



Universidad
Zaragoza



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Comportamiento de un nuevo biomaterial industrial en la producción de alimentos

Autor: María Solana Castells

Directora: Cristina Nerín De La Puerta

Elena Canellas Aguarales

Departamento Química Analítica, grupo GUIA. Universidad de Zaragoza.

2020/2021

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	3
1. Introducción	4
1.1 Migración de sustancias NIAS	4
1.2 Legislación Europea y Nacional	6
1.3 Polímeros biobasados y biodegradables	7
1.4 Técnica HS-SPME-GC-MS y UPLC-IM-Q/TOF.....	9
2. Objetivos y planteamiento.....	12
3. Materiales y desarrollo experimental.....	13
3.1 Materiales y reactivos.....	13
3.2 Instrumentación	15
3.3 Desarrollo experimental	16
3.3.1 Comparación entre fibras.....	16
3.3.2 Identificación y confirmación por HS-SPME-GC-MS	17
3.3.3 Optimización de los parámetros de SPME.....	17
3.4 Ensayos de migración en agua y té verde	18
3.4.1 Identificación de compuestos migrantes por HS-SPME-GC-MS.....	18
3.4.2 Identificación de compuestos migrantes por UPLC-IM-Q/TOF	19
3.5 Preparación de las rectas de calibrado para compuestos volátiles y no volátiles.....	19
4. Resultados	20
4.1 Comparación entre diferentes tipos de fibra	20
4.2 Confirmación de los compuestos identificados por HS-SPME-GC-MS	21
4.3 Optimización por diseño factorial.....	22
4.4 Identificación de los compuestos migrantes por ambas técnicas.....	23
4.4.1 Identificación de compuestos volátiles por HS-SPME-GC-MS.....	23
4.4.2 Identificación de compuestos no volátiles por UPLC-IM-Q/TOF	23
4.5 Cuantificación de los compuestos migrante.....	24
4.5.1 Cuantificación de compuestos volátiles	24
4.5.2 Cuantificación de compuestos no volátiles	24
5. Conclusiones	25
6. Bibliografía	26
ANEXOS	28

Resumen

Debido a la gran importancia que supone actualmente la seguridad alimentaria y la concienciación pública en lo relacionado a materiales biodegradables y el cuidado del medioambiente, en este estudio se evaluó las migraciones de compuestos no intencionadamente añadidos (NIAS) provenientes desde un laminado multicapa, formado por biopolímeros como el PLA y Ecovio utilizados en la fabricación de tazas de té, junto con un adhesivo biodegradable en base acuosa, cuando estos se encuentran en contacto con agua y té. Para ello se utilizaron dos técnicas analíticas, HS-SPME-GC-MS y UPLC-IM-Q/TOF, con las cuales se identificaron y cuantificaron compuestos migrantes. Además, se realizó una comparación entre diferentes tipos de fibras y se optimizaron las condiciones más óptimas de la extracción por SPME.

Analizando los resultados obtenidos, se observó la presencia de cinco oligómeros cíclicos no volátiles en muestras de té al utilizar Ecovio®. También, la presencia de compuestos volátiles como 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona utilizando el mismo biomaterial. Todos ellos superaban el 0.01 mg/Kg de alimento o simulante alimenticio que se establece como límite para estos compuestos.

Abstract

Due to the great importance that currently supposes food safety and public awareness in relation to biodegradable materials and care for the environment, in this study the migrations of nonintentionally added substances (NIAS) from a multilayer laminate, formed by biopolymers such as PLA and Ecovio® used in the manufacture of tea cups, with a water-based biodegradable adhesive, when these are in contact with water and tea. For this, two analytical techniques were used, HS-SPME-GC-MS and UPLC-IM-Q / TOF, compounds were identified and quantified, respectively. In addition, a comparison was made between different types of fibers and the best optimal conditions of the extraction by SPME were optimized.

Analyzing the results obtained, the presence of five non-volatile cyclic oligomers was observed in tea samples using Ecovio®. Also, the presence of volatile compounds such as 1,6-Dioxacyclododecane-7,12-dione using the same biomaterial. All of them exceeded the 0.01 mg / Kg of food or food simulant that is established as a limit for these compounds.

1. Introducción

1.1 Migración de sustancias NIAS

En lo que respecta al envasado de los alimentos, el envase representa una de las tres partes que conforman un producto envasado, junto a el producto y al entorno que rodea al envase. Estos se utilizan para proteger al propio alimento, así como para conservar su calidad, sus características e integridad. Es por ello, que estos deben llevar un estricto control para asegurar que el contacto entre ellos y el alimento no supone ningún riesgo en la salud de los consumidores (Enguita Rupérez, 2020).

En la actualidad existen diversos materiales plásticos utilizados en la fabricación de estos envases como pueden ser el polietilentereftalato (PET), el polietileno de alta densidad (HDPE) y de baja densidad (LDPE), así como, poliestireno (PE), polipropileno (PP) o poli(ácido láctico), conocido como PLA, entre muchos otros. Por otro lado, muchos de los envases utilizados en la industria alimentaria requieren características concretas como puede ser, alta barrera a gases como el O₂, CO₂, H₂O, etc, o aromas, resistencia química, sellabilidad, propiedades de forma o contracción y es por ello que habitualmente se utilizan materiales multicapa debido a que, ningún material por sí solo puede otorgarles estas características. Estos materiales están formados por múltiples capas de polímero unidas por adhesivos, el cuál puede aplicarse por toda el área de embalaje (laminado) o parcialmente (Aznar et al., 2011; Elena Canellas et al., 2015).

Los adhesivos son mezclas complejas de componentes, formados por un componente principal que proporciona las características principales al adhesivo y recibe el nombre de resina base. A este se le añaden diversos compuestos, aditivos, para otorgar otras propiedades que se necesitan y que dependerán de la composición del sistema, de su posterior aplicación y del coste, entre otros factores. Algunos de estos componentes son: Agentes de curado, catalizadores, plastificantes, endurecedores y flexibilizadores, antioxidantes, agentes antihidrólisis y estabilizantes, promotores de pegajosidad (tack), etc. Todos estos aditivos son compuestos que se adicionan intencionadamente y que reciben el nombre de IAS (intentionally added substances), sin embargo, podemos identificar sustancias que, por el contrario, no han sido añadidas intencionadamente y que

reciben el nombre de NIAS (nonintentionally added substances) (Canellas Aguarales, 2010; Kato & Conte-junior, 2021; Wrona & Ner, 2020).

Es importante destacar que al estar hablando de materiales multicapas las migraciones se pueden dar no solo en el material que entra en contacto directo con el alimento, sino también puede darse en las capas internas incluyendo al propio adhesivo debido a procesos de difusión y partición de los compuestos entre las diferentes capas. Es por ello que es necesario identificar los NIAS que provienen del polímero como de los adhesivos debido a su posible riesgo como migrantes al alimento cuando estos laminados son usados como materiales de envasado para garantizar la seguridad alimentaria y garantizar que no generan ningún problema en la salud de los consumidores. Sin embargo, son difíciles de controlar ya que en ocasiones su caracterización química no es la adecuada y además, suelen encontrarse a niveles de concentración bajos lo que complica su identificación y en consecuencia se necesitan técnicas analíticas con altas prestaciones, con alta sensibilidad y resolución (Ubeda et al., 2020).

