, al evaporar el disolvente después del clean up pueden ocurrir procesos de degradación de los COPs por cambios en el pH del medio, teniendo en cuenta que los disolventes contienen trazas de agua (más polar que el disolvente de elución); estos cambios pueden ser debidos a la concentración/dilución en presencia de compuestos con propiedades ácido-base en el medio después del clean up.

Por otra parte, cuando se realiza la determinación de los COPs mediante GC, se ha de llevar a cabo una reacción de derivatización, lo que requiere que el extracto obtenido después de la etapa de clean up y evaporación del disolvente de elución se encuentre exento de agua; la presencia de trazas de ésta durante la derivatización de los COPs-con Tri-Sil, produce medio ácido, dando lugar potencialmente a reacciones de transformación de los COPs y del colesterol de acuerdo con las reacciones propuestas por Nielsen et al.,1996.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios de recuperación de las muestras analizadas aplicando el procedimiento descrito en 4.4.12, donde se obtienen valores de R superiores al 70% excepto para los compuestos más polares, triol y 25-OH (aproximadamente 60%), se llevó a cabo, un estudio de las transformaciones de COPs durante la etapa de clean up mediante SPE y posterior derivatización de COPs con Tri-Sil. Para ello, se utilizó una disolución conteniendo una mezcla de estándares de COPs (7 β -OH, β -epóxido, α -epóxido, triol, 6-ceto, 7-ceto, 25-OH) y colesterol, con cartuchos de distinta polaridad. Los cartuchos seleccionados se aplicaron después a la

determinación de COPs en muestras con alto contenido en ácidos grasos y un contenido en agua superior al 31 %.

En la etapa de clean up se trabajó en dos modos, elución total y colección de fracciones, ambas por gravedad a T ambiente. Ambos modos de elución de estándares fueron comparados para detectar posibles transformaciones.

5.5.1. Detección de transformaciones de COP en estándares durante la etapa de clean up mediante SPE

5.5.1.1. Ensayos con cartuchos polares

5.5.1.1.1. Modo de elución total

En primer lugar, se trabajó con cartuchos que contienen fase estacionaria polar, sílica y aminopropil que son los recomendados por la bibliografía, utilizando acetona como disolvente de elución. El clean up de la muestra mediante SPE se realizó siguiendo el procedimiento indicado en 4.4.6.3.1, aplicando los experimentos A₁, B₁ de la **Tabla 68**, donde se especifica la naturaleza del cartucho, su acondicionamiento, disolución de lavado, disolución inicial de COPs y eluyente. La reacción de derivatización se llevó a cabo adicionando 200 µL de Tri-Sil y siguiendo el procedimiento 4.4.10.1 mediante el cual se realizó la determinación de COPs aplicando el método 4.4.12.

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 69**. Se obtuvieron valores de recuperación entre 80 y 101 % para el cartucho de sílica y entre 82 y 102 % para el de aminopropil en todos los COPs excepto triol cuyo valor fue del 60 y 56 %, respectivamente. Los valores de recuperación más pequeños, corresponden a los compuestos más polares, triol, 25-OH y 7β-OH.

Tabla 68. Clean up de muestra mediante SPE

Cartuchos polares					
Experimento	V_{inicial} de COPs, 2 mg/L	Cartucho	Acondicion. cartucho	Lavado	Eluyente
A₁	Hexano, 5mL	Silica	Hexano, 5mL	Hex:Et ₂ O, (80:20), 15 mL	Acetona, 10 mL
A₂					Hex:Acetona, (70:30), 15 mL
B₁	Hexano, 5mL	Amino Propil	Hexano, 5mL	Hex:AcOEt, (90:10), 15 mL	Acetona 10 mL
B₂					Hex:Acetona, (70:30), 20 mL
Cartuchos no polares					
C₁	ACN:H ₂ O (70:30), 1mL	C ₈	ACN:H ₂ O (50:50), 3 mL	ACN:H ₂ O, (70:30), 2 mL	ACN:H ₂ O (80:20), 8 ml
C₂					
D₁	ACN:H ₂ O (80:20) 5mL	C ₁₈	ACN, 3 mL	ACN, 5 mL	MeOH, 10 mL
D₂					ACN:MeOH, (95:5), 25 mL

¹10 mg/L; V_{inicial}, volumen de la disolución inicial, Hex, hexano; ACN, acetonitrilo; Et₂O, éter dietílico; C₈, octilsilano; C₁₈, octadecilsilano; AcOEt, acetato de etilo; MeOH, metanol; sub-índices (1) modo elución total (2) modo elución colección de fracciones

Tabla 69. Recuperación de COPs usando SPE en modo elución total

Experimento	7β-OH	β-epóxido	α-epóxido	triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
A₁	80.4	95.7	99.6	60.4	101.1	98.0	85.1
B₁	82.2	101.6	90.9	56.2	102.2	95.8	83.7
C₁	97.9	45.6	70.8	102.9	96.7	94.7	116.2
D₁	100.7	96.6	98.6	102.3	99.6	96.5	103.8

Estos resultados indican que los cartuchos de sílica y aminopropil (experimentos A₁ y B₁) dan lugar a valores de recuperación relativamente pequeños para los compuestos polares, triol y 25-OH (60 y 56 %), teniendo en cuenta que únicamente se está

evaluando las pérdidas que se presentan en el proceso de limpieza de las muestras con SPE.

5.5.1.1.2. *Modo colección de fracciones*

Debido a los bajos valores de recuperación para el triol con cartuchos polares se aplicó un procedimiento distinto para eluir los COPs, basado en la colección de pequeñas fracciones del eluato hasta obtener elución total, utilizando como disolvente de elución una mezcla de hexano:acetona (70:30) de polaridad menor a la del eluyente usado en el modo de elución total. Una alícuota de una disolución estándar de COPs y colesterol a 25 ppm, anteriormente mencionada en 4.4.13, se hizo pasar a través del cartucho. Los COPs fueron eluidos en viales de 1 mL y colectados en fracciones de 0.5 y 1 mL por gravedad a diferentes tiempos sin secar el cartucho para evitar suspender el equilibrio entre fases dentro del cartucho, usando el volumen de elución indicado en la **Tabla 68**. Las fracciones fueron colectadas hasta la elución completa de los COPs, eliminando en las primeras fracciones los compuestos más apolares como el colesterol antes de iniciar la elución de COPs en los cartuchos polares. De esta forma se obtuvieron las gráficas de elución de las **Figuras** (93 y 95), donde se muestra la formación de 6-ceto a partir de triol cuando se utilizan cartuchos de fase estacionaria polar.

Los experimentos A₂ y B₂ de la **Tabla 68** fueron llevados a cabo con los mismos tipos de cartuchos utilizados en SPE en modo de elución total. Se obtuvieron así las fracciones en donde aparecen selectivamente los COPs; en los cartuchos apolares la elución se llevó a cabo con mezclas de disolventes de elución ACN:H₂O (80:20) y ACN:MeOH (95:5) para el C₈ y C₁₈, respectivamente, eluyendo los COPs en las

primeras fracciones antes de que se iniciara la elución del colesterol (este compuesto por su baja polaridad quedará retenido en el cartucho, evitando así su interferencia en las etapas siguientes del análisis). Esto permitió determinar tanto la optimización del poder de elución del eluyente, como el volumen requerido para la elución total de los COPs, cuyo valor óptimo para cada cartucho se muestra en la **Tabla 68**. En cada fracción, el disolvente fue evaporado burbujeando flujo de *Ar* a 40 °C; el residuo de cada fracción fue derivatizado con 200 µL de Tri-Sil como en el modo de elución total, antes de llevar a cabo su análisis mediante GC-FID.

Las áreas de pico obtenidas se comparan con las correspondientes en ausencia de clean up obteniéndose los valores de recuperación presentados en las **Tablas 70 y 71**. Usando cartuchos de sílica y aminopropil, los COPs 7β-OH, β-epoxido, α epoxido, 7-ceto y 25-OH fueron eluidos gastando 2-5 mL del eluyente, hexano: acetona (70:30), mostrando un comportamiento tipo gaussiano, **Figuras 94 y 96**. Los valores de recuperación total estuvieron en el intervalo de 89-99 % para el cartucho de sílica y fueron algo menores, 73-85%, para el cartucho de aminopropil. Respecto al triol y 6-ceto, se detecta una baja recuperación de triol y una elevada recuperación de 6-ceto, lo que indica una posible transformación de triol en 6-ceto. El triol, al ser el COP más polar, requiere un volumen relativamente grande del eluyente hexano: acetona (70:30) para su elución, dando lugar a perfiles de elución no gaussiano y valores de recuperación menores de 68% y 80% para el cartucho de sílica y aminopropil, respectivamente. Cabe resaltar que el 6-ceto tuvo un peculiar comportamiento, ya que se eluyó entre 2 y 5 mL, pero aparece un nuevo pico para un volumen de elución de 12 mL junto a las últimas fracciones del triol, obteniendo recuperaciones totales de este COP próximas a 155 % y 158% para los

cartuchos de sílica y aminopropil, respectivamente. Esto parece indicar que se forman nuevas cantidades de 6-ceto durante el proceso de concentración/elución a partir del triol. Para esta reacción de transformación se propone el siguiente mecanismo, **Figura 95**.

El colesterol, compuesto más apolar que los anteriores, eluyó en las primeras fracciones, usando volúmenes de eluyente menores de 2 mL, con recuperaciones próximas al 100%, por lo que no está involucrado en procesos de transformación. La presencia o ausencia de colesterol no modificó de forma significativa las áreas de los picos de triol y 6-ceto, bajo las mismas condiciones experimentales descritas.

Tabla 70. Recuperación de COPs utilizando cartuchos de silica, en modo de elución colección de fracciones y GC-FID

V, mL	R, %						
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
2.0	27.0	84.3	91.4	0.0	77.3	86.8	68.9
3.0	53.9	6.1	6.9	0.0	14.2	10.6	18.8
4.0	12.9	0.5	0.7	0.4	1.5	0.8	1.0
5.0	1.2	0.0	0.0	1.3	0.7	0.4	0.5
6.0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.7	0.0	0.0
7.0	0.0	0.0	0.0	5.5	2.1	0.0	0.0
8.0	0.0	0.0	0.0	7.7	1.7	0.0	0.0
9.0	0.0	0.0	0.0	13.4	3.1	0.0	0.0
10.0	0.0	0.0	0.0	13.0	3.5	0.0	0.0
11.0	0.0	0.0	0.0	10.6	6.4	0.0	0.0
12.0	0.0	0.0	0.0	7.2	1.9	0.0	0.0
13.0	0.0	0.0	0.0	2.4	27.6	0.0	0.0
14.0	0.0	0.0	0.0	2.2	6.1	0.0	0.0
15.0	0.0	0.0	0.0	2.1	7.9	0.0	0.0
R _T , %	94.9	90.9	99.0	68.5	155.3	98.6	89.2

R_T, recuperación total

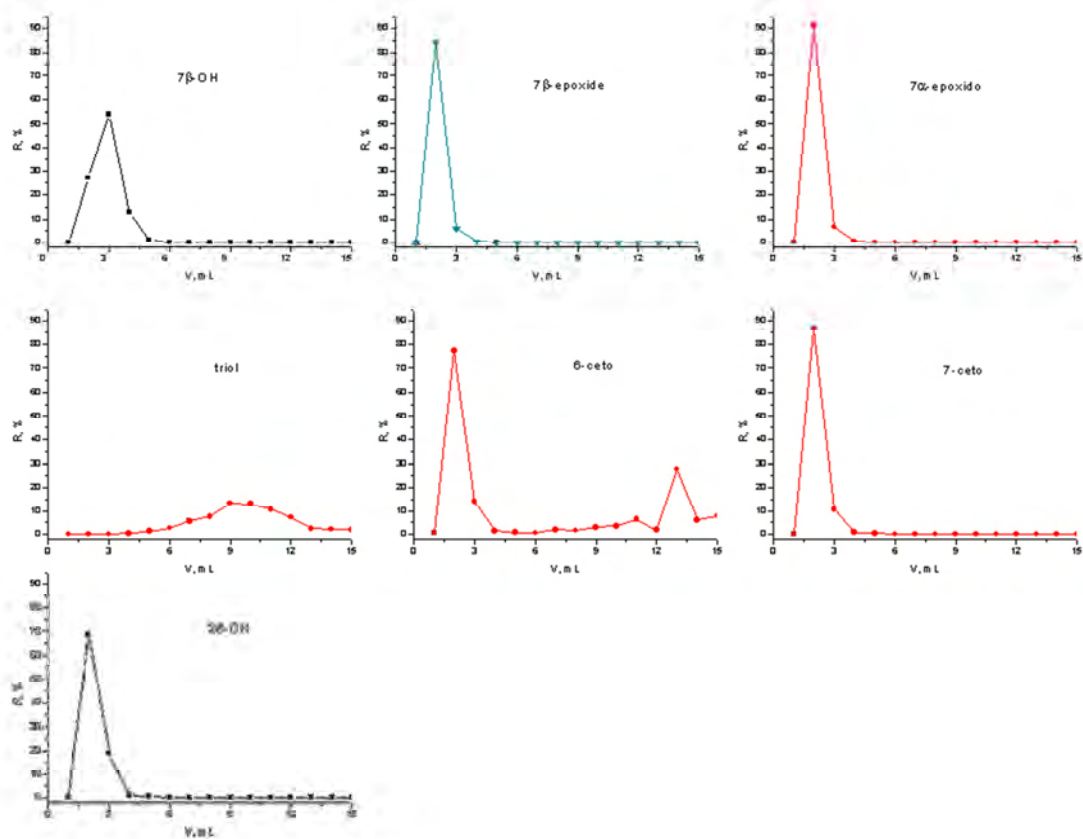


Figura 94. Gráficos de elución de COPs utilizando cartuchos de sílica en modo colección de fracciones y GC-FID

En la siguiente Figura se muestra un esquema con la ruta de la reacción de transformación propuesta de triol a 6-ceto.

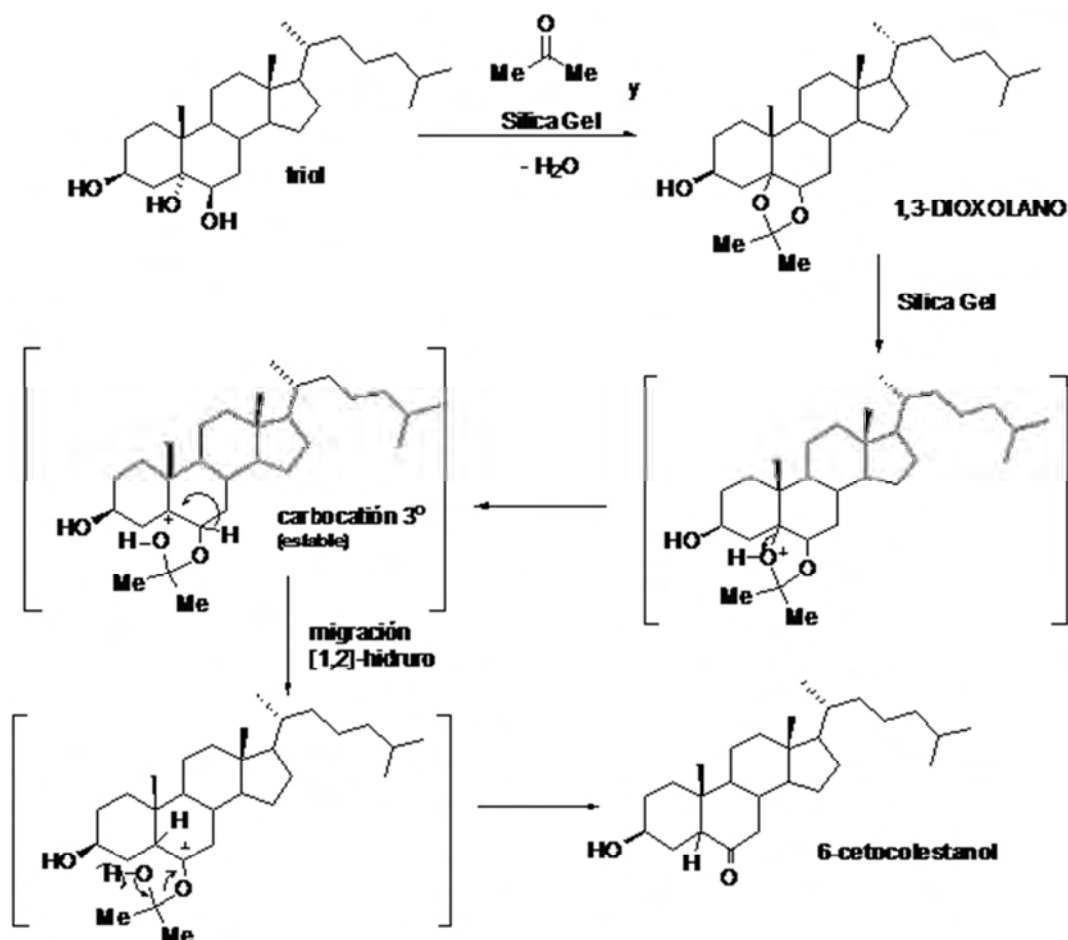


Figura 95. Reacciones de transformación de triol en 6-ceto (Aportado por el Dr. Henry Insuasty)

Tabla 71. Recuperación de COPs utilizando cartuchos de aminopropil en modo elución colección de fracciones y GC-FID

V. mL	R, %						
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
1.0	0.4	8.0	8.8	0.0	5.5	3.1	4.0
2.0	22.9	57.9	60.3	0.3	40.6	45.6	52.5
3.0	38.6	7.3	6.5	0.3	14.7	25.6	18.1
4.0	21.3	0.0	0.0	0.5	10.2	1.0	0.7
5.0	1.8	0.0	0.0	0.8	8.4	0.0	0.0
6.0	0.0	0.0	0.0	1.5	8.7	0.0	0.0
7.0	0.0	0.0	0.0	3.8	6.8	0.0	0.0
8.0	0.0	0.0	0.0	5.1	6.8	0.0	0.0
9.0	0.0	0.0	0.0	6.8	6.4	0.0	0.0
10.0	0.0	0.0	0.0	6.2	4.5	0.0	0.0
11.0	0.0	0.0	0.0	6.3	4.1	0.0	0.0
12.0	0.0	0.0	0.0	10.1	3.5	0.0	0.0
13.0	0.0	0.0	0.0	9.1	4.0	0.0	0.0
14.0	0.0	0.0	0.0	7.4	2.7	0.0	0.0
15.0	0.0	0.0	0.0	5.6	2.7	0.0	0.0
16.0	0.0	0.0	0.0	5.4	14.6	0.0	0.0
17.0	0.0	0.0	0.0	6.0	10.2	0.0	0.0
18.0	0.0	0.0	0.0	5.5	4.7	0.0	0.0
R _T , %	85.0	73.3	75.6	80.8	158.9	75.3	75.3

R_T, recuperación total

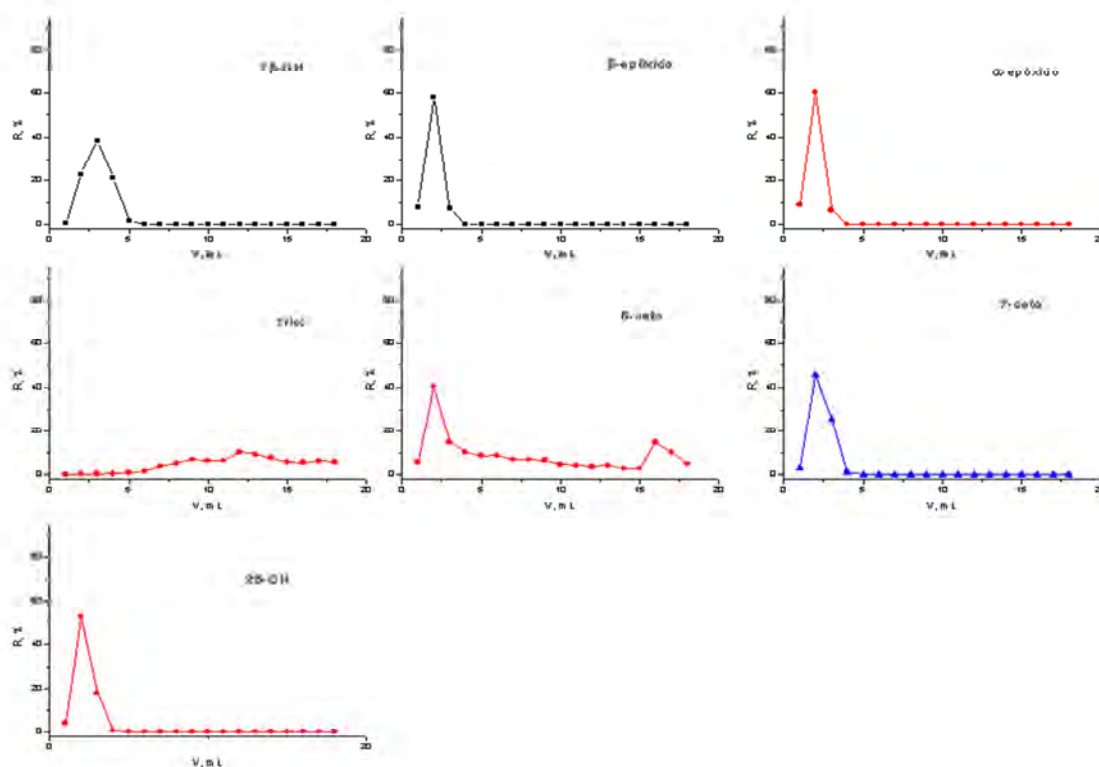


Figura 96. Gráficos de elución de COPs utilizando cartuchos de aminopropil en modo colección de fracciones y GC-FID

5.5.1.2. Ensayo con cartuchos apolares

5.5.1.2.1. Modo de elución total

Se trabajó con cartuchos no polares C₈ y C₁₈ en las condiciones especificadas en la **Tabla 68**, utilizando como eluyente la mezcla disolvente ACN:H₂O (80:20) para el cartucho C₈ y metanol para el cartucho C₁₈. Empleando cartuchos C₈ (experimento C₁) se obtuvieron valores de recuperación entre 94 y 116%, excepto para los compuestos β y α-epóxidos (45 y 71%); éstas pérdidas de recuperación podrían tener lugar por reacciones de hidrólisis durante la evaporación del disolvente debido a que la cantidad de agua presente en el extracto es relativamente grande y los disolventes de elución presentan alta afinidad con el agua. Las mejores recuperaciones se obtuvieron con

cartuchos C₁₈ (experimento D₁); sin embargo, en estas condiciones, se eluye algo de colesterol, no observándose cambios en la cantidad total de COPs eluidos.

5.5.1.2.2. *Modo colección de fracciones*

Debido a que se obtuvieron valores bajos de recuperación mediante SPE en modo usual con el cartucho C₈ para los COPs α y β -epóxidos y superiores al 100% para triol, se realizó un estudio mediante colección de fracciones empleando este cartucho con el fin de detectar posibles transformaciones de COPs y mejorar el procedimiento de limpieza. En la **Tabla 72** se muestra los valores de recuperación obtenidos para cada analito en cada fracción y la recuperación total eluyendo con una mezcla disolvente ACN: H₂O (80:20). Las curvas de elución, **Figura 97**, muestran un comportamiento tipo gaussiano para todos los COPs. Los compuestos se distribuyeron de acuerdo a su polaridad; por ejemplo, el triol eluyó en la primera fracción requiriendo 4 mL de eluyente para su elución total y los epóxidos comenzaron a eluir a 4 mL necesitando 5 mL de eluyente. De esta manera fue posible obtener los COPs en diferentes fracciones, requiriendo pequeños volúmenes de eluyente, entre 3 y 10 mL, y en éstas no se observó la presencia de colesterol lo cual podría permitir un clean up adecuado, eliminando los compuestos no polares. Los valores de recuperación, **Tabla 72**, fueron de 82 a 95% y no se observaron artefactos que indicaran reacciones de COPs indeseables. Este cartucho, aunque puede utilizar un volumen de eluyente adecuado para el clean up de compuestos polares, tiene como desventajas la presencia de agua en el eluato y que al iniciar la elución de los COPs con cantidades muy pequeñas del eluyente no es posible la limpieza de los compuestos polares que pueden estar presentes en las muestras, lo que podría causar problemas cuando el procedimiento sea aplicado a muestras reales.

Tabla 72. Recuperación de COPs utilizando cartuchos C₈ en modo de elución colección de fracciones y GC-FID

V, mL	R, %						
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
1.0	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0
2.0	1.8	0.0	0.0	71.3	1.7	0.0	2.1
3.0	49.8	0.0	0.0	4.2	3.3	3.6	43.1
4.0	30.4	0.0	0.0	1.0	36.5	44.4	30.5
5.0	3.7	9.2	1.6	0.5	34.7	30.9	4.2
6.0	1.9	52.7	18.4	1.1	6.1	1.4	1.5
7.0	0.0	25.5	37.5	1.3	2.1	0.6	0.4
8.0	0.0	6.0	21.8	1.6	1.3	0.4	0.0
9.0	0.0	1.5	7.0	0.3	0.7	0.3	0.0
10.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.6	0.0	0.0
11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0
R _T , %	87.6	94.9	87.9	84.8	87.7	81.6	81.8

R_T, recuperación total

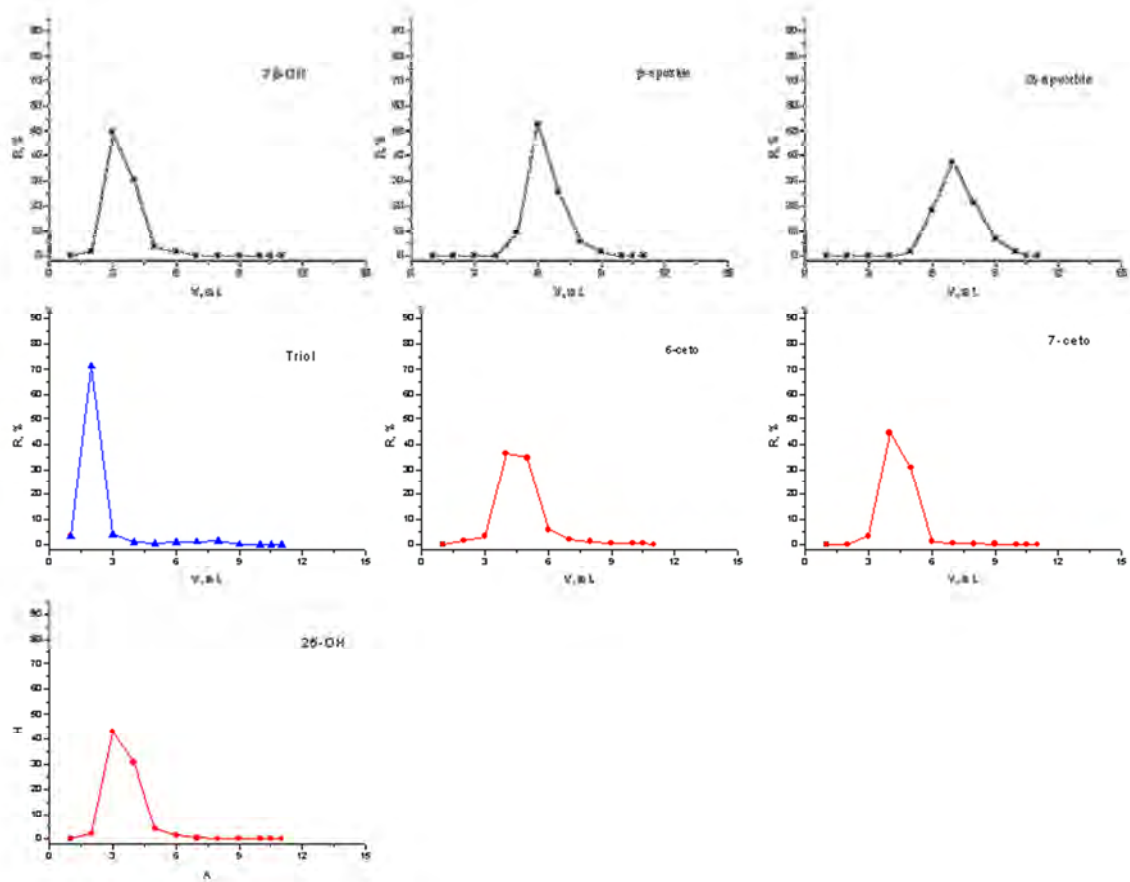


Figura 97. Gráficos de elución de los COPs utilizando cartuchos de C₈ en modo colección de fracciones y GC-FID

Los experimentos con cartuchos C₁₈ (test D₂) proporcionaron los valores de recuperación de la **Tabla 73** y los gráficos de elución de la **Figura 98** utilizando como eluyente ACN:MeOH. 95:5. El comportamiento de los COPs bajo estas condiciones fue muy irregular (tipo no-gaussiano) lo cual podría ser debido a que estos compuestos se encuentran fuertemente retenidos en la fase estacionaria del cartucho; como consecuencia de las diversas fuerzas intermoleculares que se presentan entre los COPs y la fase estacionaria del cartucho. La masa molecular parece jugar un papel importante en la elución de los COPs; si bien triol es el COP más polar, no eluyó en primer lugar. Este compuesto comenzó a eluir con un volumen de 3.0 mL, mientras el 6-ceto

comenzó a eluir en las primeras fracciones siendo un compuesto relativamente no-polar; estas diferencias suelen tener su origen en que la masa molecular del triol es mayor que la de 6-ceto, lo que indica que se combinan los dos factores (masa molecular y polaridad). Los COPs β and α -epóxidos requieren grandes volúmenes de eluyente ya que son compuestos no polares y tienen una masa molecular relativamente pequeña, implicando, como ocurre normalmente que la combinación de ambos factores, polaridad y masa molecular, es la que determina la retención de los COPs en la fase C_{18} . Los valores de recuperación de los COPs fueron próximos a 100% excepto para β and α -epóxidos (70.7 and 34.2 %), teniendo lugar durante el proceso completo de elución reacciones de transformación ya mencionadas en la bibliografía (Bösinger et al., 1993) Figura 5; cabe resaltar que en cada fracción se evapora el eluyente a sequedad antes de agregar el agente derivatizante y por otra parte el total de los COPs recuperados es el resultado de la acumulación de numerosas fracciones lo que conlleva una acumulación de errores. e incrementa la probabilidad de transformaciones. Con el fin de verificar la transformación α -epóxido y β -epóxido en triol se ha llevado a cabo la elución de una disolución de COPs conteniendo únicamente α -epóxido y β -epóxido y utilizando cartuchos de C_8 y C_{18} ; de esta forma, se han obtenido los resultados mostrados en la **Tabla 74** que corroboran las citadas transformaciones.

Tabla 73. Recuperación de COPs usando cartuchos C₁₈ en modo elución colección de fracciones y GC-FID

V, mL	R, %						
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	triol	6-ceto	7-ceto	25-OH
1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.5	0.3
2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.5	0.7
3.0	0.6	0.0	0.0	0.2	1.1	5.4	2.1
4.0	2.6	0.0	0.0	1.0	2.7	11.0	6.1
5.0	4.7	0.0	0.0	1.8	4.2	12.3	7.4
6.0	6.4	0.0	0.0	5.6	4.8	11.6	9.8
7.0	15.1	0.7	0.0	10.4	13.6	18.8	18.7
8.0	16.8	1.1	0.0	11.3	14.9	14.4	18.0
9.0	16.2	2.1	0.0	12.7	15.0	9.4	14.3
10.0	16.2	1.7	0.0	17.3	17.1	7.3	13.0
11.0	12.0	1.0	0.0	14.7	14.1	4.2	8.3
12.0	8.6	2.7	0.5	11.6	4.8	2.3	5.0
13.0	3.8	6.8	1.4	5.2	2.9	0.7	1.6
14.0	2.7	8.2	1.7	3.3	3.2	0.5	1.1
15.0	2.0	5.7	1.6	2.6	2.1	0.5	0.9
16.0	1.8	7.1	3.0	2.1	1.8	0.4	0.6
17.0	1.7	10.8	4.5	1.9	0.9	0.3	0.5
18.0	1.2	6.8	3.3	0.9	0.0	0.0	0.0
19.0	0.6	5.2	4.4	0.7	0.0	0.0	0.0
20.0	4.1	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22.0	0.0	1.8	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0
23.0	0.0	1.4	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0
24.0	0.0	0.9	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0
R _T , %	117.2	70.7	34.2	103.2	104.7	101.0	108.6

R_T, recuperación total

Tabla 74. Transformación de α y β -epóxidos en triol

Cartucho	R, %		
	α -epóxido	β -epóxido	Triol
C ₈	25	38	45
C ₁₈	18	44	48

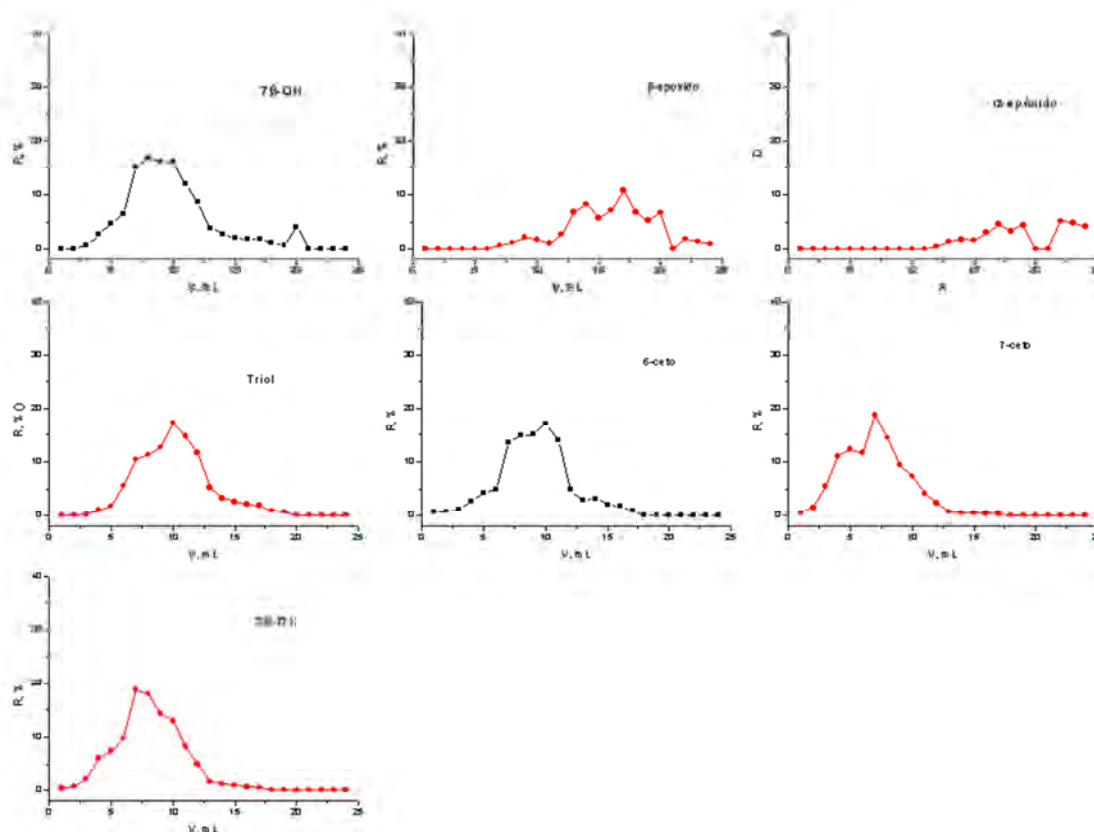


Figura 98. Gráficos de elución de los COPs obtenidos utilizando cartuchos C₁₈ en modo colección de fracciones y GC-FID

En resumen, entre todos los cartuchos ensayados los cartuchos polares, sílica y aminopropil en modo de elución total presentaron retención baja de los COPs más polares comprobando, además, mediante el modo de colección de fracciones que se produce la transformación de triol en 6-ceto.

Entre los cartuchos no polares, el C₈ presenta recuperación baja para los β- y α-epóxidos y el C₁₈ proporciona buena recuperación para todos los COPs utilizando el modo de elución total; sin embargo, cuando se utiliza el modo de colección de fracciones, el cartucho C₈ presenta recuperaciones entre 82 y 95% requiriendo un volumen pequeño de eluyente ACN/H₂O (80/20) entre 3 y 10 mL; en estas fracciones no se observó la presencia de colesterol, lo cual podría permitir un clean up adecuado. Por otra parte, el cartucho C₁₈ utilizando ACN:MeOH (95:5) como eluyente proporciona valores de R en el intervalo 95-116 % excepto para β-epóxido (45.6%) y α-epóxido (70.8%).

Como resultado, se propone el empleo de cartucho C₈ sin efectuar el secado tras la retención utilizando como eluyente ACN:H₂O (80:20) o bien el cartucho C₈ o C₁₈ usando ACN ó MeOH como eluyentes, respectivamente, ambos en modo de elución total para su aplicación en el análisis de COPs en muestras.

5.5.2. Metodología propuesta para la determinación de COPs mediante GC en muestras de alimentos con minimización de transformaciones

Teniendo en cuenta los cartuchos y condiciones óptimas seleccionadas para evitar/minimizar transformaciones de COPs utilizando estándares, se aplicó esta metodología a muestras con un alto contenido en ácidos grasos.

En primer lugar, se llevaron a cabo análisis por triplicado de muestras enriquecidas y sin enriquecer de jamón serrano, salmón ahumado y lomo de cerdo fresco. Los resultados obtenidos a un nivel de concentración añadida de COPs de 25 mg/L fueron los siguientes:

El cartucho C₈ proporcionó valores bajos de recuperación con los dos eluyentes mencionados y, además, no permitió una limpieza adecuada de los COPs obteniéndose cromatogramas notablemente sucios y valores de recuperación muy dispersos. Utilizando el cartucho C₁₈ y su eluyente (MeOH), se aplicó la metodología especificada en el método D₁ (Tabla 68) se obtuvieron recuperaciones próximas al 100% para todos los COPs, excepto para α y β -epóxidos cuyas recuperaciones fueron inferiores al 50% y para triol que fueron superiores al 100 % (como se ha indicado, las transformaciones de COPs en las muestras podrían tener lugar durante la evaporación del eluyente; de acuerdo con la reacción de hidrólisis ácida de los epóxidos para su transformación en triol, ya mencionada (Bösinger et al., 1993), según se ha esquematizado en la **Figura 5**.

Para evitar estas posibles transformaciones de COPs al evaporar el disolvente después del clean up, se pensó que podrían ser debidas a cambios del pH en el medio debido al aumento de la concentración, genéricamente, en ácidos grasos. En consecuencia, se llevó a cabo un estudio utilizando disoluciones reguladores de fosfato y de esta manera evitar cambios de pH en el proceso de evaporación del disolvente.

5.5.2.1. Influencia del pH del tampón durante la evaporación del eluyente en las transformaciones de COPs

5.5.2.1.1. Ensayos con estándares

En primer lugar se trabajó con estándares de COPs y de colesterol, empleando la columna C₁₈ seleccionada y trabajando en modo colector de fracciones; se realizó la elución de los COPs utilizando un volumen de MeOH equivalente al poder de elución del volumen de eluyente ACN/MeOH 95/5 gastado en la elución total de COPs en el modo colección de fracciones; los eluatos se recogieron en viales conteniendo un volumen de tampón a pH en el intervalo 4.0-7.0; por tanto, antes de evaporar el disolvente de elución y preconcentrar el extracto para llevar a cabo la reacción de derivatización. Se obtuvieron los valores de recuperación que se presentan en la **Tabla 75** y en el gráfico de barras de la **Figura 99**. Se observa que, efectivamente, el pH afecta la recuperación; tampones con valores de pH entre 4.5 y 6.0 son los más adecuados, obteniéndose recuperaciones máximas.

Tabla 75. Influencia del pH del tampón de la disolución de evaporación en la recuperación de COPs en estándares

pH	R, %					
	7-BOH	β-epóxido	α-epóxido	triol	7-ceto	25-OH
4.0	103.5	74.59	69.17	41.06	90.65	91.3
4.5	121.6	88.1	76.19	112.8	90.85	103.7
5.0	112.5	92.9	80.08	106.5	83.33	97.59
5.5	103.2	84.61	71.17	82.2	95.84	96.31
6.0	102	80.54	79.87	80	93.72	94.45
6.5	113.2	103.7	95.22	16.21	102.4	113.6
7.0	100.1	72.48	48.54	23.78	94.13	100.2

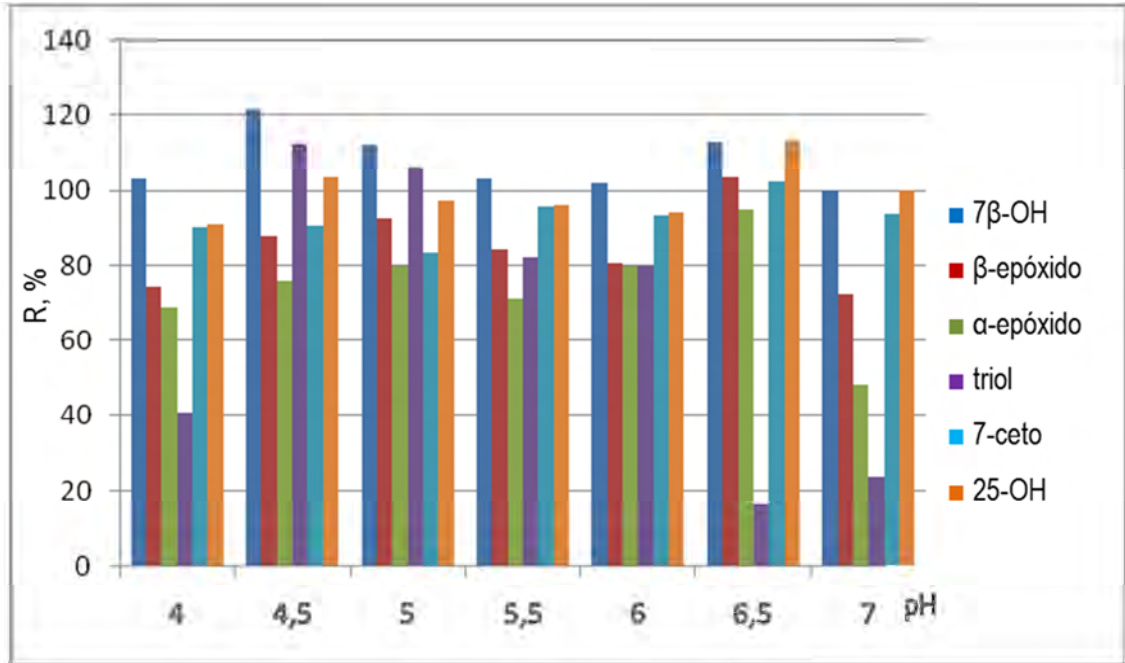


Figura 99. Influencia del pH del tampón de la disolución de evaporación en la recuperación de COPs en estándares

5.5.2.1.2. Ensayos en muestras

Se realizó, en primer lugar, la determinación del contenido en agua, lípidos y colesterol en las muestras de lomo fresco y lomo adobado aplicando los procedimientos indicados en 5.1.1, seleccionando para el análisis 3 g de muestra.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 76**

Tabla 76. Parámetros característicos de las muestras de lomo fresco y adobado

Muestra	Agua		Lípidos		Colesterol	
	X, mg/100 g	RSD ^b , %	X, %	RSD, %	X, mg/100 g	RSD, %
LF	74,52	0.42	18	10.2	17,7	9,5
	73,89		22		19,8	
	74,21		21		21,5	
	^a 74,2		^a 20,3		^a 19,7	
LA	81,46	0.23	6	10,2	17,5	14.7
	81,81		6		23,3	
	81,77		5		22,5	
	^a 81,7		^a 5,7		^a 21,1	

^aX, valor medio; ^bRSD, desviación estándar relativa (n=3)

El contenido de agua en estas muestras es más alto que el encontrado en las muestras anteriormente estudiadas (cárnicas, queso y salmón), Comparando el contenido de los tres parámetros en las muestras de los distintos tipo de lomo estudiadas, el contenido en lípidos y colesterol es menor en las muestras de LA; sin embargo, su contenido en agua es más alto (82%), como cabía esperar, debido a los aditivos añadidos conteniendo agua durante el proceso del adobo. Los contenidos de las otras muestras ensayadas, jamón serrano y salmón ahumado se indicaron en 5.2.1

En segundo lugar, se realizó la purificación de las muestras de lomo fresco, jamón serrano y salmón ahumado utilizando los cartuchos C₈ y C₁₈ antes seleccionados y se adicionó regulador de pH 7.0 en el vial, previo a la recogida del eluato, igualmente, antes de evaporar el disolvente de elución; la adición de tampón a pH 7.00, algo superior al intervalo encontrado como óptimo, 4.5-6.0, tiene por objeto asegurar que en

los extractos de las muestras se mantiene el pH en el intervalo óptimo aún en presencia de pequeñas cantidades de componentes ácidos endógenos. Para la cuantificación de los COPs se utilizó el 6-ceto como IS.