Existe una amplia variedad de posibles fuentes de los NIAS, pero se pueden clasificar en cinco grupos principales (Nerin et al., 2013):

- *Procesos de degradación:* Es la vía más frecuente y se puede dar tanto en el propio polímero como en los aditivos cuando son expuestos a altas temperaturas o elevadas energías de irradiación en los procesos de fabricación de los polímeros.
- *Degradación de los aditivos:* Son sustancias que también pueden sufrir procesos de degradación y generar nuevos migrantes potenciales con pesos moleculares más pequeños y mayores coeficientes de difusión, aumentando así su capacidad migratoria.
- *Impurezas:* Se encuentran tanto en la materia prima como en los aditivos de partida utilizados en la fabricación del polímero.
- *Compuestos neoformados:* Compuestos que se forman en reacciones colaterales, no deseadas o por reacciones de polimerización incompletas, no eficientes.
- *Contaminantes:* Es una fuente importante de NIAS en los materiales reciclados que se utilizan en el envasado de alimentos.

Por todo lo comentado hasta ahora, es importante hacer hincapié en aspectos como la migración, la migración global y la específica. La migración se define como la transferencia de una sustancia presente en un material hasta el alimento que depende de las propiedades físico-químicas del compuesto y del alimento, así como de la naturaleza que posee el material utilizado para su fabricación, del tiempo de contacto, de la temperatura, del estado en el que se encuentra el alimento, etc. Por otro lado, podemos diferenciar entre migración global y específica, la migración global hacer referencia a la cantidad total de componentes del envasado que se transfieren al alimento en las condiciones menos favorables de uso y engloba todos los componentes independientemente de su interés o toxicidad y, por otro lado, la migración específica hace referencia a la cantidad de una sustancia en concreto, individualmente, que ha migrado al alimento (Enguita Rupérez, 2020).

Si se produce la migración sus consecuencias afectan a los envases, donde se origina la pérdida de componentes presentes en el mismo debido a alteraciones en las características físico-químicas y mecánicas del material del envase, y/o en el producto envasado donde se producen cambios en su composición por la incorporación de las sustancias migrantes que originan cambios sensoriales modificando la calidad y su aceptación comercial y en algunos casos, poseen un carácter tóxico para los seres humanos, limitando de esta forma su consumo (Canellas Aguarales, 2010).

1.2 Legislación Europea y Nacional

En cuanto a la regulación, todos los materiales destinados en la UE para entrar en contacto con alimentos deben cumplir el Reglamento Marco (CE) no.1935/2004 en el que se establecen las bases para la protección de la salud de los consumidores, así como, la definición y los requisitos básicos de dichos materiales. En el caso de materiales plásticos también se aplica la legislación europea o nacional de plásticos, el Reglamento (UE) no. 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos y el Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos.

En ambos se establecen listas positivas de sustancias autorizadas junto con su límite de migración específica (LME) que se define en el Reglamento como: “cantidad máxima permitida de una sustancia dada liberada desde un material u objeto en alimentos o en simulantes alimentarios” y su límite de migración global (LMG), definido como: “cantidad máxima permitida de sustancias no volátiles liberada desde un material u objeto en simulantes alimentarios”. Las sustancias que no aparezcan en estas listas positivas no deberán ser detectadas en una cantidad superior a 0.01 mg/Kg de alimento o simulante alimenticio. Aparte, en el Reglamento Europeo 10/2011/EU aparecen las formas de evaluar la migración (ensayos de migración), los simulantes alimentarios y las condiciones que se deben utilizar en cada caso, junto con los requisitos sobre la declaración de los NIAS.

Destacar que, aunque exista una amplia variedad de adhesivos en la fabricación de envases multicapa no existe mucha información sobre la posible migración de ciertas sustancias, ni tampoco existe legislación específica para ellos dentro de la UE. Es por ello, que se aplica la legislación europea y nacional comentada anteriormente.

1.3 Polímeros biobasados y biodegradables

Actualmente debido a la fuerte conciencia pública sobre los desafíos ambientales relacionados con los materiales plásticos y la necesidad urgente de reducir el impacto ambiental causado por los residuos de envases, se ha desencadenado un desarrollo de envases de alimentos biodegradables y de base biológica debido a que, la mayoría de los polímeros convencionales utilizados en la fabricación de estos se producen a partir de fuentes fósiles, no renovables, tampoco son biodegradables, y en muchos casos, no son totalmente reciclables. Por ello, la Organización Europea de Bioplásticos define a un material plástico como bioplástico, si este es de base biológica (biobasado), es decir el material deriva, en parte, de biomasa como recurso renovable, o si es biodegradables o posee ambas propiedades. La biodegradación es el proceso por el cual los polímeros se degradan por la acción de microorganismos donde el material se desintegra en agua, dióxido de carbono, biomasa y metano, y su proceso depende de factores ambientales, del propio entorno, de la planta de compostaje industrial, del suelo y de las propiedades del material en sí (Nilsen-Nygaard et al., 2021). Por otro lado, las normativas europeas EN

13432 y EN 14045 establecen que, un polímero biodegradable se puede considerar compostable cuando al menos el 90 % del este se degrada en un periodo máximo de 6 meses dentro de una planta de compostaje industrial con unas condiciones específicas de temperatura y oxígeno.

Este estudio está basado en dos polímeros biodegradables, el ácido poliláctico (PLA) y el polímero Ecovio®, constituido por un 40 % de poliéster y un 60 % de PLA.

Ácido poliláctico (PLA)

El PLA es un poliéster lineal y alifático, el cuál puede obtenerse por dos vías, por fermentación bacteriana, a partir de trigo, maíz, arroz y remolacha de donde deriva el ácido láctico, o por síntesis química, donde la reacción de formación de la lactida (diéster cíclico del ácido láctico) es un paso intermedio. Por síntesis química, el PLA se obtiene por policondensación directa del monómero ácido láctico o por polimerización con apertura de anillo a partir de la lactida, que presenta tres estereoisómeros debido a que el ácido láctico del cuál deriva es quiral. Por este motivo, las propiedades del PLA varían según la relación y distribución de estos estereoisómeros (Nilsen-Nygaard et al., 2021; Ubeda et al., 2019).

Las estructuras químicas, tanto del PLA como la de sus monómeros, aparecen a continuación en la figura 1.

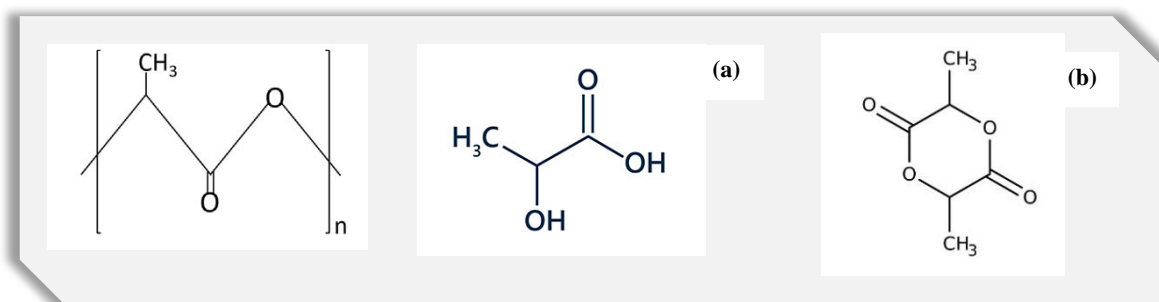


Figura 1. Estructura química del PLA, junto con sus monómeros (a) ácido láctico; (b) lactida

En comparación con polímeros convencionales como el PS (poliestireno) o el PET (tereftalato de polietileno), no puede cumplir ciertos requisitos que estos sí cumplen, por ejemplo, sus propiedades mecánicas son similares a las del PS pero menores que las del PET y una de sus peores propiedades como material de envasado es, su baja barrera en cuanto al paso de vapor de agua, oxígeno u otros gases. Es por esto que actualmente existe un gran desafío que conlleva el logro de propiedades adecuadas sin comprometer la biodegradabilidad de este material (Nilsen-Nygaard et al., 2021).

Es importante resaltar que, el proceso de polimerización nunca ocurre al 100 % y es por ello que durante estos procesos se forman oligómeros como productos de reacciones secundarias, cuyas estructuras químicas pueden variar desde dímeros hasta decámeros con estructuras cíclicas y lineales y pueden ser compuestos volátiles o no volátiles. También procesamientos térmicos, humedad o contacto con alimentos acuosos pueden afectar a la estabilidad del PLA y favorecer la formación de estos, los cuales pueden migrar a los alimentos suponiendo un problema para el envasado y en algunos casos, representando un problema para la salud. Por ello, se consideran NIAS y deben ser estudiados, identificados y cuantificados y es en ello, en lo que se va a centrar nuestro trabajo donde se requieren técnicas analíticas avanzadas de alta sensibilidad, cuyas principales características se van a comentar en el apartado posterior.

1.4 Técnica HS-SPME-GC-MS y UPLC-IM-Q/TOF

Uno de los principales inconvenientes que tiene el análisis de los NIAS es, su baja concentración y sus matrices complejas que proporcionan múltiples interferencias en el análisis. Además, su estructura química es difícil de establecer ya que la información sobre la composición, de los diferentes compuestos y del material utilizado en la fabricación de envases, es escasa. A esto se le añade, la confidencialidad de ciertos compuestos que no se declaran y que, junto con lo citado anteriormente, dificultan el trabajo. Por ello, se suelen utilizar técnicas analíticas sofisticadas junto con métodos de pretratamiento antes de la detección para mejorar la eficiencia, sensibilidad y la fiabilidad analítica (Nerin et al., 2013; Ouyang et al., 2021).

Técnica HS-SPME-GC-MS

Los objetivos principales del pretratamiento radican en la extracción y el enriquecimiento de los analitos que queremos estudiar, para así poder eliminar o minimizar el efecto matriz y las interferencias. Algunos de los ejemplos más comúnmente utilizados en sustancias volátiles y semivolátiles son: HS (“headspace”) y HS-SPME (“headspace solid phase microextraction”).

En la extracción directa por espacio de cabeza (HS), los analitos que se encuentra a nivel traza no se extraen bien y su concentración se encuentra por debajo de los límites de detección, es por ello, que para lograr una buena sensibilidad y una cuantificación

adecuada se utiliza la microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) para analitos con bajas concentraciones (Ouyang et al., 2021). Esta técnica se basa en los principios de adsorción/absorción y desorción que nos permite extraer utilizando una fibra recubierta con una fase extractiva y así poder concentrar y enriquecer los analitos en una muestra. Además, se pueden utilizar brazos robóticos que permiten automatizar la extracción con SPME y su posterior inyección en el cromatógrafo.

En cuanto a las fibras encontramos distintos tipos y la elección de una u otra radica en la polaridad y en el peso molecular del analito que queramos analizar. Esto se muestra en la figura 2 donde se describen las fibras que existen y la composición de su recubrimiento, junto con la naturaleza del analito recomendada para su uso.

	FIBRA ROJA	FIBRA AMARILLA	FIBRA VERDE	FIBRA BLANCA
Composición del recubrimiento	Polidimetilsiloxano (PDMS)	Polidimetilsiloxano (PDMS)	Polidimetilsiloxano (PDMS)	Poliacrilatos
Grosor	100 μm	30 μm	7 μm	85 μm
Aplicación	Compuestos volátiles o de bajo peso molecular	Compuestos apolares semivolátiles o de mayor peso molecular	Compuestos apolares semivolátiles o de mayor peso molecular	Compuestos muy polares

	FIBRA AZUL	FIBRA NEGRA	FIBRA GRIS
Composición del recubrimiento	Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)	PDMS/Carboxeno	DVB/Carboxeno en fibra de PDMS
Grosor	65 μm	75 μm	50/30 μm
Aplicación	Compuestos muy polares y volátiles (p.ej: alcoholes o aminas)	Compuestos volátiles a nivel traza	Compuesto para analizar un rango amplio (C3-C20)

Figura 2. Diferentes tipos de fibras utilizadas en la técnica SPME

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica que se utiliza para separar y analizar compuestos volátiles sin descomponerse. En esta técnica se utiliza una fase móvil gas encargada del transporte de la muestra a través de una columna, la cual está rellena de lo que recibe el nombre de fase estacionaria sólida. A grandes rasgos, la separación de los compuestos al paso por esta columna se realiza según su afinidad, los que posean menor afinidad por la fase estacionaria de la columna eluirán antes, mientras que los que posean mayor afinidad eluirán más tarde. Por otro lado, esta técnica se encuentra acoplada a un espectrómetro de masas como detector (MS), basado en la ionización de las

moléculas y su posterior separación en iones registrados según su relación masa carga (m/z). Los iones que llegan a él producen una señal eléctrica que es ampliada y procesada para obtener finalmente el espectro de masas correspondiente.

Por todo lo comentado hasta ahora, no cabe duda de que las principales ventajas de esta técnica son, su rapidez (reduce el tiempo de preparación de la muestra en un 70 %), el escaso uso de disolvente, su coste y su versatilidad, así como su capacidad de ser reutilizada la fibra hasta más de 50 extracciones. Además, podemos alcanzar alta sensibilidad y precisión, gracias al acoplamiento GC-MS.

Técnica UPLC-IM-Q/TOF

Es cierto, que incluso utilizando técnicas de alta resolución no siempre conseguimos identificar todos los NIAS presentes en la muestra, en parte, por la complejidad del tratamiento de sus datos espectrales y de la interpretación de los mismos. Para abordar esto, se suelen utilizar técnicas como UPLC-IM-Q/TOF. La movilidad iónica (IM) es una técnica que trabaja en fase gaseosa, cuyo mecanismo se basa en la separación de los iones según su movilidad al pasar a través de una celda en la cual se aplica un campo eléctrico constante. También nos permite obtener el CCS (“Collision Cross Section”), un parámetro que refleja el tamaño y la forma de cada molécula y se encuentra relacionado con el tamaño, la forma, la carga total y la distribución de la carga del ion, es por ello que, nos permite obtener más información respecto a la espectrometría de masas convencional (técnicas como de tiempo de vuelo o Orbitrap) y es muy útil cuando se tratan muestras con matrices complejas. Se suele utilizar acoplada a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (UPLC) junto a un analizador cuadrupolo/ tiempo de vuelo (Q/TOF). Estos dos tipos de analizadores de masas son los más frecuentes y en este caso, se encuentran acoplados. El cuadrupolo (Q) está formado por cuatro barras paralelas dispuestas en un cuadrado, cuando se le aplica un voltaje determinado las barras generan campos magnéticos y estos determinan que iones atraviesas el mismo según su relación m/z . Este puede trabajar en modo SCAN, utilizado generalmente para análisis cualitativos y de identificación o en modo SIM, utilizado para cuantificar y monitorizar compuestos de masas conocidas. En cuanto a los analizadores de masa de tiempo de vuelo (TOF), se basan en la aceleración que sufren todos los iones generados del analito al aplicar una fuerza electromagnética, debido a este fenómeno los iones más ligeros viajarán más rápido que los más pesados y llegarán antes al detector, analizando el tiempo de llegada

y su relación m/z conseguimos conocer la masa exacta de nuestro analito y con ello, su composición elemental (Agilent-Technologies, 2001).