En la **tabla 77** se presenta los valores de recuperación por triplicado para cada uno de los COPs, en muestras enriquecidas al nivel de concentración de 2 µg/mL, utilizando el cartucho C₁₈. Se comprueba que añadiendo un volumen pequeño de tampón de pH 7.00 se obtienen buenos valores de R para jamón Serrano (entre 80 y 105%), para lomo fresco (entre 72 a 104%) y para lomo adobado (entre 70 y 108%) con valores de RSD entre 2.3 y 10 %.

Tabla 77. Recuperación de COPs en muestras enriquecidas, aplicando el método D₁ modificado

Muestra	R, %					
	7-βOH	β-epóxido	α-epóxido	triol	7-ceto	25-OH
LF	82.1	78.6	90.9	89.9	98.5	85.2
	71.8	72.8	74.4	102.2	89.7	99.4
	72.8	70.1	82.6	103.8	91.0	97.5
X. %	75.6	73.8	82.6	98.7	93.1	94.0
RSD	7.5	5.9	10.0	7.7	5.1	8.2
LA	79.8	69.8	77.7	101.4	84.3	79.2
	72.3	71.6	73.4	108.2	88.1	73.4
	75.2	78.4	80.8	103.5	90.6	71.2
X, %	78.8	73.3	77.8	104.4	87.7	74.6
RSD	5.0	6.2	4.8	3.3	3.6	5.5
JS	98.7	84.9	79.9	105.5	85.4	93.2
	93.2	91.3	83.6	93.7	98.2	86.3
	88.6	86.8	80.9	98.1	93.1	90.1
X. %	93.5	87.7	81.4	99.1	92.2	89.9
RSD. %	5.4	3.7	2.3	6.0	7.0	3.8

LF. lomo fresco; JS. jamón Serrano; x. valor medio; RSD. desviación estándar relativa

En el caso del salmón, tratando de mejorar los resultados con los cartuchos C₈ se llevó a cabo el estudio empleando tampones de pH entre 5.0 y 6.0. En la **Tabla 78 (Figura 100)** se presentan los valores de recuperación obtenidos; éstos fueron altos para todos los COPs excepto para los dos epóxidos, posiblemente debido a que estas muestras presentan un contenido de ácidos grasos superior al de las muestras de lomo fresco y jamón serrano. Si la hipótesis planteada fuera correcta, la muestra de salmón ahumado requeriría usar tampones de pH más altos. Por consiguiente, se amplió el estudio de pH del tampón hasta 9.0 en las muestras de salmón enriquecidas con una disolución mezcla de estándares de COPs y colesterol a un nivel de concentración de 10 mg/L, para ver si la recuperación de estos compuestos depende del pH. Los resultados obtenidos en la **Tabla 78** muestran que los mejores valores de recuperación para α -epóxido se obtuvieron a pH 9.0 (78.6%). Sin embargo, la recuperación del β -epóxido fue muy baja (1.2 %); cabe resaltar que a pH inferiores a 9 no llega a detectarse este compuesto lo cual parece indicar que el pH 9.0 es suficiente para minimizar la reacción de transformación propuesta del α -epóxido pero no del β -epóxido. En consecuencia, se plantea otra hipótesis en el sentido de que la fase empleada no es adecuada para las muestras de salmón, por su elevado contenido en ácidos grasos, ya que no permitiría la suficiente eliminación de los compuestos endógenos ácidos que participan en la transformación de los COPs durante la evaporación del disolvente de elución.

Tabla 78. Influencia del pH del tampón en la recuperación de COPs

pH	R, %					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	Triol	7-ceto	25-OH
5.00	93.8	-----	18.7	113.6	105.3	142.3
6.00	115.1	-----	43.2	108.2	76.0	97.3
7.00	116.7	-----	39.6	104.9	68.7	96.6
7.50	129.9	-----	59.6	139.1	81.3	111.8
8.00	117.1	-----	24.7	109.0	82.1	106.2
9.00	103.9	1.2	78.6	81.5	88.9	91.2

* Método C₂; muestras de salmón ahumado enriquecidas a 10 mg/L

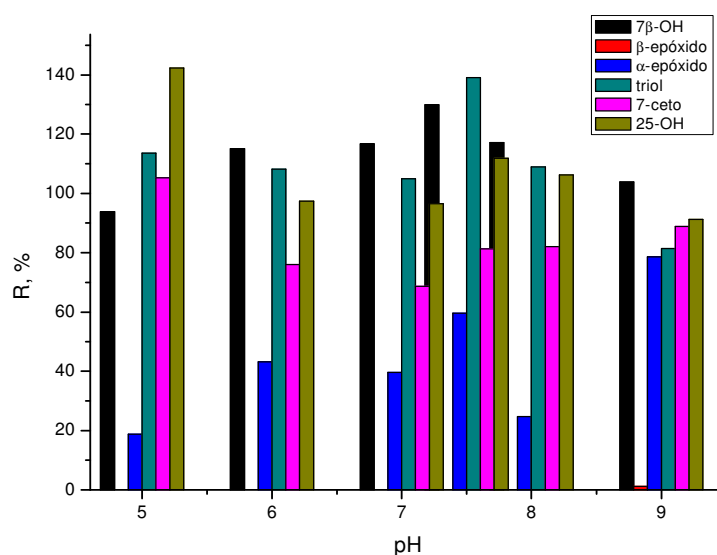


Figura 100. Influencia del pH en la recuperación de los COPs en muestras de salmón ahumado

Basándose en los resultados anteriores, se realizaron nuevos estudios con las muestras de jamón serrano y lomo fresco; se eligió el cartucho no polar de fase C₁₈ utilizando el experimento D₁ (Tabla 68) modificado mediante colección total del eluato en un vial en medio tamponado a pH controlado, conteniendo 300 μ L de la disolución reguladora de

pH 7.00, antes de llevar a cabo la reacción de derivatización. En la **Figura 101** se presenta los cromatogramas obtenidos. Como puede observarse se obtiene una línea base bien definida y una limpieza de muestra notablemente superior a la obtenida mediante los experimentos aplicando métodos convencionales.

Cabe indicar que existen ciertas diferencias entre las muestras de jamón serrano y lomo fresco; la matriz del jamón serrano contiene una cantidad superior de grasas muy apolares que podría aumentar la retención del colesterol y otros componentes apolares dentro del cartucho, proporcionando cromatogramas más limpios.

Los valores de recuperación, **Tabla 77**, fueron superiores al 74 % con valor de RSD inferior al 10 %. Por tanto, se comprueba que las transformaciones de COPs fueron minimizadas empleando el método D₁ modificado, resultando efectivo para el análisis de las muestras en estudio.

De este estudio se deduce que, como cabía esperar, existe una mayor retención de lípidos, tales como los ácidos grasos, en los cartuchos polares, sílica y aminopropil, que en los cartuchos apolares, C₈ y C₁₈. De estos últimos, el cartucho C₁₈ permite realizar un lavado más exhaustivo de los COPs, sin pérdida de los mismos, eliminando de este modo posibles interferentes que pudieran eluir junto con los COPs; de esta manera, al estar más limpio el extracto que contiene los COPs, se minimizan transformaciones en la etapa de evaporación del eluyente, así como la generación de artefactos.

La **Figura 101** presenta los cromatogramas de jamón Serrano y lomo fresco en muestras enriquecidas con 25 mg/L de COPs.

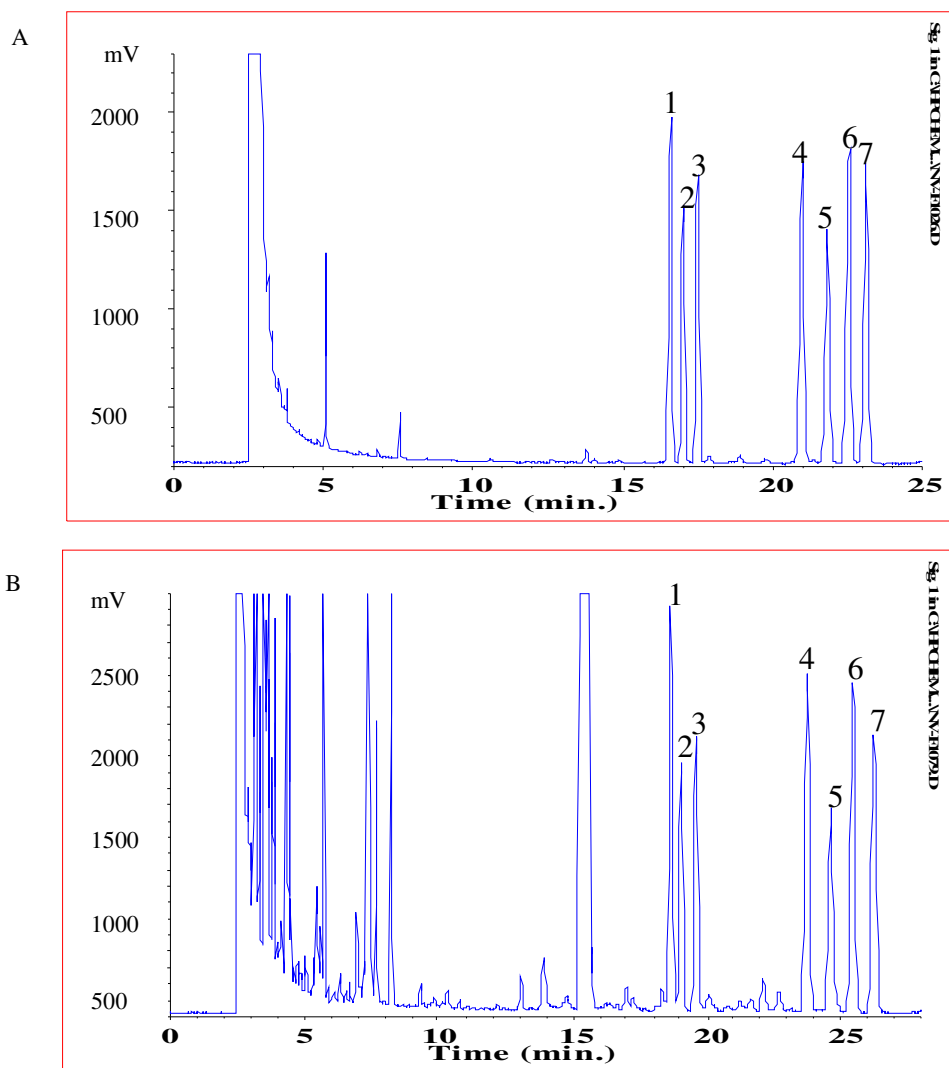


Figura 101. Cromatogramas de los Tri-Sil derivados en muestras enriquecidas. [COPs], 25 mg/L: A) Jamón serrano, B) Lomo fresco de cerdo. Picos, 1) 7 β -OH; 2) β -epóxido; 3) α -epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto; 6) 7-ceto; 7) 25-OH

La reproducibilidad fue en general, mejor para muestras de jamón Serrano, posiblemente debido a que presenten menos interferencias que las muestras de lomo fresco; en efecto, estas últimas tienen un contenido en agua mayor y en el proceso de extracción lipídica diferentes compuestos endógenos pueden estar presentes en el eluato. Cabe destacar que aunque en el intervalo de tiempo de elución de los COPs, el cromatograma es limpio y su línea base bien definida, después de 45 min aparecen otras sustancias de la matriz y es necesario limpiar la columna aproximadamente 2 h. Para eliminar estas interferentes es necesario optimizar el volumen de metanol para eluir los COPs; usualmente entre 5 y 10 mL de este disolvente fue requerido, dependiendo del tipo de matriz. Se recomienda optimizar el pH de la solución reguladora que hay que añadir antes de evaporar el disolvente para el proceso de derivatización de COPs, en el intervalo entre 7 y 8.

5.5.2.2. Influencia de los parámetros característicos de las muestras de lomo sobre la formación de los COPs

Teniendo en cuenta los valores de los parámetros característicos y el contenido total de COPs encontrado en las muestras de LF y LA se comprobó que existe correlación entre las variables por lo que se realizó un estudio de PCA para las muestras de lomo. La **Tabla 79** presenta la matriz de correlación, observando por los valores de los coeficientes de correlación de Pearson, que las variables están correlacionadas y cuyo gráfico de dispersión, **Figura 102**, corrobora.

Tabla 79. Matriz de correlación con los datos de los parámetros característicos de las muestras de lomo y formación de los COPs mediante GC-FID

	7β-OH	β-epóxido	α-epóxido	triol	7-ceto	25-OH	Agua	Lip	Col	COPs_T
7b-OH		0,9889	0,9816	0,6402	0,9921	0,977	-0,9899	0,9727	-0,2828	0,9964
b-epóxido	0,9889	0,0002	0,0005	0,1709	0,0001	0,0008	0,0002	0,0011	0,5872	0,0000
a-epóxido	0,0002		0,0005	0,6306	0,9957	0,0025	-0,9951	0,9788	-0,3471	0,9960
	0,9816	0,9811		0,1795	0,0000	0,0025	0,0000	0,0007	0,5003	0,0000
triol	0,0005	0,9811		0,7282	0,9784	0,0001	-0,9873	0,9705	-0,4326	0,9894
	0,6402	0,6306	0,7282	0,1008	0,6469	0,771	0,0002	0,0013	0,3916	0,0002
7-ceto	0,1709	0,1795	0,1008		0,1650	0,0727	-0,6884	0,7049	-0,5135	0,6680
	0,9921	0,9957	0,9784	0,6469		0,9666	-0,9979	0,1178	0,2975	0,1470
25-OH	0,0001	0,0000	0,0007	0,165		0,0017	0,0000	0,0001	-0,2809	0,9971
	0,9770	0,9589	0,9901	0,771	0,9666		-0,9761	0,9659	0,5897	0,0000
Agua	0,0008	0,0025	0,0001	0,0727	0,0017		0,0008	0,0017	-0,3672	0,9788
	-0,9899	-0,9951	-0,9873	-0,6884	-0,9979	-0,9761		-0,9923	0,474	-0,9980
Lip	0,0002	0,0000	0,0002	0,1305	0,0000	0,0008		0,0001	0,5223	0,0000
	0,9727	0,9788	0,9705	0,7049	0,9908	0,9659	-0,9923		-0,2691	0,9842
Col	0,0011	0,0007	0,0013	0,1178	0,0001	0,0017	0,0001		0,606	0,0004
	-0,2828	-0,3471	-0,4326	-0,5135	-0,2809	-0,3672	0,3305	-0,2691		-0,3286
COPs_T	0,5872	0,5003	0,3916	0,2975	0,5897	0,474	0,5223	0,606		0,5248
	0,9964	0,9960	0,9894	0,668	0,9971	0,9788	-0,9980	0,9842	-0,3286	
	0,0000	0,0000	0,0002	0,147	0,0000	0,0007	0,0000	0,0004	0,5248	

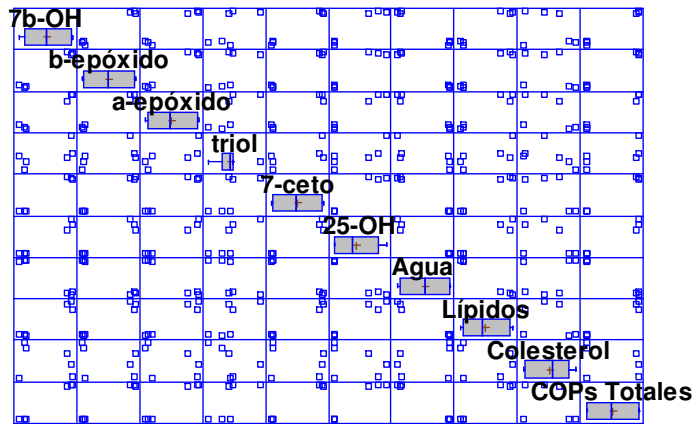


Figura 102. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de los parámetros característicos de las muestras de lomo y formación de COPs; mediante GC-FID

Para obtener mayor información se realizó un análisis conjunto a las dos muestras de lomo mediante PCA, obteniendo dos PC que explican un 95.6 de la varianza acumulada. La **Tabla 80** presenta los autovalores de los PC, sus ecuaciones, así como la varianza explicada y acumulada.

Tabla 80. Estudio de la influencia de los parámetros característicos de las muestras de lomo sobre la formación de los COPs mediante PCA

PC	Autovalor	Ecuación	Varianza explicada %	Varianza acumulada %
1	8,54	$0,336*7\beta\text{-OH} + 0,337*\beta\text{-epóxido} + 0,341*\alpha\text{-epóxido} + 0,255*\text{triol} + 0,338*7\text{-ceto} + 0,339*25\text{-OH} - 0,340*\text{Agua} + 0,336*\text{Lip, \%} - 0,14*\text{Col} + 0,340*\text{COPs}_T$	85,4	
2	1,02	$0,14*7\beta\text{-OH} + 0,092*\beta\text{-epóxido} - 0,028*\alpha\text{-epóxido} - 0,41*\text{triol} + 0,14*7\text{-ceto} + 0,004*25\text{-OH} - 0,085*\text{Agua} + 0,12*\text{Lip, \%} + 0,85*\text{Col} + 0,097*\text{COPs}_T$	10,2	95,6

La **Figura 103** presenta la bigráfica obtenida, donde se observa que las muestras de LF y LA se comportan de forma diferente; la formación de COPs se ve favorecida en la muestra de LF con mayor contenido en lípidos. El mayor contenido en agua en las muestras de LA afecta de distinta forma; aunque la presencia de mayor contenido en agua podría favorecer la formación de COPs en LA, este agua puede ser menos activa debido a la presencia de sal en esta muestra. Por otra parte, la presencia de aditivos antioxidantes puede ejercer un efecto protector a la oxidación.

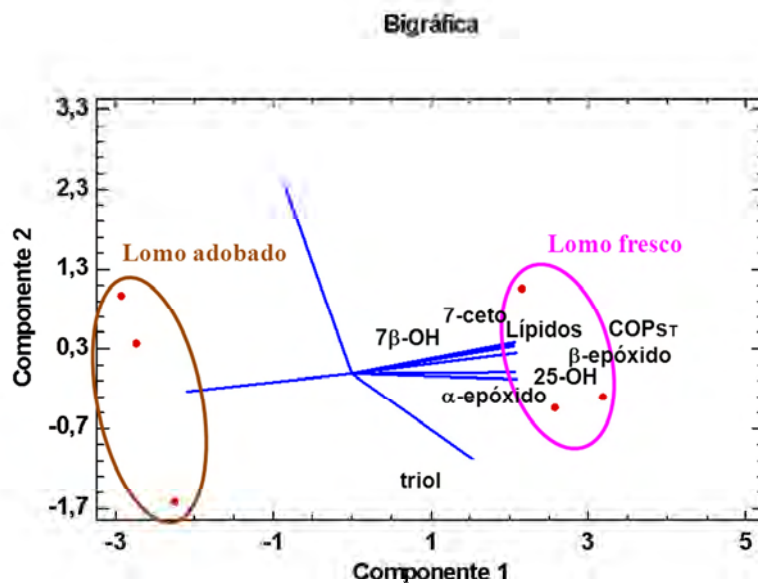


Figura 103. Influencia de los parámetros característicos de las muestras de lomo sobre la formación de los COPs. Análisis mediante GC-FID

Identificación de COPs mediante GC-TOF en muestras enriquecidas y sin enriquecer

La identificación de los COPs se llevó a cabo mediante GC-TOF siguiendo el método propuesto en 4.4.10, utilizando una columna DB-5 en muestras de lomo fresco enriquecidas con 10 mg/L y sin enriquecer, identificándose en ésta última los COPs 7β-

OH, α -epóxido y 7-ceto, los cuales fueron confirmados por comparación de sus espectros según se indica en la parte experimental 5.3.5. La **Figura 104** muestra el cromatograma obtenido de una muestra enriquecida.

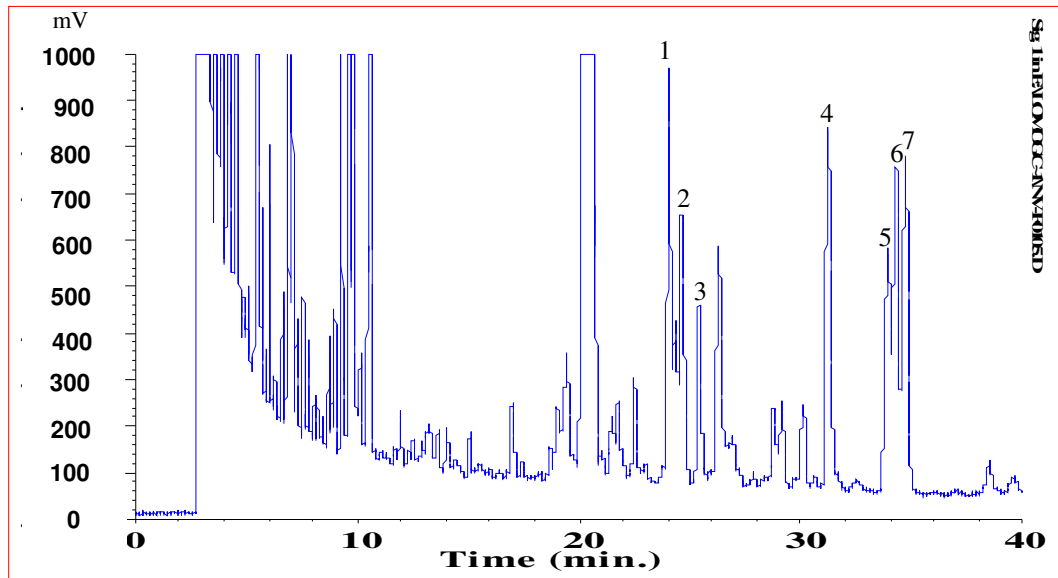


Figura 104. Cromatograma mediante GC-FID de una muestra de lomo fresco de cerdo enriquecida. [COPs], 10 mg/L. Columna HP-5. Picos. 1) 7 β -OH; 2) β -epóxido; 3) α -epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto. 6) 7-ceto; 7) 25-OH

Los cromatogramas de los Tri-Sil derivados de la **Figura 105** presentan, con más detalle, el intervalo de tiempo de elución de los COPs de interés para las muestras de lomo fresco, sin enriquecer y enriquecida.

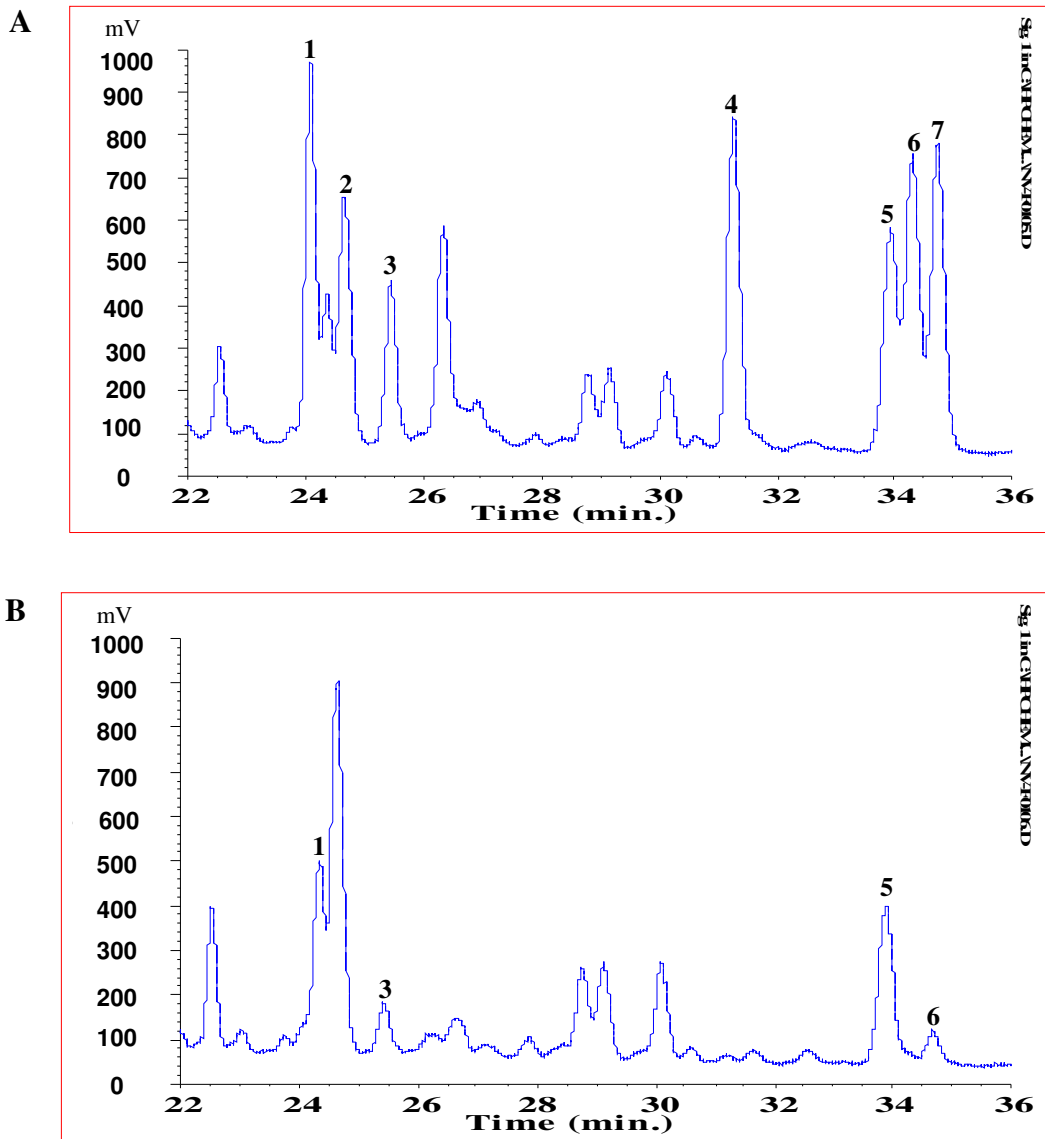


Figura 105. Cromatogramas de COPs en muestras de lomo: 1) 7β -OH; 2) β -epóxido; 3) α -epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto. SI; 6) 7-ceto; 7) 25-OH. A) Muestra de lomo fresco enriquecida a 10 mg/L; B) Muestra de lomo fresco sin enriquecer

Se observa que los COPs 7β -OH, β -epóxido y α -epóxido eluyen entre 23 y 26 min y triol, 6-ceto, 7-ceto y 25-OH eluyen entre 31 y 36 min; es necesario indicar que con esta columna no se separan completamente hasta línea base los COPs 6-ceto 7-ceto y 25-OH con el programa de gradiente empleado, de acuerdo a lo expuesto en 5.2.3. Sin embargo, la separación es suficiente para realizar la identificación mediante GC-MS.

Para verificar que no se forma 6-ceto en el proceso de irradiación ni en el proceso de preparación de la muestra utilizando el nuevo método, se prepararon tres muestras de lomo fresco a 1.5 kGy en presencia y ausencia de 6-ceto a 5 mg/L como IS. En los cromatogramas de la **Figura 106**, se observa que al tiempo de elución del 6-ceto la línea base se puede considerar como ruido

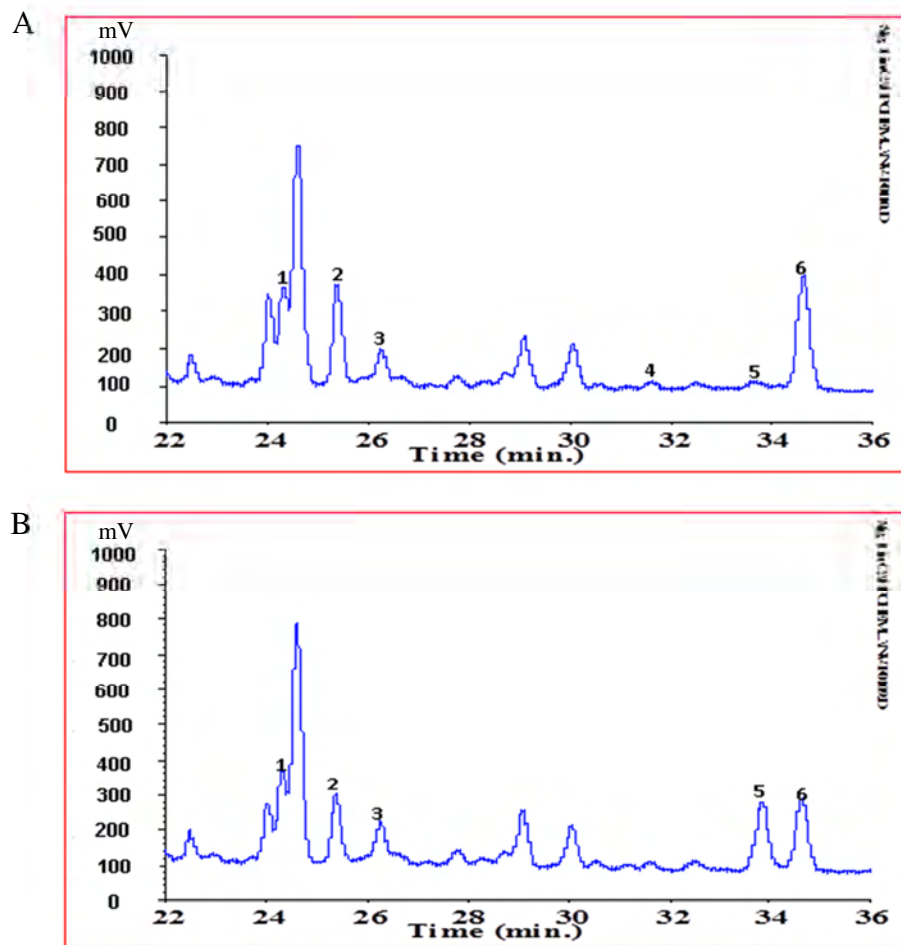


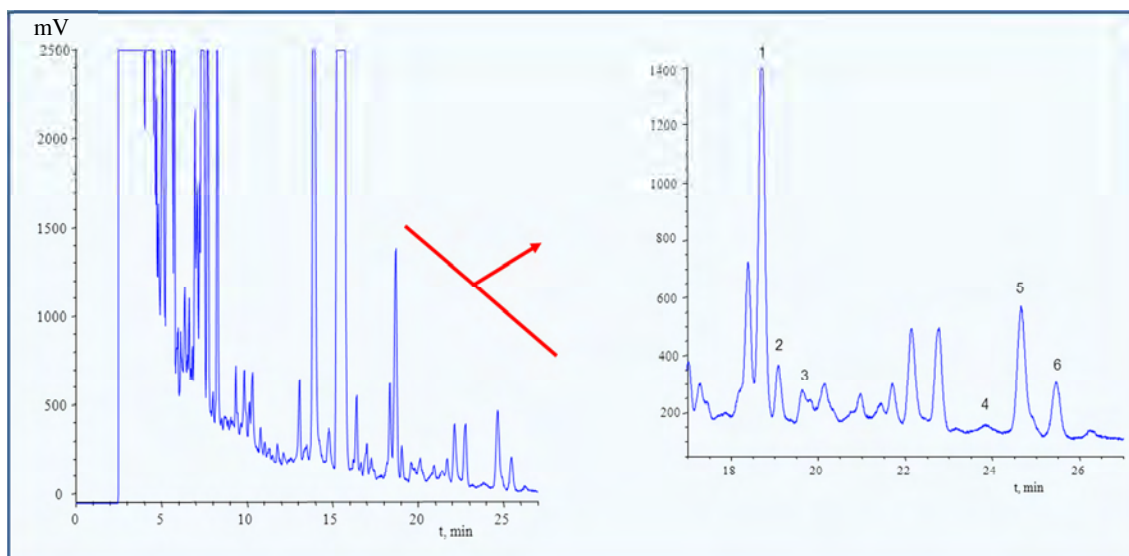
Figura 106. Cromatograma de COPs en muestras de lomo fresco a 1.5 kGy; 1) 7 β -OH ; 2) β -epóxido; 3) α -epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto SI; 6) 7-ceto. A) sin, B) con adición de 6-ceto

5.5.3. Determinación de COPs en muestras de lomo fresco y adobado irradiadas

En el contexto del estudio sobre el efecto de la irradiación en muestras de lomo, teniendo en cuenta que en la normativa europea únicamente se permite irradiar los alimentos hasta 1.5 kGy, se procedió a preparar muestras de lomo fresco y de lomo adobado sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy y se aplicó el método desarrollado usando 6-ceto, a 5 mg/L como IS.

La **Figura 107** presenta los cromatogramas de las muestras de lomo fresco sin irradiar e irradiado a 2 kGy. En este último se produce una disminución de los COPs.

A



B

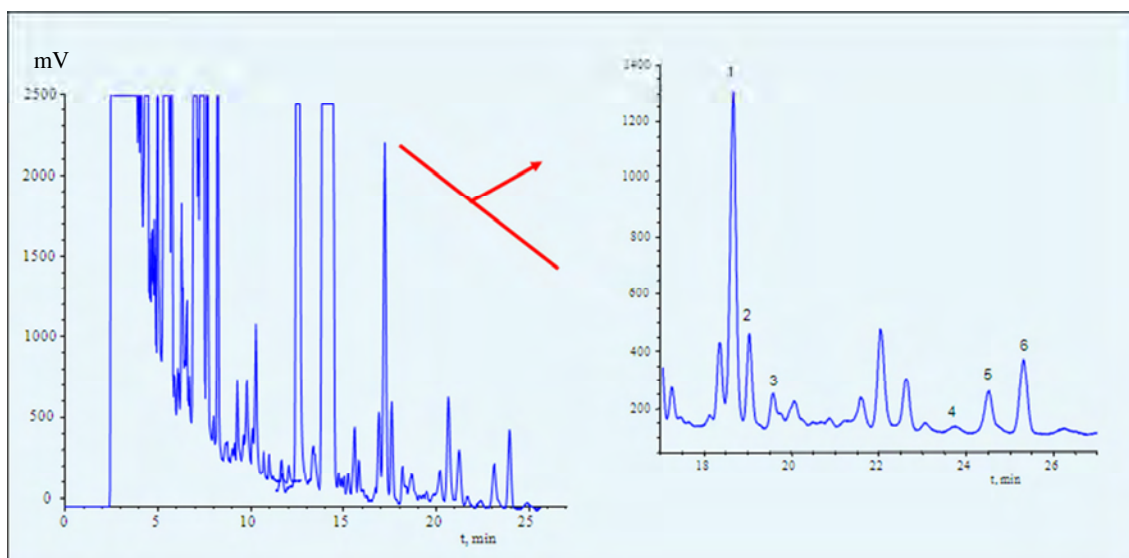


Figura 107. Cromatogramas de COPs en las muestras de lomo fresco: A) sin irradiar; B) irradiado a 2 kGy. Picos: 1) 7 β -OH; 2) β -epóxido; 3) α -epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto SI; 6) 7-ceto

La **Figura 108** presenta los cromatogramas de las muestras de lomo adobado sin irradiar e irradiado a 2 kGy. En este último también se observa una disminución de los COPs.

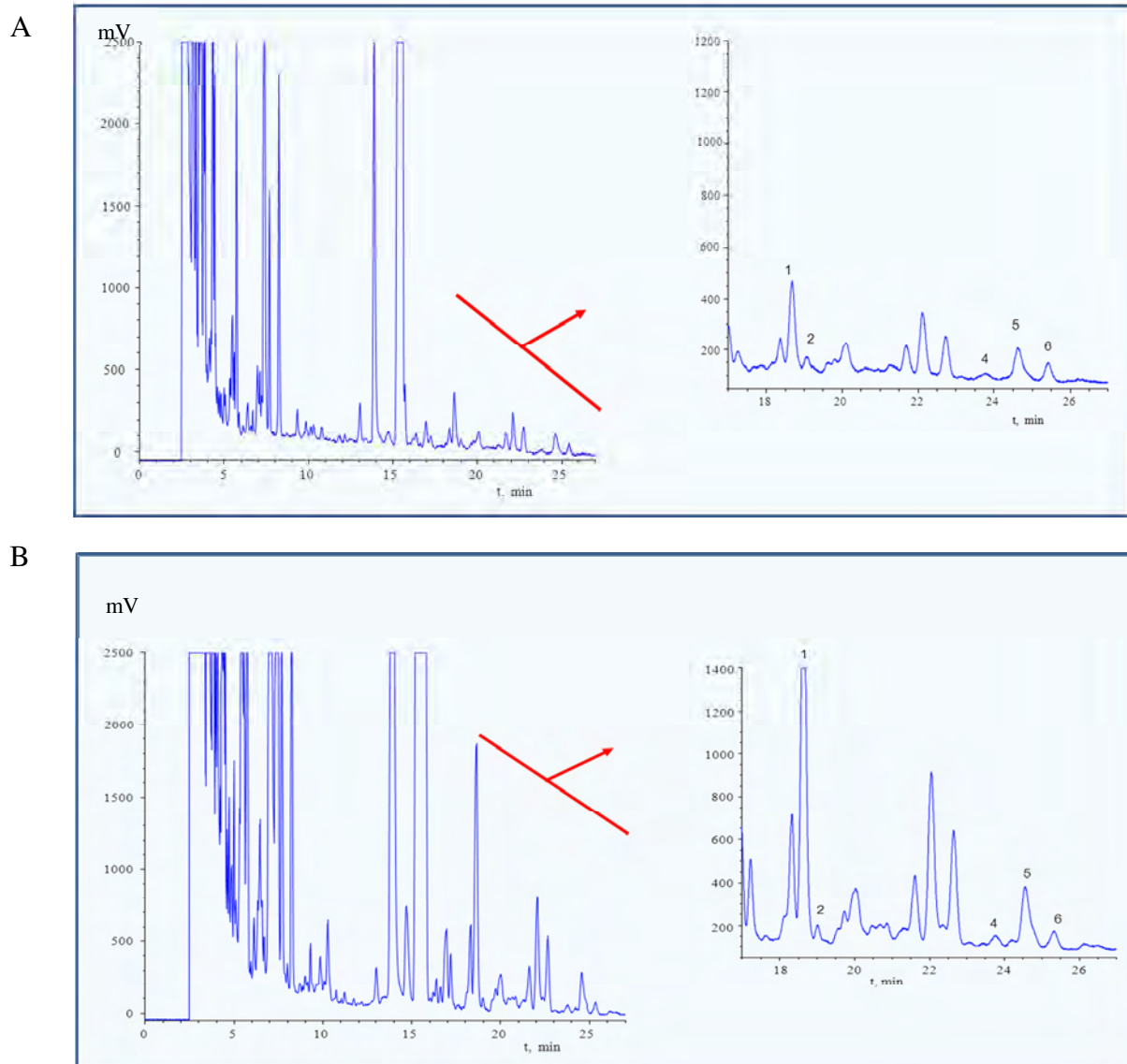


Figura 108. Cromatogramas deCOPs en las muestras de lomo adobado: A) sin irradiar; B) irradiado a 2 kGy. Picos: 1) 7 β -OH; 2) β -epóxido; 3) α -epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto SI; 6) 7-ceto

El comportamiento diferente de los COPs en las muestras de LF irradiado sin adobar y adobado podría atribuirse a diferencias en el contenido de agua y al efecto antioxidante de los ingredientes del adobo (pimentón, ajo y hierbas aromáticas).

5.5.3.1. Análisis de la varianza, ANOVA

La comparación de resultados para cada tipo de muestra se llevó a cabo mediante test ANOVA de un factor; el test ANOVA proporcionó diferencias significativas entre las concentraciones medias de COPs, indicadas por los valores p inferiores a 0.05 entre muestras no irradiadas e irradiadas, como se detalla en las muestras descritas a continuación.

5.5.4.1.1. Lomo fresco

Los valores del contenido de COPs en muestras de lomo fresco a diferente dosis de irradiación (0-2 kGy) se presentan en la **Tabla 81**. Los contenidos de COPs fueron comparativamente más altos a 1 kGy que aquellos encontrados en las muestras sin irradiar e irradiadas a 2 kGy. El COP 7 β -OH es el compuesto que se encuentra en mayor proporción, seguido por β -epóxido y 7-ceto; triol y 25-OH se encuentran en cantidades relativamente pequeñas, no cuantificándose a 2 kGy. Para esta disminución de COPs con la irradiación no se ha encontrado explicación hasta el momento, aunque podrían producirse transformaciones de COPs no detectadas.

Tabla 81. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de lomo fresco

Dosis Irradiación, kGy	COP, ng/g					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
0	2367	1424	951	109	1226	117
0	2331	1362	965	141	1281	139
0	2258	1432	840	104	1312	91
1	2286	1445	707	142	1192	nq
1	2258	1737	767	137	1672	nq
1	2366	1905	844	199	1713	nq
2	2648	532	401	nq	380	nq
2	2369	476	374	nq	422	nq
2	2345	523	386	nq	498	nq

nq, no cuantificado

Estos resultados indican que los COPs se formaron durante la irradiación de las muestras; en general, el contenido de COP aumenta a la dosis de irradiación de 1 kGy, y disminuye a 2 kGy, no existiendo, por tanto, una relación lineal entre dosis de irradiación y concentración de COP detectada. Se encontraron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95.0% para, β -epóxido, α epóxido, triol, 7-ceto y 25-OH, con valores de $\alpha < 0.05$. El test Tukey HSD se utilizó para determinar cuáles de estas dosis de irradiación eran diferentes. La **Figura 109** presenta las gráficas del test Tukey y permite visualizar las concentraciones medias de los intervalos al 95% para los COPs obtenidos para cada dosis de irradiación.

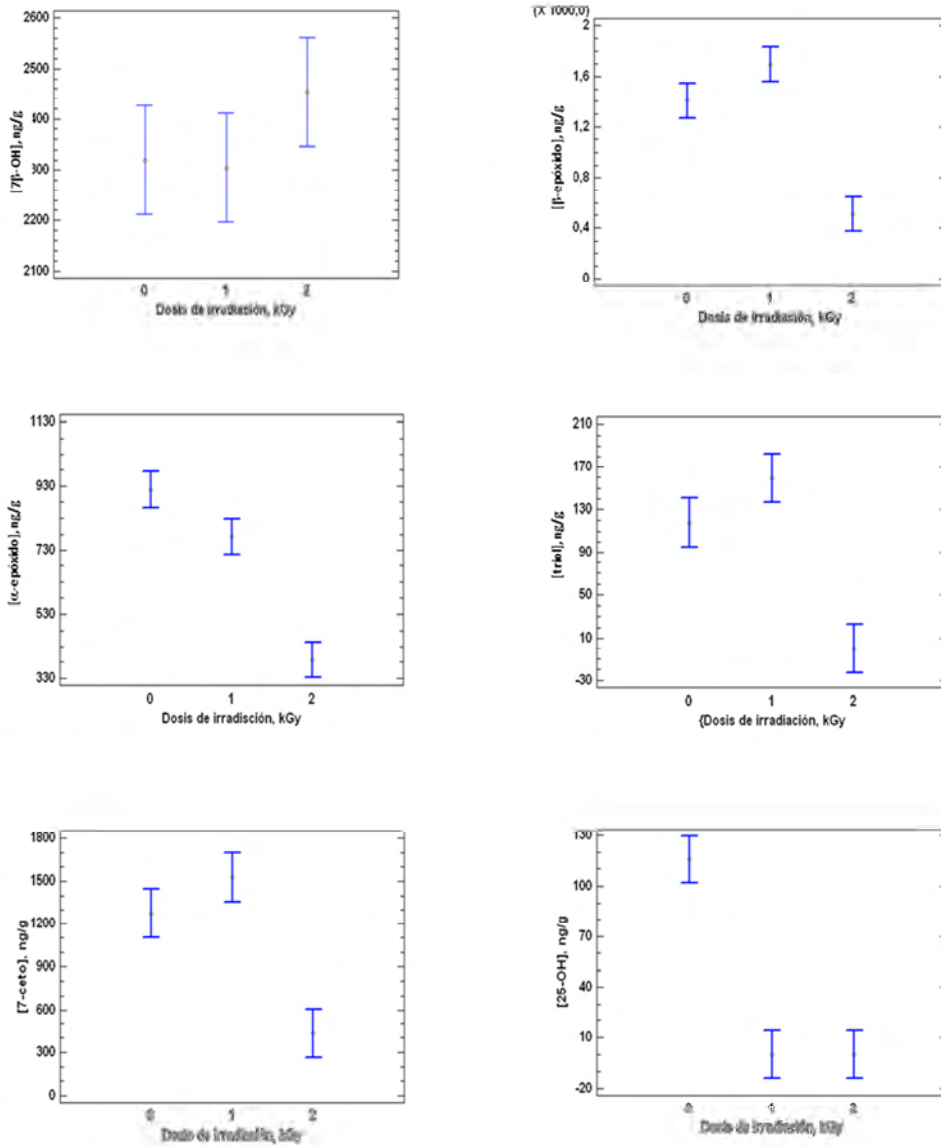


Figura 109. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de lomo fresco

Con respecto a las muestras irradiadas (dosis de irradiación de 1 y 2 kGy) no hubo diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre ellas para 7β-OH y 25-OH.

5.5.4.1.2. Lomo adobado

Los valores medios del contenido de COPs en muestras de lomo adobado a diferentes dosis de irradiación (0-2 kGy) se presentan en la **Tabla 82**. En general, los contenidos de COPs fueron también comparativamente más altos a 1 kGy y disminuyeron a 2 kGy excepto para 7 β -OH, compuesto que se encuentra en mayor proporción; 7-ceto y triol se encuentran en cantidades relativamente pequeñas no cuantificándose este último a 2 kGy; 25-OH no fue cuantificado en ningún caso.

La **Tabla 82** presenta los contenidos de COPs en muestras de lomo adobado a las distintas dosis de irradiación.

Tabla 82. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de lomo adobado

Dosis Irradiación, kGy	COPs, ng/g					
	7 β -OH	β -epóxido	α -epóxido	triol	7-ceto	25-OH
0	1161	630	424	106	205	nq
0	1278	583	370	81	240	nq
0	1307	592	346	96	227	nq
	1513	675	530	104	1132	nq
1	1339	663	517	112	1144	nq
1	1345	800	492	109	1158	nq
	1606	144	150	nq	81	nq
2	1640	146	124	nq	116	nq
2	1434	121	139	nq	85	nq

nq= no cuantificado

El test ANOVA indica que, en general, el contenido de COPs se incrementa al irradiar las muestras a 1 kGy, **Figura 110**, aunque únicamente este incremento es significativo para 7-ceto; 7 β -OH aumenta su contenido linealmente hasta 2 kGy, mientras que β -epóxido, α -epóxido, triol y 7-ceto disminuyen su contenido a 2 kGy, al igual que en la

muestra de LF. Este comportamiento debe tener alguna explicación que no se ha encontrado hasta el momento.

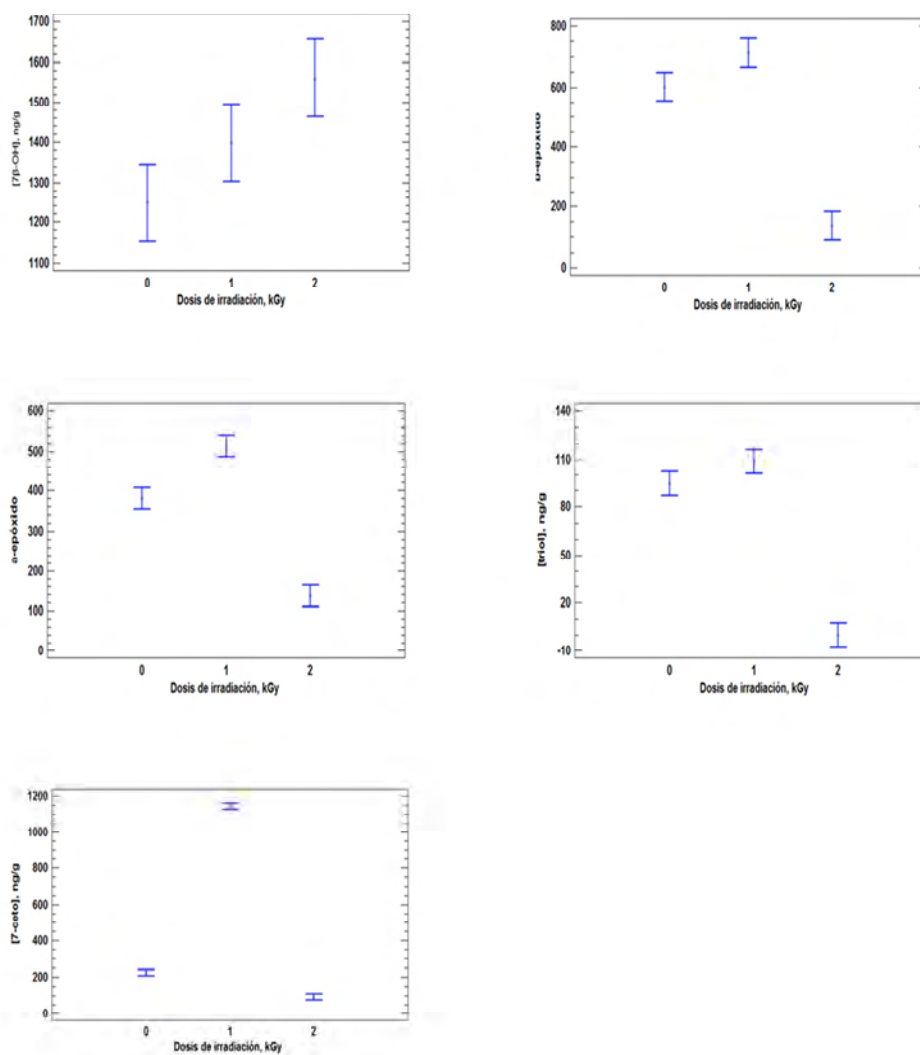


Figura 110. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de lomo adobado

El test ANOVA de dos factores (irradiación y muestra) mostró además, diferencias significativas al nivel de confianza del 95% entre los valores medios obtenidos para cada COP en las distintas muestras.

Se puede concluir que el comportamiento de cada COP depende del tipo de muestra. Teniendo en cuenta que el análisis ANOVA no ha proporcionado una información completa sobre el efecto de la irradiación en la formación de COPs y la naturaleza de la muestra, se ha llevado a cabo un estudio multivariante de los datos mediante análisis de componentes principales, por lo que en primer lugar se comprueba si existe correlación entre las variables originales para la posible aplicación de dicha técnica quimiométrica.

5.5.4.2. Análisis de correlación

El análisis multivariado de los resultados obtenidos para las distintas irradiaciones en las diferentes muestras analizadas de LF y LA indicó que existen correlaciones entre las diferentes variables estudiadas y las dosis de irradiación. En la **Tabla 83** se muestra la matriz de correlación en la que se observa una alta correlación de β -epóxido con α -epóxido, de β -epóxido con triol, de β -epóxido con 7-ceto y de α -epóxido con 7-ceto, así como triol con 7-ceto cuyos valores del coeficiente lineal de Pearson son próximos a la unidad ($\alpha < 0.05$). También se encuentran correlacionadas las variables 7 β -OH con β -epóxido y α -epóxido con 25-OH, en todos los casos con correlación positiva.

Tabla 83. Matriz de correlación utilizando los resultados de las muestras de lomo sin irradiar e irradiadas mediante GC-FID

Irradiación	Irradiación	7β-OH	β-epóxido	α-epóxido	triol	7-ceto	25-OH
		0,1839	-0,5112	-0,6014	-0,7043	-0,3525	-0,538
7-OH	0,1839 ^a	0,4651	0,0301	0,0083	0,0011	0,1514	0,0211
	0,4651 ^b	0,5337	0,5423	0,0441	0,4343	0,3932	
β-epóxido	-0,5112	0,0225	0,0201	0,8622	0,0717	0,1065	
	0,0301	0,5337		0,9319	0,8405	0,8977	0,4512
α-epóxido	-0,6014	0,0225		0,0000	0,0000	0,0000	0,0602
	0,0083	0,5423	0,9319	0,7874	0,8787	0,8010	0,6851
triol	-0,7043	0,0201	0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	0,0017
	0,0011	0,0441	0,8405	0,7874	0,8010	0,8010	0,2894
7-ceto	-0,3525	0,8622	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,2441
	0,1514	0,4343	0,8977	0,8787	0,8010		0,3822
25-OH	-0,5385	0,0717	0,0000	0,0000	0,0001	0,3822	0,1175
	0,0211	0,3932	0,4512	0,6851	0,2894	0,3822	
		0,1065	0,0602	0,0017	0,2441	0,1175	

^a Correlación; ^b Valor-P

En la **Figura 111** se presenta el gráfico de dispersión de la matriz de correlación, en la que se confirma, por el hábito de los puntos, las correlaciones observadas en la matriz. En ambos casos, se muestra claramente que los distintos COPs estudiados están poco correlacionados (en general, de forma negativa) y no es lineal la variable dosis de irradiación con las distintas variables.

Teniendo en cuenta que existen correlaciones entre algunas variables estudiadas y que, además, el análisis ANOVA no ha proporcionado una información completa sobre el efecto de la irradiación y de la naturaleza de la muestra en la formación de COPs, se ha llevado a cabo un estudio multivariante de los resultados obtenidos (Tabla 81 y 82) mediante análisis de componentes principales.

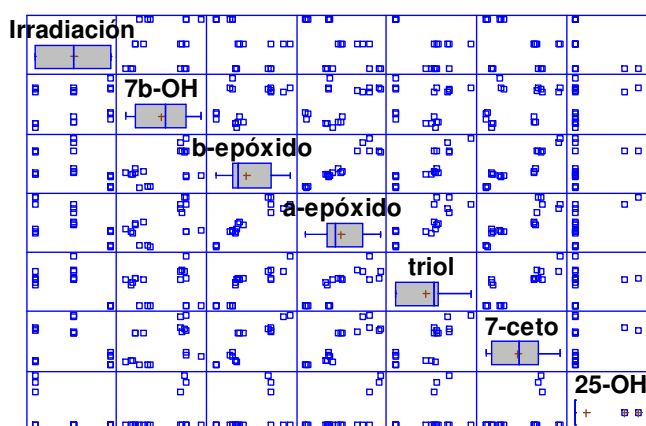


Figura 111. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las muestras de lomo mediante GC-FID

5.5.4.3. Análisis de Componentes Principales, PCA.

Se realizó un estudio mediante PCA teniendo en cuenta las variables especificadas en la **Tabla 81**, y los resultados recogidos en las **Tablas 81 y 82**, acerca de la influencia de la irradiación en la formación de los COPs en las muestras de LF y LA. En la **Tabla 84** se presenta los resultados del autovalor del primer y segundo componente, PC1 y PC2, sus ecuaciones, así como el porcentaje de varianza explicada y acumulada.

Tabla 84. Estudio de la influencia de la irradiación de las muestras de lomo mediante PCA

PC	Autovalor	Ecuación	Varianza explicada %	Varianza acumulada %
1	4,47	- 0,31*Dosis, kGy + 0,22*7β-OH + 0,45*β-epóxido + 0,47*α-epóxido + 0,40*triol + 0,42*7-ceto + 0,30*25-OH	63,8	
2	1,35	0,56*Dosis, kGy + 0,74 *7β-OH + 0,090 *β-epóxido + 0,082 *α-epóxido + -0,33 *triol + 0,11*7-ceto + 0,078 *25-OH	19,3	83,1

La **Figura 112** presenta la bigráfica del análisis de PCA de las muestras de lomo. Se observa que ambos tipos de lomo, LF y LA, tienen distinto comportamiento; en la muestra de LF que se caracteriza por un contenido alto en epóxidos, cuando aumenta la irradiación a 1 kGy se destruyen parte de estos epóxidos, y se transforman en triol cuando la irradiación se incrementa a 2 kGy (aunque la cantidad de triol es pequeña y tiene poco peso); este efecto coincide con la transformación de COPs referida por Nielsen et al. (1996). El adobo protege a las muestras de las modificaciones, incluso aunque se encuentren irradiadas.

La formación e inhibición de COPs durante procesos de marinado en patas de cerdo, con salsa de soja y azúcar, ha sido referida por Cheng et al. (2012).

Lomo fresco
Lomo adobado

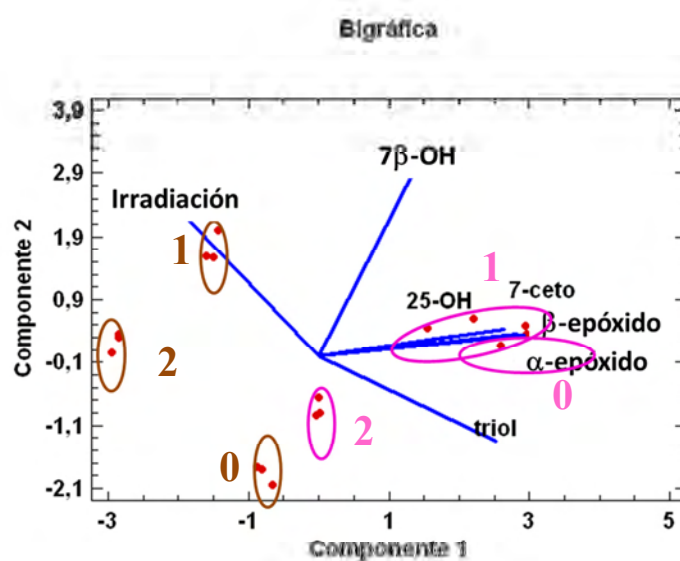


Figura 112. Influencia de la irradiación sobre la formación de los COPs en muestras de lomo fresco y lomo adobado (LF y LA)

**5.6. INFLUENCIA DE LA IRRADIACIÓN
E-beam EN EL CONJUNTO DE TODAS
LAS MUESTRAS ESTUDIADAS, SIN
IRRADIAR E IRRADIADAS A 1 Y 2 kGy
MEDIANTE PCA.**

5.6. Influencia de la irradiación E-beam en el conjunto de todas las muestras estudiadas, sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy mediante PCA.

En primer lugar, se obtiene la siguiente matriz de los coeficientes bivariados de Pearson (**Tabla 85**) con los diferentes datos obtenidos en todos los alimentos, analizados mediante GC para las muestras sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy, indicando los valores próximos a la unidad las variables originales más correlacionadas; la **Figura 113** corrobora la colinealidad obtenida entre dichas variables.

Tabla 85. Matriz de correlación obtenida con los datos del conjunto de las muestras sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy. Análisis mediante GC-FID

Irradiación	Irradiación	7β-OH	β-epóxido	α-epóxido	triol	7-ceto	25-OH
7β-OH	0,0656	0,0656	-0,0826	-0,1632	-0,0283	-0,0210	0,2297
	0,6094	0,6094	0,5201	0,2013	0,8259	0,8701	0,0701
β-epóxido	0,0656	0,7799	0,7799	0,8308	0,4388	0,4439	-0,4103
	0,6094	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0003	0,0008
α-epóxido	-0,0826	0,7799	0,8809	0,8809	0,6300	0,7005	-0,2356
	0,5201	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0630
α-epóxido	-0,1632	0,8308	0,8809		0,7144	0,4740	-0,2087
	0,2013	0,0000	0,0000		0,0000	0,0001	0,1008
triol	-0,0283	0,4388	0,6300	0,7144		0,1707	0,0778
	0,8259	0,0003	0,0000	0,0000		0,1809	0,5444
7-ceto	-0,0210	0,4439	0,7005	0,4740	0,1707		-0,3131
	0,8701	0,0003	0,0000	0,0001	0,1809		0,0125
5-OH	0,2297	-0,4103	-0,2356	-0,2087	0,0778	-0,3131	
	0,0701	0,0008	0,0630	0,1008	0,5444	0,0125	

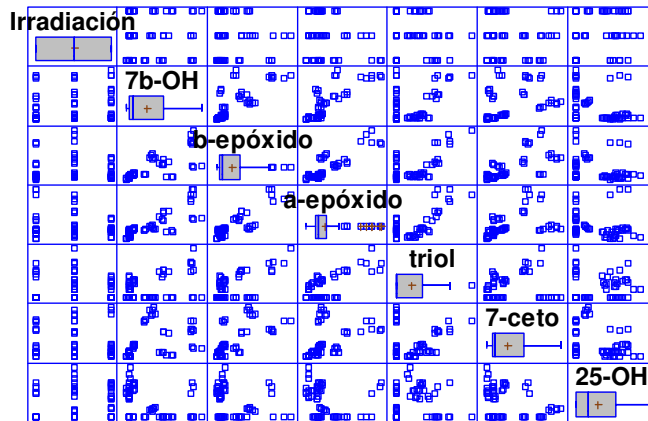


Figura 113. Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos del conjunto de las muestras sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy

En segundo lugar, se realiza un estudio mediante PCA. Se obtienen tres PC, como se observa por los autovalores > 1 de la **Tabla 86**, que explican prácticamente un 84% de los datos., donde se muestra, además, la ecuación de cada PC y su varianza explicada y acumulada.

La **Figura 114** muestra los gráficos bivariados para dos y tres componentes, respectivamente.

Tabla 86. Estudio de la influencia de la irradiación del conjunto de las muestras estudiadas sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy mediante PCA

PC	Autovalor	Ecuación	Varianza explicada, %	Varianza acumulada, %
1	3,60	$-0.059 * \text{Irradiación} + 0.46 * \beta\text{-OH} + 0.50 * \beta\text{-epóxido} + 0.50 * \alpha\text{-epóxido} + 0.35 * \text{triol} + 0.35 * 7\text{-ceto} - 0.19 * 25\text{-OH}$	51.5	
2	1,26	$0.48 * \text{Irradiación} - 0.021 * \beta\text{-OH} + 0.062 * \beta\text{-epóxido} + 0.12 * \alpha\text{-epóxido} + 0.46 * \text{triol} - 0.22 * 7\text{-ceto} + 0.70 * 25\text{-OH}$	18.0	69.5
3	1,00	$0.81 * \text{Irradiación} + 0.21 * \beta\text{-OH} + 0.02 * \beta\text{-epóxido} - 0.17 * \alpha\text{-epóxido} - 0.35 * \text{triol} + 0.35 * 7\text{-ceto} - 0.18 * 25\text{-OH}$	14.3	83.8

En la bigráfica de dos componentes, **Figura 114**, se observa una clara diferencia entre las muestras sin irradiar e irradiadas, así como una agrupación según el tipo de muestra y dosis de irradiación. El componente PC1 proporciona la variabilidad de los COPs, según la naturaleza de la muestra y el PC2 la variabilidad en cuanto al incremento de la dosis de irradiación.

Respecto a la bigráfica de tres componentes de la **Figura 114**, cabe indicar que todas las muestras no irradiadas se encuentran en el plano inferior del cubo. Para muestras no irradiadas existen dos comportamientos distintos; en el caso del LF se caracteriza por la formación de triol y α -epóxido y en el caso de LA por la formación de bajo contenido en triol; a la irradiación de 1 kGy las muestras se caracterizan por la formación de

Los dos epóxidos, si bien la muestra de lomo adobado con un contenido más bajo; a medida que aumenta la irradiación a 2 kGy las muestras se caracterizan más por el contenido en 25-OH.

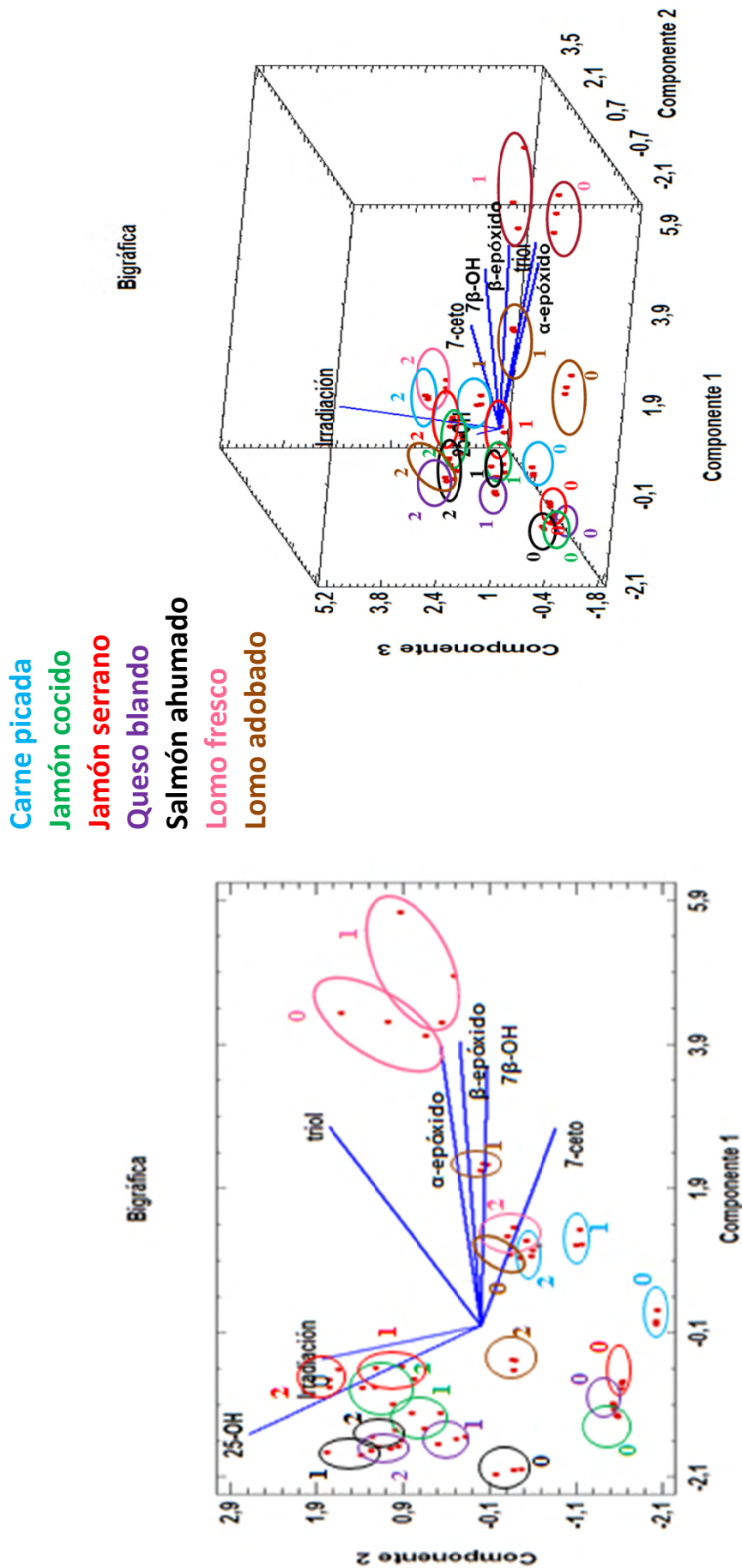


Figura 114. Biográfica con dos y tres PC. Influencia de la irradiación (0 a 2 kGy) sobre la formación de los COPs en muestras de alimentos

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Se han desarrollado/optimizado y validado métodos cromatográficos, HPLC y GC, incluyendo la preparación de muestra, para la determinación de COPs en alimentos RTE de origen animal ricos en lípidos con objeto de evaluar el efecto de la irradiación E-beam con fines de conservación.

Aplicación de técnicas quimiométricas

Estas técnicas han permitido:

- La optimización de la preparación de muestra reduciendo el número de experimentos y la cantidad de disolventes, aumentando la información, tanto sobre los métodos propuestos como sobre las muestras analizadas.
- El análisis de resultados estableciendo correlaciones entre el efecto de la irradiación E-beam y la composición/naturaleza del alimento.

Preparación de la muestra

- La extracción de lípidos (y COPs) mediante ASE permitió automatizar la etapa de preparación de muestra con la consiguiente disminución, respecto a la técnica de lixiviación, del empleo de reactivos tóxicos, de disolventes y del tiempo de análisis.
- El uso de doble cartucho silica-aminopropil mediante SPE proporcionó óptimos resultados en cuanto a recuperaciones de COPs.

Métodos cromatográficos

El método GC-FID (que utiliza extracción con ASE y derivatización con Tri-Sil) ha proporcionado mayor sensibilidad que el método HPLC-UV, permitiendo detectar

mayor número de COPs, así como establecer la estructura de los COPs-Tri-sil-derivados (7 β -OH, α -epóxido, β -epóxido, triol, 6-ceto, 7-ceto y 25-OH) mediante su identificación por GC-MS.

Transformaciones de COPs

Durante la preparación de muestra por los métodos disponibles en la bibliografía se detectaron transformaciones de algunos COPs, en especial en la etapa de SPE, lo que llevó a proponer rutas de degradación/transformación de COPs. Las principales transformaciones detectadas fueron:

- Triol en 6-ceto cuando se emplea SPE y fase normal
- β - y α -epóxidos en triol cuando se emplean cartuchos C₁₈.

Método propuesto para minimizar transformaciones de COPs

El método mediante GC-FID y derivatización con Tri-Sil, se basa esencialmente en:

- Ajustar la cantidad de muestra para que el extracto lipídico obtenido mediante ASE no sobrepase los 300 mg.
- El uso de cartuchos C₁₈ en la etapa SPE y elución con MeOH, ajustando su volumen en función de la naturaleza de la muestra.
- Controlar el pH del tampón usado para recoger los COPs eluidos con MeOH en la etapa de limpieza mediante SPE, antes de evaporar a sequedad para realizar el proceso de derivatización con Tri-Sil.

COPs detectados en alimentos

Se han detectado y/o cuantificado los siguientes COPs, dependiendo del tipo de alimento RTE analizado:

7 β -OH, b-epóxido, a-epóxido, triol, 7-ceto y 25-OH

Estudio de correlaciones contenido en COPs/composición alimento/dosis de irradiación

- La técnica PCA permitió establecer correlaciones entre las diferentes variables estudiadas.
- Genéricamente, se detectaron diferencias del contenido en COPs entre las muestras no irradiadas e irradiadas.

Muestras sin irradiar

- El contenido de COPs está relacionado con el de lípidos y colesterol, siendo factores a tener en cuenta la relación lípido/colesterol, contenido de colesterol y tipo de proceso que se utiliza en la preparación del alimento.
- El contenido en COPs de 7-ceto, 7 β -OH, β -epóxido y α -epóxido aumenta con el contenido en lípidos y colesterol.
- El contenido en agua presenta un efecto importante en sentido contrario al de los lípidos.

Muestras irradiadas

- En la mayoría de los alimentos analizados se forman 7 β -OH, β -epóxido, α -epóxido y 7-ceto; los COPs triol y 25-OH son cuantificables excepto en las muestras de carne picada y queso blando.
- El mayor contenido de 7-ceto encontrado en la muestra de carne picada se justifica por la mayor facilidad de oxidación de la muestra.

- Dosis entre 1 a 8 kGy favorecieron genéricamente la formación de COPs; este proceso de formación depende tanto de la dosis como del tipo de alimento, si bien la formación de los COPs no presenta un comportamiento lineal con la dosis de irradiación.
- En todos los casos, el contenido de COPs fue menor que los niveles tóxicos establecidos para experimentos in vitro e in vivo.
- La radiación E-beam podría ser una técnica útil para la higienización de los alimentos envasados al vacío con la posibilidad de que los métodos propuestos permitan hacer uso de los COPs como marcadores.
- La irradiación produce cambios organolépticos importantes en la coloración, olor y textura de las muestras, especialmente en las muestras de salmón ahumado, detectándose 25-OH, no encontrado/cuantificado en las otras muestras estudiadas.
- Se detectaron agrupaciones de muestras según las dosis de irradiación y la naturaleza de la muestra.
- La formación de 25-OH puede verse favorecida, dependiendo de la dosis de la irradiación, en las muestras con alto contenido en agua.
- La formación tanto de 7-ceto como de 25-OH tiene lugar a bajas dosis de irradiación si bien su contenido depende de la naturaleza de la muestra.

La aplicación de la irradiación como medio de higienización de alimentos RTE exige el estudio individual de cada alimento con objeto de evaluar las transformaciones incluso a los niveles de irradiación permitidos por la legislación vigente.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Addis, P. B. (1986). Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1021–1030.

Addis, P.B.; Warner, G.J. (1991). The potential health aspects of lipid oxidation products in food. En: *Free radicals and food additives*. Auroma O. Halliwell B., Eds. Taylor & Francis Ltd., London, 77-119.

Ahn, D. U., Jo, C., & Olson, D. G. (2000). Analysis of volatile components and the sensory characteristics of irradiate raw pork. *Meat Science*, 54, 209–215.

Ahn, D.U.; Nam, K.C.; Du, M.; Jo, C. (2001). Effect of irradiation and packaging conditions after cooking on the formation of cholesterol and lipid oxidation products in meats during storage. *Meat Science*, 57, 413-418.

Al-Ismail, K.M.; Herzallah, S.M.; Humied, M.A. (2007). Effect of processing and storage of Jameed on conjugated linoleic acid content and fat and cholesterol oxidation. *LWT Food Science and Technology*, 40, 454–459.

Al-Saghir, S.; Thurner K.; Karl-Heinz W.; Frisch, G.; Luf, W.; Razzazi-Fazeli, E.; Elmadfa, I. (2004). Effects of Different Cooking Procedures on Lipid Quality and Cholesterol Oxidation of Farmed Salmon Fish (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5290-5296.

Angulo, A. J., Romera, J. M., Ramírez, M., & Gil, A. (1997). Determination of cholesterol oxides in dairy products. Effect of storage conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 4318–4323.

AOAC (1998). AOAC Official Method 930.15, moisture in animal feed. AOAC International.

Appelqvist, L.A., (1996) Oxidized sterols, *International Dairy Federation Bulletin*, 315, 52–58.

Appelqvist, L.A.; Addis, P.; Bjorkhem, I.; Bosset, J.O. Caboni, .; M.F.; Dutta, P.; Grandgirard, A.; Guardiola, F.; Hau, L.B.; Nielsen, J.H.; Hugget, A.; Hwang, L.S.; Kumpulainen, J.; McCluskey, S.; Ohshima, T.; Przbylski, R.; Sevanian, A.; Yan, P. (2004). Harmonization of methods for analysis of cholesterol oxides in foods—the first portion of a long road toward standardization: interlaboratory study, *Journal of the American Oil Chemists' Society International*, 87, 511–519.

ASTM (2000). American Society for Testing and Materials. E1650-97e1 Standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems, Vol. 12.02 West Conshohocken, Pennsylvania.

Baggio, S.R.; Bragagnolo, N. (2006a). Cholesterol oxide cholesterol total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. *LWT- Food Science and Technology*, 39, 513–520.

Baggio S. R.; Bragagnolo N. (2006b). The effect of heat treatment on the cholesterol oxides cholesterol total lipid and fatty acid contents of processed meat products. *Food Chemistry*, 95, 611–619.

Bal, N.; Kowale, V.; Kesava, R.N.; Pedda, B.; Nagendra, S; Girdhar, S.B. (1996), Lipid Oxidation and Cholesterol Oxidation in Mutton During Cooking and Storage. *Meat Science*, 43, (2), 195-202.

Blank, G., Shamsuzzaman, K., & Sohal, S. (1992). Use of electron beam irradiation for mold decontamination on cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 75, 13–18.

Bligh, E.G.; Dyer, W.J. (1959). A rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (8), 911-917

Bloch, K. (1964), The biological synthesis of cholesterol.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1964/bloch-lecture.pdf

Bonoli, M.; Fiorenza, M.; Caboni, M.; Rodriguez-Estrada, T.; Lercker, G. (2007). Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. *Food Chemistry*, 101, 1327–1337.

Boselli, E.; Fiorenza, M.; Caboni, M.; Rodriguez-Estrada, T.; Gallina T.; Toschi, M.; Lercker D.G. (2005). Photooxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under commercial retail conditions. *Food Chemistry*, 91, 705–713.

Boselli, E.; Rodriguez-Estrada, M.T.; Fedrizzi, G.; Caboni, M.F. (2009). Cholesterol photosensitized oxidation of beef meat under standard and modified atmosphere at retail conditions. *Meat Science*, 81, 224–229.

Boselli, E.; Velazco V.; Caboni, M. F.; Lercker, G. (2001). Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A*, 917, 239–244.

Bösinger, S.; Luf, W.; Brandl, E. (1993). Oxysterols: their occurrence and biological effects. *International Dairy Journal*, 3 (1), 1–33.

Brewer, M. S. (2009). Irradiation effects on meat flavor: A review. *Meat Science*, 81, 1–14.

Broncano, J.M.; Petró, M.; Parra, J.; Timón, M.L. (2009). Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in *Latissimus dorsi* muscle of Iberian pigs. *Meat Science*, 83, 431–437.

Brooks, C.J.W.; Henderson, W.; Steel, G. (1973). The use of trimethylsilyl ethers in the characterization of natural sterols and steroid diols by gas chromatography–mass spectrometry, *Biochimical. Biophysical Acta*, 29 431–445.

Brown, M. S.; Goldstein J.L. (1985). A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1985/brown-goldstein-lecture.pdf

Brown, A.J.; Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 142, 1–28.

Brown, A.J.; Jessup, W. (2009). Oxysterols: Sources cellular storage and metabolism and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 111–122.

Busch, T.P.; King, A.J. (2009). Artifact generation and monitoring in analysis of cholesterol oxide products. *Analytical Biochemistry*, 388, 1–14.

Cabeza, M.C.; Cambero, I.; De la Hoz, L.; Ordóñez, J.A. (2007). Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 299–305.

Caboni, M.E.; Costa, A.; Rodríguez-Estrada, M.T.; Lercker, G. (1997). High Performance Liquid Chromatographic Separation of Cholesterol Oxidation Products. *Chromatographia*, 46 (3/4), 151-155.

Cardenia, V; Rodríguez-Estrada, MT; Baldacci, E; Savioli, S; Lercker, G. (2012) Analysis of cholesterol oxidation products by Fast gas chromatography/mass spectrometry. *Separation Science*, 35 (3), 424-430.

Careri, M.; Ferretti, D.; Manini, P., Musci, M. (1998). Evaluation of particle beam high-performance liquid chromatography–mass spectrometry for analysis of cholesterol oxides. *Journal of Chromatography A*, 794, 253–262.

Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M.; Parolari, G. (1998). Development of Gas Chromatographic Method for Determination of Cholesterol Oxides in Meat Products. *Chromatographia*, 47 (1/2), 42-48.

Carlson, R; Carlson J.E., *Design and Optimization in Organic Synthesis*. Elsevier. Amsterdam (2005).

Cela, R.; Lorenzo, R.A., Casais, M.C. (2002). *Técnicas de separación en Química analítica*. Editorial Síntesis.

Chang, J.Y.; Liu, L.Z. (1997). 25-Hydroxicholesterol Causes Death But Does Not Prevent Nerve Growth Factor-Induced Neurite Out Growth in PC12 Cells. *Neurochemistry International*; 31 (4), 517-523.

Chang, J.Y.; Liu, L.Z. (1998). Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. International*, 32, 317-323.

Chang, J.Y.; Chavis, J.A.; Liu, L.Z.; Drew, P.D. (1998). Cholesterol Oxides Induce Programmed Cell Death in Microglial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249, 817–821.

Chang, J.Y.; Phelan, K.D.; Liu, L.Z. (1997). Establishment of Two Morphologically Distinct PC12 Cell Lines Resistant to 25-OH-Cholesterol. *Toxicity Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239, 429–434.

Chang, J.Y.; Phelan, K.D.; Chavis, J.A. (1998). Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on sympathetic neurons. *Brain Research Bulletin*, 45 (6), 615–622.

Chen, Y.C.; Chien, J.T.; Inbaraj, B.S.; Chen B.H. (2012). Formation and inhibition of cholesterol oxidation products during marinating of pig feet. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60 (1), 173-179.

CODEX. (1983). Norma general para los alimentos irradiados, CODEX STAN, 106-1983, Rev. 1-2003.

CODEX (2007). *Código de Prácticas de Higiene para la Carne*, FAO.

Colpo, A. (2005). Colesterol LDL: ¿Colesterol Malo o Mala Ciencia?, *Journal of American Physicians and Surgeons*, 10 (3): 83-89.

Conchillo, A.; Ansorena, D.; Astiasaran, I. (2005). Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *Journal of Food Science and Agriculture*, 84, 141–146.

Copesi, F.S.; Unin, P.Z.; Azzella, M.M.; Testa, M.; Bog G., R.; Vangelisti, F.E; Erra G.S. (2002), 7-Cetocholesterol in human and adapted milk formulas. *Clinical Nutrition*, 21, (5), 379–384.

Daneshfar, A.; Khezeli, T.; Lotfi, H.J. (2009). Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC–UV. *Journal of Chromatography B*, 877, 456–460.

Deckert, V.; Desrumaux, C.; Athias, A.; Duverneuil, L.; Palleau, V.; Gambert, P.; Masson, D.; Lagrost, L. (2002). Prevention of LDL a-tocopherol consumption cholesterol oxidation and vascular endothelium dysfunction by polyphenolic compounds from red wine. *Atherosclerosis*, 165, 41-50.

Derewiaka D.; Obiedziński M., (2010). Cholesterol oxides content in selected animal products determined by GC-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112 (10), 1130-1137.

Diehl, J.F.; Dekker, M. (1995). *Safety of irradiated foods* NY:. Inc; 2nd ed.

Dionex Corporation (2000). Extraction of fat from dairy products (cheese, butter and liquid milks) using accelerated solvent extraction (ASE®). *Dionex Application Note*, no. 345.

Dionex Corporation (2000). Rapid determination of fat in meat using accelerated solvent extraction (ASE®). *Dionex Application Note*, no. 334.

Dionisi F.; Golay, P.A.; Aeschlimann, J.M.; Fay, L. B., (1998). Determination of Cholesterol Oxidation Products in Milk Powders: Methods Comparison and Validation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2227-2233.

Dobarganes, C.; Marquez-Ruiz, G. (2003). Oxidize fat in foods. *Current Opinion Clinical Nutrition Metabolims*; 6, 157-162.

Drodoesky, M.; Jayaraman, K.M.; Forchielli, M.E.; Dorfman, R.I. (1965). Requirements of the cholesterol side-chain-cleaving enzyme system of rat-testing mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General subjects*, 104,(1), 229-236.

Du, M.; Ahn, D.U. (2000). Effects of Antioxidants and Packaging on Lipid and Cholesterol Oxidation and Color Changes of Irradiated Egg Yolk Powder. *Journal of Food Science*; 65, (4), 425-429.

Dutta, P.C.; Caboni, M.F.; Diczfalusy, U.; Dionisi, F.; Dzeletovic, S.; Grandgirard, A.; Guardiola, F.; Kumpulainen, J.; Lebovics, V.K.; Pihlava, J.M.; Rodriguez-Estrada, M.T.; Ulberth, F. (1999). Measurements of cholesterol oxides in foods: results of an interlaboratory comparison study, in: *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition Health and Disease*, Royal Society of Chemistry, Cambridge. 309–315.

European Union Directives (1999). *Official Journal of the European Communities*, 13.3, L66/24.

FAO/OIEA/OMS and Comission of Codex Alimentarius (1978). <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/AC328S/AC328S07.htm> 29 June 2011, date last accessed.

FAO/OIEA/OMS. (1981). *Informe de un Comité Mixto de expertos*, Organización Mundial de la Salud, Ginebra.