Esta técnica nos permite identificar compuestos no volátiles como pueden ser los NIAS y obtener espectros más limpios y menos complejos, ya que el ajuste de los precursores y de los iones de los fragmentos se basan tanto en el tiempo de deriva como en el de retención y sus valores m/z son muy precisos (E. Canellas et al., 2019; Elena Canellas et al., 2021).

2. Objetivos y planteamiento

Actualmente existen muy pocos estudios que se centren en la migración de compuestos desde materiales fabricados por multicapas biodegradables, por ello el objetivo de este trabajo es realizar un estudio de identificación de los compuestos volátiles y no volátiles presentes en polímeros biodegradables utilizados en la fabricación de envases alimentarios y el desarrollo de un método para detectarlos. Así como, la realización de un estudio de migración de una multicapa biodegradable formada por los polímeros biodegradables, PLA y Ecovio®, junto con el adhesivo (EPOTAL ECO 3675X) y papel, tanto en agua como en té verde.

Para cumplir con estos objetivos, se ha planteado el siguiente procedimiento:

- Optimización la técnica SPME para extraer los compuestos migrantes en el adhesivo, en el agua y en el té. Además, de la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles y no volátiles utilizando las técnicas analíticas de HS-SPME-GC-MS y UPLC-IM-Q/TOF.
- Barrido en modo SCAN en el GC-MS, para tener todos los compuestos de nuestra muestra y se comparará con un blanco. Una vez identificados los picos que no corresponden con el blanco, se utilizarán las librerías NIST y Wiley para identificar todos los compuestos que tengamos según su coincidencia (“matching”) con los espectros de masas de las librerías.
- Selección de los picos con los que vayamos a trabajar, siendo estos los picos que tengan mayor abundancia y para confirmar que la identificación ha sido la adecuada se prepararán patrones de esos compuestos y los compararemos para confirmar que son los correctos.

- Una vez realizada la identificación se realizará el mismo proceso, pero en modo SIM donde únicamente obtendremos los picos que nosotros deseamos y así aumentar la sensibilidad.
- Finalmente se realizará un estudio de migración donde se utilizará agua y té verde, ya que este adhesivo se pretende emplear en la fabricación de multicapas flexibles que se utilizarán posteriormente en la fabricación de vasos de plástico destinados al ser utilizados para el consumo de té. Estos estudios se basaron en la identificación de compuestos migrantes tanto volátiles como no volátiles y todos ellos se cuantificaron realizando las correspondientes rectas de calibrado y se calculó sus límites de detección y cuantificación
- La identificación de los compuestos migrantes no volátiles se realizó haciendo uso de la base de datos creada para el equipo UPLC-IM-Q/TOF en el grupo GUIA.

3. Materiales y desarrollo experimental

3.1 Materiales y reactivos

Muestra de referencia

Para realizar este trabajo es necesario el uso de un compuesto similar a la sustancia que se va a analizar, es por ello que se utilizó el oligómero cíclico AA-DEG (ácido adípico, dietilenglicol) de concentración conocida, 1764,1952 ppm.

Adhesivo y biopolímeros utilizados

Se utilizó un adhesivo biodegradable en base acuosa, EPOTAL ECO 3675X, suministrado por una empresa. Además, se utilizó en el estudio biopolímeros como el PLA y Ecovio®, para realizar los ensayos de migración.

Se estudió también varios laminados formados por la unión de dos sustratos, el biopolímero correspondiente y papel, con el adhesivo. Su preparación se hizo en el laboratorio utilizando una laminadora con rodillos, cuyo funcionamiento se asemejaba al proceso industrial a gran escala donde se fabrican estos compuestos multicapas. En primer lugar, se aplicó el adhesivo sobre el PLA o Ecovio® con la ayuda de una barra Mayer, cuya finalidad es dejar un gramaje uniforme de adhesivo. En segundo lugar, una vez seco

el adhesivo, se colocó un papel sobre él y finalmente el conjunto se hizo pasar por la laminadora la cual aportó la presión y la temperatura adecuada, unos 90 °C.

Fibras SPME

En este trabajo se realizó un estudio comparativo entre tres fibras para optimizar las mejores condiciones en la microextracción y se utilizaron para ello, la fibra de poliacrilatos de 85 μm , la fibra DVB/Carboxeno en fibra de PDMS de 50/30 μm y la fibra PDMS de 100 μm , ambas tres suministradas por Supelco (España).

Muestra de agua y Té

Para realizar el estudio de la optimización de los parámetros del equipo y realizar los ensayos de migración, se utilizó agua destilada y té marca Hacendado, cuya composición es: 35 % té blanco, 30 % té negro y 30 % té rojo. Este se compró en un supermercado local y se utilizó como una mezcla representativa de diferentes tés. Se sumergió una bolsa de té en 200 ml de agua hirviendo durante 5 minutos para obtener la disolución utilizada en los ensayos de migración.

Reactivos

- Etanol para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) suministrado por Scharlau Chemie S.A (Sentmenat, España)
- Benzisotiazolinona (pureza del 98%), tributilfosfato (pureza del 98%), 1,6-Hexanodiol, 2-Metilnaftaleno, Butilhidroxitolueno que se adquirieron de Merck.
- Como patrón se utilizó un oligómero cíclico AA-DEG, que había sido aislado y concentrado de un producto industrial por Coim S.p.A (Offanengo, Italia).
- Se compró localmente un material multicapa biodegradable y 100% compostable hecho de un polímero biodegradable, adhesivo biodegradable de 20 μm de 12 g / m² y papel de 120 g / m². Según el fabricante, la composición del polímero biodegradable es 40% poliéster y 60% PLA. El material multicapa se utilizó para construir tazas de té.
- El té marca Hacendado.

3.2 Instrumentación

Microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases-espectrómetro de masas (HS-SPME-GC-MS)

La cromatografía de gases se llevó a cabo en un con un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado con un espectrómetro de masas MS 5975B como detector, junto a un muestreador automático CTC Analytics CombiPal. Todo ello, suministrado por Agilent Technologies (Madrid, Spain).

Se trabajó en el modo de microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) e inyección automática y el volumen de cada vial fue de 3 ml.

Se utilizó una columna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 μm x 250 μm) de Agilent Technologies (Madrid, Spain). El programa del horno fue: 50 °C durante 2 minutos, aumentando a una velocidad de 10 °C/ minuto hasta alcanzar un máximo de 300 °C que se mantuvo durante 2 minutos. Se inyectó en modo Splitless y se utilizó un caudal de helio de 1 ml/min con una temperatura del inyector de 250 °C. La adquisición se realizó mediante ionización electrónica (EI) y en modo SCAN (rango m/z: 45-350) para la identificación de los compuestos y en modo SIM para la cuantificación.

Para el análisis de las migraciones en agua y té, se optimizaron las condiciones de la microextracción en fase sólida con el objetivo de obtener buena sensibilidad y altas resoluciones utilizando el software MODDE 6.0 para el diseño experimental. Los parámetros optimizados fueron, la temperatura, el tiempo de extracción y el porcentaje de sal añadido en cada muestra. Finalmente se optó por trabajar a 80 °C, 30 minutos y un porcentaje en sal del 35 por ciento.

Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas por movilidad iónica y analizador QTOF (UPLC-IM-Q/TOF)

La cromatografía de líquidos se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Acquity™ UPLC acoplado a una interfaz de electrospray (ESI) y VION® espectrómetro de masas de movilidad iónica- cuadrupolo de tiempo de vuelo (IM-Q/TOF) de Waters (Manchester, UK). Se utilizó una columna UPLC BEH C18 de 1,7 μm de tamaño de partícula, 2,1 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud de Waters (Milford, MA, EE. UU.), con un caudal de 0,3 ml/min y una temperatura de columna de 35 °C. Las fases móviles fueron agua (fase A) y metanol (fase B), ambas con ácido fórmico al 0,1 %. El gradiente utilizado

fue del 95% A al 100% B después de 13 min, con 2 min de reequilibrio a las condiciones iniciales. El volumen de muestra inyectado fue de 5 μ l.