Fillion, L.; Zee, J.A. (1991). Determination of a Cholesterol Oxide Mixture by Single-Run High-Performance Liquid Chromatographic Analysis Using Benzoylation. *Journal of Chromatography A*, 547, 105-112.

Finocchiaro, E.T.; Richardson, T. (1983). Sterol oxides in food-stuffs: a review. *Journal of Food Protection*, 46, 917-925.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Gao, X.; Raghavamenon, A.C.; D'Auvergne, O.; Uppu R.M. (2009) Cholesterol Secoaldehyde Induces Apoptosis in J774 Macrophages via Mitochondrial Pathway but not Involving Reactive Oxygen Species as Mediators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389 (2) 382-387.

García Regueiro., J.A.; Marachiello, C. (1997). Procedure for the Determination of Eighth Colesterol Oxides in Poultry Meat Using On-column and Solvente Venting Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 764, 279-293

Geni R. S., Bastos D. H.M., Soares R.A.M., Queiroz Y.S., Torres E.A.F.S (2006). Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chemistry*, 95, 467- 351-

Gheli, A.; Porcelli, A.M.; Zanna, C.; Rugolo, M. (2002). 7-cetocholesterol and Staurosporine Induce Opposite Changes in Intracellular pH Associated with Distinct Types of Cell Death in ECV304 Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 402, 208-217.

Gil, M.D.; Bañón, S.; Laencina J.; Garrido, M.D. (2004). Oxidación del Colesterol en Carne y Derivados: Factores que Determinan su Formación. *Anatomía. Veterinaria*, 20, 21-34.

Gil-Díaz, M., Santos-Delgado, M. J., Rubio-Barroso, S., & Polo-Díez, L. M. (2009). Free DAmino acids determination in ready-to-eat cooked ham irradiated with electron beam by indirect chiral HPLC. *Meat Science*, 82, 24–29.

Girao, H.; Mota, M.C. Ramalho, J.M.; Pereira P. (1998). Cholesterol Oxides Accumulate in Human Cataracts. *Expression Eye Resources*, 66, 645-652.

Guardiola F., Codony R., Rafecas M., Boatella J. (1995). Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray dried egg. *Journal of Chromatography A*, 705, 289-309.

Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, R.; Boatella, J. (1996). Biological effects of oxysterols: Current status. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 193-211.

Guardiola F.; Jordan, A.; Grau, A.; Garcia S.; Boatella J.; Rafecas M.; Codony, R. (1998). Recent methodological advances in oxysterol determination, in: S.G. Pandalai (Ed.), *Recent Research Developments in Oil Chemistry*, Transworld Research Network, Trivandru. 77–88.

Guardiola, F.; Bou, R.; Boatella, J.; Codony, R. (2004). Analysis of sterol oxidation products in foods, *Journal American Oil Chemical Society International*, 87, 441–466.

Guardiola, F.; Tres, A.; Codony, R.; Addis, PB; Bergmann, SD; Zavoral, JH. (2007). Lack of effect of oral supplementation with antioxidants on cholesterol oxidation product concentration of human plasma, as revealed by an improved gas chromatography method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 277-289.

Guillen-Casla, V. et al., (2011). Principal component analysis (PCA) and multiple linear regression (MLR) statistical tools to evaluate the effect of E-beam irradiation on ready-to-eat food, *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 456–464.

Guillen-Casla, V., (2012). *Nuevas Metodologías Cromatográficas para el Análisis de Compuestos de Interés Medioambiental y Agroalimentario: Desarrollos en*

Cromatografía Líquida Capilar, Quiral y Bidimensional. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica.

Haigh, W.G.; Wong, T.; Lee S.P. (2006). The production of oxysterols in bile by activated human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343, 467–469.

Hall, M. C. (2006). The effect of oxysterols, individually and as a representative mixture from food, on in vitro cultured bovine ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 292, 1–11.

Hammad, A.I; El-Mongy, T.M. (1992). Shelf-life extension and improvement of the microbiological quality of smoked salmon by irradiation, *Journal of Food Processing and Preservation*, 16 (5), 361–370.

Hara A.; Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90, 420-426.

Herzallah, S.M. (2005). Influence of Microwaving and Conventional Heating of Milk on Cholesterol Contents and Cholesterol Oxides Formation. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4, (2), 85-88.

Hennig B.; Boissonneault, G.A.; (1987) Cholestan- 3b 5a 6b-triol decrease barrier function of cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis*, 68, 255-261.

Hiesberg, J., & Luf, W. (2000). Oxidation of cholesterol in butter during storage effects of light and temperature. *European Food Research and Technology*, 211, 161–164.

Hoz, L.; Cambero, M.J., Cabeza, M.C., Herrero, A.M., Ordóñez, J.A. (2008). Elimination of *Listeria monocytogenes* from Vacuum-Packed Dry-Cured Ham by E-Beam Radiation. *Journal of Food Protection*, 71, (10), 2001-2006.

<http://www.zonadiet.com/salud/colesterol-reduccion.htm>

<http://www.botanical-online.com/medicinalcolesterol.htm>

Huber, K.C.; Pike, O.A.; Huber, C.S. (1995). Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in a spray-dried food system during accelerated storage. *Journal of Food Science*, 60, 909-916.

Hur, S.J.; Park, G.B.; Joo, S.T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control*, 18, 939–947.

- Hwang, K.T.; Maerker, G. (1993). Quantitation of Cholesterol Oxidation Products in Unirradiated and Irradiated Meats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, (4), 371-375.
- Hygely, N.A.; Taylor, S.L.; Herian, A.M.; Lee, K. (1986). Cholesterol Oxides in Processed Meats. *Meat Science*, 16, 175-188.
- Johnson, C.B. (1996). Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 736, 205-210.
- Johnsson, L.; Dutta, P.C. (2006). Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. *Food Chemistry*, 97, 606-613.
- Kim, J.H.; Jang, S.J.; Kwon, Y.J. (2000). Formation of Cholesterol Oxides in Saury (*Cololabis seira* Konchi) During Pan Frying Deep Fat Frying and Microwave Cooking. *Food Science and Biotechnology*, 9 (1), 48-51.
- Kristensen, D.; Hansen, E.; Arandal, A.; Trinderup, R.A.; Skibsted, L.H. (2001). Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *International Dairy Journal*, 11, 837-843.
- Kwon, J. H., Kwon, Y., Namb, K. C., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2008). Effect of electron-beam irradiation before and after cooking on the chemical properties of beef, pork, and chicken. *Meat Science*, 80, 903-909.
- Lai, S.M.; Gray I.; Zabik, M.E. (1995). Evaluation of Extraction and Gas Chromatography for Determination of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried Whole Egg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry American Chemical Society*, 43, 1122-1126.
- Lai, S.M.; Gray I.; Buckley D. J.; Kelly P. M. (1995). Influence of Free Radicals and Other Factors on Formation of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried Whole Egg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry American Chemical Society*, 43 (5) 1127-1131.
- Lakritz, L.; Jones, K.C. (1997). Separation and Quantitation of Cholesterol Oxides by HPLC with and Evaporative Light Scattering Detector in a Model System. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, (8), 943-946.

- Leonarduzzi, G.; Sottero, B.; Poli, G. (2002). Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review), *Journal of Nutrition Biochemistry*, 13, 700–710.
- Lercker, G., & Rodriguez-Estrada, M. T. (2000). Cholesterol oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in different food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 625–631.
- Li, S.; Cherian, G.; Ahn, D.; Hardin, R.; Sim, J. (1996). Storage heating and tocopherols effect on cholesterol oxide formation in food oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3830-3834.
- Liao, P.L.; Cheng, Y.W.; Li, C.H.; Lo Y.L.; Kang, J.J. (2009). Cholesterol-3-beta 5-alpha 6-beta-triol induced PI3K-Akt-eNOS-dependent cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells. *Toxicology Letters*, 190, 172–178.
- Liu, H.; Wang, T.; Huang, K. (2009). Cholestane-3_5_6_-triol-induced reactive oxygen species production promotes mitochondrial dysfunction in isolated mice liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*, 179, 81–87.
- Lozada-Castro, J.J.; Gil-Díaz M.; Santos-Delgado M.J.; Rubio-Barroso S.; Polo-Díez L.M. (2011). Effect of electron-beam irradiation on cholesterol oxide formation in different ready-to-eat foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 519-525.
- Lu, B.; Zhang, Y; Wu, X.; Shi, J. (2007). Separation and Determination of Diversiform Phytosterols in Food Materials using Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Ultraperformance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 588, 50-63.
- Lyons M. A.; Brown A.J. (1999), 7-Ketocholesterol. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 31 (3–4) 369–375.
- Maerker, G. (1987). Cholesterol autoxidation-Current status. *Journal American Oil Chemical Society*, 64, 388-392.
- Malcolm, A.L., Andrew J.B. (1999). Molecules in focus 7-Ketocholesterol, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31, 369-375.
- Matsunaga, I.; Hakamata, H.; Sadohara, K.; Kakiuchi, K.; Kusu, F. (2009). Determination of oxysterols in oxidatively modified low-density lipoprotein by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochemistry*, 393, 222–228.

- Mazalli, M.R., Sawaya, A.C.H.F; Eberlin, M.N.; Bragagnolo, N. (2006). HPLC Method for Quantification and Characterization of Colesterol and its Oxidation Products in Eggs. *Lipids*, 41 (6), 615-622.
- Menéndez-Carreño, M.; García-Herreros, C.; Astiarán, I.; Ansorena D. (2008). Validation of a Gas Chromatography-Mass Method for the Analysis Sterol Oxidation Products in Serum. *Journal of Chromatography B*, 864, 61-68.
- Miller, J.N.; Miller, J.C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Pearson Education, S.A. Madrid.
- Miyuki, A.; Hiroko, T.; Katsumi I. (2002). Dietary cholesterol-oxidation products accumulate in serum and liver in apolipoprotein E-deficient mice but do not accelerate atherosclerosis. *British Journal of Nutrition*, 88, 339–345.
- Morales-Aizpur, I.C.; Tenuta-Filho, A. (2005). Oxidation of cholesterol in mayonnaise during storage. *Food Chemistry*, 89, 611–615.
- Morgan J.N.; Armstrong D.J. (1989), Wide-bore capillary gas chromatography method for quantification of cholesterol oxidation products in egg Yolk powder. *Journal of Food Science*, 54, 427-429.
- Morrissey, P.A.; Kiely, M. (2006). *Advanced Dairy Chemistry; Volume 2: Lipids*, 3rd edition, Edited by P.F. Fox and P.L.H. McSweeney Springer, New York.
- Nam, K.C.; Du, M.; Jo, C.; Ahn, D.U. (2001). Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. *Meat Science*, 58, 431–435.
- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2003). Effects of ascorbic acid and antioxidants on the color of irradiated ground beef. *Journal of Food Science*, 68, 1686–1690.
- Nanke, K. E., Sebranek, J. G., & Olson, D. G. (1998). Color characteristics of irradiated vacuum-packed pork, beef, and turkey. *Journal of Food Science*, 63, 1001–1006.
- Narvaiz, P., Irradiación de Alimentos; 05/12/00, <http://www.nutrinfo.com.ar>
- Nielsen, J.H.; Olsen, C.E.; Duedahl, C.; Skibsted, L.H. (1995). Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry, *Journal Dairy Research*, 62, 101–113.

Nielsen, J.H.; Olsen, C.E.; Skibsted, L.H. (1996). Cholesterol oxidation in a heterogeneous system initiated Food Chem, 56, 33-37.

Nourooz-Zadeh, J.; Appelqvist, L.A. (1987). Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: fresh eggs and dehydrated egg products, Journal of Food Science, 52, 57–62.

Novelli, E.; Zanardi, E.; Ghiretti, G.P.; Campanini, G.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Chizzolini, R. (1998). Lipid and Cholesterol Oxidation in Frozen Stored Pork Salame Milano and Mortadella. Meat Science, 48 (1-2), 29-40.

Obara, A.; Obiedziński, M. , Kołczak, T. (2006). The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray- and freeze-dried egg powders. Food Chemistry, 95, 173–179.

Ohshima, T.; Shozen, K.i.; Ushio, H.; Koizumi, C. (1996). Effects of Grilling on Formation of Cholesterol Oxides in Seafood Products Rich in Polyunsaturated Fatty Acids. Lebensmittel Wissenschaft & Technologie, 29, 94–99.

Osada, K.; Takahashi M.; Hoshina, S.; Nakamura, M.; Nakamura, S.; Sugano, M. (2001). Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro Comparative. Biochemistry and Physiology, 128, 153-164.

Otto, M., Chemometrics (2007). Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. Wiley-VCH. Weinheim.

Palladini, G.; Finardi, G.; Bellomo, G. (1996). Disruption of Actin Microfilament Organization by Cholesterol Oxides in 73/73 Endothelial Cells. Experimental Cell Research, 223, 72–82.

Paniangvait, P.; King, A. J.; Jones, A. D.; German, B. G. (1995). Cholesterol oxides in foods of animal origin. Journal of Food Science, 60, 1159–1174.

Park, S.W.; Addis, P.B. (1986). Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34, 653-659.

Park, P.S.W.; Addis, P.B. (1989). Derivatization of 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β -triol into trimethylsilyl ether sterol for GC analysis, Journal of the American Oil Chemists' Society, 66, 1632–1634.

Park, P.W.; Guardiola, F.; Park, S.H.; Addis, P.B. (1996). Kinetic evaluation of 3-hydroxycholesterol stability during saponification, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 623–629.

Parlamento Europeo. (1999). Directiva de 1999/2/CE y 1999/3/CE del y del Consejo de 22 de febrero de 1999 sobre la irradiación de alimentos.

Penzi, C.M.F.; Caboni, P.; Zunin, F.; Evangelisti, E.; Tiscornia, T.; Gallina, T.; Lercker, G. (1995). Routine High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Free 7-Cetocholesterol in Some Foods by Two Different Analytical Methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72 (12), 1523-1526.

Peng, S.K.; Taylor C.B. (1984). Cholesterol autoxidation health and arteriosclerosis. *World Review Nutrition Dietary*, 44, 117-154.

Peng, S.K.; Hu, B.; Morin, R.J. (1991). Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 5, 144-152.

Petrón, M.J.; García-Regueiro, J. A.; Martín, L.; Muriel, E; Antequera, T. (2003) Identification and Quantification of Cholesterol and Cholesterol Oxidation Products in Different Types of Iberian Hams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5786-5791.

Phelan, K.D.; Mahler, H.R. (1997). Acute Exposure to 25-Hydroxy-cholesterol Selectively Reduces Gabab and Not Gabaa Receptor-Mediated Synaptic Inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237, 68–73.

Poli, G., Sottero, B., Gargiulo, S., & Leonarduzzi, G. (2009). Cholesterol oxidation products in the vascular remodelling due to atherosclerosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 180–189.

Raith, K., Brenner, C., Farwanah, H., Muller, G., Eder, K., Neubert, R.H.H. (2005). A new LC/APCI-MS method for the determination of cholesterol oxidation products in food. *Journal of Chromatography A*, 1067, 207–211.

Razzazi-Fazeli, E.; Kleineisen, S.; Luf, W. (2000). Determination of cholesterol oxides in processed food using high performance liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Chromatography A*, 896, 321–334.

Raghavamenona; A.C.; Gernapudi, R.; Babu, S.; D’Auvergne, O.; Murthy, S.N., Kadowitz, P.J., Uppu, R.M. (2009). Intracellular oxidative stress and cytotoxicity in

rat primary cortical neurons exposed to cholesterol secoaldehyde. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386, 170–174.

Real Decreto 348/2001, España, del 4 de abril de 2001. Comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.

Rodriguez-Estrada, M. T., Penazzi, G., Caboni, M. F., Bertacco, G., & Lercker, G. (1997). Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of beef hamburger. *Meat Science*, 45, 365–375.

Rodriguez-Estrada, M.T.; Costa, A.; Pelillo, M.; Caboni, M.F.; Lercker, G. (2004) Comparison of cholesterol oxidation product preparation methods for subsequent gas chromatographic analysis, *Journal of the American Oil Chemists' Society International*, 87, 474–480.

Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Pérez-Arribas, L. V., & Polo-Díez, L. M. (2008). Determination of heterocyclic aromatic amines by capillary highperformance liquid chromatography with diode array detection in ready-to-eat cooked ham treated with electron-beam irradiation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(4), 1433–1442.

Rossi, L.; Watson, D.; Escandarani, S.; Miranda, A.; Troncoso A. (2009). La radiación a la mesa. *Revista chilena de infectología*, 26 (4) 318-330.

Saldanha, T.; Benassi, M.T.; Bragagnolo, N. (2008). Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as a result of frozen storage followed by grilling. *LWT Food Science and Technology*, 41, 1301–1309.

Saldanha, T.; Bragagnolo, N. (2008). Relation between types of packaging frozen storage and grilling on cholesterol and fatty acids oxidation in Atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). *Food Chemistry*, 106, 619–627.

Saldanha, T.; Frankland Sawaya, A. C. H.; Nogueira Eberlin, M.; Bragagnolo, N. (2006). HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI UV and APCI-MS Detectors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4107-4113.

Saqer, M.H. (2005). Influence of Microwaving and Conventional Heating of Milk on Cholesterol Contents and Cholesterol Oxides Formation. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4 (2), 85-88.

Sathishkumar, K.; Gao X.; Raghavamenon, A.C.; Parinandi, N.; Pryor, W.A.; Uppu, R.M. (2009). Cholesterol secoaldehyde induces apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts through reactive oxygen species involving mitochondrial and death receptor pathways. *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 548–558.

Shan, H.; Pang, J.; Li, S.; Chiang, T.B.; Wilson, W.K.; Schroepfer G.J. (2003) Chromatographic behavior of oxygenated derivatives of cholesterol. *Steroids*, 68, 221–233.

Shozen, K.; Oshima, T.; Ushio, H.; Takiguchi, A.; Koizumi, C. (1997). Effects of antioxidants and packing on cholesterol oxidation in processed anchovy during storage. *Food. Science Technology Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 30, 2-8.

Smith, L. L. (1981). Cholesterol autoxidation. New York/London: Plenum Press

Soupas, L.; Huikko, L.; Lampi, A.M., Piironen, V. (2007). Pan-frying may induce phytosterol oxidation. *Food Chemistry*, 101, 286–297.

Spiegel., M.R.; Schiller, J.; Srinivasan, R. A. (2007). «9. Análisis de la varianza». *Probabilidad y Estadística [Schaum's Outline of Theory and Problems of Probability and Statistics]*. Schaum (2ª edición). México D.F.: McGraw-Hill. pp. 335-371. ISBN 978-970-10-4231-1.

Spiric, A.; Trbovic, D.; Vranic, D.; Djinovic, J.; Petronijevic, R.; Matekalo-Sverak, V. (2010), Statistical evaluation of fatty acid profile and cholesterol content in fish (common carp) lipids obtained by different sample preparation procedures. *Analytica Chimica Acta*, 672, 66–71.

Tavori, H.; Aviram, M.; Khatib, S.; Musa, R.; Nitecki, S.; Hoffman, A.; Vaya, J. (2009). Human carotid atherosclerotic plaque increases oxidative state of macrophages and low-density lipoproteins whereas paraoxonase 1 (PON1) decreases such atherogenic effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 607–615.

Terry Finocchiaro, E.; Lee, K.; Richardson, T. (1984). Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, 61, 877-883.

Thakur, B.R.; Singh, R.K. (1994). Food irradiation. Chemistry and applications. *Food Review International*, 10, 437–473.

Toshiaki, O.; Kei-ichi, S. Heideki, U.; Chiaki, K. (1996). Effects of Grilling on Formation of Cholesterol Oxides in Seafood Products Rich in Polyunsaturated Fatty Acids. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*, 29, 94–99.

Tsuzukia, D.; Sumino, K.; Yokoyama M. (2000). Analysis of 7-ketocholesterol in low densitylipoprotein and fatty acid composition in erythrocytemembranes of patients on maintenance hemodialysisand healthy controls. *Clinica Chimica Acta*, 295, 155–168.

Ubhayasekera, S.J.K.A.; Verleyen, T.; Dutta, P.C. (2004). Evaluation of GC and GC–MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chemistry*; 84, 149–157.

Ulberth, F.; Rossler, D. (1998). Comparison of solid-phase extraction methods for the cleanup of cholesterol oxidation products. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry*, 46, 2634-2637.

Valenzuela, A.; Nieto, S. (1996). Synthetic and natural antioxidants food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47, 186-196.

Valenzuela, A.; Sanhueza, J.; Nieto S. (2000). Rancidez oxidativa en la industria de nutrición animal: El uso racional de los antioxidantes. *Aceites y Grasas*, XII, 210-214.

Valenzuela, B. A.; Sanhuesa C. J.; Nieto K. S. (2002a). Óxidos de Colesterol (Oxisteroles): Factores que Condicionan su Formación Efectos Biológicos y Presencia en los Alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*, 29, 116-124.

Valenzuela, A.; Sanhueza, J.; Nieto, S. (2002b). Effect of synthetic antioxidants on cholesterol stability during the thermal-induced oxidation of a polyunsaturated vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79 (4), 325-328.

Valenzuela, A.; Sanhueza, J.; Nieto, S. (2004). Cholesterol oxidized products in foods: potential health hazards and the role of antioxidants in prevention. *Grasas y Aceites*, 55, (3), 312-320.

Vejux, A.; Guyot, S.; Montange, T.; Riedinger, J.M.; Kahn, E.; Lizard, G. (2009). Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-cetocholesterol-induced apoptosis. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 45–61.

Vesa, M.O; Hynynen, R. (2009). Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 123–133.

Vicente, S.J.V.; Torres, E.A.F.S. (2007). Formation of four cholesterol oxidation products and loss of free lipids cholesterol and water in beef hamburgers as a function of thermal processing. *Food Control*, 18, 63–68.

Woods, R.J.; Pikaev, A.K. (1994). Selected topics in radiation chemistry. *Applied radiation chemistry: Radiation processing*. NY: John Wiley and Sons Inc, 6, 165–210.

Yin, J.; Chaufour, X.; McLachlan C.; McGuire, M.; White, G.; King N.; Hambly B. (2000). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cholesterol and its oxides in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*, 148, 365–374.

Zanardi, E.; Battaglia, A.; Ghidini, S.; Conter, M.; Badiani, A.; Ianieri, A. (2009). Lipid oxidation of irradiated pork products. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1301–1307.

Zhang, W.B.; Addis, P.B.; Krick, T.P. (1991). Quantification of 5 α -cholestane-3 β 5 α 6 β -triol and other cholesterol oxidation products in fast food French fried potatoes. *Journal of Food Science*, 56, 716-718.

Zhu, M., Du, M., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 34–42.

Zubillaga, M.P, Maerker, G. (1991). Quantification of 3 Cholesterol Oxidation Products in Raw meat and Chiken. *Journal of Food Science*, 56, 1194-1196.

APÉNDICES

LISTADO DE TABLAS	pagina
1. Formación del colesterol a partir de Acetil CoA	14
2. Formación de oxisteroles en LDL modificadas por oxidación	19
3. Contenido de Colesterol en alimentos de consumo frecuente	35
4. Características de los COPs	42
5. Radiosensibilidad de diferentes bacterias en determinadas condiciones ambientales	60
6. Clasificación de tratamientos con radiaciones ionizantes	67
7. Métodos analíticos para determinar COPs en alimentos mediante HPLC	79
8. Métodos analíticos para determinar COPs en alimentos mediante GC	81
9. Matriz de ANOVA de un factor	84
10. Términos para calcular los resultados mediante ANOVA de un factor	85
11. Matriz de experiencias para un diseño 2^3	88
12. Matriz del modelo codificada para un diseño factorial 2^3	93
13. Tratamiento de limpieza de muestra mediante SPE	139
14. Contenido de agua en muestras de alimentos	148
15. Contenido de lípidos en muestras de alimentos.	148
16. Contenido de colesterol en alimentos	149
17. Calibrados de áreas mediante HPLC	151
18. Evaluación de la repetibilidad de los COPs mediante HPLC-UV	153
19. Evaluación de la reproducibilidad de los COPs mediante HPLC-UV	154
20. Evaluación de LOD y LOQ del método de determinación de COPs mediante HPLC-UV	155
21. Factores, dominio experimental y niveles del diseño factorial de screening 2^3	156

	página
22. Factores, dominio experimental y niveles del diseño factorial de superficie de respuesta 3^2	157
23. Respuestas del diseño factorial 3^2	158
24. Coeficientes de regresión y ecuación del modelo ajustado para COPs aplicando el diseño factorial 3^2	160
25. Precisión y exactitud del método de HPLC-UV para analizar COPs en alimentos	167
26. Contenido de COPs (ng/g) y su RSD (%) en alimentos RTE	168
27. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de carne picada	172
28. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de jamón cocido	174
29. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de jamón serrano	176
30. Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de queso blando	178
31. Matriz de correlación con los datos de irradiación de las muestras analizadas mediante HPLC	181
32. Contenido de agua en muestras de alimentos	186
33. Contenido de lípidos en muestras de carne picada	187
34. Contenido de lípidos en muestras de alimentos. Cantidad de muestra seleccionada para analizar COPs	188
35. Contenido de colesterol en muestras de alimentos	189
36. Factores, dominio experimental y niveles del diseño factorial de screening 2^{4-1}	190
37. Factores, dominio experimental y niveles del diseño factorial de superficie de respuesta 3^2	191
38. Respuestas del diseño experimental 3^2	191
39. Coeficientes de regresión y ecuación del modelo ajustado	196
40. Condiciones para la separación de los COPs mediante GC-FID	198

41.	Determinación de parámetros cromatográficos mediante GC-FID	200
42.	Ecuaciones de los calibrados con áreas	200
43.	Evaluación de la repetibilidad de los COPs mediante GC-FID	202
44.	Evaluación de la reproducibilidad de los COPs mediante GC-FID	203
45.	Medidas de los blancos para calcular la precisión del t_R , LOD y LOQ mediante GC-FID	204
46.	Parámetros estudiados en la optimización de muestra para la determinación de COPs mediante ASE y GC-FID	206
47.	Relación m/z e iones de fragmentos formados mediante GC-MS de los Tri-Sil COPs derivados	210
48.	Estabilidad de los Tri-Sil derivados	218
49.	Factores de respuesta (R_f) calculados a diferentes concentraciones	219
50.	Recuperaciones de COPs en muestras de alimentos	224
51.	Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de carne picada	226
52.	Influencia del procedimiento de extracción y de la irradiación en la formación de COPs en muestras de carne picada.	229
53.	Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de jamón cocido	231
54.	Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de jamón serrano	233
55.	Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de queso blando	236
56.	Influencia de la irradiación en la formación COPs en muestras de salmón ahumado	238
57.	Matriz de correlación con los datos de COPs obtenidos mediante GC-FID	241
58.	Estudio de la influencia de la irradiación de las muestras de alimentos mediante PCA	244
59.	Influencia de los parámetros característicos de las alimentos sobre la formación de COPs. Análisis mediante HPLC	257

60.	Matriz de correlaciones de las muestras cárnicas analizadas mediante HPLC-UV	258
61.	Matriz de correlación con los datos de las cuatro muestras analizadas mediante HPLC-UV	259
62.	Estudio de la influencia de los parámetros característicos de las muestras sobre la formación de COPs mediante PCA	262
63.	Contenido total de COPs y relación COP _{S7} /Colesterol en muestras de alimentos sin irradiar; análisis mediante GC-FID	264
64.	Matriz de correlación con los datos de las muestras cárnicas analizadas mediante GC-FID	265
65.	Matriz de correlaciones de las muestras cárnicas y muestras de queso analizadas mediante GC-FID	267
66.	Matriz de dispersión correspondiente a las cinco muestras analizadas mediante GC-FID	269
67.	Comparación de las metodogías propuestas para la determinación de COPs en muestras de alimentos	280
68.	Clean up de muestra mediante SPE	286
69.	Recuperación de COPs usando SPE en modo elución total	286
70.	Recuperación de COPs obtenida utilizando cartuchos de silica, en modo de elución colección de fracciones y GC-FID	290
71.	Recuperación de COPs obtenida utilizando cartuchos de aminopropil, en modo elución colección de fracciones y GC-FID	293
72.	Recuperación de COPs obtenida usando cartuchos C8 en modo elución colección de fracciones y GC-FID	296
73.	Recuperación de COPs obtenida usando cartuchos C ₁₈ en modo elución colección de fracciones y GC-FID	299
74.	Transformación de α y β -epoxido en triol	300
75.	Influencia del pH del tampón en la recuperación de COPs en estándares	303
76.	Parámetros característicos de las muestras de lomo fresco y adobado	305
77.	Recuperación de COPs en muestras enriquecidas, aplicando el método D ₁ modificado	306

78.	Influencia del pH del tampón en la recuperación de COPs	308
79.	Matriz de correlación con los datos de los parámetros característicos de las muestras de lomo y formación de los COPs; mediante GC-FID	312
80.	Estudio de la influencia de los parámetros característicos de las muestras de lomo sobre la formación de los COPs mediante PCA	313
81.	Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de lomo fresco	322
82.	Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de lomo adobado	324
83.	Matriz de correlación con los datos de las muestras de lomo sin irradiar e irradiadas mediante GC-FID	327
84.	Estudio de la influencia de la irradiación de las muestras de lomo mediante PCA	329
85.	Matriz de correlación obtenida con los datos del conjunto de las muestras sin irradiar e irradiadas mediante GC-FID	334
86.	Estudio de la influencia de la irradiación del conjunto de las muestras estudiadas sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy mediante PCA	336

LISTADO DE FIGURAS		pagina
1.	Estructura de la matriz lipídica de las membranas	11
2.	Estructura molecular del colesterol	13
3.	Formación del colesterol a partir de unidades isoprenoides	18
4.	Autooxidación del colesterol	21
5.	Formación de epóxidos y triol	22
6.	Principales rutas de oxidación del colesterol	23
7.	Rutas de formación de oxisteroles por irradiación	24
8.	Diferencia entre Colesterol bueno y colesterol malo	27
9.	Obstrucciones arteriales por acumulación de colesterol malo	28
10.	Mecanismo de regulación del Colesterol	32
11.	Estructura del colesterol y algunos de sus productos de oxidación	37
12.	Radiación gamma	50
13.	Dispositivo generador de electrones acelerados	51
14.	Etiqueta de alimento irradiado (Radura)	53
15.	Efectos de radiación ionizante	56
16.	Formación de radicales libres en la radiolisis del agua	56
17.	Dosis letal de irradiación para distintos organismos	58
18.	Parásito <i>Trichinella spiralis</i>	68
19.	Gráfico de medias de Fisher	86
20.	Representación gráfica de diseños de screening. a- 2^3 y b- 2^{3-1}	89
21.	Representación gráfica de diseños de superficie de respuesta. a- 3^2 y b- diseño de estrella.	90
22.	Gráfico de los efectos. a- Efectos principales y b- Efectos de interacción	95
23.	Gráfico de Pareto para efectos estandarizados	96

24.	Representación grafica de una superficie de respuesta	97
25.	Ejemplo de un gráfico de sedimentación	99
26.	Transformación de las variables originales a componentes principales	102
27.	Bigráfica obtenida mediante PCA	104
28.	Equipo HPLC para la determinación de COPs	115
29.	Equipo GC-TOF	117
30.	Sistema ASE	118
31.	Sistema para evaporar disolventes con flujo de argón a T controlada	119
32.	Sistema para evaporar pequeños volúmenes de disolventes a T controlada	119
33.	Sistema de vacío para la limpieza de muestras mediante SPE	120
34.	Vibrador mecánico para realizar el proceso de lixiviación	121
35.	Sistema para eliminar el exceso de Tri-Sil	122
36.	Diagrama de preparación de muestra para determinar COPs utilizando distintos métodos: A) ASE; B) lixiviación	136
37.	Diagrama de preparación de muestra para determinar COPs mediante el método de minimización de transformaciones	141
38.	Cromatogramas de COPs mediante HPLC-UV. [COPs], 25 mg/L. a λ , 205 nm; y. 238 nm	150
39.	Calibrados de áreas mediante HPLC-UV	151
40.	Gráficos de Pareto estandarizados para el diseño factorial 3^2	159
41.	Gráficos de superficie de respuesta estimada para el diseño factorial 3^2	159
42.	Cromatograma mediante HPLC-UV de carne picada sin irradiar a 205 nm y 238 nm	162
43.	Cromatogramas mediante HPLC-UV de jamón cocido sin irradiar enriquecida con 25 mg/L (1:1), a 205 nm y 238 nm	163
44.	Cromatogramas mediante HPLC-UV de jamón serrano sin irradiar, enriquecida con 25 mg/L (1:1), a 205 nm y 238 nm	164
45.	Cromatogramas mediante HPLC-UV de queso sin irradiar	

	enriquecida con 25 mg/L (1: 1) a 205 nm y 238 nm	165
46.	Comparación de cromatogramas de HPLC-UV. (-), patrones a 25 mg/L; (-), carne picada sin irradiar; (-), carne picada a 8 kGy, A) 238 nm y B) 205 nm	170
47.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en Muestras de carne picada. A. 25-OH y B. 7-ceto	173
48.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en Muestras de jamón cocido para el 7-ceto	175
49.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en Muestras de jamón serrano. A) 25-OH y B) 7-ceto	177
50.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en Muestras de queso blando A) 25-OH y B) 7-ceto	179
51.	Gráfica de dispersión de la matriz de correlación con los datos de irradiación de las muestras analizadas mediante HPLC	181
52.	Gráficos de efectos principales obtenidos a partir del diseño factorial 3^2 Respuestas: A) A_r y S/N para triol; B) A_r , S/N para 6-ceto; C) A_r , S/N para 7-ceto D) A_r , S/N para 25-OH; R_{1-2} , R_{2-3} y R_{3-4} pares críticos respectivos	193
53.	Graficas de superficies de respuestas de COPs obtenidas por medio del diseño experimental 3^2 : Respuestas: A), A_r y S/N, para triol B) A_r , S/N para 6-ceto; C) A_r , S/N para 7-ceto D) A_r , S/N para 25-OH; R_{1-2} , R_{2-3} y R_{3-4} pares críticos respectivos	195
54.	Curva de Van Deemter usando n-tetradecano (10 mg/L). $T_{columna}$ 125 °C; $T_{inyector}$, 175 °C ; $T_{detector}$, 250 °C	197
55.	Cromatograma mediante GC-FID de Tri-Sil derivados de COPs. COP, 50 mg/L; picos, 1) 9,10-DFA (IS); 2) 7 β -OH; 3) β -epóxido; 4) α -epóxido; 5) triol; 6) 6-ceto; 7) 7-ceto y 8) 25-OH	199
56.	Calibrados para los estándares, 7 β -OH; β -epóxido; α -epóxido y triol, usando como IS 9,10-DFA	200
57.	Calibrados para los estándares, 7-ceto y 25-OH y 6-ceto, usando como IS 9,10-DFA	200
58.	Muestra de jamón Serrano homogéneizada con tierras de diatomeas	207
59.	Recuperación de COPs mediante diferentes métodos de extracción; ASE; Lixiviación. Muestras de carne picada	208
60.	Espectros de masa del 7 β -OH Tri-Sil derivado. A) Muestra de carne	

	picada; B) Disolución patrón de 7 β -OH	211
61.	Espectro del β -epóxido Tri-Sil derivado. A) Muestra de carne picada, B) Disolución patrón de β -epóxido	212
62.	Espectro del α -epóxido Tri-Sil derivado. A) Muestra de carne picada; B) Disolución patrón de α -epóxido	213
63.	Espectro del 7-ceto Tri-Sil derivado. A) Muestra de carne picada; B) Espectro y estructura propuestos por la librería NIST	214
64.	Espectro del derivado del triol. A) Disolución patrón; B) Espectro y Estructura propuestos por la librería NIST	215
65.	Espectro del 6-ceto Tri-Sil derivado. A) Disolución patrón; B) Estructura propuesta por la librería NIST	216
66.	Espectro del 25-OH Tri-Sil derivado. A) Disolución patrón; B) Estructura propuesta por la librería NIST	217
67.	Cromatograma mediante GC-FID de los Tri-Sil derivados para carne picada sin irradiar. Picos, 1) 7- β OH; 2) β -epóxido; 3) α -epóxido y 4) 7-ceto	220
68.	Cromatograma mediante GC-FID de los Tri-Sil derivados para jamón cocido sin irradiar. Picos, 1) 7 β -OH, 2) β -epóxido, 3) α -epóxido y 4) 7-ceto	220
69.	Cromatograma mediante GC-FID de los Tri-Sil derivados para jamón serrano sin irradiar. Picos, 1) 7 β -OH, 2) β -epóxido, 3) α -epóxido y 4. SI (6-ceto) y 5) 7-ceto	221
70.	Cromatograma mediante GC-FID de los Tri-Sil derivados para queso blando sin irradiar. Picos, 1) 7 β -OH, 2) β -epóxido, 3) α -epóxido y 4) IS (6-ceto) y 5) 7-ceto	222
71.	Cromatograma mediante GC-FID de los Tri-Sil derivados para salmón ahumado sin irradiar. Picos, 1) 7 β -OH, 2) β -epóxido, 3) α -epóxido y 4) IS (6-ceto) y 5) 25-OH	223
72.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en Muestras de carne picada	227
73.	Gráfico de Dispersión para los COPs, 7-ceto/ β -epóxido	230
74.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en muestras de jamón cocido	232
75.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en muestras de jamón serrano	235

76.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en Muestras de queso blando	237
77.	Influencia de la irradiación E-beam en la formación de COPs en Muestras de salmón ahumado	239
78.	<u>Cromatogramas obtenidos con muestras de jamón Serrano no irradiada (—) e irradiada a 8 kGy (—)</u>	240
79.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las cinco muestras analizadas mediante GC-FID	242
80.	Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en muestras de jamón cocido	246
81.	Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en muestras de queso blando	247
82.	Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en muestras de jamón serrano	248
83.	Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en muestras de salmon ahumado	249
84.	Influencia de la irradiación sobre la formación de COPs en las muestras de alimentos estudiadas	251
85.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con las muestras cárnicas analizadas mediante HPLC-UV	259
86.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las cuatro muestras analizadas mediante HPLC-UV	260
87.	Bigráfica de la influencia de los parámetros característicos de las muestras en la formación de COPs. Análisis mediante HPLC	261
88.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las muestras cárnicas analizadas mediante GC-FID	266
89.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las muestras cárnicas y muestras de queso analizadas mediante GC-FID	268
90.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de todas las muestras estudiadas mediante GC-FID.	270
91.	Influencia de los parámetros característicos de las muestras cárnicas sobre la formación de COPs; análisis mediante GC-FID	271
92.	Influencia de los parámetros característicos de las muestras cárnicas	

	y de queso sobre la formación de COPs	272
93.	Influencia de los parámetros característicos de todas muestras estudiadas sobre la formación de COPs. Análisis mediante GC-FID	273
94.	Gráficos de elución de COPs utilizando cartuchos de Silica en modo colección de fracciones y GC-FID	291
95.	Reacciones de transformación de triol en 6-ceto (Aportado por el Dr. Henry Insuasty)	292
96.	Gráficos de elución de COPs utilizando cartuchos de Aminopropil en modo colección de fracciones y GC-FID	294
97.	Gráficos de elución de COPs utilizando cartuchos C ₈ en modo colección de fracciones y GC-FID	297
98.	Gráficos de elución de COPs utilizando cartuchos C ₁₈ en modo colección de fracciones y GC-FID	300
99.	Influencia del pH del tampón de la disolución de evaporación en la recuperación de COPs en estándares	304
100.	Influencia del pH en la recuperación de los COPs en muestras de salmón ahumado	308
101.	Cromatogramas de los Tri-Sil derivados en muestras enriquecidas. [COPs], 25 mg/L: A) jamón serrano, B) Lomo fresco de cerdo. Picos, 1) 7β-OH; 2) β-epóxido; 3) α-epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto; 6) 7-ceto; 7) 25-OH	310
102.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de los parámetros característicos de las muestras de lomo y formación de COPs; mediante GC-FID	313
103.	Influencia de los parámetros característicos de las muestras de lomo sobre la formación de los COPs. Análisis mediante GC-FID	314
104.	Cromatograma mediante GC-FID de una muestra de lomo fresco de cerdo enriquecida. [COPs], 10 mg/L. Picos, 1) 7β-OH; 2) β-epóxido; 3) α-epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto, 6) 7-ceto; 7) 25-OH	315
105.	Cromatogramas de COPs en muestras de lomo: 1) 7β-OH; 2) β-epóxido; 3) α-epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto, SI; 6) 7-ceto; 7) 25-OH. A) Muestra de lomo fresco enriquecida a 10 mg/L; B) Muestra de lomo fresco sin enriquecer	316
106.	Cromatograma de COPs en muestras de lomo fresco a 1.5 kGy; Picos, 1) 7β-OH ; 2) β-epóxido; 3) α-epóxido; 4) triol; 5) 6-ceto SI; 6) 7-ceto. A) sin, B) con adición de 6-ceto	317

107.	Cromatogramas de las muestras de lomo fresco: A) sin irradiar; B) irradiado a 2 kGy	319
108.	Cromatogramas de las muestras de lomo adobado: A) sin irradiar; B) irradiado a 2 kGy	320
109.	Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de lomo fresco	323
110.	Influencia de la irradiación en la formación de COPs en muestras de lomo adobado	325
111.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos de las muestras de lomo mediante GC-FID	328
112.	Influencia de la irradiación sobre la formación de los COPs en muestras de lomo fresco y lomo adobado (LF y LA)	330
113.	Gráfico de dispersión de la matriz de correlación con los datos del conjunto de las muestras sin irradiar e irradiadas a 1 y 2 kGy	335
114.	Bigráfica con dos PC. Influencia de la irradiación (0 a 2 kGy) sobre la formación de los COPs en muestras de alimentos	337

ANEXOS



Effect of electron-beam irradiation on cholesterol oxide formation in different ready-to-eat foods

J.J. Lozada-Castro^b, M. Gil-Díaz^a, M.J. Santos-Delgado^{a,*}, S. Rubio-Barroso^a, L.M. Polo-Díez^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University 28040 Madrid, Spain

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Nariño University, Pasto, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 October 2010
Accepted 6 July 2011

Editor Proof Receive Date 2 August 2011

Keywords:
Cholesterol oxidation products
E-beam irradiation
Ready-to-eat food
HPLC

ABSTRACT

A study of the formation of ¹cholesterol oxidation products (COPs) has been carried out in four ²ready-to-eat (RTE) foods (cooked ham, Spanish Serrano ham, minced beef, and soft cheese). The samples were previously treated with electron-beam irradiation between 1 and 8 kGy. Three COPs, 25-hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol and 6-ketocholestanol, were extracted together with the lipid fraction using chloroform. Then, COPs were isolated by sample clean up using ³solid phase extraction (SPE) and were analyzed by ⁴high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). Method validation was established by precision and recovery studies. Results showed that non-irradiated cheese and cooked ham samples did not contain COPs. In general, an increase in COP content was observed in all cases when the irradiation dose increased, although this increase was not linear. The 6-keto COP was not detected in any of the RTE food samples studied regardless of the irradiation dose.

Industrial relevance: Nowadays, changes in dietary habits have produced an important increase in consumption of prepared foods thus increasing microbiological contamination risks; consequently, it is necessary to apply easy methods, able to be implanted in industrial production lines, and which eliminate potential contaminants and enhance shelf life. The application of E-beam irradiation to vacuum packed ready-to-eat (RTE) food of animal origin could be a useful technique for sanitization purposes; besides, it is a clean, rapid and environmentally friendly treatment. During this treatment cholesterol oxide products (COPs) may be formed. They have received considerable attention in recent years because of their biological activity which has been associated with human diseases, such as the inhibition of cholesterol biosynthesis, atherosclerosis, changes in membrane properties, cytotoxicity, mutagenesis and carcinogenesis. Therefore, COP analysis in food samples of animal origin is of great interest.

In this work, an increase in the 25-OH and 7-keto COP content has been detected after E-beam irradiation with doses from 1 to 8 kGy, which is in the upper accepted limit in other foods, but final COP concentrations found in the foodstuffs studied here were at least one order of magnitude lower than those which produce toxic effects in vivo and in vitro experiments. Analysis was made by HPLC with UV detection; so, two COPs with absorption properties were used as targets.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, changes in dietary habits have produced a high increase in the consumption of prepared foods, especially in urban areas. This has led to the manufacture of a great variety of ready-to-eat (RTE) foods. Food handling operations such as cutting, slicing and packaging may result in its microbial contamination; consequently, it

is necessary to eliminate potential contaminants, thus enhancing their shelf life.

Several irradiation techniques, including γ -Rays, X-Rays and β -Rays or ⁵electron beam (E-beam), have been used. The latter has proved to be the most easily-applied irradiation technique in food processing, although it may produce transformations in food components. It is a non thermal physical process which is quite effective in preventing the growth of pathogenic microorganisms, such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* among others (Blank, Shamsuzzaman, & Sohal, 1992; Cabeza, Cambero, de la Hoz, & Ordóñez, 2007; Zhu, Du, Cordray, & Ahn, 2005).

* Corresponding author. Tel.: +34 913944323; fax: +34 913944329.
E-mail address: mjsantos@quim.ucm.es (M.J. Santos-Delgado).

¹ Cholesterol oxidation products (COPs).

² Ready-to-eat (RTE).

³ Solid phase extraction (SPE).

⁴ High performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV).

⁵ Electron-beam (E-beam).

The use of this technology for food preservation was approved in 1981 by a joint committee of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/International Atomic Energy Agency (IAEA)/World Health Organization (WHO) on the wholesomeness of irradiated food (FAO/OIEA/OMS, 1978). The 1999/2 and 1999/3 European Union Directives, 1999 L 66/24 authorized irradiation treatments for dried aromatic herbs, spices and vegetable seasonings at a maximum dose of 10 kGy. However, this technology is under-used mainly due to consumer reticence. In an effort to produce high quality products, the study of irradiation effects on food has been under way for some time. Studies have shown that irradiation can accelerate lipid oxidation (Ahn, Jo, & Olson, 2000), produce off-odour compounds (Brewer, 2009; Cabeza et al., 2007; Kwon, Kwon, Namb, Lee, & Ahn, 2008) and colour changes (Cabeza et al., 2007; Nam & Ahn, 2003; Nanke, Sebranek, & Olson, 1998). However, studies on the irradiation of vacuum-packed cooked ham, using a maximum dose of 8 kGy, concluded that radiation did not produce significant racemization of L-amino acids (Gil-Díaz, Santos-Delgado, Rubio-Barroso, & Polo-Díez, 2009) and nor were heterocyclic amines produced (Rosales-Conrado, León-González, Pérez-Arribas, & Polo-Díez, 2008).

On the other hand, E-beam irradiation generates ions and free radicals which may cause the oxidation of different compounds; unsaturated fatty acids are the most affected, producing lipid oxidation which gives rise to COPs. The susceptibility of cholesterol to oxidation is well known and more than seven oxidation products (Smith, 1981) have been described. Those most frequently observed in food are the following: 7-ketocholesterol, 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol, 5,6 α - and 5,6 β -epoxide, cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol.

Thus, COPs which are present in humans are derived both from diet and from endogenous enzymatic processes (Brown & Jessup, 1999). They have received considerable attention in recent years because of their biological activities associated with human diseases, such as the inhibition of cholesterol biosynthesis, atherosclerosis, changes in membrane properties, cytotoxicity, mutagenesis and carcinogenesis (Bösinger et al., 1993; Poli, Sottero, Gargiulo, & Leonarduzzi, 2009; Yin et al., 2000). Therefore, COP analysis in food samples of animal origin is of great interest.

COP content has been determined by using HPLC and ⁶gas chromatography (GC), although the latter technique requires derivatization. However, HPLC-UV is useful for those COPs which have enough sensitivity, in which cases HPLC could be an alternative to GC. Food sample preparation for COP quantification by chromatography is difficult; COPs are present at low levels ($\mu\text{g/L}$ to mg/L) and have a similar polarity to lipids; procedures are mainly based on total lipid extraction followed by COP enrichment, clean up by SPE, and chromatographic analysis (Ulberth & Rössler, 1998). In the case of fatty foods, such as butter, oil and lard, some methods based on solvent extraction followed by SPE clean up are described in the literature (Al-Saghir et al., 2004; Petró, García Regueiro, Martín, Muriel, & Antequera, 2003; Razzazi-Fazeli, Kleineisen, & Luf, 2000). Some COPs are susceptible to oxidation, loss and degradation during sample preparation, preconcentration being the most controversial step (Ulberth & Rössler, 1998). Other authors have carried out the saponification of the fat extract, although artefact formation was observed, in both hot and cold saponification (Angulo, Romera, Ramírez, & Gil, 1997). Studies showed that 7-keto is the most easily degraded COP in an alkaline medium (Lercker & Rodríguez-Estrada, 2000; Park, Guardiola, Park, & Addis, 1996). Furthermore, saponification processes are time-consuming since they may require overnight incubation.

The object of this study was to research the effect of E-beam irradiation on COP formation in several food samples of animal origin

(cooked ham, Spanish Serrano ham, minced beef and soft cheese). The optimization of a simple and gentle COP preparation method valid for 25-OH, 7-keto and 6-keto in RTE foods was carried out. Non-irradiated and irradiated food samples were analyzed and results were compared by ANOVA. Correlations between lipids and produced COPs were established.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and materials

A HPLC system equipped with the following components was used: a Jasco PU-1580 gradient pump (Tokyo, Japan) linked to a Jasco LG-1580-04 quaternary gradient unit provided with a degasser; a Rheodyne Model 7125 injection valve with a 20 μL loop (Cotati, CA, USA); a LDC Analytical SpectroMonitor 4100 UV detector and a personal computer equipped with ChromNec XP Integration Software (Madrid, Spain) which allows the acquisition and processing of chromatograms; a Tracer Excel 120 ODSA C-18, (150 \times 4.6 mm, 3 μm) column from Teknokroma (Barcelona, Spain) thermostated in a P-Selecta Presciterm bath (Barcelona, Spain) at 28 °C for COP separation; a Tracer Excel C-8 (100 \times 4.6 mm, 3 μm) column from Teknokroma for cholesterol determination.

A Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extractor (Idstein, Germany) for lipid extraction was used.

A P-Selecta Vibromatic shaker, a rotary evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland) and a vortex system from Selecta (Spain) were also used. A homemade evaporator for six simultaneous samples coupled to a Tembloc heating system or to a water bath heating system, both from Selecta (Spain), were used.

Sep-pak Vac (500 mg, 6 mL) silica cartridges for SPE clean up were purchased from Applied Separations (Allentown, PA, USA).

Nylon membrane filters with 0.45 μm pore size from Teknokroma and a Visiprep vacuum manifold system (Supelco, Bellefonte, PA, USA) were used for filtering solvents to prepare mobile phase. Nylon membrane filters (25 mm, 0.45 μm pore size) from Teknokroma were used for filtering sample extracts.

A porcelain mortar from Staatlich Berlin (Germany) for sample homogenization was used.

2.2. Chemical

Cholesterol (99% purity) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The COPs studied were ⁷25-hydroxycholesterol (25-OH) from Fluka (98% purity), ⁸7-ketocholesterol (7-keto) (90%) and ⁹6-ketocholestanol (6-keto) (97%) from Sigma-Aldrich.

Petroleum ether (Sigma-Aldrich) and diatomaceous earth (Hydromatrix, Varian, Surrey, UK) were used in the extraction process.

Anhydrous sodium sulphate (analytical grade) and the following solvents, hexane, diethyl ether, acetone, 2-propanol, methanol, acetonitrile and chloroform (HPLC-grade) were from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water was purified using a Millipore system (Bedford, MA, USA).

COP stock solutions at 500 mg/L were prepared in 2-propanol and they were stored in the dark at -18 °C. The final stock solution concentration was calculated taking into account the purity of the standards. Working standard solutions were prepared from stock solutions by suitable dilution using acetonitrile.

⁷ 25-hydroxycholesterol (25-OH).

⁸ 7-ketocholesterol (7-keto).

⁹ 6-ketocholestanol (6-keto).

⁶ Gas chromatography (GC).

2.3. Food samples

Food samples of cooked ham, Serrano ham, minced beef and soft cheese (Manchego-type), were purchased from a local supermarket. Serrano ham is a dry-cured Spanish ham from the whole pork leg.

The cooked ham, Serrano ham and cheese were sliced (2–3 mm thickness) using an electric machine and the resulting slices were vacuum packed in thermoplastic bags; in each bag, three slices were laid flat without touching each other; minced beef was prepared as hamburgers (1 cm thickness) and vacuum packed.

2.4. Procedures

2.4.1. Determination of food characteristic parameters

Fat and cholesterol were extracted by following protocols proposed by the ASE manufacturer as it is described in Application Notes from Dionex Corporation (2000a,b). Cholesterol was determined using the method described in the literature (Daneshfar, Khezeli, & Lotfi, 2009).

Water content was determined by heating at 130 °C to constant weight (AOAC (1998)).

2.4.2. Irradiation treatment

Vacuum-packed bag units containing the samples were transported in insulated polystyrene boxes to the irradiation plant (IONMED sterilization SA, Tarancón, Cuenca, Spain). The bags were placed independently inside the irradiation compartment and they were irradiated under an E-beam radiation source which operated at 10 MeV. The bags were rotated while receiving the radiation laterally. Absorbed radiation doses were 1, 2, 3, 6 and 8 kGy at about 90 kGy/min, the Min/Max ratio being close to one (the thickness of the slices was less than or close to 1 cm). The dose absorbed by each sample was evaluated by determining the absorbance of a cellulose triacetate dosimeter (ASTM, 2000), simultaneously irradiated with the samples; the temperature increase during the treatment was less than 2 °C. Afterwards, the samples were stored at –18 °C until analyzed.

2.4.3. COP extraction and clean up

The food samples (cooked ham, minced beef and cheese) were homogenized by crushing in a porcelain mortar. About 6 g of the homogenized sample was accurately weighed; then was transferred to a 100 mL screw cap tube and 70 mL of chloroform was added; in the case of Serrano ham, about 3 g of sample and 30 mL of chloroform were used. The tube was protected against light with aluminium film and then it was vigorously shaken using the vibromatic shaker at 780 rpm for 18 h at room temperature. The chloroform extract was passed through a cartridge containing 10 g of anhydrous sodium sulphate and it was collected in a round bottomed flask. Then, the flask was placed in the rotary evaporator and the extract was evaporated to dryness at 40 °C. The residue was dissolved in 6 mL of hexane. Then, the solution was passed through a silica cartridge which was pre-conditioned by passing through 5 mL of hexane. Afterwards, the cartridge was successively washed using the following solvents: 10 mL hexane-diethyl ether (95:5, v/v), 25 mL hexane-diethyl ether (90:10, v/v) and 15 mL hexane-diethyl ether (80:20, v/v) and it was dried by air vacuum. COPs were eluted with 10 mL of acetone (5 × 2 mL) which was collected in a 12 mL amber vial. The acetone extract obtained was evaporated by blowing an Argon flow to dryness.

2.4.4. COP determination by HPLC

Following the COP extraction process the residue obtained was dissolved in 250 µL of acetonitrile and then a 20 µL aliquot was injected in the HPLC system using a filter syringe.

COPs were separated using a C-18 column in isocratic mode. The mobile phase consisted of 90:10 (v/v) acetonitrile–water using a

Table 1
Fat, cholesterol and water contents of the RTE food studied.

Food	Fat content, %		Cholesterol, mg/100 g		Water content, %	
	x ^a	RSD ^b	x	RSD	x	RSD
Cooked ham	2.9	0.3	17.5	4.1	73.1	0.6
Serrano ham	20.1	0.4	30.9	1.3	38.7	3.9
Minced beef	25.8	3.1	45.5	2.4	31.8	2.0
Cheese	31.9	1.9	50.3	0.5	45.2	1.4

^a Mean values.

^b Relative standard deviation.

1 mL/min flow rate. UV detection was performed simultaneously at two wavelengths, 205 and 238 nm. Retention times and peak areas were used for identification and quantification purposes, respectively, using an external calibration method. Three replicates were carried out for each sample.

2.4.5. Statistical procedures

Differences in COP contents in irradiated and non-irradiated samples were evaluated by two-way ANOVA at a significance level of $p < 0.05$, using the Statgraphics Plus 5.0 (Manugistics, Maryland, USA) program. The method used to discriminate among the means was Bonferroni's multiple comparison procedure.

3. Results and discussion

3.1. Determination of food characteristic parameters: fat, cholesterol and water contents

Since COP formation must be related with fat and cholesterol contents these parameters were determined in the analysis of the sample (Table 1). All the parameters were measured in triplicate and in all cases reproducible results were obtained. A positive correlation between fat content and cholesterol was observed; the lowest contents of total fat and cholesterol were obtained for cooked ham (2.9 and 17.5%, respectively) which also presented the highest water content (73.1%). The highest total fat and cholesterol contents were detected in cheese samples (31.9 and 50.3%, respectively). The relative standard deviation was from 0.3 to 3.1% for fat content and from 0.5 to 4.1% for cholesterol.

3.2. Analytical characteristics from standard

Linear regression was applied to obtain COP external calibration plots for each standard. The linearity was proven using eight calibration points in the 0.4–100 mg/L concentration range for 7-keto, seven points in the range 1–100 mg/L for 25-OH and six points between 5 and 100 mg/L for 6-keto. Regression coefficients were in all cases around 0.9999. Detection limits, defined as three times the signal-to-noise ratio ($DL = 3 S/N$) were in the range 0.5–3.4 ng, 6-keto having the lowest sensitivity. Quantitation limits ($QL = 10 S/N$) were lower than 11.3 ng. The RSD being lower than 1.9 for 5.0 mg/L concentration level ($n = 3$). COP standard solutions were significantly stable (ANOVA, $p < 0.05$) for at least 40 days at –18 °C.

3.3. Food sample preparation

Chromatographic COP analysis in food entails several difficulties due to the need to isolate very low concentrations from large amounts of fat and cholesterol fractions. In addition, COPs may be oxidated and degraded during extraction (Angulo et al., 1997; Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000; Park et al., 1996); so, preliminary studies were done to minimize COP loss during extraction and clean-up steps which

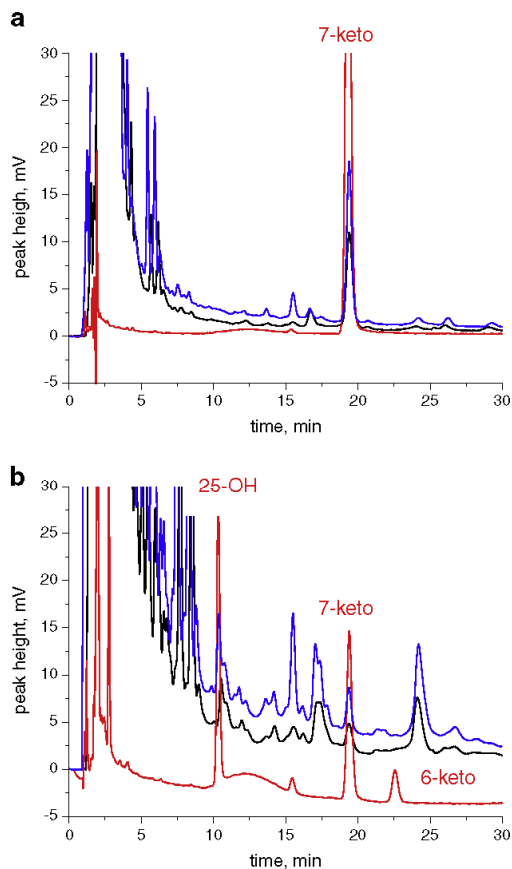


Fig. 1. COP chromatograms obtained by HPLC-UV using C_{18} column and acetonitrile/water, 90/10 at 1.0 mL/min flow rate, a—205 nm (1, 25-OH; 2, 7-keto and 3, 6-keto and b—238 nm (2, 7-keto). — Standard solution, — non irradiated minced beef sample and — irradiated minced beef sample at 8 kGy.

eliminate interfering non polar lipids and cholesterol, thus facilitating COP determination. Optimization of the COP extraction method was carried out using a cooked ham sample; after homogenization of the sample, the cooked ham was spiked with a COP standard mixture solution and after a contact time of 30 min, COP extraction was carried out. Different extraction methods were tested. Direct saponification according to the protocol described by Dionisi, Golay, Aeschlimann, and Fay (1998) gave rise to emulsions which were difficult to handle. Sample preparation procedures described by Hiesberg and Luf (2000), Petrón et al. (2003), Al-Saghir et al. (2004), Folch, Lees, and Sloane Stanley (1957) and Razzazi-Fazeli et al. (2000) were tested; the best results were obtained by the latter which uses chloroform in the leaching step followed by a clean-up step by SPE using silica cartridges. Since leaching was apparently the most critical step, different agitation techniques were tested, including mechanical and ultrasonic; the latter was chosen since it gave the highest recoveries. The leaching method was further refined by applying a 3^2 experimental design (three levels and two factors). The factors were extraction time and solvent volume and the levels were 6, 12, 18 h and 40, 70, 100 mL, respectively. Long extraction times gave rise to better recoveries; however, no significant differences were found

between 70 and 100 mL. So, a 70 mL chloroform extraction volume and 18 h for shaking time (overnight) were chosen as optimum conditions.

COPs were determined by applying the method specified in Materials and methods to one sample of each type. Chromatograms obtained at two wavelengths from COPs in minced beef samples are showed in Fig. 1.

3.4. COP determination

COP content (6-keto, 7-keto and 25-OH) in different RTE samples of animal origin (cooked ham, Serrano ham, minced beef and soft cheese) was determined using the conditions specified in Materials and methods for both COP sample preparation and COP determination by HPLC. The 6-keto COP was not detected in any of the samples studied. 7-keto (193.2 ng/g) and 25-OH (139.2 ng/g) were found only in minced beef. Their concentrations were comparatively higher than in other food samples; this is probably due to the high contact surface of minced beef which can facilitate oxidation reactions. Other studies showed the presence of a significant amount of 7-keto in raw meat (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000; Rodriguez-Estrada, Penazzi, Caboni, Bertacco, & Lercker, 1997); although 7-keto (110.1 ng/g) was also found in Serrano ham samples, its concentration was lower. Petrón et al. (2003) found 7-keto to be the major COP in Iberian hams, and to be present at higher concentrations (570–710 ng/g) than those found in our study.

It was observed that cholesterol increased with increasing lipid content. In beef samples COP content increased along with fat content.

3.5. Validation of COP HPLC-UV method

Recoveries and other validation criteria were used to evaluate the HPLC method for COP determination. Results are summarized in Table 2.

Samples were fortified with a COP mixture solution at three different concentration levels to obtain intra-day precision; four replicates were employed. The inter-day variation was evaluated over five consecutive working days after fortifying at 2.0 $\mu\text{g/g}$. Mean recoveries were between 56 and 94% at 0.2 $\mu\text{g/g}$. At spiked levels of 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/g}$, recoveries were higher than 62 and 68%, respectively; in general, intra-day and inter-day precisions showed lower RSD values than 10%, except for cooked ham samples which were in the range 6.7–13.1%. Serrano ham presented intra-day RSD values higher than 10% at the lowest concentration level. Although the proposed COP extraction method is time-consuming, compared with other methods previously described it is simple and gentle and minimizes artefact formation.

Table 2
Analytical precision and accuracy of COP determination in spiked food samples.

RTE food	COP	Recovery, %			RSD intra-day, % ^a			RSD inter-day, % ^b	
		0.2	1.0	2.0	0.2	1.0	2.0	0.2	2.0
Cooked ham	25-OH	73.2	74.1	85.3	11.1	11.2	7.2	9.0	
	7-KETO	85.8	77.1	84.7	12.7	12.1	10.2	10.3	
	6-KETO	81.0	80.1	81.9	13.7	13.1	6.7	9.2	
Serrano ham	25-OH	90.8	70.6	75.8	13.7	8.9	2.9	4.5	
	7-KETO	72.1	85.3	87.1	1.6	4.9	3.4	3.5	
	6-KETO	66.8	71.6	81.1	18.4	9.9	4.2	5.2	
Minced beef	25-OH	94.1	86.0	96.3	5.8	5.2	2.6	7.5	
	7-KETO	79.8	73.3	89.3	2.5	8.4	3.4	3.3	
	6-KETO	56.0	89.9	94.6	3.2	5.2	5.1	6.3	
Cheese	25-OH	90.8	68.9	85.0	9.2	7.3	3.7	5.2	
	7-KETO	92.7	86.4	83.1	2.3	5.0	3.8	4.9	
	6-KETO	83.4	62.3	68.3	9.5	7.6	3.0	3.1	

RSD, relative standard deviation. ^an=4; ^bn=5; concentration level, 0.2, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/g}$.

Table 3
COP content (ng/g) and RSD in RTE food.

Food	COP	Irradiation dose, kGy													
		0		1		2		3		4		6		8	
		x ^a	RSD ^b	x	RSD	x	RSD	x	RSD	x	RSD	x	RSD	x	RSD
Cooked ham	25-OH	nd ^c		nd		nd		nd		nd		nd		27.8	2.4
	7-KETO	nd		nd		2.9	9.7	3.3	4.1	4.1	2.5	9.1	1.3	13.3	4.8
Serrano ham	25-OH	nd		254.2	2.5	na		na		292.3	6.9	373.0	8.1	361.4	6.5
	7-KETO	110.1	3.6	320.6	7.2	na		na		296.8	3.7	501.7	2.1	467.2	2.9
Minced beef	25-OH	139.2	3.9	na ^d		177.9	12.8	232.3	6.8	224.2	2.5	193.3	1.0	342.8	1.6
	7-KETO	193.2	3.1	na		203.6	4.9	181.9	7.3	295.1	1.7	269.4	11.1	278.4	3.2
Cheese	25-OH	nd		293.0	5.6	320.1	9.1	na		379.2	5.8	556.1	6.6	562.1	7.1
	7-KETO	nd		130.3	7.3	134.0	3.6	na		139.2	1.0	203.0	11.5	196.0	3.5

^a Mean values, ng/g.^b Relative standard deviation, %.^c nd: non detected.^d na: non analyzed.

3.6. Effect of irradiation doses on COP formation

Since cholesterol can be oxidized during food processing and storage, thus giving rise to COPs, the influence of irradiation doses from 1 to 8 kGy on COP formation was studied. Table 3 shows mean concentrations and RSD values for 25-OH and 7-keto in non-irradiated and irradiated samples. As an example, chromatograms from COPs in minced beef irradiated at 8 kGy and two wavelengths are shown in Fig. 1.

3.6.1. Cooked ham

This sample presented the lowest COP level, probably because its lipid content was the lowest. On the other hand, 25-OH was below the quantification limit at all irradiation doses except at 8 kGy. At this dose it reached 27.8 ng/g which was higher than the 7-keto content (13.3 ng/g) at the same irradiation dose. The 7-keto COP was detected at 2 kGy and increased with an increasing irradiation dose. Three significantly different groups can be distinguished in Fig. 2 according to 7-keto content. Regarding microbial sanitization, Cabeza et al. (2007) concluded that with treatment at 1 and 2.5 kGy, the food safety objective to eliminate *L. monocytogenes* was reached in accordance with directives made by the EU and US Departments of Agriculture. As mentioned by the authors, these doses did not modify the sensory properties enough to be detected by consumers, except that a slight odour was detected when 2.5 kGy were applied.

3.6.2. Serrano ham

In non-irradiated samples, 7-keto (110.1 ng/g) was detected but 25-OH was not. In irradiated samples, 7-keto concentration levels

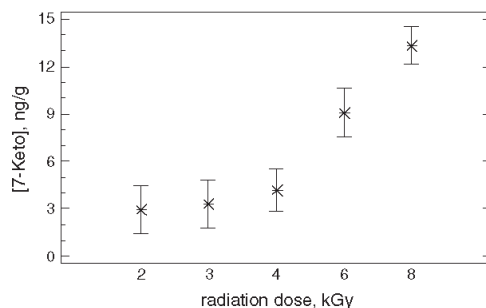


Fig. 2. Influence of irradiation dose in 7-keto formation by ANOVA and Bonferroni's intervals (95%) for cooked ham.

were higher than those of 25-OH. The analysis of Bonferroni's intervals (95.0%) and mean concentrations of 25-OH showed that concentrations at 1–4 kGy were significantly lower than those obtained at 6–8 kGy (Fig. 3a). Similar behaviour was observed for 7-keto; non-irradiated samples presented the lowest levels. Radiation induced a significant increase in 7-keto, obtaining similar concentrations at 1 and 4 kGy, while the highest levels were detected at 6 and 8 kGy (Fig. 3b). Hoz, Cambero, Cabeza, Herrero, and Ordóñez (2008) studied the same RTE foods in order to optimize microbial sanitization treatment and they concluded that at an irradiation dose of 1.12 kGy, the food safety objective according to the USDA criterion was reached, while no irradiation treatment was necessary to meet the EU microbiological criterion for bacteria.

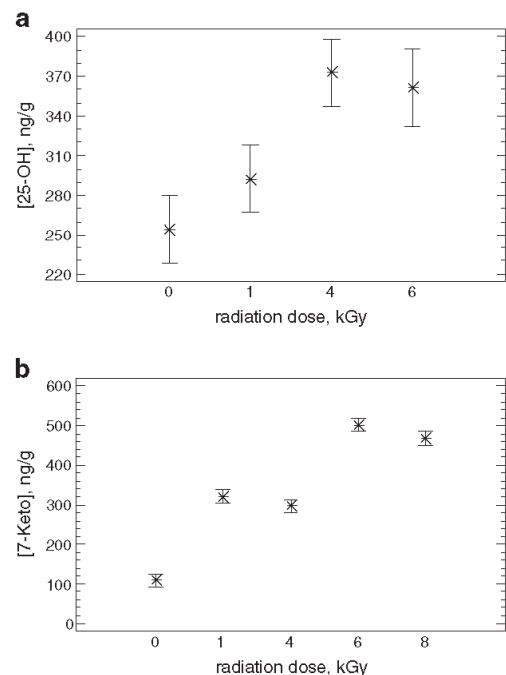


Fig. 3. Influence of irradiation dose in COP formation by ANOVA and Bonferroni's intervals (95%) for Serrano ham (a – 25-OH and b – 7-keto).

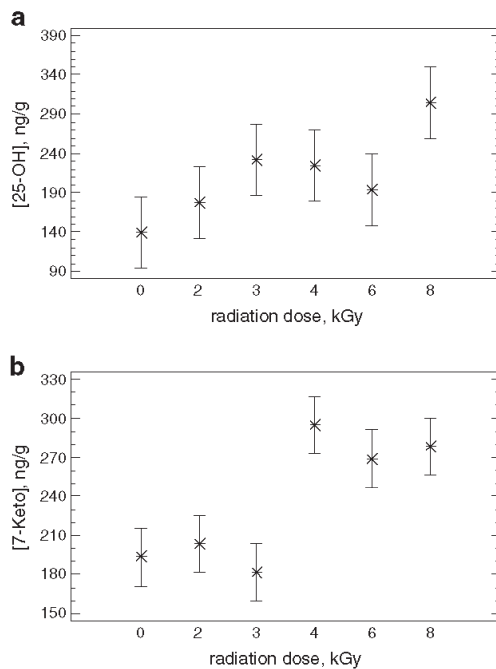


Fig. 4. Influence of irradiation dose in COP formation by ANOVA and Bonferroni's intervals (95%) for minced beef (a – 25-OH and b – 7-keto).

3.6.3. Minced beef

In non-irradiated minced beef samples, both 25-OH and 7-keto were found; these COP concentrations increased with an increasing irradiation dose. Fig. 4a shows Bonferroni's intervals (95.0%) and means for 25-OH; concentration increased moderately when the dose was changed from 2 kGy to 6 kGy, while the highest concentration was found at 8 kGy. On the other hand, irradiation doses up to 3 kGy did not lead to a significant increase in 7-keto. At 4 kGy, higher concentrations were detected. These concentrations were similar at 4, 6 and 8 kGy (Fig. 4b). Nam, Du, Jo, and Ahn (2001) found a considerable amount of COPs in fresh raw meats; they studied cholesterol oxidation in irradiated raw meats in different packaging and with varying storage times; these authors detected a synergic irradiation effect on cholesterol oxidation.

3.6.4. Cheese

Irradiation of cheese samples produced high concentrations of 25-OH (up to 562 ng/g), higher than those of 7-keto (up to 196 ng/g). The 25-OH COP content at a low irradiation dose of 1 and 2 kGy was similar. At 4 kGy 25-OH increased moderately and at 6 and 8 kGy, concentrations were highest (Fig. 5a). Regarding 7-keto, contents obtained at 1 and 4 kGy irradiation doses were similar and they were significantly lower than those obtained at 6 and 8 kGy (Fig. 5b). In a study of E-beam irradiated cheddar cheese, Blank et al. (1992) found that a low dose, 0.95 kGy, was enough to remove microbial contamination.

It must be emphasized that according to toxicity studies, 25-OH and 7-keto concentrations found in the foodstuffs studied here were at least one order of magnitude lower than those which produce toxic effects in *in vivo* and *in vitro* experiments (Bösinger et al., 1993; Hall, 2006; Yin et al., 2000; Zanardi et al., 2009). Therefore, taking into

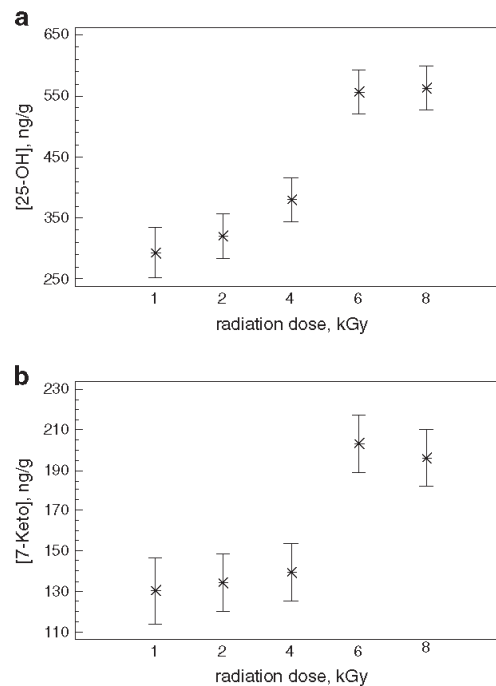


Fig. 5. Influence of irradiation dose in COP formation by ANOVA and Bonferroni's intervals (95%) for cheese (a – 25-OH and b – 7-keto).

account the results obtained in the present study, E-beam irradiation could be a useful technique for sanitizing vacuum-packed RTE food.

In general, 7-keto and 25-OH contents increased with an increasing irradiation dose for all types of food, although this increase was not linear. 6-keto did not appear in any sample at any of the irradiation doses applied. Results indicated that the ionizing radiation effect depends on the composition of the RTE food. 25-OH content was higher than that of 7-keto, except in Serrano ham and minced beef samples at 3 and 8 kGy. Minced beef presented the highest levels of 25-OH, while the highest concentration of 7-keto appeared in Serrano ham samples. Cooked ham presented the lowest level of both COPs.

4. Conclusions

The proposed HPLC-UV method is simpler and gentler than those described in the literature, minimizing COP oxidation. It is useful for the determination of 25-OH, 7-keto and 6-keto in cooked ham, minced beef, Serrano ham and cheese samples. It involves a previous extraction of the lipid fraction by leaching with chloroform and sample clean up by SPE using silica cartridges. The 7-keto COP was detected in minced beef and Serrano ham samples and the 25-OH COP was found in minced beef samples, but their concentrations were low in all cases. The 6-keto COP was not detected in any of the analyzed samples.

E-beam irradiation increased the 25-OH and 7-keto COP concentrations although this increase was not linear when the irradiation dose increased from 1 to 8 kGy. However, COP content was lower than the toxic level for *in vitro* and *in vivo* experiments. Thus, E-beam irradiation could be a useful technique for sanitizing vacuum-packed RTE food, with the advantage that the proposed method allows for COPs to be used as targets and thus monitored.

Acknowledgements

The present work has received financial support from the project TEMINYS/CM "Emerging technologies and minimal processing: application to chemical and microbiological safety of ready-to-eat (RTE) foods"(S-0505/AGR-0314) funded by the Dirección General de Universidades e Investigación, Consejería de Educación, Comunidad de Madrid.

References

- Ahn, D. U., Jo, C., & Olson, D. G. (2000). Analysis of volatile components and the sensory characteristics of irradiate raw pork. *Meat Science*, *54*, 209–215.
- Al-Saghir, S., Thurner, K., Wagner, K. H., Frisch, G., Luf, W., Razzazi-Fazeli, E., et al. (2004). Effects of different cooking procedures on lipid quality and cholesterol oxidation of farmed salmon fish (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 5290–5296.
- Angulo, A. J., Romera, J. M., Ramirez, M., & Gil, A. (1997). Determination of cholesterol oxides in dairy products. Effect of storage conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *45*, 4318–4323.
- AOAC (1998). *AOAC Official Method 930.15, moisture in animal feed*. AOAC International.
- ASTM (2000). American Society for Testing and Materials. *E1650-97e1 Standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems*, Vol. 12.02 West Conshohocken, Pennsylvania.
- Blank, G., Shamsuzzaman, K., & Sohal, S. (1992). Use of electron beam irradiation for mold decontamination on cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, *75*, 13–18.
- Bösinger, S., Luf, W., & Brandl, E. (1993). 'Oxysterols': Their occurrence and biological effects. *International Dairy Journal*, *3*, 1–33.
- Brewer, M. S. (2009). Irradiation effects on meat flavor: A review. *Meat Science*, *81*, 1–14.
- Brown, A. J., & Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *142*, 1–28.
- Cabeza, M. C., Cambero, I., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (2007). Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *8*, 299–305.
- Dionex Corporation (2000). Extraction of fat from dairy products (cheese, butter and liquid milks) using accelerated solvent extraction (ASE®). *Dionex Application Note*, no. 345.
- Daneshfar, A., Khezeli, T., & Lotfi, H. J. (2009). Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. *Journal of Chromatography B*, *877*, 456–460.
- Dionex Corporation (2000). Rapid determination of fat in meat using accelerated solvent extraction (ASE®). *Dionex Application Note*, no. 334.
- Dionisi, F., Golay, P. A., Aeschlimann, J. M., & Fay, L. B. (1998). Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: Methods comparison and validation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *46*(6), 2227–2233.
- European Union Directives (1999). *Official Journal of the European Communities*, *33*, 166/24.
- FAO/OIEA/OMS and Commission of Codex Alimentarius (1978). <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/AC3285/AC328507.htm> 29 June 2011, date last accessed.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*, 497–509.
- Gil-Díaz, M., Santos-Delgado, M. J., Rubio-Barroso, S., & Polo-Díez, L. M. (2009). Free D-Amino acids determination in ready-to-eat cooked ham irradiated with electron-beam by indirect chiral HPLC. *Meat Science*, *82*, 24–29.
- Hall, M. C. (2006). The effect of oxysterols, individually and as a representative mixture from food, on in vitro cultured bovine ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *292*, 1–11.
- Hiesberg, J., & Luf, W. (2000). Oxidation of cholesterol in butter during storage effects of light and temperature. *European Food Research and Technology*, *211*, 161–164.
- Hoz, L., Cambero, M. J., Cabeza, M. C., Herrero, A. M., & Ordóñez, J. A. (2008). Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam radiation. *Journal of Food Protection*, *71*(10), 2001–2006.
- Kwon, J. H., Kwon, Y., Namb, K. C., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2008). Effect of electron-beam irradiation before and after cooking on the chemical properties of beef, pork, and chicken. *Meat Science*, *80*, 903–909.
- Lercker, G., & Rodriguez-Estrada, M. T. (2000). Cholesterol oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in different food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, *13*, 625–631.
- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2003). Effects of ascorbic acid and antioxidants on the color of irradiated ground beef. *Journal of Food Science*, *68*, 1686–1690.
- Nam, K. C., Du, M., Jo, C., & Ahn, D. U. (2001). Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. *Meat Science*, *58*, 431–435.
- Nanke, K. E., Sebranjek, J. G., & Olson, D. G. (1998). Color characteristics of irradiated vacuum-packed pork, beef, and turkey. *Journal of Food Science*, *63*, 1001–1006.
- Park, P. W., Guardiola, F., Park, S. H., & Addis, P. B. (1996). Kinetic evaluation of 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *73*, 623–629.
- Petrón, M. J., García Regueiro, J. A., Martín, L., Muriel, E., & Antequera, T. (2003). Identification and quantification of cholesterol and cholesterol oxidation products in different types of Iberian hams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(19), 5786–5791.
- Polí, G., Sottero, B., Gargiulo, S., & Leonarduzzi, G. (2009). Cholesterol oxidation products in the vascular remodelling due to atherosclerosis. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*, 180–189.
- Razzazi-Fazeli, E., Kleineisen, S., & Luf, W. (2000). Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation. *Journal of Chromatography A*, *896*, 321–334.
- Rodriguez-Estrada, M. T., Penazzi, G., Caboni, M. F., Bertacco, G., & Lercker, G. (1997). Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of beef hamburger. *Meat Science*, *45*, 365–375.
- Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Pérez-Arribas, L. V., & Polo-Díez, L. M. (2008). Determination of heterocyclic aromatic amines by capillary high-performance liquid chromatography with diode array detection in ready-to-eat cooked ham treated with electron-beam irradiation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *391*(4), 1433–1442.
- Smith, I. L. (1981). *Cholesterol autoxidation*. New York/London: Plenum Press.
- Ulberth, F., & Rössler, D. (1998). Comparison of solid-phase extraction methods for the cleanup of cholesterol oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2634–2637.
- Yin, J., Chaufour, X., McLachlan, C., McGuire, M., White, G., King, N., et al. (2000). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cholesterol and its oxides in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*, *148*, 365–374.
- Zanardi, E., Battaglia, A., Ghidini, S., Conter, M., Badiani, A., & Lanieri, A. (2009). Lipid oxidation of irradiated pork products. *LWT – Food Science and Technology*, *42*, 1301–1307.
- Zhu, M., Du, M., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *4*, 34–42.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Food Composition and Analysis
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Determination of free cholesterol oxide products in food samples by gas chromatography and accelerated solvent extraction. Influence of electron-beam irradiation on cholesterol oxide formation

Article Type: Original Research Article

Keywords: Cholesterol Oxide Products, Accelerated Solvent Extraction, Derivatization, Gas Chromatography, E-beam irradiation, food samples of animal origin

Corresponding Author: Dr María Jesús Santos-Delgado,

Corresponding Author's Institution: Complutense University

First Author: Juan José Lozada-Castro

Order of Authors: Juan José Lozada-Castro; María Jesús Santos-Delgado, Dra; Luis María Polo-Díez, Dr

Abstract: An efficient method has been developed for Cholesterol Oxide Product determination (COPs) in Ready-to-Eat foods by Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) after an easy Accelerated Solvent Extraction, ASE, and derivatization with Tri-Sil. The ASE solvent was an 85/15 petroleum ether/chloroform mixture at 40 °C and 1500 psi followed by Solid Phase Extraction (SPE). The ASE method was compared with the established lixiviation method, proving an advantageous alternative, reducing analysis time by a factor of 15 and solvent volume by 50%, and minimizing the use of chlorinated solvents. COP derivative structures were identified by Gas Chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Analytical characteristics were determined from standards and recoveries from samples from 63- 95%, establishing the validity of the method. Chemiometric techniques were used to establish COP formation and/or an increase in COP content, as well as the effect of the main food components on COP formation after E-beam irradiation.

**1 Determination of free cholesterol oxide products in food samples by gas chromatography
2 and accelerated solvent extraction. Influence of electron-beam irradiation on cholesterol
3 oxide formation**

4

5 J. J. Lozada-Castro^a, M.J. Santos-Delgado* and L.M. Polo-Díez.

6 *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid,*

7 *28040 Madrid, Spain.*

8 ^{a)} *Department of Chemistry, Faculty of Science, Nariño University. Colombia*

9 * Corresponding author. Tel: +34 91 3944323

10 E-mail address: mjsantos@quim.ucm.es

11 **Abstract**

12 An efficient method has been developed for Cholesterol Oxide Product
13 determination (COPs) in Ready-to-Eat foods by Gas Chromatography-Flame Ionization
14 Detector (GC-FID) after an easy Accelerated Solvent Extraction, ASE, and
15 derivatization with Tri-Sil. The ASE solvent was an 85/15 petroleum ether/chloroform
16 mixture at 40 °C and 1500 psi followed by Solid Phase Extraction (SPE). The ASE
17 method was compared with the established lixiviation method, proving an advantageous
18 alternative, reducing analysis time by a factor of 15 and solvent volume by 50%, and
19 minimizing the use of chlorinated solvents. COP derivative structures were identified by
20 Gas Chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Analytical
21 characteristics were determined from standards and recoveries from samples from 63-
22 95%, establishing the validity of the method. Chemiometric techniques were used to
23 establish COP formation and/or an increase in COP content, as well as the effect of the
24 main food components on COP formation after E-beam irradiation.

25

26 *Keywords:* Cholesterol Oxide Products, Accelerated Solvent Extraction, Derivatization,
27 Gas Chromatography, E-beam irradiation, food samples of animal origin.