La ESI se utilizó con ionización positiva aplicando las condiciones que aparecen en la tabla 1 y los datos se registraron con el software UNIFI v.1.8.

Tabla 1. Condiciones instrumentales UPLC-IM-Q/TOF

<i>Voltaje del capilar</i>	3 kV
<i>Voltaje de cono</i>	30 V
<i>Temperatura de la fuente</i>	120 °C
<i>Temperatura del gas de desolvatación</i>	500 °C
<i>Caudal del gas</i>	800 L/h
<i>Rampa de energía de colisión</i>	20 a 40 V
<i>Rango de adquisición de datos</i>	50-1000 m/z
<i>Modo de adquisición</i>	HDMS

3.3 Desarrollo experimental

Antes de realizar los ensayos de migración, fue necesario optimizar la técnica SPME, para ello se compararon diferentes tipos de fibras y se optimizaron las condiciones idóneas para realizar la extracción.

3.3.1 Comparación entre fibras

Se realizó el estudio comparativo entre tres fibras con diferentes prestaciones, la fibra de poliacrilatos de 85 μ m, la fibra DVB/Carboxeno en fibra de PDMS de 50/30 μ m y la fibra PDMS de 100 μ m. Para el estudio de cada una de ellas se tomaron 3 viales, uno de ellos para el blanco que únicamente contenía aire y en los dos restantes se añadió 3 ml de adhesivo directamente en cada uno de ellos.

Las condiciones que se utilizaron en el equipo fueron:

- Modo de adquisición: SCAN (masas de 50 a 400)
- Temperatura de incubación: 80 °C
- Tiempo de extracción: 1800 s

Todo ello se realizó para obtener un barrido completo y así poder elegir los picos más abundantes, identificando de que compuestos se trataban, para una vez identificados verificarlos con patrones.

3.3.2 Identificación y confirmación por HS-SPME-GC-MS

Con los compuestos identificados utilizando la fibra de DVB/Carboxeno en fibra de PDMS de 50/30 μm , se realizó una confirmación de estos haciendo uso de los patrones comerciales que aparecen en el apartado 3.1. Para ello, se prepararon disoluciones de 1 ppm, 500 ppb y 300 ppb en 3 ml de agua destilada con los compuestos a confirmar y las condiciones utilizadas en el equipo fueron las mismas que en el ensayo de comparación entre fibras.

También se realizó la identificación de compuestos provenientes del laminado, donde se prepararon 3 réplicas de cada laminado, tanto del PLA como de Ecovio®, donde se tomaron fracciones de estos y se introdujeron en los viales que fueron analizados por HS-SPME-GC-MS con las mismas condiciones anteriores.

3.3.3 Optimización de los parámetros de SPME

Se optimizaron tres parámetros: el tiempo, la temperatura de extracción y el porcentaje de sal a añadir en las muestras. Se realizaron 17 experimentos tanto en agua como en té, cuyas condiciones aparecen en la tabla 2, generados a partir de un diseño factorial donde la temperatura de extracción tenía un rango de 50 a 80 grados, el tiempo de 10 a 30 minutos y el porcentaje de sale entre 0, 17.5 y 35 por ciento.

Se tomaron 17 viales y en cada uno de ellos se añadió 100 ppb del patrón del oligómero AA-DEG, en un volumen final de 3 ml de agua destilada y se trabajó en cada uno de ellos en las condiciones establecidas. El mismo procedimiento se llevó a cabo para el té.

Tabla 2. Diseño factorial generado por software MODDE 6.0 para optimización de los parámetros

<i>Exp N°</i>	<i>Nombre Exp</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Sal (%)</i>
1	N1	50	10	0
2	N2	80	10	0
3	N3	50	30	0
4	N4	80	30	0
5	N5	50	10	35
6	N6	80	10	35
7	N7	50	30	35
8	N8	80	30	35
9	N9	50	20	17,5
10	N10	80	20	17,5
11	N11	65	10	17,5
12	N12	65	30	17,5
13	N13	65	20	0
14	N14	65	20	35
15	N15	65	20	17,5
16	N16	65	20	17,5
17	N17	65	20	17,5

3.4 Ensayos de migración en agua y té verde

Para realizar estos ensayos, en primer lugar, se calentó agua y té a 100 °C y una vez alcanzada esta temperatura se tomaron 3 ml, se llevaron a un vial y se añadió un 35 % de sal en el mismo. En segundo lugar, se colocó en la parte superior del vial un cuadrado del laminado, explicado con detalle en el apartado 3.1, y finalmente, se cerró y se dejó boca abajo en una gradilla durante 2 horas en un horno a 20 grados. Este proceso se hizo en 10 réplicas, cinco de ellas utilizando PLA y las restantes, utilizando Ecovio®, tanto en té como en agua, donde cuatro viales eran blancos conteniendo únicamente 3 ml de agua o té calentados a 100 °C y cerrados sin utilizar el laminado.

3.4.1 Identificación de compuestos migrantes por HS-SPME-GC-MS

Comparando los espectros entre los blancos y las muestras de las migraciones y haciendo uso de las librerías NIST y Wiley, se identificaron los compuestos que migraban al agua y al té desde los dos laminados, utilizando en el equipo las condiciones de temperatura, tiempo y sal optimizadas y utilizando el modo SIM, donde los compuestos identificados se dividieron en tres grupos y se establecieron las masas de sus iones, el Dwell y el tiempo de inicio de cada grupo, todo ello aparece reflejado en la tabla 3.

Tabla 3. División en grupos para aplicar el modo SIM por HS-SPME-GC-MS

Grupo	Compuesto	Masas ión/Dwell				Tiempo de inicio (min)
1	1,6-Hexanodiol	57/50	67/100	81,9/50		0
2	BHT	205,2/100	220,1/50			15
3	1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona	55/100	83/50	99/100	173,1/100	18
	Tributilfosfato					

3.4.2 Identificación de compuestos migrantes por UPLC-IM-Q/TOF

En lo que respecta al análisis por UPLC, únicamente se realizaron ensayos de migración con el té utilizando Ecovio®. Para realizar una identificación de las sustancias migrantes por esta técnica, el primer paso es averiguar la composición elemental del ion molecular del compuesto desconocido, para ello se obtuvo utilizando HDMS como modo de adquisición espectros de alta y baja energía en un único barrido, donde este último permitió identificar el ion molecular. Los elementos considerados fueron el carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, cloro, bromo, flúor, azufre, fósforo, silicio y sodio y se utilizaron ciertos criterios para establecer la composición elemental del compuesto desconocido como son, el *i-Fit* que es una medida de ajuste del patrón del isótopo teórico a los picos en el espectro que vamos a medir y, la tolerancia de masa, que esta se fijó en 3 mDa.

Una vez determinada la fórmula molecular de cada masa exacta, se llevó acabo la identificación utilizando una base de datos creada para este equipo en el grupo GUIA que contiene un millar de compuestos relacionados con el envase alimentario analizados en el equipo. Para la identificación se consideraron los tiempos de retención (tolerancia de 0.3 min), masa exacta (considerando una tolerancia de 3 ppm), fragmentos obtenidos y el valor de CCS (tolerancia de 5%).

3.5 Preparación de las rectas de calibrado para compuestos volátiles y no volátiles

Para realizar los ensayos de cuantificación tanto de los compuestos no volátiles como de los volátiles, se prepararon rectas de calibrado para cada uno de los compuestos identificados en un rango variables de concentraciones en un volumen final de 3 ml de té, junto con los blancos correspondientes que únicamente contenía té y sal. En cada vial, también se añadió un 35 % de cloruro de sodio. Estos rangos aparecen en la tabla 4, donde se identifican todos los compuestos que se van a cuantificar.

Tabla 4. Rango de concentraciones utilizado de patrones para la preparación de la recta de calibrado en té

Compuesto	Rango utilizado para recta de calibrado
Benzisotiazolinona	0,01 - 1 (ng/g)
Oligómero cíclico AA-DEG ¹	0,1-6 (mg/Kg)
Tributilfosfato	0,01-1 (ng/g)
Oligómero cíclico AA-DEG ²	0,6-4 (mg/Kg)
¹ Utilizado en la cuantificación de los oligómeros cíclicos no volátiles	
² Utilizado en la cuantificación del compuesto 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona	

Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 que aparecen a continuación.

$$LOD = \frac{C}{SN} \cdot 3 \text{ (ec. 1)} \qquad LOC = \frac{C}{SN} \cdot 10 \text{ (ec. 2)}$$

Donde C=Concentración mínima con la que se obtiene una señal medible

SN= Relación señal/ruido

4. Resultados

4.1 *Comparación entre diferentes tipos de fibra*

El estudio comparativo se llevó a cabo utilizando la fibra de DVB/ Carboxeno en fibra de PDMS 50/30 µm, que se caracteriza por ser útil en un amplio rango de compuestos desde C3 hasta C20. Sin embargo, se quiso comparar con otros dos tipos de fibras, la fibra de poliacrílatos de 85 µm utilizada para el análisis de compuestos muy polares, y la fibra de PDMS de 100 µm cuya aplicación es para compuestos volátiles o de bajo peso molecular. Este estudio tenía como finalidad comprobar y confirmar que la primera fibra utilizada servía a la hora de detectar los compuestos de interés, además de comprobar que nuestra muestra no tuviera compuestos muy polares que la fibra no pudiera detectar.

Al realizar el estudio, donde se analizó el adhesivo por HS-SPME-GC-MS, se observó que con la primera fibra se identificaban un mayor número de compuestos y con mayores abundancias respecto a la fibra de poliacrílatos de 85 µm, con la cual únicamente se identificó un compuesto y la fibra de PDMS de 100 µm, con la que únicamente se identificaron dos compuestos. En la tabla 5 aparecen todos los compuestos identificados

por ambas fibras. Es por ello, que se seleccionó la fibra de DVB/ Carboxeno en fibra de PDMS 50/30 μm para realizar los experimentos restantes de todo el trabajo.

Tabla 5. Compuestos identificados analizados por HS-SPME-GC-MS utilizando ambas fibras

Fibra utilizada	Compuesto	Composición elemental	Tiempo de retención (min)	Match	n°CAS	Masa exacta
DVB/Carboxeno en fibra PDMS 50/30 μm	Dimetilsilanol	C ₂ H ₈ O ₂ Si	2,771	861	1066-42-8	92,029356
	Neopentilglicol	C ₅ H ₁₂ O ₂	8,162	645	126-30-7	104,08373
	1,6-Hexanodiol	C ₆ H ₁₄ O ₂	12,313	732	629-11-8	118,09938
	3-Metil-1,5-pentanodiol	C ₆ H ₁₄ O ₂	12,317	740	4457-71-0	118,09938
	(Z)-3-Dodecano	C ₁₂ H ₂₄	13,047	688	7239-23-8	168,1878
	2-Metilnaftaleno	C ₁₁ H ₁₀	14,758	808	91-57-6	142,07825
	Butilhidroxitolueno (BHT)	C ₁₅ H ₂₄ O	17,437	743	128-37-0	220,18272
	1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	20,442	657	777-95-7	200,10486
PDMS 100 μm	Butilhidroxitolueno (BHT)	C ₁₅ H ₂₄ O	17,437	610	128-37-0	220,18272
	1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	20,425	635	777-95-7	200,10486
Poliacrilatos 85 μm	1,6-Hexanodiol	C ₆ H ₁₄ O ₂	12,346	733	629-11-8	118,09938

4.2 Confirmación de los compuestos identificados por HS-SPME-GC-MS

Se seleccionaron cuatro compuestos para su confirmación, o bien porque eran los más abundantes y su match era elevado, o porque no se disponía del resto de patrones. Estos compuestos fueron: 1,6-Hexanodiol, 2-Metilnaftaleno, Butilhidroxitolueno y 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona. Para su confirmación se utilizaron patrones comerciales de cada compuesto, nombrados en el apartado 3.1, de los cuáles se utilizó el patrón del oligómero AA-DEG para confirmar el compuesto 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona, debido a su similitud estructural. Finalmente, únicamente se confirmó el compuesto 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona, cuya estructura y su espectro aparece en la figura 4.

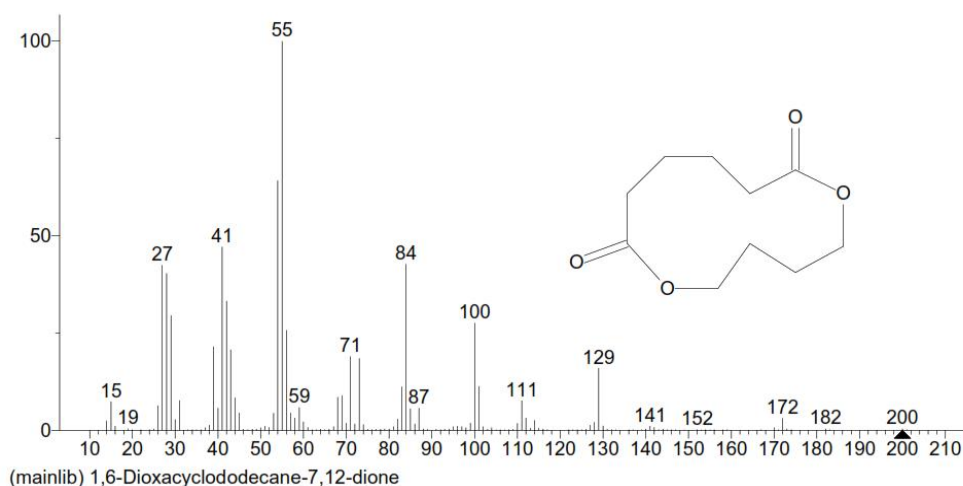


Figura 4. Estructura del compuesto confirmado 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona

Por otro lado, en el estudio del laminado por HS-SPME-GC-MS se identificó el compuesto tributilfosfato, pero no se confirmó con el patrón ya que sus tiempos de retención no eran los mismos, por tanto, se consideró un compuesto desconocido. Tanto la confirmación de este compuesto como la del resto aparece reflejada en la tabla 6.

Tabla 6. Confirmación por patrones de los compuestos identificados tanto en el adhesivo como en el laminado por HS-SPME-GC-MS

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Tiempo de retención Patrón (min)	Confirmado por patrones
1,6-Hexanodiol	12,313	* No identificado	NO
2-Metilnaftaleno	14,758	17,235	NO
Butilhidroxitolueno	17,437	20,042	NO
1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona	20,442	19,522	SI
Tributilfosfato	22,078	17,07	NO

4.3 Optimización por diseño factorial

Se concluyó que las mejores condiciones experimentales eran las utilizadas en el experimento número 8; temperatura de 80 grados, tiempo 30 minutos y un 35 % de sal.

En la figura 5, se representa el área de la lactona respecto a la temperatura y el tiempo en tres gráficas diferentes donde varía el porcentaje en sal. Se puede observar que hay un gran aumento en el área en las máximas condiciones de los tres parámetros a evaluar.