29 **1. Introduction**

30 Cholesterol in the human diet comes mainly from animal food sources. It is essential
31 for some organism functions; however, it can be oxidized in the presence of oxygen,
32 light, heat, radiation, free radicals and so on; its oxidation products form a group of
33 cholesterol oxides (COPs) (Morrissey and Kiely, 2005) whose structures are similar to
34 that of cholesterol but which can be potentially more harmful to health than cholesterol;
35 consequently, the interest regarding toxicity of COPs has increased markedly in recent
36 years as they may be linked to the development of atherosclerosis, cancer and coronary
37 heart diseases, as well as modification of membrane functions (Peng and Taylor, 1984;
38 Böesinger et al., 1993).

39 COP content has been determined by using different analytical techniques, High
40 Performance Liquid Chromatography (HPLC) and GC being the most widely employed
41 for food COP analysis. Although some COPs can be detected by HPLC with Ultraviolet
42 Detection (UV) their sensitivity is not very high (Saldanha et al., 2006; Lozada-Castro
43 et al. 2011) so, GC is preferred because it has higher detection sensitivity,
44 identifications are easier by MS and peak capacity is also higher than for HPLC,
45 although a derivatization reaction is required. Silylation is often used, Tri-Sil being a
46 useful reagent. However, Tri-Sil compounds derived from COPs have both close
47 molecular masses and boiling points; thus, their physical-chemical properties are similar
48 and consequently, their retention times, t_R , are very close, Therefore, lack of resolution
49 still remains in GC and critical pairs appear involving especially 6-ketocholestanol, 7-
50 ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol, requiring quite critical conditions for COP
51 derivative separations (García-Regueiro and Maraschiello, 1997).

52 COPs have been determined in complex food samples of animal origin (Paniangvait
53 et al., 2006; Petróñ et al., 2003; Al-Saghir et al., 2004; Finocchiaro et al., 1984; Novelty

54 et al., 1998; Busch and King, 2009). Sample preparation requires multiple steps and
55 gentle conditions; consequently, these compounds can be transformed during the
56 analysis process (Ulberth, and Rossler, 1998). Sample treatments for COP analysis by
57 GC in food samples included lixiviation (Folch et al., 1957) using non-polar solvents or
58 different solvent mixtures together with SPE clean up (Razzazi-Fazeli et al., 2000),
59 and/or saponification methods (Angulo et al., 1997).¹⁶ Lixiviation for lipid extraction
60 and silylation for COP derivatization are commonly used, but described methods are
61 tedious and dirty extracts are obtained (Saldanha et al., 2006). In recent years,
62 pressurized liquid extraction (ASE) has been successfully applied to lipid extraction,
63 reducing both organic solvent consumption and extraction time; however, only one
64 paper is referred for the determination of oxysterols in powdered egg samples, which
65 contain low water content (4%) (Boselli et al., 2001).

66 Nowadays, changes in dietary habits have produced a high increase in the
67 consumption of prepared foods, which has led to the manufacture of a great variety of
68 ready-to-eat (RTE) foods in individual or family-size packages (Gil et al., 2004).
69 Processing involves handling, such as cutting, slicing, dicing and packaging with an aim
70 to facilitating home consumption. These processes may result in microbial
71 contamination (Cabeza et al., 2007); consequently, it is necessary to eliminate these
72 potential contaminants. Electron-beam (E-beam) irradiation can be used to minimize or
73 eliminate RTE food microbial contamination in order to lengthen its life. Although
74 irradiation is not allowed for meat and fish in Europe, scientific knowledge of its effects
75 could be of interest since its application in several countries is in compliance with food
76 safety regulations for the commercial processing of specific foods other than meat and
77 fish, using up to an overall dose of 10 kGy (Hwang and Maerker, 1993; Ahn et al.,
78 2001; Zanardi et al., 2009).

79 In this research the effect of E-beam irradiation on COP formation was evaluated.
80 After applying radiation doses higher than those accepted by legislation in some
81 countries, differences in COP concentration between irradiated and non irradiated RTE
82 food samples as well as the effect of main food components on COP formation were
83 established by chemiometric techniques. Although sample preparation methods for COP
84 determination by GC have been described simplification of sample preparation using
85 ASE is also included, which is critical in analytical work where sample preparation is
86 inevitable.

87 **2. Materials and methods**

88 *2.1. Equipment and Material*

89 A GC-FID chromatograph (Hewlett Packard 5890, USA) equipped with an HP-1
90 (100% dimethyl polyxilosane) capillary column (30 m, 0.25 mm, and 0.25 μ m internal
91 diameter, i.d.) was used. An HP-5 (5% phenyl-methyl polysiloxane) capillary column
92 (30 m, 0.25 mm, and 0.25 μ m i.d.) was also tested. For COP identification a coupled
93 time of flight mass detector (Waters model GC-TOF Premier, USA) was used. The
94 NIST 2.0 (2005) mass spectra library was employed for the identification of Tri-Sil
95 derivatives.

96 An accelerated solvent extractor ASE 200 from Dionex (USA) was used for lipid
97 extraction; fat content in the analyzed sample is limited to 800 mg; a homemade
98 evaporator able to handle six samples simultaneously, and coupled to a Tembloc heater
99 or to a water bath heater, both from Selecta (Spain), was used in the ASE method. A
100 rotary evaporator from Hedolph-Laborota 4000 (USA), a vibrator shaker and a vortex
101 system from Selecta (Spain) were used in the lixiviation method.

102 An SPE vacuum system (visiprep) from Supelco (USA) was used as well as silica gel
103 and aminopropyl SPE cartridges (500 mg/6mL) from Applied separations; Nylon Filters
104 (4 mm and 0.45 μm) were from National Scientific (USA). A porcelain mortar from
105 Staatlich Berlin (Germany) was used to homogenize the sample; amber vials of 12 mL,
106 screw cap tubes of 100 mL and homemade anhydrous sodium sulphate cartridges (10 g)
107 were used.

108 A Statgraphics centurion XVI.1 program was used for factorial design, ANOVA and
109 PCA studies.

110 2.2. *Reagents and standards*

111 The following reagents were used: methanol (MeOH), n-hexane and acetone from
112 Romil Teknokroma S. Coop Ltda. (Spain); 2-propanol (2-PrOH), chloroform and
113 petroleum ether HPLC grade from Scharlau Chemie S.A (European Union); diethyl
114 ether and ethyl acetate pesticide grade from Carlo Erba RS (Italy); anhydrous sodium
115 sulfate from Panreac PA-ACS-ISO (Spain); Tri-Sil from Thermo Scientific (USA) and
116 30/40 mesh diatomaceous earth from Cultek S.L.U. (Spain).

117 The following COP standards were from Sigma-Aldrich (Germany): 7 β -
118 hydroxycholesterol (7 β -OH); cholesterol 5 β ,6 β -epoxide (β -epoxide), 98%; cholesterol
119 5 α ,6 α -epoxide (α -epoxide), cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol); 7-ketocholesterol (7-keto),
120 90% and, as internal standard (IS), 6-ketocholestanol (6-keto), 97%. 25-
121 hydroxycholesterol (25-OH), 98%, from Fluka, Biochemika (USA) was also used.

122 Stock standard solutions containing 1000 mg L⁻¹ were prepared by weighing and
123 dissolving in 2-propanol. Individual or COP mixture working solutions in 2-propanol
124 were prepared from stock solutions by suitable dilution.

125 2.3. *Samples*

126 Minced beef, cooked ham, Serrano ham, soft cheese and smoked salmon samples
127 from a Madrid (Spain) supermarket were minced in an electric machine and vacuum
128 packed in polystyrene bags, each containing a 50 g sample with a thickness of less than
129 one centimeter. The packages were stored at -18°C and protected from light until their
130 analysis. Some of these samples were irradiated by E-beam.

131 2.4. *Determination of food characteristic parameters*

132 Water, fat and cholesterol contents were determined by following procedures
133 specified in the literature which were referred in a previous work (Lozada-Castro et al.,
134 2011).

135 2.5. *Sample irradiation treatment*

136 Sample treatment has been described in a previous work (Lozada-Castro et al.,
137 2011)⁵; essentially, the E-beam radiation source operated at 10 MeV and radiation doses
138 absorbed by the samples were 1, 2, 3, 6 and 8 kGy at about 90 kGy/min-

139 2.6. *COP sample preparation*

140 2.6.1. *ASE method*

141 About 5 g of the sample, previously macerated and homogenized in the porcelain
142 mortar, were accurately weighed; this sample together with 6 g of 30/40 mesh
143 diatomaceous earth was transferred to the mortar and crushed until the mixture was
144 completely homogeneous. The resulting mixture was transferred to the bottom of an
145 ASE cell (22 mL), which was then filled up with diatomaceous earth and placed in the
146 ASE carousel. COPs were extracted using petroleum ether:chloroform (85:15). The

147 optimized settings were as follows; pressure (P), 15000 psi; temperature (T), 40 °C;
148 preheat time, 5 min; heat, 5 min; statics, 5 min; flush volume, 120%; purge time, 60 s;
149 cycles, 2. Total lipid extract volume was 45 mL and total analysis time was 20 min per
150 sample. The extract was collected in a 60 mL glass vial which was placed in the
151 Tembloc heater at 40 °C, blowing an Argon flow to dryness. The residue was dissolved
152 in 6 mL of hexane by vortex shaking and the clean up was carried out as indicated in the
153 following paragraph.

154 *2.6.2. Lixiviation and clean up comparison method*

155 COP extraction and clean up was carried out as indicated in a previous work
156 (Lozada-Castro et al., 2011).

157 *2.6.3. Tri-Sil COP derivatization*

158 40 µL of 6-keto (50 mg/L) as IS were added to a 12 mL amber vial also containing
159 either 40 µL of each COP standard solution, their mixture, or the sample residue
160 obtained after the above COP sample clean up. The solvent, when it was present, was
161 removed by an Argon flow. Then, 400 µL of Tri-Sil were added to the vial and it was
162 shaken vigorously for 2 min by vortex. Afterwards, the reaction was carried out at 60 °C
163 for 45 min inside the Tembloc heater. After reaching room temperature, Tri-Sil excess
164 was removed by an Argon flow. Then, 400 µL of hexane were added to the vial and it
165 was shaken for 2 min by vortex. The solution was filtered through a 0.45 µm and 4 mm
166 membrane filter.

167 2.7. *COP GC-FID chromatographic method*

168 Experimental conditions were: He as a carrier gas at 1.6 mL/min flow rate; 290 °C
169 oven temperature; 300 °C detector and injector temperature; injection volume, 2 µL in
170 split ratio mode (3:1).

171 2.7.1. *Calibration graphs*

172 The Calibration graph for each COP was based on five points in the 0.1 to 10 mg L⁻¹
173 concentration range using 6-keto as IS.

174 2.8. *COP determination in food samples*

175 Samples were prepared by following the procedures specified in sections 2.5.1 to
176 2.5.3. COP concentrations were determined using the internal standard calibration graph
177 with three replicates for each sample and experimental response factors (Rf) for each
178 COP with respect to the IS. ANOVA analysis was used to compare COP contents
179 obtained by applying the ASE method at different irradiation doses. Recoveries were
180 determined (when it was the case) for both lixiviation and ASE methods by adding 16
181 µL of a 50 mg/L COP standard solution to the homogenized solid sample which was
182 then settled for 30 min at room temperature.

183 2.9. *COP identification*

184 Tri-Sil derivative COPs were identified by GC-MS comparing their experimental
185 spectra in total ion Scan mode with those present in the NIST library.

186 **3. Results and discussion**

187 3.1. *Determination of food characteristic parameters, water, fat and cholesterol*
188 *contents, in non-irradiated samples*

189 COPs in animal food products may be present in fresh samples due to enzymatic
190 processes (Busch and King, 2009) and their formation could be related to fat and
191 cholesterol contents; consequently, these parameters were previously determined in
192 non-irradiated samples. From the analytical point of view, they are included in the lipid
193 fraction. The maximum fat content able to be determined by the ASE system, which is
194 specified by the manufacturer, is 800 mg; consequently, this parameter was required to
195 select the sample weight. Results of water, fat and cholesterol were determined and they
196 are specified in Table 1; the water content in all samples was higher than 31 g/100g.
197 The lowest fat and cholesterol contents were obtained for cooked ham.

198 3.2. *Chromatographic optimization*

199 Two capillary columns, HP-1 and HP-5 were tested for COP Tri-Sil derivative
200 separation and temperature programs proposed by other authors were evaluated (Petrón
201 et al., 2003; Guardiola et al., 1995); however, they were found unsatisfactory because
202 two critical pairs, 6-keto/7-keto and 7-keto/25-OH remained. Therefore, temperature
203 programs for COP ester separation were tested. Other chromatographic conditions, such
204 as flow rate as well as injector and detector temperatures were optimized. The HP-1
205 column showed a lower analysis time than the HP-5 column and was selected; Rs
206 values higher than 2.0 for critical pairs in less than 22 min and retention factors lower
207 than 15 were obtained.

208 3.3. *Optimization of the COP derivatization reaction*

209 COP Tri-Sil derivatives whose separation was difficult were selected for the
210 optimization study, mainly triol and especially critical pairs involving 6-keto/7-keto and
211 7-keto/25-OH.

212 A fractional experimental design 2^{4-1} (four factors and two levels) was applied to
213 determine the most significant variables (factors); a replicated central experiment was
214 added. The design response was used in terms of chromatographic peak area. Selected
215 factors were stirring time, t_s (2 and 8 min), type of solvent (hexane and acetonitrile),
216 reaction temperature, T (55 and 65 °C) and reaction time, t (30 and 60 min). The most
217 significant factor was the solvent type, hexane being the most suitable for the
218 derivatization reaction. The stirring time was not significant and therefore, its value was
219 fixed at 2 min. Temperature affected the reaction positively. Reaction time had a
220 positive or negative effect depending on the particular COP.

221 T and t , non fixed factors in the above fractional design, were optimized by a new 3^2
222 full factorial design at three levels, 15, 45 and 75 min for t , and 25, 45 and 65 °C for T ,
223 also adding a replicated central experiment. Responses were now expressed in terms of
224 relative area, A_r (peak area with respect to that from the IS), signal/noise (S/N) ratio and
225 critical pair resolution (R_s). An experimental design analysis was performed by the
226 Statgraphics program giving rise to main effect plots and response surface graphs which
227 showed a direct relationship between T and A_r ; the best responses were obtained at 65
228 °C for T and 40 min for t , which agree with literature (Menéndez-Carreño et al., 2008).

229 3.4. *Analytical characteristics from standards*

230 Calibration graphs were obtained using 6-keto as IS; COP response factors were in
231 the range 0.80-1.36. The criteria of the 96/23/EC directive to evaluate the performance
232 of analytical methods, linearity, LOD and LOQ were followed (Official Directive
233 96/23/CE (2002/657/CE)). Calibrations were linear in the 0.5-10 mg L⁻¹ concentration
234 range with determination coefficients higher than 0.9965, RSD at 5 mg L⁻¹
235 concentration level being lower than 5% (n=6) for repeatability and lower than 8%
236 (n=3) for inter day reproducibility. Detection limits were in the range from 2.54×10^{-2} to

237 12.6x10⁻² ng. Derivative COPs were significantly stable at -18 °C (ANOVA, p<0.05,
238 for inter day precision), for at least 5 days.

239 *3.5. Optimization of the ASE method applied to samples*

240 COP analysis in lipid food samples by GC is difficult because the COPs have to be
241 isolated from complex matrices. Since COPs are usually present at a very low
242 concentration, pre-concentration and clean up steps are needed.

243 Lixiviation and ASE methods were compared to extract COPs from cooked ham
244 samples based on recoveries. Results are shown in Figure 1. The lixiviation method,
245 which uses chloroform, had been optimized in the referred study (Lozada-Castro et al.,
246 2011). Temperature (40 to 80 °C) and pressure (1500-2000 psi) were tested in the ASE
247 method. Lipid COP extracts were cleaner using the ASE method, which was found to be
248 more efficient since sample homogenization increased sample-solvent contact and
249 allows T and P control. The extraction time decreased drastically from 18 h (lixiviation
250 method) to 20 min (ASE method). Besides, the use of petroleum ether containing a
251 small chloroform percentage, which continues to be a more volatile solvent than pure
252 chloroform and has low toxicity, made the use of a rotary evaporator unnecessary.
253 Because COPs can suffer oxidation at high temperature, gentle conditions, 40 °C at
254 1500 psi, were selected to ensure that cholesterol does not react to produce COPs. The
255 use of a small chloroform percentage was necessary to extract quantitatively the most
256 polar COPs (triol and 25-OH). Other solvent mixtures were also tested;
257 methanol:chloroform mixtures gave dirty extracts, possibly because methanol increases
258 the solubility of water soluble endogen compounds. For this reason, the Boselli
259 methodology (Boselli et al., 2001) based also on ASE extraction, which was applied to
260 powdered egg samples containing a low water percentage (4%), was not suitable for
261 studied samples that contained both higher water amounts and polar endogenous

262 compounds; in addition, this methodology uses a saponification step with KOH in
263 methanol and some COPs (triol and epoxides) are likely to react due to a change in the
264 pH of the medium (Nielsen et al., 1996). Furthermore, triol (acidic compound) in a
265 basic medium could be transformed into its negatively charged species, which are
266 insoluble in non-polar solvents.

267 Similar RSD values (in general lower than 10%) and higher recoveries were obtained
268 for the ASE method in comparison with the lixiviation method. Besides, sample
269 preparation time decreased by a factor of 15, solvent consumption decreased by 50%,
270 drastically reducing the volume of chloroform needed, and COP extracts were cleaner,
271 thus minimizing contamination risks.

272 3.6. *COP identification by GC-MS*

273 COP Tri-Sil derivatives from food samples were identified by GC-MS using the
274 NIST library, except in the case of α - and β -epoxide, whose Mass Spectra were
275 compared with experimental ones from standards. COPs identified and/or quantified in
276 the samples were: 7- β OH, β -epoxide, α -epoxide and 7-keto in all cases and 25-OH in
277 some samples. Because 6-keto was not found in any sample, this COP was selected as
278 IS.

279 3.7. *Validation of the GC-FID method*

280 The precision and accuracy of the ASE method were evaluated through recovery
281 studies from spiked samples using a COP mixture solution at 2 mg/L concentration
282 level in the analytical solution and three replicates. The lowest recoveries were for the
283 more polar COPs, namely triol and 25-OH (63 and 66% for cooked ham and smoked
284 salmon, respectively); the highest recovery was for 7-keto (95.2%) from cooked ham
285 samples. RSD values were lower than 12%.

286 3.8. *COP determination in non-irradiated food samples.*

287 COP content in minced beef, cooked ham, Serrano ham, soft cheese and smoked
288 salmon was determined using the ASE method to prepare the sample. Results are shown
289 in Table 2.

290 Obviously, detected COPs depended on the sample type. All COPs studied, except
291 25-OH, were detected in Serrano ham samples. In the other samples, except in salmon,
292 four COPs, 7 β -OH, β -epoxide, α -epoxide and 7-keto, were identified and quantified. In
293 minced beef samples their concentrations were comparatively higher than those found
294 in the other analyzed foods; this is probably due to the high contact surface of minced
295 beef which can facilitate oxidation reactions. Finally, in smoked salmon samples, which
296 had different food characteristic parameters with respect to the other samples studied,
297 only 7 β -OH, β -epoxide and 25-OH were detected, the latter having the highest content.
298 In general, COP content in salmon samples was the lowest among all those studied; it
299 must be emphasized that 7-keto was quantified in all samples, except in smoked salmon
300 in which it was not detected.

301 In other studies, similar COP contents were found in minced beef, cheese and
302 Serrano ham (Petrón et al., 2003; Finocchiaro et al., 1984; Vicente and Torres, 2007);
303 however, in samples of cold meat cuts, higher COP contents were obtained (Zanardi et
304 al., 2009); moreover, a tendency to COP formation due to heating during food
305 processing has been mentioned (Al-Saghir et al., 2004).

306 3.9. *Influence of E-beam irradiation on COP formation. Statistical studies.*

307 3.9.1. *Analysis of variance, ANOVA.*

308 In order to detect potential effects due to the irradiation process, samples irradiated at
309 different doses (0 to 8 kGy) were also analyzed. Results are shown in Table 2. In

310 general terms, COP contents were higher than those obtained from non-irradiated
311 samples. ANOVA testing gave significant differences between COP mean
312 concentrations, indicated by p values lower than 0.05. In general, COP content
313 increased when the irradiation dose increased, although linear correlations were not
314 obtained. COP content increased by a factor up to 1.7 at 8 kGy. Detected levels were
315 about 100 fold lower than the toxic levels allowed for in *in vitro* experiments (Yin et al.,
316 2000).

317 In cooked ham no statistical significant differences were found between different
318 irradiation doses, except for β -epoxide at 6 kGy. COP content in Serrano ham increased
319 significantly after irradiation but there were no significant differences among irradiation
320 doses. In soft cheese significant differences between non-irradiated and irradiated
321 samples were not observed up to 6 kGy, except for 25-OH which showed significant
322 differences just above 1 kGy. In smoked salmon samples, sensory and texture changes
323 after sample irradiation were observed; the characteristic color of smoked salmon
324 disappeared gradually with an increasing irradiation dose and changes in sample smell
325 and texture were observed which agree with literature (Boselli et al., 2005). Diverse
326 COP amounts of 25-OH were found in irradiated samples and 7-keto was detected but
327 not quantified.

328 A two factor ANOVA showed significant differences between COP mean values
329 obtained in the different samples at 95% confidence level; in conclusion, COP
330 formation depends on sample type.

331 As an example, chromatograms obtained from irradiated and non-irradiated Serrano
332 ham samples are shown in Figure 2.

333 3.9.2. *Principal component analysis, PCA.*

334 Since the ANOVA test did not supply significant information on the effect of
335 irradiation doses on COP formation and its relation with sample type, a PCA study was
336 carried out. Firstly, based on the results showed in Table 2, their correlation matrix was
337 obtained indicating that lineal and non-lineal correlations (positive and negative)
338 between some variables exist. In the PCA study, taking into account the irradiation
339 doses and variables specified in Table 1, two principal components were found for all
340 types of sample except for minced beef for which only one principal component, PC₁,
341 appeared, explaining 68.83% of the total variance. The results of PC₁ and PC₂
342 eigenvalues for each type of sample, their equations as well as explained and cumulative
343 variance percentages are shown in Table 3.

344 Taking as an example the results obtained for cooked ham samples, the biplot graph,
345 dispersion and weight component, is showed in Figure 3a; COP contents in non
346 irradiated samples are clearly different from those found in irradiated ones at 4, 6 and 8
347 kGy irradiation doses; samples at 1 and 2 kGy are located in an intermediate position
348 which may indicate a transition from non irradiated to high irradiated samples.

349 Other conclusions for cooked ham samples can be drawn; at 6 and 8 kGy, a higher
350 amount of α - and β -epoxide appeared and at the lowest irradiation doses, formation of
351 the less non-polar compounds, such as 25-OH and triol and even 7-keto was more
352 favorable. The high water content in these samples can affect COP formation at the
353 lowest irradiation doses, the weight component being highest for 25-OH; it would seem
354 that water content favors COP formation.

355 Similarly, a biplot graph (PC₂ vs PC₁) for cheese samples is showed in Figure 3 b. A
356 type of transition is also observed. Differences between non irradiated and irradiated
357 samples were not apparent up to the high irradiation doses, 6 and 8 kGy, as the

358 formation of α -epoxide, 7-keto and 7-OH indicates. For low irradiation doses, the high
359 fat content could protect against COP formation.

360 Correlations between high irradiation doses and the appearance of COPs are also
361 observed in cheese and cooked ham samples, being quite clear for 7-keto.

362 In Serrano ham, similar effects to those observed in soft cheese regarding the
363 formation of α -epoxide and 7-keto were observed at 4 and 6 kGy; this could be due to
364 their similar lipid content. At the lowest irradiation doses, 1, 2 and 4, high α -, β -epoxide
365 and triol contents were detected.

366 On the other hand, the smoked salmon samples present a similar behavior to that of
367 soft cheese, but only at low irradiation doses, forming α -epoxide, 7-keto and 7-OH. The
368 high water content of salmon could explain that the 25-OH initial content does not
369 suffer significant changes after irradiation; at 2 and 8 kGy, triol showed the most
370 important changes.

371 In summary, significant differences were observed between non irradiated and
372 irradiated samples. The highest differences were found in Serrano ham and in smoked
373 salmon samples at all irradiation doses tested. E-beam irradiation of food samples in the
374 range 1 to 8 kGy increased COP content between 0.100 and 2.600 $\mu\text{g g}^{-1}$, which was
375 about 100 times lower than toxic levels allowed in *in vitro* and *in vivo* experiments
376 (Böesinger et al., 1993; Zanardi et al., 2009; Yin et al., 2000). This increase depends on
377 both irradiation dose and food composition, but COP's increase was not linear with
378 irradiation dose.

379 On the other hand, 25-OH COP formation can be favored in samples containing high
380 water content. However, for other samples, the 25-OH content was not significant as a
381 weight component.

382 3.10. *Correlation between COP content and characteristic parameters before*
383 *sample irradiation*

384 Correlations between fatty acid contents and cholesterol effects of food processing
385 on COP formation have been described by several authors (Boselli et al., 2005; Geni et
386 al., 2006; Baggio and Bragagnolo, 2006); we have studied our samples and results fit
387 general specified comments. A positive correlation between fat and cholesterol content
388 was observed. Table 1 also shows cholesterol and total COP content; analyses were
389 made in triplicate and in general RSD values were lower than 10%. Minced beef
390 samples had high cholesterol content and the highest COP amounts; they also contained
391 the highest COP/cholesterol ratio. In cooked ham, very low fat and cholesterol content
392 were found; however, the COP/cholesterol ratio was relatively high, possibly due to
393 temperature changes during manufacture. In the case of Serrano ham, the aging process
394 is relatively slow, indicating that maturation time may be an important factor in COP
395 formation. Soft cheese samples had the highest fat and cholesterol content; however,
396 COP content was lower than that of Serrano ham, which suggests that COP formation is
397 associated not only with the presence of cholesterol but also with the presence of other
398 fat components. Finally, smoked salmon showed high cholesterol content; however, its
399 COP content was low and its COP/cholesterol ratio was the lowest; because its fat
400 content was also low, it is possible that this matrix could contain compounds which
401 prevent cholesterol oxidation.

402 Regarding multivariate studies, the correlation matrix of results obtained (Table 2)
403 together with the total COP content indicated some lineal and non-lineal correlations
404 between variables. A PCA study gave three significant principal components, whose
405 3D-biplot graph (PC₃ vs PC₂ vs PC₁) showed clear correlations between cholesterol
406 content and soft cheese samples, as well as between lipid content and 7-keto, β -epoxide

407 and α -epoxide contents which is related to Serrano ham and minced beef samples;
408 however, the effect of water content is negatively correlated to the lipid content. Cooked
409 ham is the most related sample to water content, as should be expected due to its high
410 water percentage (73%).

411 **4. Conclusion**

412 The proposed ASE method for sample preparation and further determination of
413 COPs in food samples of animal origin by GC-FID is advantageous with respect to the
414 lixiviation method; sample preparation time decreased by a factor of 15, solvent
415 consumption decreased by 50%, drastically reducing the need for chloroform, analyte
416 extracts were cleaner and the risk of contamination was lower. The proposed method is
417 gentle, requiring 40 °C and 1500 psi for lipid extraction, and making the saponification
418 step unnecessary for free COPs determination.

419 E-beam irradiation of food samples in the range 1 to 8 kGy increased COP content
420 between 100 to 2600 ng g⁻¹, which was about 100 times lower than toxic levels allowed
421 for in vitro and in vivo experiments. This increase depends on both irradiation doses and
422 food composition, including fat/cholesterol ratio but it was not linear with the
423 irradiation doses.

424 **Acknowledgements**

425 The present work has received financial support from the project TEMINYSA/CM
426 “Emerging technologies and minimal processing: application to chemical and
427 microbiological safety of ready-to-eat (RTE) foods”(S-0505/AGR-0314) funded by the
428 Dirección General de Universidades e Investigación, Consejería de Educación,
429 Comunidad de Madrid.

- 455 Cabeza M. C., Cambero I., De la Hoz L., Ordóñez J. A. (2007). Optimization of E-beam
456 irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE)
457 cooked ham. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 299–305.
- 458 Finocchiaro, E.T., Lee K., Richardson T. (1984). Identification and quantification of
459 cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. *Journal of the American*
460 *Oil Chemists' Society* 61, 877-883.
- 461 Folch J., Lees M., Sloane S. G.H. (1957). A Simple method for the isolation and
462 purification of total lipids from animal tissues. *The journal of Biological Chemistry*
463 226, 497-509.
- 464 García-Regueiro, J.A. and Maraschiello, C. (1997). Procedure for the determination of
465 eight cholesterol oxides in poultry meat using on-column and solvent venting capillary
466 gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 764, 279-293.
- 467 Geni R. S., Bastos D. H.M., Soares R.A.M., Queiroz Y.S., Torres E.A.F.S (2006). Fatty
468 acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chemistry* 95, 344–
469 351.
- 470 Gil M.D., Bañón S., Laencina J., Garrido M.D. (2004). Oxidación del colesterol en
471 carne y derivados: factores que determinan su formación. *Anales Veterinaria* 20, 21-
472 34.
- 473 Guardiola F., Codony R., Rafecas M., Boatella J. (1995). Comparison of three methods
474 for the determination of oxysterols in spray dried egg. *Journal of Chromatography A*
475 705, 289-309.
- 476 Hammad, A.I. and El-Mongy, T.M. (1992). Shelf-life extension and improvement of the
477 microbiological quality of smoked salmon by irradiation, *Journal of Food Processing*
478 *and Preservation*. 16(5), 361–370.

431 **5. References**

- 432 Ahn D.U., Nam K.C., Du M., Jo C. (2001). Effect of irradiation and packaging
433 conditions after cooking on the formation of cholesterol and lipid oxidation products
434 in meats during storage. *Meat Science* 57, 413-418.
- 435 Al-Saghir S., Thurner K., Wagner Karl-Heinz, Frisch G., Luf W., Razzazi-Fazeli E.,
436 Elmadfa I. (2004). Effects of different cooking procedures on lipid quality and
437 cholesterol oxidation of farmed salmon fish (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural*
438 *and Food Chemistry* 52, 5290-5296.
- 439 Angulo, A. J., Romera J. M., Ramírez, M., Gil, A. (1997). Determination of cholesterol
440 oxides in dairy products. Effect of storage conditions. *Journal of Agricultural and*
441 *Food Chemistry* 45, 4318–4323.
- 442 Baggio S.R., Bragagnolo N. (2006). The effect of heat treatment on the cholesterol
443 oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents of processed meat products.
444 *Food Chemistry* 95, 611–619.
- 445 Böesinger S., Luf W., Brandl E. (1993). Oxysterols: their occurrence and biological
446 effects. *International Dairy Journal* 3, 1-33.
- 447 Boselli E., Velazco V., Fiorenza C. M., Lercker G. (2001). Pressurized liquid extraction
448 of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of*
449 *Chromatography A* 917, 239–244.
- 450 Boselli E., Caboni M.F., Rodriguez-Estrada M.T., Toschi T.G., Mara D., Lercker G.
451 (2005). Photooxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under
452 commercial retail condition. *Food Chemistry* 91, 705–713.
- 453 Busch T.P., King A.J. (2009). Artifact generation and monitoring in analysis of
454 cholesterol oxide products. *Analytical Biochemistry* 388, 1–14.

- 479 Hwang K. T., Maerker G. (1993). Quantization of cholesterol oxidation products in
480 unirradiated and irradiated meats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70
481 (4), 371-375.
- 482 Lozada-Castro, J.J., Gil-Díaz M., Santos-Delgado M.J., Rubio-Barroso S., Polo-Díez
483 L.M. (2011). Effect of electron-beam irradiation on cholesterol oxide formation in
484 different ready-to-eat foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*
485 12, 519-525.
- 486 Menéndez-Carreño, M., García-Herreros, C., Ansorena, D., Astiasaran, I. (2008).
487 Validation of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of
488 sterol oxidation products in serum. *Journal Chromatography B* 864, 61–68.
- 489 Morrissey P.A., Kiely M. (2005). Oxysterols: Formation and biological function.
490 *Advanced dairy chemistry, Volume 2: Lipids*, 3rd edition, Edited by P.F. Fox and
491 P.L.H. McSweeney, Springer, New York.
- 492 Nielsen, J. H., Olsen, C. E., Skibsted, L.H. (1996). Cholesterol oxidation in a
493 heterogeneous system initiated by water-soluble radicals. *Food Chemistry* 56, 33-37.
- 494 Novelty E., Zanardi E., Ghiretti G. P., Campanini G., Dazzi G., Madarena G.,
495 Chizzolini R. (1998). Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame
496 Milano and mortadella. *Meat Science* 48 (1-2) 29-40.
- 497 Official Directive 96/23/CE (2002/657/CE) (regarding analytical methods and the
498 interpretation of results), Official Journal of the European Communities.
- 499 Paniangvait P., King A.J., Jones A.D., German B.G. (2006). Cholesterol oxides in foods
500 of animal origin. *Journal of Food Science* 60(6), 1159-1174
- 501 Peng S.-K., Taylor C.B. (1984). Cholesterol autooxidation, health and atherosclerosis.
502 *World Review of Nutrition and Dietetics* 44, 117-154.

- 503 Petró n M. J., García-Regueiro. J. A., Martín L., Muriel E., Antequera T. (2003).
504 Identification and quantification of cholesterol and cholesterol oxidation products in
505 different types of Iberian hams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(19),
506 5786-5791.
- 507 Razzazi-Fazeli, E., Kleineisen, S., Luf, W. (2000). Determination of cholesterol oxides
508 in processed food using high-performance liquid chromatography- mass
509 spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation. *Journal of*
510 *Chromatography A* 896, 321–334.
- 511 Saldanha T., Christine A., Sawaya H. F., Nogueira Eberlin M., Bragagnolo N. (2006).
512 HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish:
513 comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. *Journal of Agricultural and*
514 *Food Chemistry* 54, 4107-4113.
- 515 Ulberth, F.; Rossler, D. (1998). Comparison of solid-phase extraction methods for the
516 cleanup of cholesterol oxidation products. *Journal of Agricultural and Food*
517 *Chemistry* 46, 2634-2637.
- 518 Vicente S.J.V., Torres E.A.F.S. (2007). Formation of four cholesterol oxidation
519 products and loss of free lipids, cholesterol and water in beef hamburgers as a
520 function of thermal processing. *Food Control* 18, 63–68.
- 521 Yin J., Chaufour X., Mclachlan M., McGuire M., White G., King N., Hambly B.
522 (2000). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cholesterol and its
523 oxides in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 148, 365–374.
- 524 Zanardi E., Battaglia A., Ghidini S., Conter M., Badiani A., Ianieri A. (2009). Lipid
525 oxidation of irradiated pork products. *LWT - Food Science. and Technology* 42,
526 1301–1307.

528 *Figure captions*

529 **Figure 1.** Recovery plots of COPs by ASE and lixiviation techniques in cooked ham.

530 R, recovery.

531 **Figure 2.** Chromatograms from Serrano ham samples.(—) non-irradiated and (—)

532 irradiated at 6 kGy. 1. 7β -OH, 2. β -epoxide, 3. α -epoxide, 4. triol, , 5. IS (6-keto) 6. 7-

533 keto and 7. 25-OH.

534 **Figure 3.** PCA study of the influence of irradiation on the sample. a- Cooked ham; b-

535 Soft cheese.

536 **Figure 4.** Correlation between COP formation and characteristic parameters of the

537 samples.

Table 1 Water, fat, cholesterol and the total COP contents in food samples

Sample	Water, ^a mg/100 g	Fat, ^a %	Cholesterol, ^a mg/100g	COPs, ^a µg/g	COPs/ Cholesterol, ^a µg/mg
Minced beef	28.9 (3.5)	10.4 (2.6)	34.5 (12.3)	2.756	7.99
Cooked ham	72.4 (1.6)	5.2 (4.5)	19.6 (2.8)	0.449	2.29
Serrano ham	36.8 (4.2)	34.0 (4.4)	37.1 (3.4)	1.231	3.32
Soft cheese	40.3 (7.0)	25.9 (5.9)	52.3 (5.3)	0.601	2.61
Smoked salmon	62.3 (2.6)	11.4 (5.4)	38.3 (6.9)	0.102	0.266

^a Mean value (RSD, %, n=3)

Table 2 Mean COP contents in non-irradiated food samples (n=6) and irradiated samples (n=3).