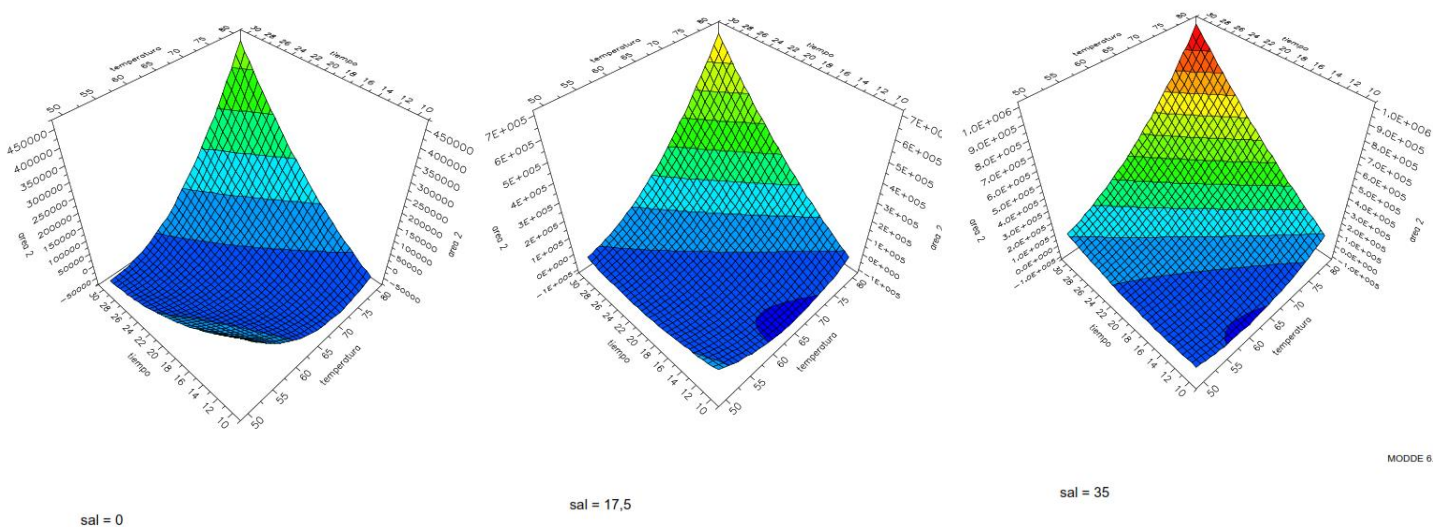


Figura 5. Representación del área de la lactona con las diferentes condiciones establecidas en los 17 experimentos del diseño factorial utilizando el software MOODE 6.0

4.4 Identificación de los compuestos migrantes por ambas técnicas

4.4.1 Identificación de compuestos volátiles por HS-SPME-GC-MS

Al analizar las migraciones se obtuvo que únicamente el compuesto 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona era la especie que migraba desde el laminado Ecovio® al té, descartando su migración en agua y la migración desde el PLA tanto en agua como en té.

4.4.2 Identificación de compuestos no volátiles por UPLC-IM-Q/TOF

Se identificaron todos los compuestos que aparecen en la tabla 7, junto con diversos parámetros como son el tiempo de retención, m/z detectado, composición elemental y valor CCS. La mayor parte de ellos son oligómeros cíclicos formados por algunas de las siguientes unidades: 1,4-butanodiol (1,4-BD), ácido adípico (AA), neopentilglicol (NPG) y 6-hexanodiol (1,6-HD). También se identificó la benzisotiazolinona y el tributilfosfato.

Tabla 7. Compuestos identificados por UPLC-IM-Q/TOF en la migración del té utilizando un laminado de Ecovio®

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Relación m/z detectada	Composición elemental	CCS (Å ²)
Benzisotiazolinona	3,4	152,0165	C7H5NOS [H] ⁺	128,9
Oligómero cíclico 1,4-BD-AA-1,4-BD-AA	5,84	423,2001	C20H32O8 [Na] ⁺	188,4
Oligómero cíclico NPG-AA-1,6-HD-AA	6,38	443,265	C23H38O8 [H] ⁺	201,6
Oligómero cíclico NPG-AA-NPG-AA	6,46	429,2482	C22H36O8 [H] ⁺	198,6
Oligómero cíclico 1,4-BD-AA-1,4-BD-AA-1,4-BD-AA	6,52	623,3043	C30H48O12 [Na] ⁺	234,5
Oligómero cíclico 1,6-HD-AA-1,6-HD-AA	6,79	457,2796	C24H40O8 [H] ⁺	206,4
Tributilfosfato	6,79	289,154	C12H27O4P [Na] ⁺	184,1

La identificación se llevó a cabo utilizando una base de datos creada para este equipo en el grupo GUIA que contiene un millar de compuestos relacionados con el envase alimentario analizados en el equipo. Para la identificación se consideraron los tiempos de retención (tolerancia de 0.3 min), masa exacta (considerando una tolerancia de 3 ppm), fragmentos obtenidos y el valor de CCS (tolerancia de 5%).

4.5 Cuantificación de los compuestos migrante

4.5.1 Cuantificación de compuestos volátiles

Para la cuantificación del compuesto 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona se diseñó una recta de calibrado utilizando el patrón del oligómero AA-DEG en té, ya que en agua no había migración. A partir de la recta de calibrado obtenida, se obtuvo el ajuste lineal y se interpolaron las áreas de tres de las cinco réplicas preparadas en las migraciones, para obtener así la concentración final, concentración promedio de las tres réplicas, del compuesto migrante con su correspondiente incertidumbre. Se interpoló únicamente tres áreas debido a que en dos réplicas sus áreas no tenían demasiada abundancia y no eran representativas, así que fueron descartadas.

Todo ello, junto con los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOC) calculados aparece reflejado en la tabla 8.

Tabla 8. Concentración final del compuesto migrante en té, junto con su límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOC)

Nº Réplicas	Área obtenida	Concentración interpolada (mg/Kg)	Concentración interpolada (ppb)
1	295065	3,4280	342,8
2	171473	0,9335	93,35
3	258473	2,6894	268,94
Concentración promedio		2,3503	235,0300
Incertidumbre global		1,2814	128,1356
Concentración final		2,3503 ± 1,2814 (mg/Kg)	235,03 ± 128,1356 (ppb)

LOD (mg/Kg)	0,1365
LOC (mg/Kg)	0,4549

4.5.2 Cuantificación de compuestos no volátiles

Para la cuantificación de estos compuestos se realizó una recta de calibrado para cada uno de ellos en los rangos de concentración explicados en el apartado 3.5. Al igual que en los volátiles, se interpoló el área de cada una de las réplicas y se obtuvo la concentración final con su correspondiente incertidumbre. La tabla 9 muestra los resultados de las migraciones de todos los compuestos identificados por UPLC.

Destacar que los oligómeros cuantificados no están legislado y por tanto no existen valores límites de migración. Como son NIAS se deberán hacer estudios de toxicidad de los mismos para evaluarlos.