Sample	Irradiation doses. kGy	COP concentration in $\mu\text{g g}^{-1}$ and (RSD. %) obtained by ASE method					
		7 β -OH	β -epoxide	α -epoxide	triol	7-keto	25-OH
Minced meat	0	0.678(5.4)	0.227(8.7)	0.163(10.7)	nd ^a	1.688(3.5)	nd
	1	0.889(5.8)	0.935(7.4)	0.242(7.4)	nd	2.036(6.9)	0.024(9.8)
	2	0.996(4.5)	0.826(3.9)	0.186(5.0)	nd	2.173(6.6)	0.033(11.4)
	4	0.976(3.3)	0.780(8.7)	0.218(13.4)	nd	2.034(4.0)	0.062(10.7)
	6	1.151(8.0)	0.903(13.7)	0.349(14.9)	nd	2.669(7.4)	0.056(13.2)
	8	0.880(5.3)	0.695(7.8)	0.254(2.8)	nd	2.138(6.0)	0.019(15.1)
Cooked ham	0	0.115(3.3)	0.133(1.7)	nq ^b	nd	0.201(10.8)	nd
	1	0.138(5.39)	0.126(6.5)	nq	nq	0.231(6.2)	0.096(13.5)
	2	0.135(9.1)	0.132(10.0)	0.142(11.2)	nq	0.259(6.8)	0.074(9.4)
	4	0.146(13.7)	0.157(7.7)	0.127(14.0)	nq	0.426(21.6)	0.122(1.5)
	6	0.122(6.4)	0.260(13.4)	0.139(3.5)	nq	0.296(24.8)	0.094(17.6)
	8	0.131(7.1)	0.253(8.7)	0.108(5.3)	nq	0.273(12.6)	0.108(12.3)
Serrano ham	0	0.283(3.6)	0.283(3.6)	0.185(11.0)	nq	0.480(9.9)	nd
	1	0.302(5.9)	0.235(8.2)	0.193(9.6)	nq	0.537(7.5)	0.116(13.1)
	2	0.295(5.8)	0.227(10.0)	0.192(9.3)	nq	0.575(7.7)	0.131(5.1)
	4	0.281(8.9)	0.242(9.6)	0.206(12.9)	nq	0.680(11.5)	0.095(28.5)
	6	0.310(4.5)	0.230(2.8)	0.197(11.2)	nq	0.746(6.8)	0.192(6.3)
	8	0.257(8.1)	0.198(14.6)	0.159(11.3)	nq	0.510(1.9)	0.155(11.1)
Soft cheese	0	0.140(3.4)	0.110(12.8)	0.161(11.6)	nd	0.190(4.7)	nd
	1	0.130(5.1)	0.101(1.6)	0.140(1.6)	nd	0.229(9.3)	0.108(12.0)
	2	0.138(5.5)	0.085(6.0)	0.151(3.0)	nd	0.228(2.6)	0.124(10.6)
	4	0.106(7.7)	0.089(4.2)	0.164(3.4)	nd	0.183(2.5)	0.143(5.8)
	6	0.164(7.1)	0.106(6.8)	0.187(1.3)	nd	0.269(6.9)	0.172(7.6)
	8	0.256(5.5)	0.128(11.6)	0.206(6.4)	nd	0.379(5.8)	0.121(10.4)
Smoked salmon	0	nq	nq	nd	nd	nd	0.102(12.1)
	1	0.167(13.3)	0.210(13.7)	nq	nq	nq	0.175(13.4)
	2	0.149(7.8)	0.156(6.8)	nq	nq	nq	0.086(15.6)
	4	0.119(27.1)	0.220(9.7)	nq	nq	nq	0.165(16.3)
	6	0.146(6.3)	0.236(11.0)	nq	nq	nq	0.200(8.6)
	8	0.149(7.8)	0.156(6.8)	nq	nq	nq	0.086(15.6)

^a non detected; ^b non quantified

Tabla 3 Study of irradiation influence on the COP sample formation by PCA

Sample	PC ^a	Eigenvalue	Equation	Variance %	
				Explained	Cumulative
Minced beef	1	4.09967	0.33 * irradiation + 0.46 * 7-OH + 0.39 * α -epoxide + 0.41 * β -epoxide + 0.45 * 7-keto + 0.39 * 25-OH	68.33	
	2	0.836865		13.95	82.28
Cooked ham	1	3.52461	0.39 * irradiation + 0.30 * 7-OH + 0.31 * β -epoxide + 0.31 * α -epoxide + 0.41 * Triol + 0.42 * 7-keto + 0.47 * 25-OH	50.35	
	2	1.6732	-0.45 * irradiation + 0.54 * 7-OH - 0.57 * β -epoxide - 0.19 * α -epoxide + 0.31 * Triol + 0.10 * 7-keto + 0.17 * 25-OH	23.90	74.25
Serrano ham	1	3.65123	-0.10 * irradiation 0.34 * 7-OH - 0.44 * β -epoxide - 0.47 * α -epoxide - 0.41 * Triol - 0.40 * 7-keto - 0.35 * 25-OH	52.16	
	2	0.88215	0.72 * irradiation 0.37 * 7-OH - 0.15 * β -epoxide - 0.14 * α -epoxide - 0.16 * Triol + 0.20 * 7-keto + 0.48 * 25-OH	24.87	77.03
Soft cheese	1	4.00669	0.45 * irradiation + 0.46 * 7-OH + 0.36 * β -epóxido + 0.45 * α -epóxido + 0.47 * 7-keto + 0.17 * 25-OH	66.78	
	2	1.36671	0.33 * irradiation - 0.21 * 7-OH - 0.49 * β -epoxide + 0.03 * α -epoxide - 0.04 * 7-keto + 0.79 * 25-OH	22.78	89.56
Smoked salmon	1	4.32088	0.23 * irradiation + 0.45 * 7-OH + 0.44 * β -epóxido + 0.47 * α -epóxido + 0.37 * Triol + 0.38 * 7-ceto + 0.23 * 25-OH	61.73	
	2	1.35996	-0.34 * irradiation - 0.16 * 7-OH + 0.28 * β -epoxide + 0.075 * α -epoxide - 0.50 * Triol - 0.04 * 7-keto + 0.72 * 25-OH	19.43	81.16

^a Principal component

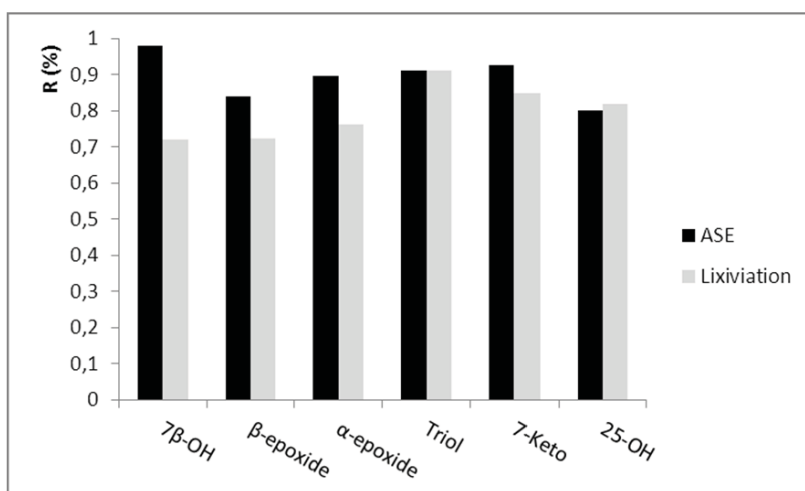


Figure 1

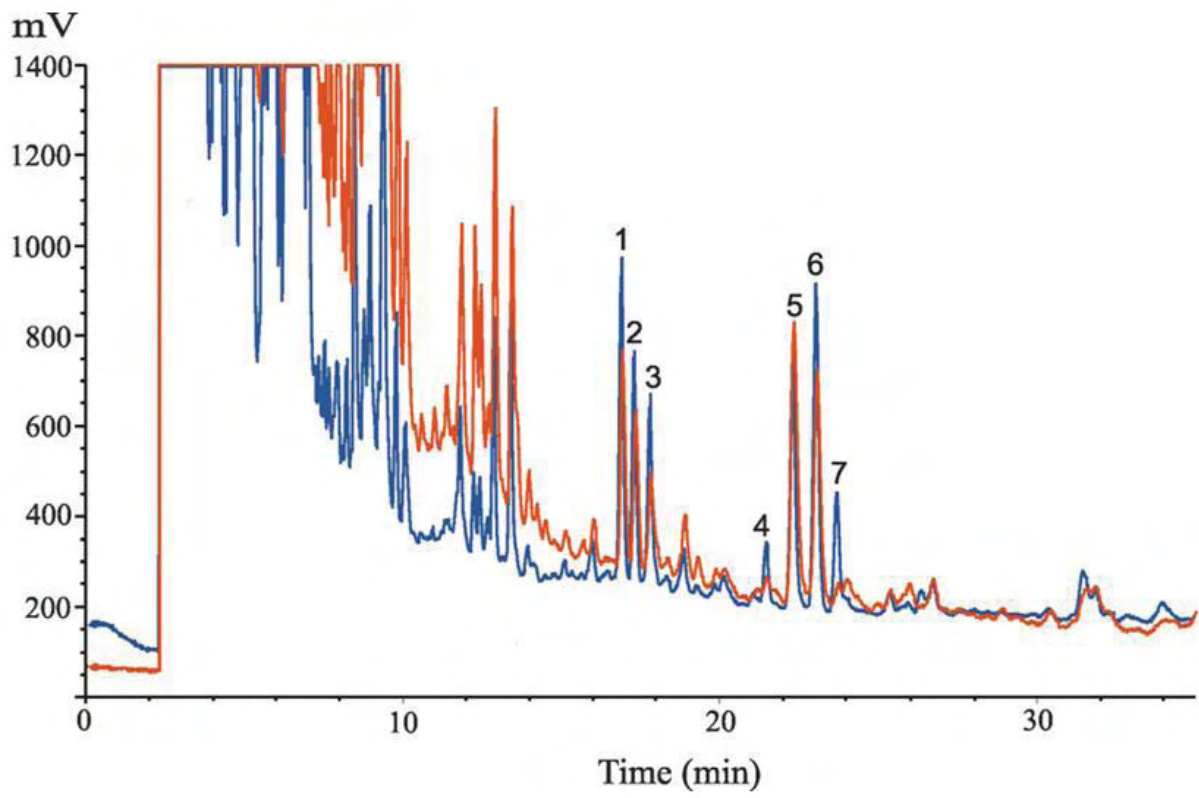


Figure 2

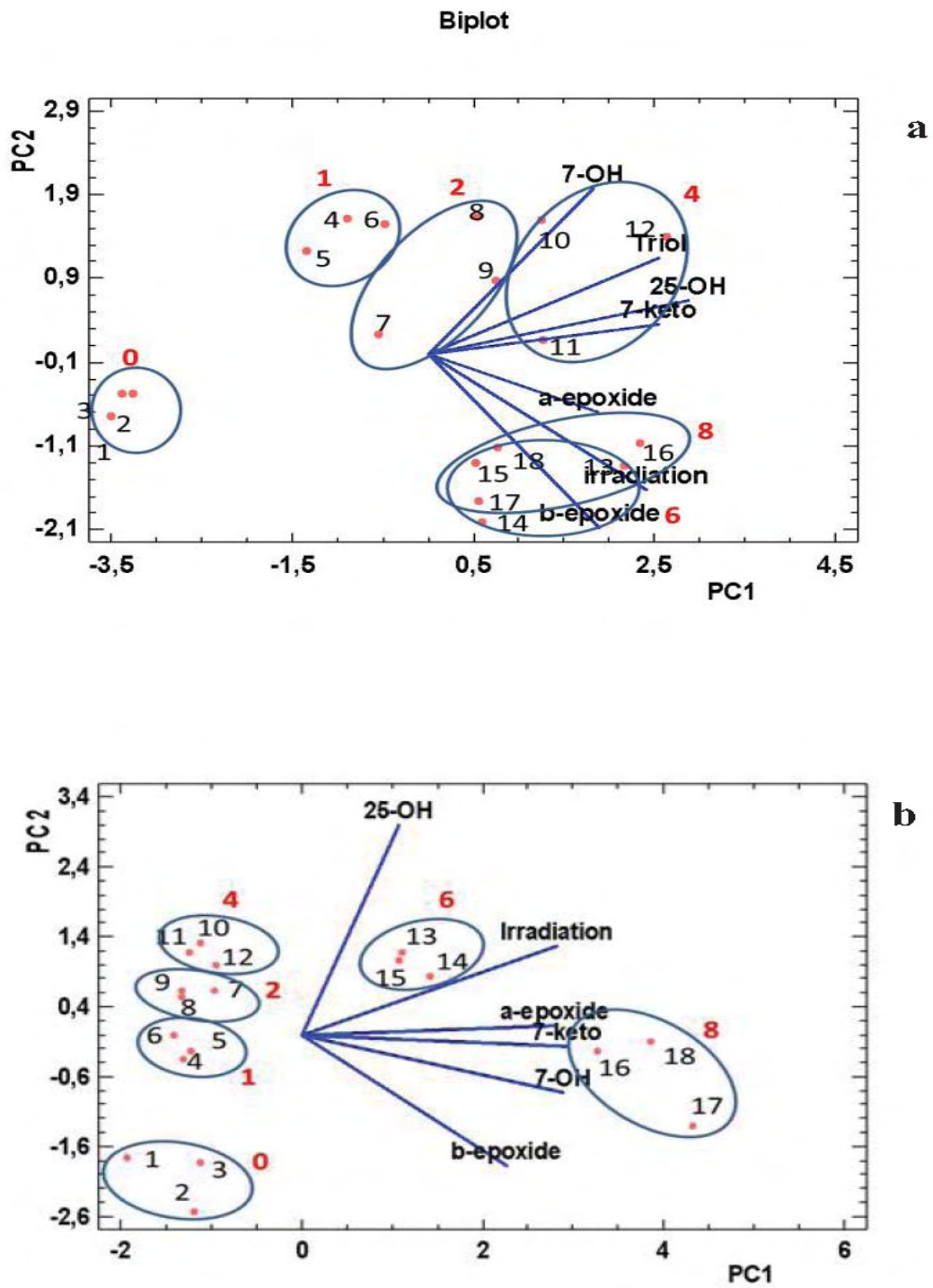


Figure 3

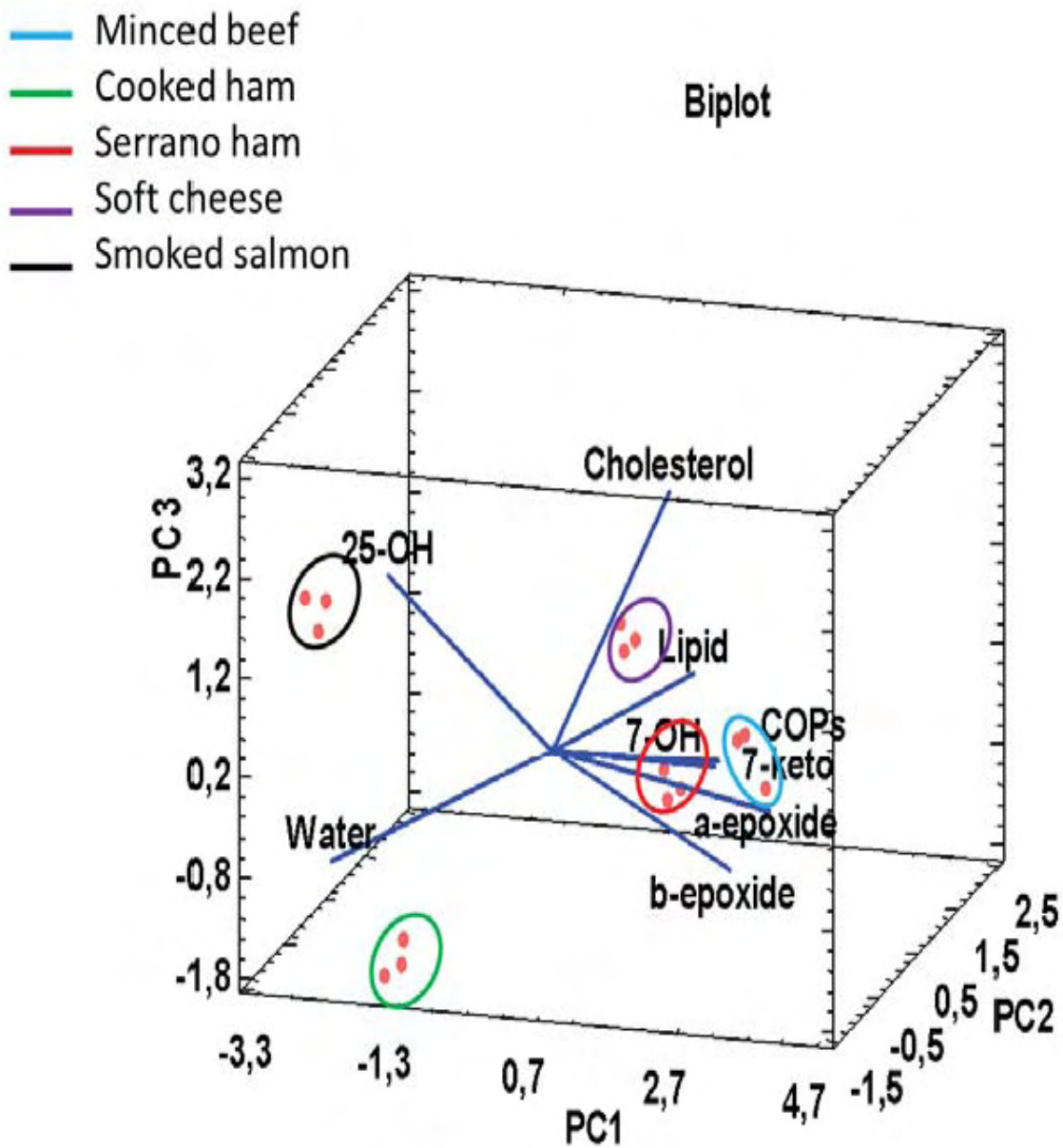
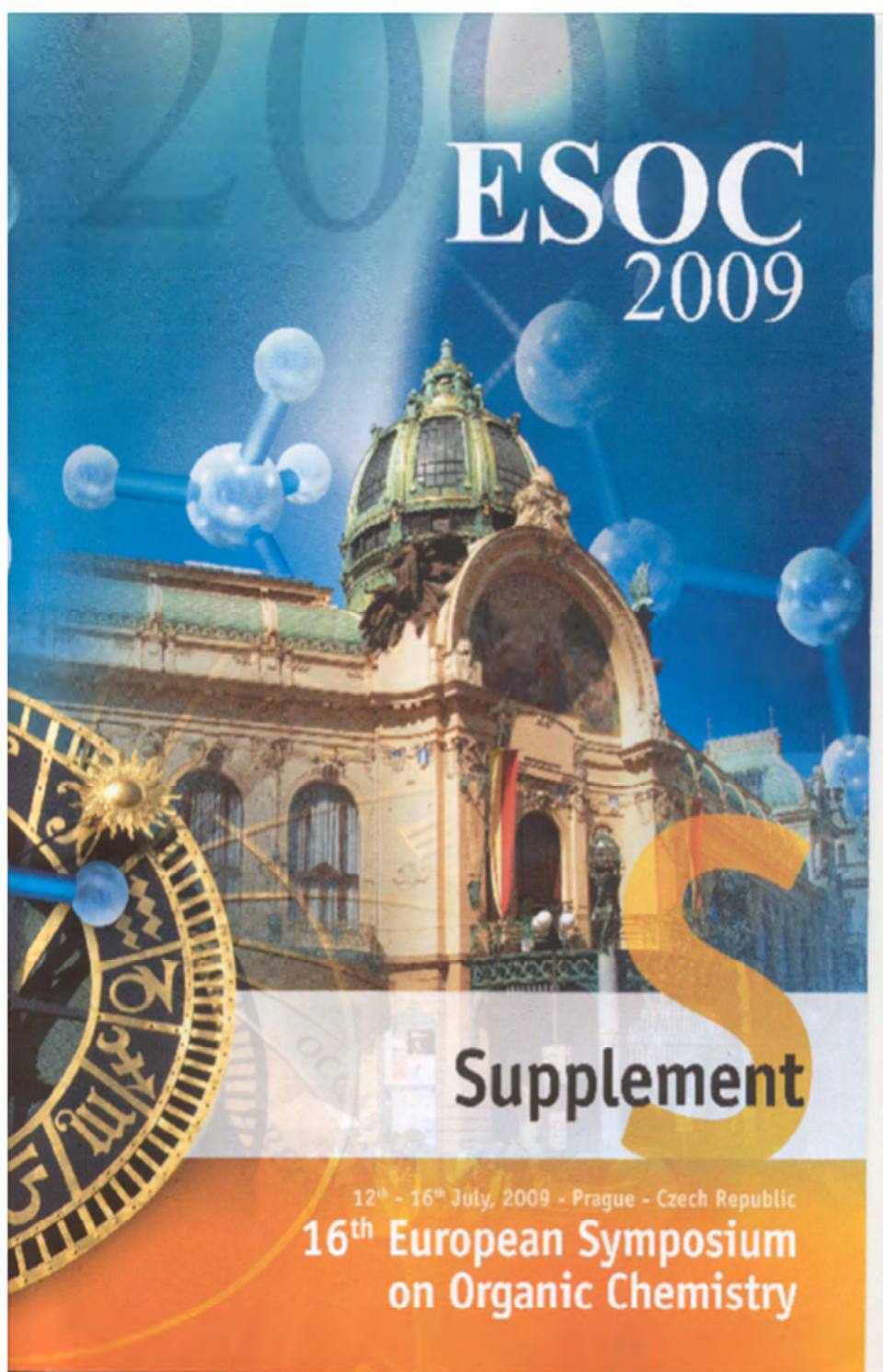


Figure 4



P2.273

Reassessment of the cholesterol oxides silyl derivatization reaction by factorial design for their determination by gas chromatography

J. J. Lozada-Castro, M.J. Santos-Delgado*, E. Crespo-Corral and L.M. Polo-Díez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.
 mj.santos@quim.ucm.es

Cholesterol in the human diet is mainly the result of animal food sources being oxidized in the presence of oxygen, light, heat, radiation, free radicals and so on; its oxidation products form a group of cholesterol oxides (COPs) whose structure is similar to that of cholesterol but which can be potentially more harmful to our health than cholesterol. Consequently, interest in the toxicity of COPs has increased markedly in recent years, and it has been linked to the development of atherosclerosis and coronary heart diseases. Although some COPs can be detected by HPLC-UV their sensitivity is quite small; so, gas chromatography, GC, methods are preferred although a derivatization reaction is required. A silylation reaction is often used, a useful reagent being Tri-Sil. However, their derivative compounds are difficult to separate and lack of resolution still remains, especially for the 6-Ket-7-Keto, and 7-Keto-25-OH critical pairs; the best separations seem to be obtained using polar columns.

In this work, seven cholesterol oxides were selected because they are most often found in animal food samples (25-Hydroxycholesterol (25-OH), 7-Ketocholesterol (7-Keto), 6-Ketocholesterol (6-Keto), Cholestanetriol (Triol)), 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OH), 5 α ,6 α -Epoxycholestan-3 β -ol (α -Epoxy) and 5 β , 6 β -Epoxycholestan-3 β -ol (β -Epoxy), and a GC method is proposed for their determination. Firstly, the COPs were derivatized using Tri-Sil as derivative reagent based on a literature method [1]. The silyl derivatization reaction was optimized by factorial design. In all experiments, 1.0 to 5 mg/l COP concentration, a volume of 400 μ l of Tri-Sil and 9-10-diphenyl-anthracene as internal standard were used; the best experimental conditions were obtained; reaction time was 40 min, stirring time was 2 min, reaction temperature was 65°C and hexane was used as a solvent. Optimum experimental conditions are slightly different from those referred in the literature. A study of different columns (non polar stationary phases) and temperature programmes for COP ester separation was carried out. Semi capillary and capillary columns, HP-5 and HP-1, and an FID detector were used. Chromatographic conditions, such as injector and detector temperatures, and flow rates were optimized. From this study, it was confirmed that semi-capillary columns yielded noise levels about 16 times higher than capillary columns. HP-5 columns (5% phenyl-methyl silicone) were not suitable for COP ester separation in a reasonable time; although good resolution was obtained in isotherm mode; however, HP-1 columns (dimethyl silicone) showed resolutions higher than 1.5 and retention factors lower than 15. The optimum chromatographic conditions were injector temperature 350 °C, 1.6 ml/min carrier gas flow, 2 μ l injection volume using a 3:1 split ratio and an oven isotherm temperature of 290 °C during 22 min; the possible compounds formed during the derivatization reaction were removed extending the temperature programme using a ramp of 5° C/min up to 300 °C for 15 min. This method has been successfully applied to RTE animal food samples.

1) M. Menéndez-Carreño; C. García-Herreros; I. Astiasarán; D. Ansorena. *Journal of Chromatography A*, 2008, 864, 61-68

REASSESSMENT OF THE CHOLESTEROL OXIDES Silyl DERIVATIZATION REACTION BY FACTORIAL DESIGN FOR THEIR DETERMINATION BY GAS CHROMATOGRAPHY



Lozada J.J.^{a,b}, Santos-Delgado, M.J.^a, Crespo-Corral, E.^a, and Polo-Diez, L.M.^a
 a. Analytical Chemistry Department, Chemistry Faculty, Complutense University, Madrid (Spain).
 b. Chemistry Department, Science Faculty, Nariño University, Colombia

INTRODUCTION

Cholesterol in the human diet is mainly the result of animal food sources being oxidized in the presence of oxygen, light, heat, radiation, free radicals and so on; its oxidation products form a group of cholesterol oxides (COPs) whose structure is similar to that of cholesterol but which can be potentially more harmful to our health than cholesterol. Consequently, interest in the toxicity of COPs has increased markedly in recent years, and it has been linked to the development of atherosclerosis and coronary heart diseases. Although some COPs can be detected by HPLC-UV, their sensitivity is quite low; so, gas chromatography, GC, methods are preferred although derivatization is required being silylation with Tri-Sil often used. However, their derivative compounds are difficult to separate and lack of resolution still remains, especially for the 6-Ket-7-Keto, and 7-Keto-25-OH critical pairs; the best separations seem to be obtained using polar columns. Regarding to the sample, processed meat can undergo oxidation during the pickled step yielding to COPs formation. The aim of this work was firstly, COPs separation by GC; secondly, identification of their structure by GC-MS and thirdly, the determination of COPs in pickled bovine meat samples. The COP studied were those generally appearing more frequently in these samples: 7 β -OH-cholesterol (7 β -OH); 5 β , 6 β -Epoxycholestan-3 β -ol (5,6 β); 5 α , 6 α -Epoxycholestan-3 β -ol (5,6 α); cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol (triol); 3 β -Hydroxy-5 α -cholestan-6-one (6-K); 3 β -Hydroxy-5-cholestan-7-one (7-K) and 25-Hydroxycholesterol (25-OH).

EXPERIMENTAL

Chromatographic Separation A column HP-1 (100% dimethyl silicone, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m) and a column HP-5 (95% methyl 5% phenyl silicone, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m) were used. The He flow was adjusted from the Van Deemter curve and the separation was optimized by adjusting the temperature programme.

Optimization of the Tri-Sil reaction In an amber vial, 40 μ L of each COPs and of 9,10-Difenil anthracene as IS were added (50 mg/L in isopropanol). The solvent was removed by an Ar flow. Then, 400 μ L of Tri-Sil were added, shaking strongly for 2 min in vortex. The design conditions specified in table 1 were applied. After getting room temperature, the mixture was blowed up to dryness again with Ar. Then, 400 μ L of hexane were added shaking strongly for 2 min in vortex. Then, the solution was filtered, injecting 2 μ L into the GC-FID.

Table 1. Experimental design

EXPERIMENTAL DESIGN	FACTORS	LEVELS	RESPONSE
A 3 ² FACTORIAL DESIGN WITH TWO CENTRAL EXPERIMENTS	T _{reaction} , °C	25	Relative Area Signal/Noise R _s of critical pairs
		45	
	t _{reaction} , °C	15	
		45	
		75	

Sample Preparation About 5 g of the commercial pickled meat were accurately weighed, the sample was macerated and homogenized, and then it was introduced in a 100 mL bottle with cover threads, 70 mL of chloroform were added and it was shaken during 18 hours. The extract was filtered through a 10 g anhydrous sodium sulphate cartridge. Chloroform was removed in rotavapor at 40 °C, the residue was dissolved in 6 mL of hexane, clearing the extract according to the method of Shu-Mei Lai (double extraction by solid phase)(1). Then, derivatization in the optimum conditions found after the experimental design were applied (T, 65 °C and 1, 40 min).

Analytical Parameters The analytical parameters, Linearity, LOD, LOQ, and Recovery were evaluated, according to the 96/23/CE directive (2).

Identification and Quantification In order to COPs identification, a Waters equipment, model GC-TOF premier was employed, using standard solutions and the NIST library. In order to COPs quantification an equipment GC-FID Hewlett Packard 5890 was used; 6-Ketocolestanol was employed as internal standard, IS.

RESULTS

Table 2. Chromatographic conditions

Column	T _{column} , °C	T _{injection} , °C	Split Ratio	T _{injection} , °C	Flow, mL/min	R _s	k
HP-1	290	300	3	300	1.6	>2.0	<15
HP-5	245	300	3	300	1.2	>1.5	>35

Analytical characteristics. Determination coefficients (R²) being higher than 0,996. LOD and the LOQ values were between 0,167-0,288 mg/L and 0,525-0,960 mg/L respectively. Recoveries were in the range 71,86-91,12 %.

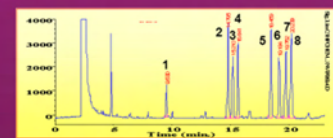


Figure 1. Chromatogram of COPs derivative standard mixtures using HP-1 column: 1, 9,10-DPA; 2, 7 β -OH; 3, 5,6 β ; 4, 5,6 α ; 5, Triol; 6, 6-K; 7, 7-K; 8, 25-OH.

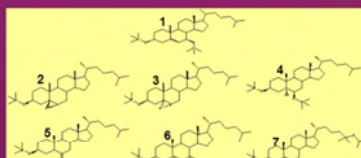


Figure 3. Structures of the COPs derivatives obtained by means GC-MS, 1, 7 β -OH; 2, 5,6 β ; 3, 5,6 α ; 4, Triol; 5, 6-K; 6, 7-K; 7, 25-OH

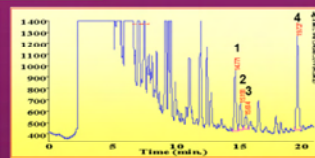


Figure 4. Chromatogram of a pickled meat sample: 1, 7 β -OH; 2, 5,6 β ; 3, 5,6 α ; 4, 7-K.

Derivatives of all the above COPs were identified and 7 β -OH; 2, 5,6 β ; 3, 5,6 α ; 4, 7-K, derivatives were quantified in pickled meat samples; their average amounts were 704; 302; 95 and 1715 ng/g sample, respectively, 7-K having the highest COP concentration.

Identification and Quantification

Optimization of the Derivation reaction

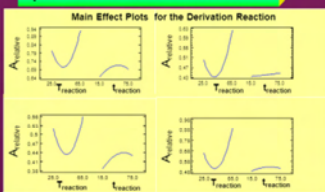


Figure 2. Graphs of main effects for the factorial design

COPs whose separation is difficult were selected for optimization propose, i.e. triol and especially the 6-Ket-7-Keto and 7-Keto-25-OH critical pairs. Main effect Plots for A_{relative} allowed the determination of the optimum conditions: T_{reaction} 65 °C and t_{reaction} 40 min. S/N response plots showed a similar behavior. The behavior for R_s response was reversed and changes were not significant.

CONCLUSIONS

- Best conditions for the COPs Tri-Sil derivative reaction were established by a 3² factorial design using the HP-1 and HP-5 columns and GC-FID, best results were found employing the HP-1 column, in isotherm mode, getting resolutions higher than 2.0 and retention factors lower than 15.
- Confirmation of the COPs derivative structures by GC-MS indicated a derivatization reaction of two OH groups for 7 β -OH, triol and 25-OH.
- The following COPs, 7-OH; 5, 6 β ; 5, 6 α and 7-K, were identified in all the studied pickled meat samples and they were also quantified. The 7-K COP was present at the highest concentration, significant concentrations of 7 β -OH, 5, 6 β and 5, 6 α were also found.

REFERENCES

1. Shu-Mei Lai, Ian Gray, and Matthew E. Zabik, Evaluation of Extraction and Gas Chromatography for Determination of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried Whole Egg, J. Agric. Food Chem., American Chemical Society 43, (1995), 1122-1126.
2. Directive 96/23/2002 of the European Community.

ACKNOWLEDGMENTS

•The present work has received financial support from Project S-0505/AGR-0314 (TEMINYSA/CM), funded by the Dirección General de Universidades e Investigación, Consejería de Educación, Comunidad de Madrid, SA. •We thank the Mass Spectrometry service of the Complutense University of Madrid, Spain.

**XV REUNIÓN
de la
SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**LIBRO DE
RESÚMENES**



Donostia-San Sebastián
19-21 de julio de 2009

COPs FORMATION HPLC MONITORING IN ELECTRON-BEAM IRRADIATED FOODS**J.J. Lozada-Castro, M. Gil-Díaz, M.J. Santos-Delgado, S. Rubio-Barroso, L.M. Polo-Díez***Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: mjsantos@quim.ucm.es*

Nowadays, changes in dietary habits have produced a high increase in the consumption of ready-to-eat (RTE) foods. Preparation of RTEs requires different treatments to minimize microbial contamination and to increase shelf-life. Electron-beam (E-beam) irradiation may be a useful anti-microbial technique, easy to apply in mass production and environmentally friendly, but food security also involves chemical control of RTEs [1,2]. During this treatment cholesterol could be oxidized, forming a group of oxides (COP) potentially more harmful than cholesterol itself. These oxides have received considerable attention in recent years because they have been associated with human diseases, such as inhibition of cholesterol biosynthesis, atherosclerosis, changes in membrane properties and carcinogenesis.

In the present work, COPs have been determined by HPLC with UV detection in two different RTE foods, "Soft cheese" and "Serrano ham", after treatment with E-beam. Firstly, these samples were prepared as thin slices and they were irradiated at different doses, 1, 2, 4, 6 and 8 kGy; the evolution of three COPs (25-hydroxycholesterol (25-OH), 7-ketocholesterol (7-Keto) and 6-ketocholestanol (6-Keto)) often found in processed foods was monitored. The analytical method was based on solvent extraction and clean-up by SPE. Recovery studies at three concentration levels were carried out and they were between 67 and 95%; relative standard deviation levels were, in general, lower than 10%.

COPs were detected after E-beam irradiation; the concentration levels of 25-OH and 7-Keto increased with the irradiation dose in the two kinds of RTE foods, above to 6 kGy dose. However, 6-Keto was not found in any of the samples analyzed.

[1] M. Gil-Díaz, M.J. Santos-Delgado, S. Rubio-Barroso, L.M. Polo-Díez. *Meat Science*, 82, (2009) 24-29

[2] N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 1433-1442



COPs FORMATION HPLC MONITORING IN ELECTRON-BEAM IRRADIATED FOODS

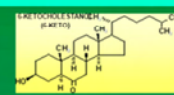
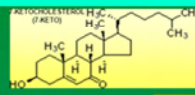
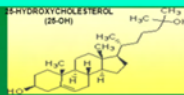
J.J. Lozada-Castro ^{a,b}, M. Gil-Díaz ^a, M.J. Santos-Delgado ^a, S. Rubio-Barroso ^a and L.M. Polo-Díez ^a

^a Analytical Chemistry Department, Chemistry Faculty, Complutense University, Madrid (Spain).

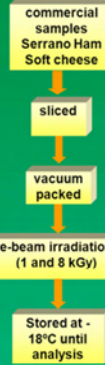
^b Chemistry Department, Science Faculty, Nariño University, Colombia

INTRODUCTION

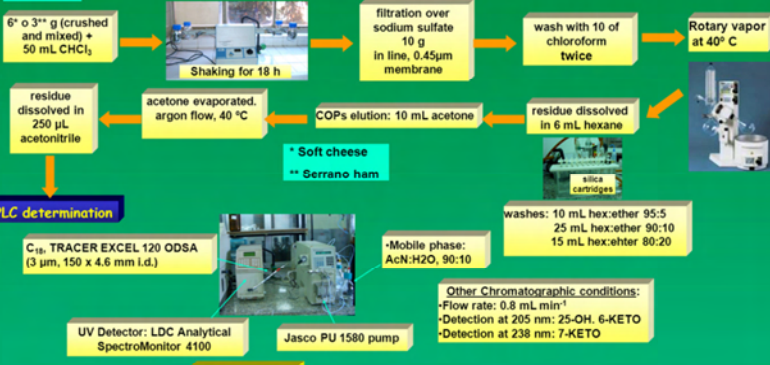
Nowadays, changes in dietary habits have produced a high increase in the consumption of ready-to-eat (RTE) foods. To increase RTE food shelf-life different treatments can be applied. Electron-beam (E-beam) irradiation it is used frequently to prepare RTEs preventing their microbial contamination; during this treatment cholesterol could be oxidized, forming a group of oxides (COPs) which are potentially toxic. The processed cheese can be considered as a stable product with a reasonable utility life time; however, it has been observed its tendency to form free radicals during processing (1). "Serrano" ham is characterized by a high content in intramuscular fat, and so many changes could occur in lipids during their processing, such as lipolysis oxidation reactions and changes related to cholesterol (2). In the present work, three COPs, 25-Hydroxycholesterol, 7-Ketocholesterol and 6-Ketocholestanol, have been determined by HPLC with UV detection in two different RTE foods, "Soft cheese" and "Serrano ham", after treatment with E-beam irradiation.



SAMPLE IRRADIATION



ANALYSIS



EXPERIMENTAL

RESULTS

Table 1. Analytical characteristics.

COPs	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	R ²	Recovery (%)	
				Cheese	Ham
25-OH	0.09	0.29	0.996	80.9	67.1
7-Keto	0.15	0.49	0.999	61.1	83.3
6-Keto	0.36	1.20	0.999	89.8	80.0

7-Keto at 238 nm, 6-Keto and 25-OH at 205 nm

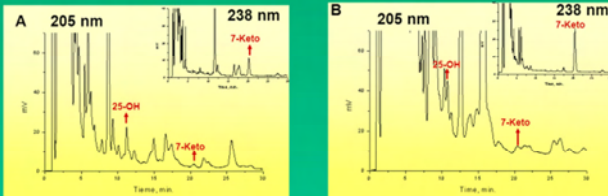


Figure 1. A- Chromatograms at 205 and 238 nm from a soft cheese sample; B- Chromatograms at 205 and 238 nm from a serrano ham sample.

Table 2. COPs content in cheese and ham samples. ng/g

Sample	COPs	IRRADIATION DOSES, kGy					
		0	1	2	4	6	8
Soft Cheese	25-OH	ND	493	320	379	556	562
	7-Keto	ND	134	134	139	203	196
Serrano Ham	25-OH	ND	57	NA	57	61	53
	7-Keto	110	327	NA	297	504	412

ND=not detected; NA=not analyzed, 7-Keto at 238 nm and 25-OH at 205 nm

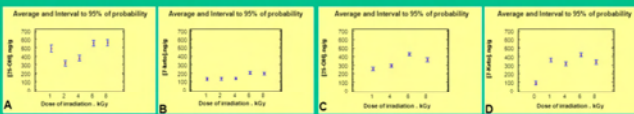


Figure 2. Average and interval graphs from ANOVA: A) 25-OH in soft cheese; B) 7-Keto in soft cheese; C) 25-OH in serrano ham; D) 7-Keto in serrano ham.

CONCLUSIONS

- The COPs concentration in both samples (soft cheese and serrano ham) increases with the irradiation, although amounts produced were not proportional to irradiation doses. Non irradiated serrano ham samples showed the presence of 7-KETO traces.
- Linearity from COPs standard solutions was observed in the range 1-100 mg/L for 25-OH and 7-Keto and 5-100 mg/L for 6-Keto, with R² around 0.999; recoveries were higher than of 67%; the method being adequate to analyze COPs in food samples.
- The mean concentrations and 95 % Tukey HSD intervals (ANOVA) for 25-OH and 7-Keto showed, in general, significant differences between irradiated and non irradiated cheese and ham samples.

REFERENCES

1. Dorthe Kristensen, Eva Hansen, Alan Amdal, Rikke Appeltgen Trinderup, Leif H. Skibsted. Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. International Dairy Journal 11 (2001) 837-843.

2. María J. Petron, José A. García Requero, Lourde Martín, Elena Muriel, Teresa Antequera. Identification and Quantification of Cholesterol and Cholesterol Oxidation Products in Different Types of Iberian Hams. J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 8786-8791.

ACKNOWLEDGMENTS

The present work has received financial support from:
- Project 8-0605/AGR-0314 (TEMNY/SACM), funded by the Dirección General de Universidades e Investigación, Consejería de Educación, Comunidad de Madrid, SA (Spain)

Image © Stadt Nürnberg, Domplatte Bf&E, Stone

3rd EuChEMs Chemistry Congress

Chemistry – the Creative Force

 29.08. – 02.09.2010 · NÜRNBERG · GERMANY



www.euchems-congress2010.org

PROGRAMME



STUDY OF THE EFFECT OF E-BEAM IRRADIATION ON THE COP FORMATION IN DIFFERENT FOODS BY GC/FID

Lozada-Castro, J. J.^a, Santos-Delgado M.J. and Polo-Díez L.M..

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.

^{a)} Chemistry Department, Science Faculty, Nariño University. Colombia

jjcc@hotmail.com

Cholesterol oxidation in food samples gives rise to a wide variety of secondary compounds, named Cholesterol Oxidation Products (COPs); more than 60 COPs have been identified which are potentially toxic to humans. Food processing techniques, including irradiation treatments, could increase its COP content.

Since animal food samples are very complex, COP sample preparation for chromatographic analysis requires multiple steps which explain that small improvements are introduced continuously depending on the sample.

In this research the following COPs (7 β -hydroxycholesterol (7 β -OH), Cholesterol 5 β , 6 β -epoxide (β -Epoxide), Cholesterol 5 α , 6 α -epoxide (α -Epoxide) Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol (triol), 5-Cholest-3 β -ol-7-one (7-Keto) and 25-hydroxycholesterol (25-OH)) have been determined in several food samples (cooked ham, Serrano ham, cheese and smoked salmon), before and after E-beam irradiation, by GC-FID after Trisil derivatization. Sample preparation was made by Accelerated Solvent Extraction (ASE) and a SPE clean up using silica and amino propyl cartridges.

Small differences in sample preparation and Specific COPs detected in the food sample depended on its composition. In non irradiated food from land animal origin, the following COPs were detected: 7 β -OH, β -Epoxide, α -Epoxide and 7-Keto which content depends on the particular food. However, in marine food (smoked salmon), the α -Epoxide and 7-Keto COP were not detected; but, the 25-OH COP appeared. In the case of soft cheese, the Triol COP was never detected. E-beam irradiation up to 8 kGy increased food COP content; significant differences between non irradiated and irradiated samples were confirmed by ANOVA analysis; COP levels were lower than those recommended by WHO and EU organisms.

—

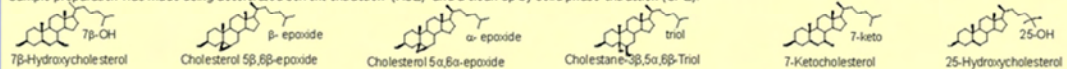
OXIDATION OF CHOLESTEROL INDUCED BY E-BEAM IRRADIATION IN FOODS



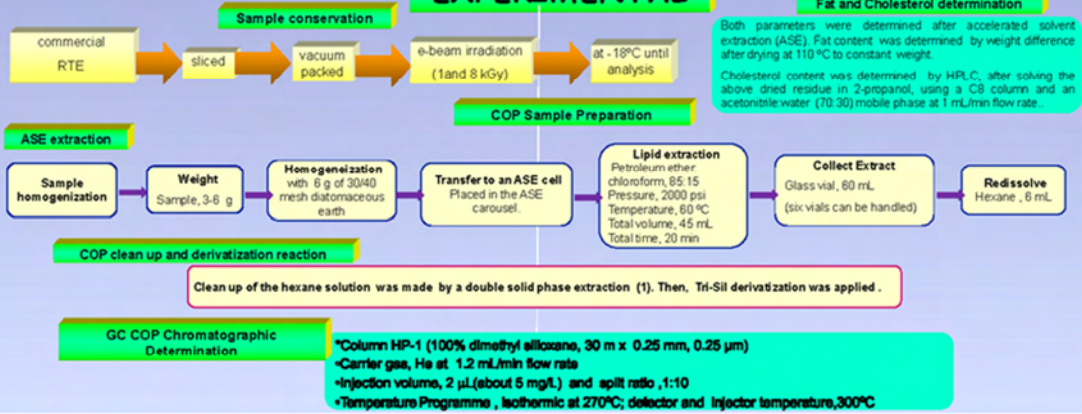
Lozada J.J.^{a,b}, Santos-Delgado, M.J.^a and Polo-Díez, L.M.^a
a. Analytical Chemistry Department, Chemistry Faculty, Complutense University, Madrid (Spain).
b. Chemistry Department, Science Faculty, Nariño University, Pasto (Colombia).

INTRODUCTION

Cholesterol is the major steroid of animal origin which produces many different metabolic functions. In the human diet is mainly the result of animal food sources being able to be oxidized in the presence of oxygen, light, heat, radiation, free radicals and so on, its oxidation products form a group of cholesterol oxides (COPs) whose structures are similar to that of cholesterol but which can be potentially more harmful to human health than cholesterol. Thus, the interest in COP toxicity has increased markedly in recent years. In the present work, the effect of e-beam irradiation on formation of seven COPs in Ready To Eat (RTE) food samples was evaluated by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). In the present work, the effect of e-beam irradiation on formation of seven COPs in Ready To Eat (RTE) food samples was evaluated by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), after derivatization with Tri-Sil. Sample preparation was made using accelerated solvent extraction (ASE) and a clean up by solid phase extraction (SPE).



EXPERIMENTAL



RESULTS AND CONCLUSIONS

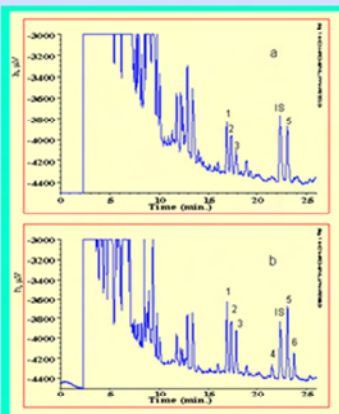


Fig 1. Chromatogram of Serrano ham samples: a-non irradiated, b-irradiated at 6 kGy 1. 7β-OH, 2. β-epoxide, 3. α-epoxide, 4. triol, 5. 7-keto and 6. 25-OH.

Analytical parameters were evaluated according to the 96/23/CE directive (2). ANOVA determination coefficients, higher than 0.996; LODs and LOQs, in the range 0.38-0.58 ng and 1.26-1.92 ng respectively. Recoveries, between 62.5 - 95.2 %. RSDs, from 2.1 to 14.5 % at 267 ng/g concentration level (n=3); values higher than 10 % were found for the most polar COPs, triol and 25-OH.

COPs in samples

- Cooked, Serrano ham and Soft cheese samples: the following COPs were quantified, 7β-OH, β-epoxide, α-epoxide and 7-keto
- Smoked salmon: only 7β-OH, β-epoxide and 25-OH were quantified

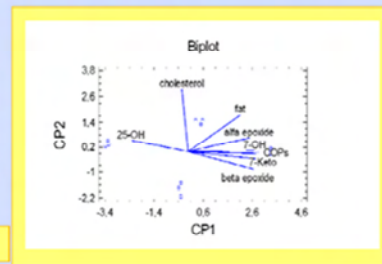


Figure 3. PCA showing that COP formation depends from fat content more than from cholesterol one.

E-beam irradiated effects on COP formation

- E-beam food irradiation can lead to COP formation; this process depends both from irradiated dose and food nature. COP content increased with irradiation dose; however, relationship was non linear.
- The highest COP content was for the 7-keto COP in all samples except in smoked salmon.
- COP formation is clearly related with fat and cholesterol content.
- Smoked salmon irradiated samples showed organoleptic characteristics quite different than those of non irradiated ones.

REFERENCES

1. Shi, Mei L. S., Ian Gray, and Matthew E. Zabit, Evaluation of Extraction and Gas Chromatography for Determination of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried Whole Egg. J. Agric. Food Chem., American Chemical Society 43, (1995), 1122-1126.
2. Directive 96/23/2002 of the European Community.

ACKNOWLEDGMENTS

*The present work has received financial support from Project S-0505/AGR-0314 (FEMINYSACM), funded by the Dirección General de Universidades e Investigación, Consejería de Educación, Comunidad de Madrid, SA.
 **We thank the Mass Spectrometry service of the Complutense University of Madrid, Spain.

Cholesterol oxides in irradiated raw and marinated pork loin

García Márquez, I., Escudero, R.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., Cambero M.I.
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de
Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
Lozada, J.J. Santos-Delgado, M.J., Polo-Díez, L.M. Departamento de Química Analítica.
Facultad de Químicas. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Application of traditional technologies for sanitizing sliced and packed raw meat portions is not feasible; however, radiation is a very effective way to eliminate pathogens present in these kinds of foods. However, some researchers have suggested that the use of this technology in meat products is limited because of resulting changes in the aroma, colour, and flavour, which can significantly affect consumer acceptance. Radiation could accelerate oxidation reactions and it may produce undesirable compounds such as cholesterol oxidation products (COPs). [1, 2] These compounds have received much attention due to their biological effects such as cytotoxicity, atherogenicity and changes in cellular membrane properties. In previous studies on pork loin we have optimized the electron-beam treatment to achieve an important increase of the shelf-life with negligible changes in the sensory attributes. Doses ≤ 2 kGy led to at least double the shelf-life maintaining consumer acceptance. The objective of the present study was to determine the effect of E-beam irradiation at low dose (1 and 2 kGy) on the COPs in vacuum packed raw and marinated pork loin slices.

Raw and marinated pork loin slices were vacuum-packed and irradiated under an electron beam radiation source (IONISOS sterilization SA, Tarancón, Cuenca Spain) which operated at 10 MeV. The dose absorbed (1 and 2 kGy) was calculated considering the absorbance of cellulose triacetate dosimeters irradiated simultaneously. The COPs were analyzed by CG-FID.

In raw loin control (untreated) 7 β -hydroxycholesterol, α -epoxicholesterol, β -epoxicholesterol, cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol) and 7-ketocholesterol, were found. However, in the marinated loin control samples, 7 β -hydroxycholesterol was only determined in significant amounts (> 0.5 ppm). The kinds of cholesterol oxides found in irradiated samples were basically the same than those found in untreated loin, but the total COPs contents in irradiated samples were higher. Different behaviour of the COPs in the raw and marinated loin samples was observed. In raw samples, a decrease of the 7 β -hydroxycholesterol and an increase of 7-ketocholesterol with increasing doses applied has been detected. However in marinated loins, irradiation treatment significantly ($p < 0.05$) increased the formation of 7 β -hydroxycholesterol, triol and α -epoxicholesterol.

Financed by projects AGL2007-65235-CO2-02, CARNISENUSA (CSD2007-00016), included in CONSOLIDER-INGENIO 2010 and UCM-BSCH 920276.

Literature:

[1] Ahn D U, Jo C, Du M., Olson D G, Nam K C. Meat Sci. 2000, 56, 203. [2] Maerker G, K.C. Jones K C. JAOCS. 1992, 69, 451



Cholesterol oxides in irradiated raw and marinated pork loin

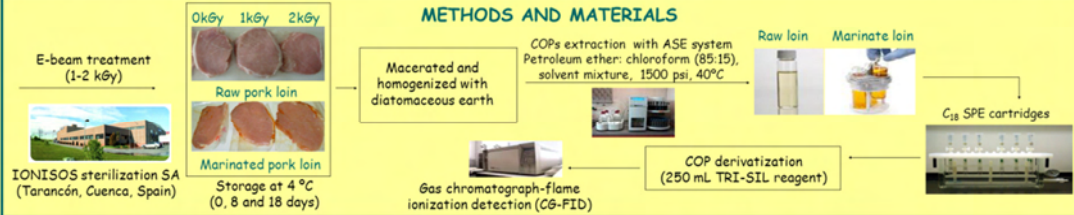
García-Márquez, I., Escudero, R.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., Cambero M.I. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
 Lozada, J.J., Santos-Delgado, M.J., Polo-Diez, L.M. Departamento de Química Analítica. Facultad de Químicas. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain



INTRODUCTION

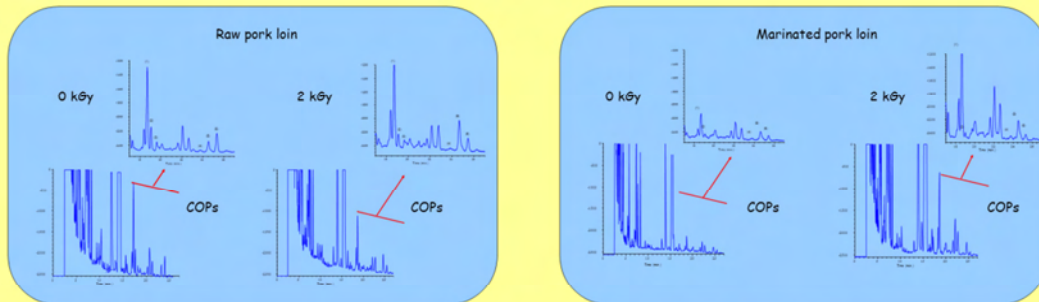
The application of traditional technologies for sanitizing sliced and packed raw meat portions is not feasible. However radiation is a very effective way to eliminate pathogens present in this kind of food^[1]. Nevertheless some researchers have suggested that the use of this technology in meat products is limited because of resulting changes in the aroma, colour and flavour, which can significantly affect consumer acceptance^[2]. Radiation may accelerate oxidation reactions and thus produce undesirable compounds such as cholesterol oxidation products (COPs)^[3,4]. Doses ≤ 2 kGy led to at least double the shelf-life while maintaining consumer acceptance. The objective of the present study was to determine the effect of E-beam irradiation at low doses (1 and 2 kGy) on the COPs in vacuum packed raw and marinated pork loin slices.

METHODS AND MATERIALS



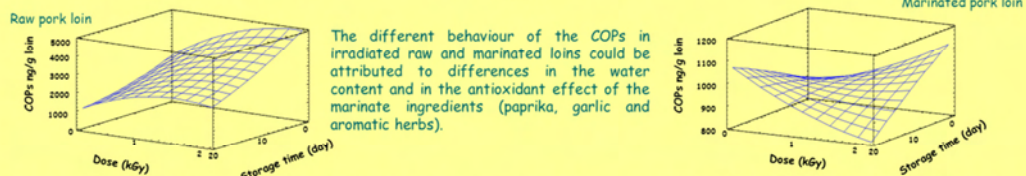
RESULTS AND DISCUSSION

Chromatograms from loin samples



COPs identified:
 (1) 7β-hydroxycholesterol, (2) Cholesterol 5β, 6β-epoxide, (3) Cholesterol 5α, 6α-epoxide, (4) Cholestane-3β, 5α, 6β-triol (Triol), (5) 6-ketocholestanol (Internal standard), (6) 7-ketocholesterol.

Response surface plots showing the effect of irradiation (kGy) and storage time at 4 °C (days) on total COP content



COPs (total content) = $2609,84 - 117,26 * t + 2369,83 * \text{dose} + 2,19 * t^2 - 591,59 * \text{dose}^2 - 32,23 * t * \text{dose}$
 $R^2 = 93\%$ (t: storage time)

COPs (total content) = $990,94 - 151,11 * \text{dose} - 3,43 * t + 124,22 * \text{dose}^2 + 0,35 * t^2 - 11,15 * \text{dose} * t$
 $R^2 = 82,27\%$ (t: storage time)

CONCLUSIONS

Cholesterol oxides found in irradiated samples (at 1 and 2 kGy) were basically the same as those found in untreated loin, but the total COP content in irradiated samples were higher. Different behaviour of the COPs in raw and marinated loin samples was observed. In raw samples, a decrease of the 7β-hydroxycholesterol and an increase of 7-ketocholesterol were detected as increasing doses were applied. However, in marinated loins, irradiation treatment significantly ($p < 0,05$) increased the formation of 7β-hydroxycholesterol, triol and α-epoxichoolesterol.

REFERENCES: [1] Mattison ML, Kraft AA, Olson DG, Walker HW, Rust RE and James DB. J. Food Sci. 1986, 51, 284. [2] Luchsinger SE, Kropf DH, Garcia Zepeda CM, Chambers IV E, Hollinsworth ME, Hunt MC, Marsden JL, Kastner CL and Kuecker WG. J. Food Sci. 1996, 61, 126. [3] Ahn D U, Jo C, Du M., Olson D G, Nam K C. Meat Sci. 2000, 56, 203. [4] Maerker G, K.C. Jones K C. JAOCS. 1992, 69, 451

ACKNOWLEDGMENTS: Financed by projects AGL2007-65235-CO2-02, CARNISENUSA (CSD2007-00016), CONSOLIDER-INGENIO 2010 and UCM-BSCH 920276

Organizan:



XXIX Congreso Latinoamericano de Química

CLAQ 2010

Industria Química y Recursos Naturales, Responsabilidad Global

www.claq2010.com
www.socolquim.com

XVI Congreso Colombiano de Química
6° Congreso Colombiano de Cromatografía

Septiembre 27 a Octubre 1° 2010
Centro de Convenciones
Cartagena de Indias-Colombia

Programa

Auspician:



Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación



Universidad de los Andes



ICETEX

Próximo evento



International Year of CHEMISTRY 2011



XXIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA
XVI CONGRESO COLOMBIANO DE QUIMICA -
VI CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRAFIA

DETERMINATION OF CHOLESTEROL OXIDE AMOUNTS IN MINCED BEEF SAMPLES BY GC-FID AND GC-MS. INFLUENCE OF E-BEAM IRRADIATION PROCESS

J. J. Lozada-Castro ^a, M.J. Santos-Delgado and L.M. Polo-Díez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.

^a) Chemistry Department, Science Faculty, Nariño University, Colombia
jjcc@hotmail.com

Keywords: Cholesterol oxides, E-beam irradiation, Accelerated solvent extraction

Introduction. Cholesterol in the human diet comes mainly from animal food sources. It is essential for some organism functions, however it is able to be oxidated under different conditions (in the presence of oxygen, light, heat, radiation, free radicals and so on) giving rise to cholesterol oxidation products (COPs) which can be potentially more harmful than cholesterol. For this reason, the interest regarding toxicity of COPs has increased markedly in the last years. COP content can be detected by using different techniques, HPLC and GC being the most widely used for food analysis; GC is preferred because its sensitivity and peak capacity are higher than by HPLC and identifications by MS are made easier, although a derivatization reaction is required.

In this work a new and faster chromatographic method for COP determination in minced beef samples by GC with Flame Ionization Detector (FID) is developed.

Methodology. The method is based on a rapid and semiautomatic extraction of COPs using accelerated solvent extraction, ASE, followed by a Solid Phase Extraction (SPE) using a double silica and amino-propyl cartridge for sample clean-up and derivatization with Tri-Sil; this reaction was optimized by factorial design.

Result and Discussions. A study of different columns (non polar stationary phases) and temperature programs for COP ester separation was carried out; semi-capillary and capillary columns, HP-5 and HP-1, and a FID detector were used. Chromatographic conditions were optimized and the ester separation was carried out in isotherm conditions, obtaining a complete resolution for derivative compounds which are difficult to separate; 6-Ketocholestanol (6-Keto) / 7-Ketocholesterol(7-Keto) and 7-Ketocholesterol / 25-Hidroxycholesterol (25-OH) critical pairs. The Tri-Sil reaction was optimized by a 3² factorial design reducing the number of experimental settings; the best conditions being reaction temperature 65°C and

reaction time 40 min. COP derivative structures were identified by mass spectrometry detection, GC-MS. Analytical characteristics were determined, detection limits being from 0.2 to 0.3 mg/L for standards. Recoveries were between 84 % and 111%, establishing the validity of the method. The following COPs, 7 β -Hydroxy-cholesterol, Cholesterol 5 β ,6 β -epoxide, Cholesterol 5 α ,6 α -epoxide and 7-Ketocholesterol were detected and quantified. A comparative study of the lixiviation and ASE extraction methods for sample preparation has been made. Formation and/or an increase in COP content after E-beam irradiation of minced beef sample was detected.

Conclusions. The proposed ASE method for sample preparation and further determination of COPs in minced beef samples is advantageous with respect to the lixiviation method; sample preparation time decreased by a factor of 7, solvent consumption was reduced by 50%, analyte extracts were cleaner and risks of contamination were lower also minimizing the use of chlorinated solvents.

The HP-1 capillary column in isothermal mode at 290 °C allowed separation of the usual critical pairs of Trisil esters, 6-Keto/7-Keto and 7-Keto/25-OH.

E-beam irradiation of minced beef samples increased COP content within the permitted range.

References. (1) Petró M. J, García Regueiro J. A., Martín L., Muriel E, Antequera T., (2003) Identification and Quantification of Cholesterol and Colesterol Oxidation Products in Different Types of Iberian Hams J. Agric. Food Chem. 51 5786-5791

(2) Lozada-Castro J. J., Santos-Delgado M.J., Crespo-Corral E. and Polo-Díez L.M. (2009). Reassessment of the cholesterol oxides silyl derivatization reaction by factorial design for their determination by gas chromatography. 16th European Symposium on Organic Chemistry. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Academy of Sciences of the Czech Republic Prague-Czech Republic, 12-16 July, P2.273.

Aquí pueden ir los patrocinadores, pero en las memorias

DETERMINATION OF COP AMOUNTS IN MINCED MEAT SAMPLES BY GC-FID AND GC-MS. INFLUENCE OF E-BEAM IRRADIATION PROCESS



Lozada J.J.^{a,b}, Santos-Delgado, M.J.^a and Polo-Diez, L.M.^a

^a Analytical Chemistry Department, Chemistry Faculty, Complutense University, Madrid (Spain).

^b Chemistry Department, Science Faculty, Nariño University, Colombia

INTRODUCTION

Cholesterol in the human diet is mainly the result of animal food sources; it can be oxidized in the presence of oxygen, light, heat, radiation, free radicals and so on; its oxidation products form a group of cholesterol oxides (COPs) which can be potentially more harmful to health than cholesterol. The COP content was determined by using different analytical techniques and methods. Minced beef was obtained by finely cutting and breaking muscles, fat and nerves by means of a chopper or knife. It is the main ingredient of hamburgers and meatballs and it is presented as ready to eat food (RTE). Because of its great surface, risk of bacteria contamination and oxidation processes exist changing its organoleptic and nutritional properties. Electron-beam (e-beam) irradiation can be used to remove microbial contamination of RTE food in order to lengthen its life. Food irradiation up to 10 kGy is accepted for commercial food processing in several countries (1,2). In this work, a new chromatographic method for the determination of seven cholesterol oxides (7 β -hydroxy-Cholesterol (7 β -OH), 5 β , 6 β -Epoxycholestan-3 β -ol (β -Epoxide), 5 α , 6 α -Epoxycholestan-3 β -ol (α -Epoxide), cholestan-3 β , 5 β , 6 β -triol (Triol), 3 β -Hydroxy-5 α -cholestan-6-one (6-Keto), 3 β -Hydroxy-5 α -cholestan-7-one (7-Keto) and 25-Hydroxycholesterol (25-OH)), most often found in foodstuffs of animal origin, is developed. It is based on a rapid Accelerated Solvent Extraction (ASE), Tri-Sil derivatization, which was optimized by factorial design, and GC-FID or GC-MS analysis. A comparative study of the leaching extraction and ASE methods for sample preparation had been made. Correlations between COP content s, e-beam irradiation dose and fat content were made.

EXPERIMENTAL

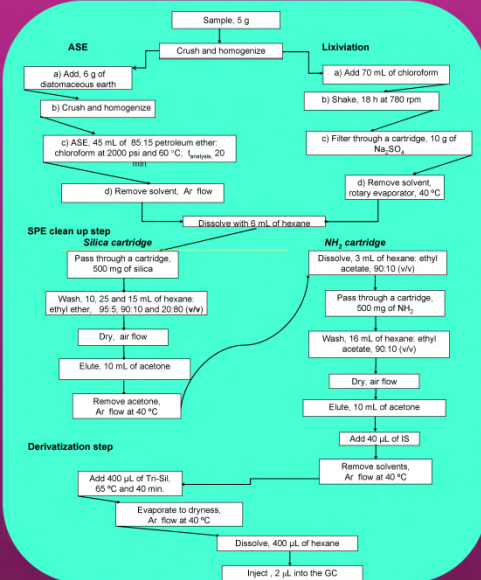
Chromatographic Separation

HP-1 column (100% dimethyl silicone, 30 m x 0.25 mm and 0.25 μ m); oven temperature, isothermic at 290 $^{\circ}$ C; detector and injector temperature, 300 $^{\circ}$ C; carrier gas, He at 1.6 mL / min; injection volume, 2 μ L and split ratio, 3:1.

Samples

Beef samples from a Madrid (Spain) supermarket were minced with an electric machine and vacuum packed in polystyrene bags, each bag containing 50 mg of raw beef. The samples were stored at -18 $^{\circ}$ C and protected from light until their analysis. Some of these samples were irradiated by e-beam.

Sample Preparation to Determine COPs



RESULTS

Analytical Parameters

COPs	Regression line	r ²	LOD, mg/L	LOQ, mg/L	R, %	
					ASE	Lixiviation
7 β -OH	Ar=0.1938x-0.026	0.9983	0.19	0.63	98.0	71.9
β -Epoxide	Ar=0.13x-0.0051	0.9968	0.29	0.96	84.0	72.4
α -Epoxide	Ar=0.1639x-0.0371	0.9980	0.21	0.69	89.5	76.1
Triol	Ar=0.2258x-0.0358	0.9965	0.19	0.52	91.0	91.1
7-Keto	Ar=0.1859x-0.0348	0.9989	0.25	0.83	92.5	84.9
25-OH	Ar=0.2313x-0.0628	0.9971	0.21	0.69	111.0	81.9

¹ Determination coefficient; ² limit of detection; ³ limit of quantification and ⁴ recovery. Linear range, 0.1 - 10 mg/L.

COP Analysis in Samples

Samples were analyzed by replicate (n=3). COP concentration was determined using the internal standard method by GC-FID. Both ASE and Lixiviation extraction methods were applied to all samples. Four COPs (7 β -OH, β -epoxide, α -epoxide and 7-Keto) were identified and quantified.

Irradiat. kGy.	COP concentration, ng/g (RSD), Lixiviation method					
	7 β -OH	β -Epoxide	α -Epoxide	Triol	7-Keto	25-OH
0	704(3.6)	302(11.9)	95(11.6)		1715(2.8)	
1	927(4.1)	384(5.9)	103(5.8)		1741(6.2)	
2	908(8.1)	473(4.8)	114(6.1)		1933(5.5)	
4	972(4.8)	420(8.3)	104(8.6)	ND	1779(2.0)	ND
6	1000(0.7)	420(3.3)	159(2.0)		1978(5.0)	
8	898(7.0)	457(3.3)	115(7.8)		2030(6.8)	
Irradiat. kGy.	COP concentration, ng/g (RSD), ASE method					
	7 β -OH	β -Epoxide	α -Epoxide	Triol	7-Keto	25-OH
0	743(6.0)	644(4.2)	194(9.4)		1955(4.2)	
1	1186(5.8)	1216(7.4)	315(7.4)		2648(6.9)	
2	1296(4.5)	1074(3.9)	242(5.0)		2825(6.6)	
4	1270(3.3)	1015(8.7)	284(13.4)	ND	2644(4.0)	ND
6	1496(8.0)	1175(13.7)	454(14.9)		3470(7.4)	
8	1145(5.3)	904(7.8)	330(2.8)		2779(6.0)	

Lipid Content

was determined by ASE, using petroleum ether as a solvent. This content was compared with that obtained using lixiviation. Results obtained by ASE were lower than those obtained by lixiviation, which used chloroform; because chloroform is more polar than petroleum ether cleaner chromatograms were obtained by ASE minimizing protein and carbohydrate extractions.

CONCLUSIONS

- Four COPs, 7 β -OH, β -epoxide, α -epoxide and 7-Keto, were identified and quantified in all meat samples. 7-Keto was present at the highest concentration; significant concentrations of 7 β -OH, β -epoxide and α -epoxide were also found.
- Triol, 6-Keto and 25-OH were not detected in any sample; therefore, 6-Keto was used as IS. Recoveries were between 70-90% for the Lixiviation method and 84-111% for ASE with RSD between 4.5% and 14%.
- COP contents increased in irradiated minced beef, although no linear relationship between irradiation doses and COP concentration were observed.
- Detected COP levels were about 100 times lower than those established as toxic in vitro and in vivo experiments (4,5); thus, E-beam irradiation could be useful for minced beef RTE sanitization purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

The present work has received financial support from: Project S-0505/AGR-0314 (TEMINSA/CM), funded by the Dirección General de Universidades e Investigación, Consejería de Educación, Comunidad de Madrid, SA.
-To the (CAI) mass service of the UCM.

BIBLIOGRAPHY

- 23.K.T. Hwang and G. Maerker, Quantitation of Cholesterol Oxidation Products in Unirradiated and Irradiated Meats, *JAOCs*, 70 (4) (1993) 371-375.
- M. Gil-Diaz, M.J. Santos-Delgado, S. Rubio-Barroso, L.M. Polo-Diez, Free D-amino acids determination in ready-to-eat cooked ham irradiated with electron-beam by indirect chiral HPLC, *Meat Science*.
- Directiva oficial 96/23/CE del Consejo en Cuanto al Funcionamiento de los Métodos Analíticos y la Interpretación de los resultados, Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2002/67/CE).
- S. Doeringer, L. Luf, V. Brandt, E. Gysler, Oxidation: their occurrence and biological effects, *Int. Dairy J.* 3 (1993) 1-33.
- S. June Liu, Courtney Netherland, Theresa Pickle, Michael S. Sosnaky, Douglas P. Theeke, Stimulation of Akt poly-ubiquitination and proteasomal degradation in P388D1 cells by 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 487 (2009) 54-58.



XXIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA
XVI CONGRESO COLOMBIANO DE QUIMICA -
VI CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRAFIA

EFFECT OF ELECTRON-BEAM IRRADIATION ON CHOLESTEROL OXIDE FORMATION IN
DIFFERENT READY-TO-EAT FOODS

J. J. Lamas-Castro¹, M. Gil-Díez, M.J. Santos-Delgado, S. Rubio-Hernanz and L.M. Fuze-Díez
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.

² Chemistry Department, Science Faculty, Nariño University, Colombia

mjsantos@quim.ucm.es

Keywords: Cholesterol oxides, E-beam irradiation, Ready-to-Eat Food

Introduction. Nowadays, changes in dietary habits have produced a high increase in the consumption of prepared food. This has led to the development of a great variety of ready-to-eat (RTE) foods whose preparation involves handling of samples. This process may result in microbial contamination; consequently, it is necessary to eliminate potential contaminants. An efficient technique in preventing the growth of spoilage microorganisms is E-beam irradiation (1).

The susceptibility of cholesterol to oxidation, which gives rise to cholesterol products (COPs), is well known. COPs have received great attention in recent years because of their biological activities which are associated with human diseases. On the other hand, E-beam irradiation generates free and free radicals which may cause oxidative phenomena; unsaturated fat acids are the most affected components, producing lipid oxidation which gives rise to COPs.

Sample preparation for COP chromatographic quantification in food samples is difficult; COPs are present at low concentration levels and have similar polarity to lipids. COP content has been determined by using HPLC and GC, although the latter technique requires derivatization. However, HPLC-UV could be useful for those COPs which have enough absorbance. Some COPs are susceptible to oxidation loss and degradation during sample preparation.

The object of this study was to research the effect of E-beam irradiation on COP formation in several food samples of animal origin. Optimization of a simple and gentle COP preparation method valid for 25-Hydroxycholesterol (25-OH), 7-Hydroxycholesterol (7-Keto) and 8-Hydroxycholesterol (8-Keto) RTE was carried out.

Methodology. Three COPs, 25-OH, 7-Keto and 8-Keto were extracted together with the lipid fraction using chloroform and hexane, COPs were isolated by clean up

using SPE with silica cartridges and they were analyzed by HPLC-UV (2).

Results and Discussions. The validity of the method was established by precision and recovery studies. Correlations between lipids and produced COPs were established. Sample particle size seems to be an important factor. Differences between irradiated and non irradiated COP content were analyzed by ANOVA analysis.

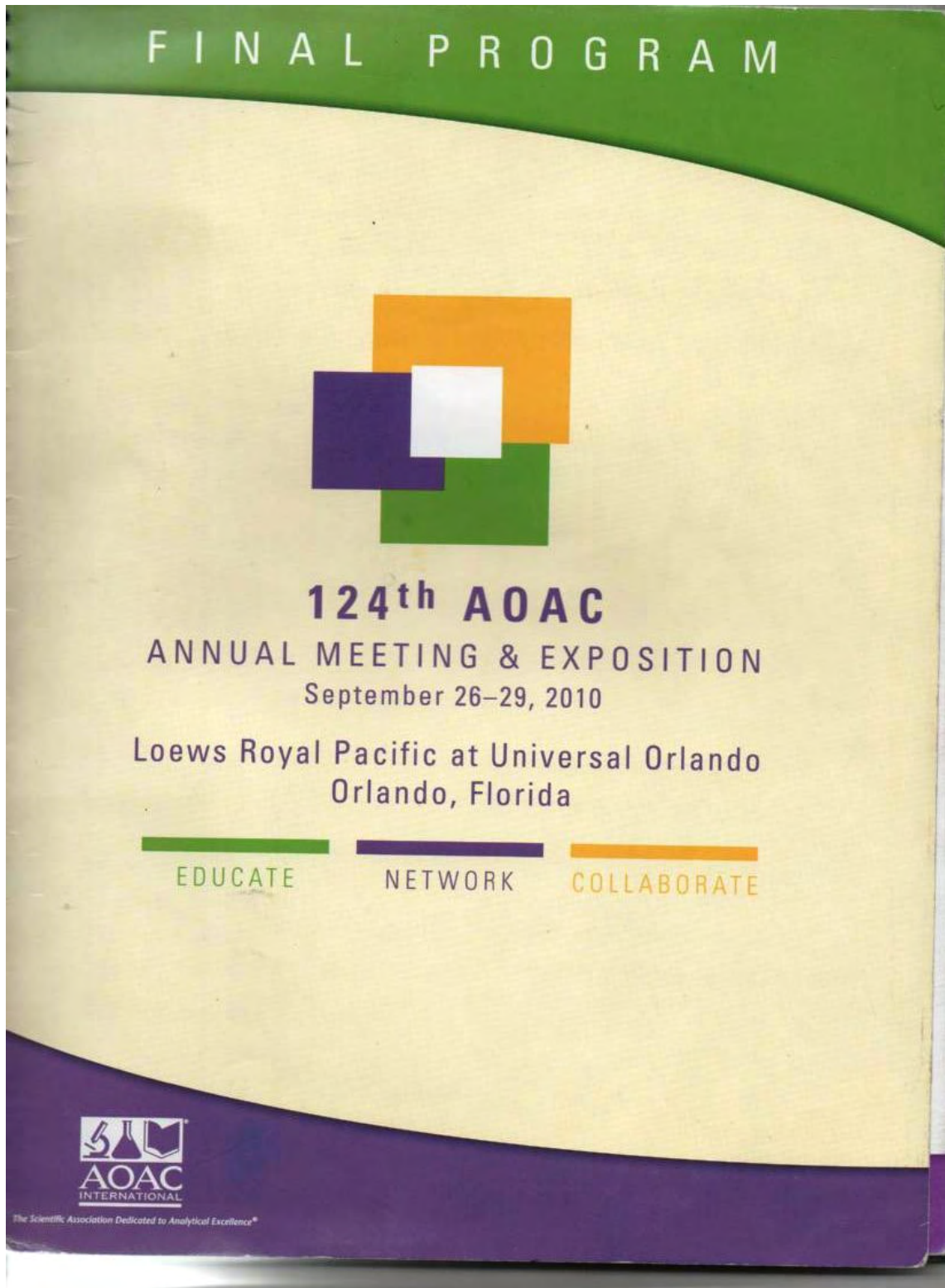
Conclusions. In general, 7-Keto and 25-OH COP content increased along with an increase in irradiation dose for all types of food, although the increase was not linear. The 8-Keto COP did not appear in any samples of any of the irradiation doses applied from 1 to 8 kGy. Results indicated that the oxidizing reaction effect depends on the RTE food composition.

After E-beam irradiation up to 8 kGy COP content is below the amount recommended by the European Union Directive 2002 and 2004.

References. (1) Kim, L., Castro, M.J., Gil-Díez, M.J., Hernanz, S., Rubio-Hernanz, S. & Gallo, J.A. (2002). Evaluation of lipid susceptibility to unsaturated lip-oxidation loss by E-beam irradiation. *Journal of Food Protection*, 75(12), 2001-2004.

(2) Gil-Díez, M., Santos-Delgado, M.J., Rubio-Hernanz, S., Fuze-Díez, L.M. (2007). HPLC-UV method for the determination of cholesterol oxides in irradiated foods. *Euroanalysis XIV*. Amberes (Bélgica), EuChemS, 464.

Aquí pueden ir los patrocinadores, pero en las memorias



of the Agilent 7700x, using the inert gas helium, allows for elimination of polyatomic species such as ArC⁺, ClO⁺, ArCl⁺, and ArAr⁺ that otherwise interfere with the trace level measurement of Cr, V, As, and Se respectively. In addition, the high temperature, highly robust plasma minimizes matrix suppression while maintaining ionization efficiency for those elements that are difficult to ionize, such as As, Se, Cd, & Hg, resulting in the lowest possible detection limits. High matrix tolerance and simple, efficient polyatomic interference removal are essential for the analysis of trace elements in food and beverage digestates to assure accuracy and productivity in the food laboratory.

PRESENTER: Amir Liba, Agilent, 2850 Centerville Rd., Wilmington, DE, 19808, USA, Phone: 302-636-1530, Email: amir_liba@agilent.com

P-W113

Jack Lohne, Shaun MacMahon, Animal Drug Research Center, U.S. Food and Drug Administration, Denver, CO, USA:

Optimization and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Detection of Nitrofurán Metabolites in Shrimp

A method was developed to detect nitrofurán metabolites in shrimp. Residues were extracted from tissues with 0.125 M hydrochloric acid and derivatized with 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA). After pH adjustment, the aqueous samples were washed with n-hexane and the derivatized nitrofurán metabolites were isolated by partitioning into ethyl acetate. Extracts were analyzed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using atmospheric pressure chemical ionization (APCI). The method was validated by using shrimp fortified with four different nitrofurán metabolites over a concentration range of 0.5-3.0 ng g⁻¹. Average recoveries (when compared to extracted matrix standard calibration curves) of the nitrofurán metabolites over the entire concentration range analyzed were 101.1% (11.1% RSD) for 1-aminohydroxy-dantoin (AH), 98.7% (11.4% RSD) for 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 95.4% (16.4% RSD) for semicarbazide (SC) and 99.4% (16.5% RSD) for 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ). The method can detect, quantify and confirm the identity of all four nitrofurán metabolites at a concentration of 1 ng g⁻¹.

PRESENTER: Jack J. Lohne, Animal Drug Research Center, U.S. Food and Drug Administration, 6th Ave. & Kipling St. Bldg. 20, Rm. H1311, HFR-SW280, Denver, CO, 80225, USA, Phone: 303-236-9612, Email: jack.lohne@fda.hhs.gov

P-W114

Maria Jesus Santos-Delgado, Luis Maria Polo-Diez, Complutense University, Madrid, Spain; Juan Jose Lozada-Castro, Nariño University, San Juan de Pasto, Colombia:

Study of COP Changes during Sample Preparation for Chromatographic Analysis

The importance of cholesterol for human health is well known. The cholesterol can be oxidized forming a lot of compounds oxides products (COPs) which can be potentially more harmful than the own cholesterol. Analytical techniques more useful for COP determination in food samples are HPLC and GC which require complex preparation methods ending with a clean up step using SPE. In this work several changes of COPs using different cartridges was carried out. Some COP changes were observed for Triol in the normal phase (silica and amino propyl cartridges) and for α - and β -epoxycholesterol in the reverse phase (C18 and C8 cartridges). SPE include concentration to dryness steps, in which traces of fatty acids and water from samples and solvents can change pH, affecting COP analyses. Besides, COP determination by GC require derivatization using reagents as Tri-Sil whose water traces can give H⁺, fragmenting the derivatives. A C18 cartridge using acetonitrile and methanol was selected because it reduced notably the solvent volume and their analysis time in the clean-up step. The pH effect can be avoided adding buffer at pH 7.0 during the process. Good recoveries for all COPs in Serrano ham samples studied were obtained. The new method for COP determination improves remarkably the analytical results.

PRESENTER: Juan Jose Lozada-Castro, Nariño University, Science Faculty, San Juan de Pasto, 27311449, Colombia, Phone: 73-13106, Email: jjlccc@hotmail.com

P-W115

Pierre Metra, Silliker Group Corp., Cergy, France; Paolo Matteini, Francesco Rosi, Alessandro Miniati, Tommaso Cafissi, Gianna Salvatici, Chiara Bondi, Silliker Italia SpA, Prato, Italy:

A New Method for the Analysis of the Antimycotic Griseofulvine

Griseofulvine is a widely used mitotic inhibitor derived from the mold *Penicillium griseofulvum*. The original scope of the Quechers extraction methodology - pesticides residues - has been extended to a wide range of organic contaminants over the past 2-3 years. The poster describes the use of the Quechers method coupled with LC-MS triple quadrupole to analyse Griseofulvine residues in food products. Validation data will be shown, they include recoveries of 95-110 % in the range 5-100 microg/



EFFECTS ASSOCIATED ON CHOLESTEROL OXIDES (COPS) ANALYSIS IN FOOD COMPLEX MATRIX

Lozada, J. J.^a, Santos-Delgado, M. J., Polo-Diez, L. M. Department of Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; ^aDepartment of Chemistry, Nariño University, Colombia

INTRODUCTION

Cholesterol oxidation products (COPs) can be formed in food by temperature treatment, irradiation effects and any mismanagement in food manufacturing processes [1,2]. A large number of analytical methods have been developed which allow us partial knowledge of the behaviour of these compounds. In particular, gas chromatography (GC) requires careful sample preparation; most sample clean up treatments are performed by solid phase extraction (SPE) using different cartridges; however, COP transformations may occur depending on the cartridge packing nature[1-4]. In this work, a study of COP transformations in Serrano ham, raw pork loin and smoked salmon samples have been carried out by comparing results obtained using SPE cartridges making clean up in two ways; firstly, in the usual way by eluting the retained COPs and secondly, collecting several eluted fractions from the cartridges. Several packings and elution solvents were tested. COPs studied were: 7 β -hydroxycholesterol, Cholesterol 5 β , 6 β -epoxide (β -Epoxide), Cholesterol 5 α , 6 α -epoxide (α -Epoxide), Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol (Triol), 6-Ketocholestanol (6-Keto), 7-Ketocholesterol (7-Keto), 25-hydroxycholesterol (25-OH) and Cholesterol. Their esters obtained by derivatization with Tri-Sil were monitored by GC-FID. Low recoveries for some COPs were obtained by SPE working in the usual way. Analysis of eluted fractions collected from the cartridges allowed the detection of COP transformations.

Table 1. Clean up test by SPE in usual mode to analyze COPs

Test	Initial COP solvent	Cartridge	Cartridge conditioning	Washing	Elution solvent
A	Hexane 5 mL	Silica	Hexane 5 mL	diethyl ether (90:10) 10 mL	Acetone 10 mL
B	Hexane 5 mL	Ambio Propyl	Hexane 5 mL	diethyl ether (90:10) 10 mL	Acetone 10 mL
C	ACN:EtO (70:30) 5 mL	C ₁₈	ACN:EtO (50:50) 3 mL	ACN:EtO (70:30) 10 mL	ACN:EtO (80:20) 10 mL
D	ACN:EtO (90:10) 5 mL	C ₁₈	ACN 3 mL	ACN 5 mL	MeCN 10 mL

PROCEDURES

Chromatographic conditions
Injector and detector temperature, 300 °C; carrier gas, He at 1.2 mL/min flow rate; injection volume, 2 μ L; split ratio 1:3; oven temperature, 270 °C; analysis time 30 min.

Sample clean up by SPE in usual mode

An aliquot of a standard mixture solution of the above mentioned COP + cholesterol at 2 mg/L concentration level was passed through the cartridge. After retaining the COPs in the cartridge, it was washed and dried by passing an Ar flow before elution. COPs were eluted and silyl derivatization was made. Details of the tests are showed in Table 1.

Sample clean up by SPE in fractions collecting mode

An aliquot of each standard solution of the above mentioned COP + cholesterol at 2 mg/L concentration level was passed through the cartridge. Fractions, at different times, were collected without drying, using the same total elution volume as above in usual mode; the solvent was evaporated, dissolved in hexane and derivatized with Tri-Sil before GC-FID. Details are showed in Table 2.

Table 2. Clean up test by SPE in fractions collecting mode to analyze COPs

Test	Initial COP solvent	Cartridge	Cartridge conditioning	Washing	Elution solvent
E	Hexane 5 mL	Silica	Hexane 5 mL	diethyl ether (90:10) 10 mL	Acetone 10 mL
F	Hexane 5 mL	Ambio Propyl	Hexane 5 mL	diethyl ether (90:10) 10 mL	Acetone 10 mL
G	ACN:EtO (70:30) 5 mL	C ₁₈	ACN:EtO (50:50) 3 mL	ACN:EtO (70:30) 10 mL	ACN:EtO (80:20) 10 mL
H	ACN:EtO (90:10) 5 mL	C ₁₈	ACN 3 mL	ACN 5 mL	MeCN 10 mL

RESULTS AND DISCUSSION

SPE IN USUAL MODE

Table No 3. COP recoveries (%) from a standard mixture solution at 25 μ g/L

Experiment	7- β OH	β -Epoxide	α -Epoxide	Triol	6-Keto	7-Keto	25-OH
A	80,4	95,7	99,6	60,4	101,1	98,0	85,1
B	82,2	101,6	90,9	56,2	102,2	95,8	83,7
C	97,9	45,6	70,8	102,9	96,7	94,7	116,2
D	100,7	96,6	98,6	102,3	99,6	96,5	103,8

Triol recoveries in tests A and B were very low (60 and 56%). In test C, β and α -Epoxy recoveries were relatively low. Best recoveries were obtained in test D. Cholesterol recoveries were close to 100% in all cases. Consequently, conditions of experiment D were selected to analyze studied samples.

SAMPLE ANALYSIS AFTER D AND/OR G CLEAN UP

Results obtained applying clean up experimental conditions indicated in test D and G to Serrano ham and raw loin samples, both spiked at 25 μ g/L COP concentration level showed that chromatograms are quite clean, and recoveries were above 74%, thus minimizing COP transformations.

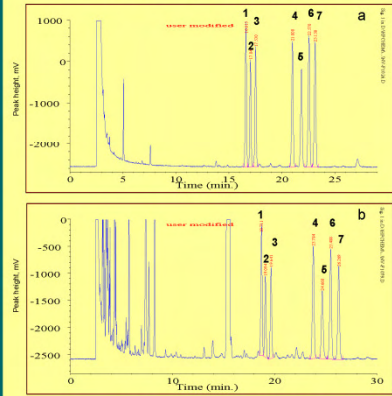


Figure 2. Chromatogram from a) Serrano ham b) raw pork loin, both 1. 7 β -OH; 2. β -Epoxide; 3. α -Epoxide; 4. Triol; 5. 6-Keto; 6. 7-Keto; 7. 25-OH.

SPE IN FRACTIONS COLLECTING MODE

Tests E and F. Elution curves from 7 β -OH, β -Epoxide, 7-Keto, 25-OH and α -Epoxide showed Gaussian habits and high recoveries. The elution by Triol and 6-Keto was not Gaussian, recoveries being very low for Triol and higher than 100% for 6-Keto indicating Triol transformation into 6-Keto.

Test G. Gaussian curves were obtained for all COPs; recoveries (Figure 1) being in the range 81-94%. However, the presence of water is a difficulty for silyl derivatization.

Test H. COP behaviour was non-Gaussian. Low recoveries for β and α -Epoxide (70.7 and 34.2%) were found and for other COPs recoveries were higher than 100% indicating partial transformations.

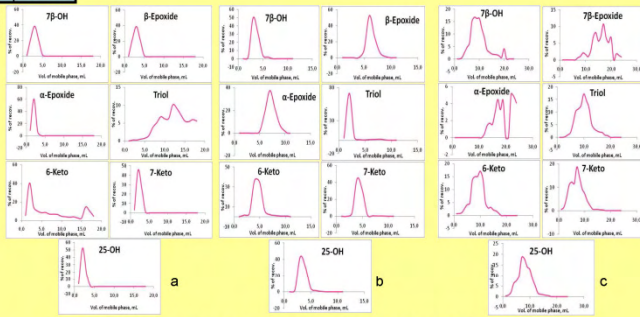


Figure 1. COP behaviour by SPE in fractions collecting mode using different cartridges: a) silica and aminopropyl; b) C₁₈ and c) C₁₈.

Table 4. COP recoveries and their RSD values (%) after spiking with a standard mixture solution at 25 μ g/L; n=3; R, Recovery; RSD, Relative Standard deviation

COPs	Serrano Ham		Raw Loin	
	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %
7- β OH	93,5	5,4	75,6	7,5
β -Epoxide	87,7	3,7	73,8	5,9
α -Epoxide	81,5	2,3	82,6	9,9
Triol	99,1	6,0	98,7	7,7
7-Keto	92,2	7,0	93,1	5,1
25-OH	89,9	3,8	94,0	8,2

CONCLUSIONS

COP transformations were detected during clean up using SPE cartridges for GC analysis.

These transformations were clearly visualized from elution curves in SPE fractioning collecting mode which were well and badly defined Gaussians; when transformations are clear, two nodules appeared.

Specific COP transformations, mainly triol to 6-Keto and α -Epoxide and β -Epoxide to triol were found.

COP transformations were minimized and good recoveries were found from very rich cholesterol samples using C18 cartridges and adjusting carefully pH and elution volumes which were about 20%.

Cleaning steps lower than those used in other existing methods were necessary.

REFERENCES: [1] S. J. Hur, G. B. Park, S. T. Joo, Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products, Food Control, 18 (2007) 939-947 [2] A. Alfonso Valenzuela B., Julio Sanhueza C. y Susana Nieto K., Cholesterol Oxides (Oxisterols): Factors Conditioning their Formation, Biological Effects and Content in Foods, Rev Chil Nutr. Vol. 29, No. 2. (Agosto 2002) 1-14 [3] María Menéndez-Carriño, Cecilia García-Herreros, Iciar Astiáriz, Diana Ansorena, Validation of a Gas Chromatography-Mass Method for the Analysis Sterol Oxidation Products in Serum, Journal of Chromatography B, 864 (2008) 61-68. [4] Ulbricht, F., Rossler, D. Comparison of solid-phase extraction methods for the cleanup of cholesterol oxidation products, J. Agric. Food Chem., 46 (1998) 2634-2637.