Tabla 9. Resultados obtenidos en las migraciones de té utilizando Ecovio®

<i>Compuesto</i>	<i>LOD (mg/Kg)</i>	<i>Migraciones en té (mg/Kg)</i>
Benzisotiazolinona	0,003	0,05 ± 0,005
Oligómero cíclico 1,4-BD-AA-1,4-BD-AA	0,005*	3,21 ± 0,28
Oligómero cíclico NPG-AA-1,6-HD-AA	0,005*	2,56 ± 0,18
Oligómero cíclico NPG-AA-NPG-AA	0,005*	3,47 ± 0,24
Oligómero cíclico 1,4-BD-AA-1,4-BD-AA-1,4-BD-AA	0,005*	3,15 ± 0,12
Oligómero cíclico 1,6-HD-AA-1,6-HD-AA	0,005*	4,68 ± 0,42
Tributilfosfato	0,008	0,07 ± 0,01

* Compuestos identificados con 1,4,7-trioxaciclotridecano-8,13-diona (oligómero cíclico AA-DG)

5. Conclusiones

En este trabajo se ha podido realizar un estudio completo sobre las posibles sustancias migrantes de envases multicapas en contacto con alimentos, té y agua en este caso, cuando se utilizan biopolímeros como son el PLA y el biopolímero Ecovio®, que pueden suponer un riesgo para la salud humana y para el propio alimento (NIAS). Utilizando dos técnicas analíticas, HS-SPME-GC-MS y UPLC-IM-Q/TOF se han podido identificar y cuantificar tanto compuestos volátiles como no volátiles. También se ha llevado a cabo, un estudio de comparación entre fibras para obtener cuál era la idónea para cubrir todo el rango de compuestos de nuestra muestra, obteniendo así los mejores resultados utilizando la fibra de DVB/Carboxeno en fibra de PDMS de 50/30 µm. Además, se ha realizado la optimización de los parámetros para realizar una buena extracción por HS-SPME llegando a la conclusión que las mejores condiciones para realizar el resto de experimentos eran; temperatura para la extracción de 80 grados, tiempo de extracción de 30 minutos y un 35 % de sal añadido en cada réplica que vayamos a analizar.

Por otro lado, en cuanto al estudio por GC de todos los compuestos identificados provenientes del adhesivo, se ha seleccionado a cuatro para su confirmación, de los cuales únicamente se ha confirmado el 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona. Este, además se ha cuantificado ya que aparecía como sustancia migrante en los ensayos de migración con laminado Ecovio® en contacto con té, realizado una recta de calibrado con un patrón comercial, oligómero AA-DEG. La concentración final promedio obtenida en las migraciones ha sido de $2,3503 \pm 1,2814$ mg/Kg, como se puede observar esta

concentración sobrepasa los 0,01 mg/Kg de alimento que establece el reglamento al no estar dentro de las listas positivas los oligómeros.

En el estudio realizado por UPLC, se identifica benzisotiazolinona y el tributilfosfato, junto con una serie de oligómeros cíclicos en los ensayos de migraciones. También se ha realizado el cálculo de su concentración junto con su incertidumbre y se observa que las concentraciones de los siete compuestos sobrepasan también los límites establecidos.

Analizando todos los resultados obtenidos se muestra la importancia que tiene realizar este tipo de ensayos de migración a alimentos y evaluar la concentración y el riesgo que suponen los NIAS en este tipo de envases, para así poder garantizar que estos cumplen los requisitos de calidad y ofrecen una seguridad al consumidor.

6. Bibliografía

Agilent-Technologies. (2001). *Basics of LC/MS (5988-2045EN)*.

Aznar, M., Vera, P., Canellas, E., Nerín, C., Mercea, P., & Störmer, A. (2011). Composition of the adhesives used in food packaging multilayer materials and migration studies from packaging to food. *Journal of Materials Chemistry*, 21(12), 4358–4370. <https://doi.org/10.1039/c0jm04136j>

Canellas Agualeles, E. (2010). *ESTUDIO ANALÍTICO DE ADHESIVOS ACRÍLICOS Y POLIURETANOS UTILIZADOS EN ENVASES ALIMENTARIOS. ANÁLISIS EXPERIMENTAL Y PREDICTIVO DE LOS PROCESOS DE MIGRACIÓN AL ALIMENTO*. Universidad de Zaragoza.

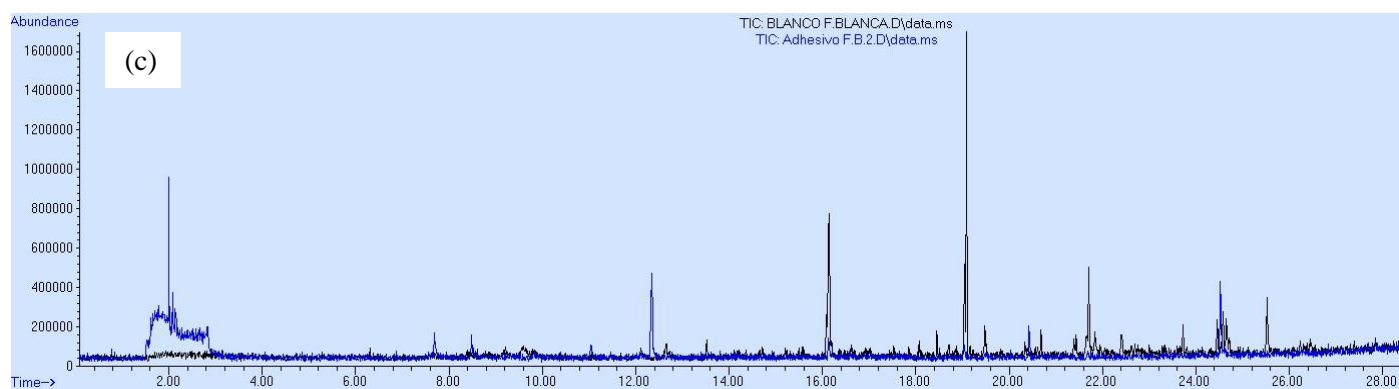
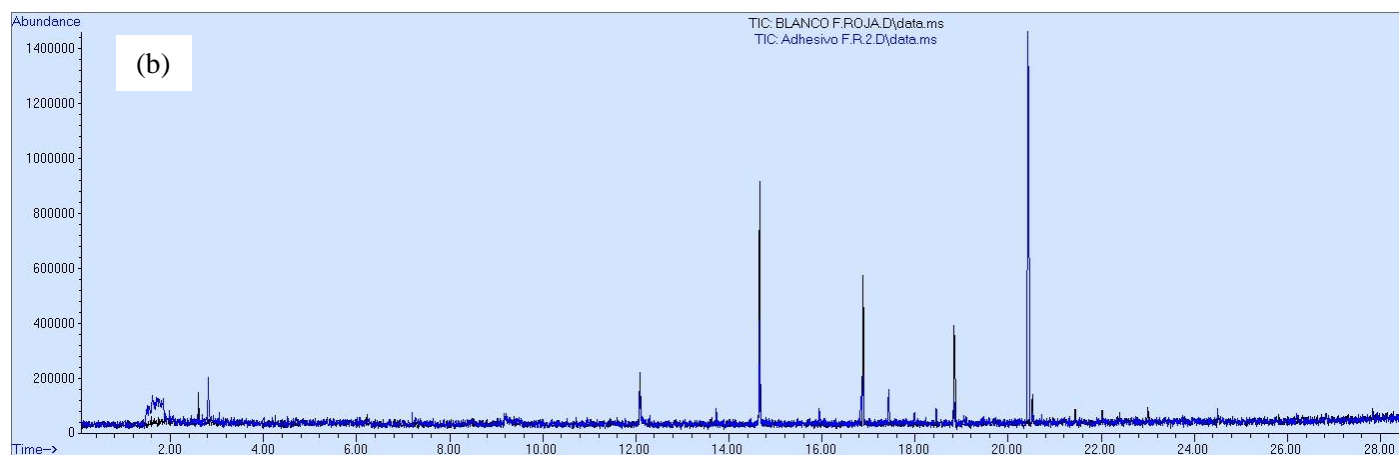
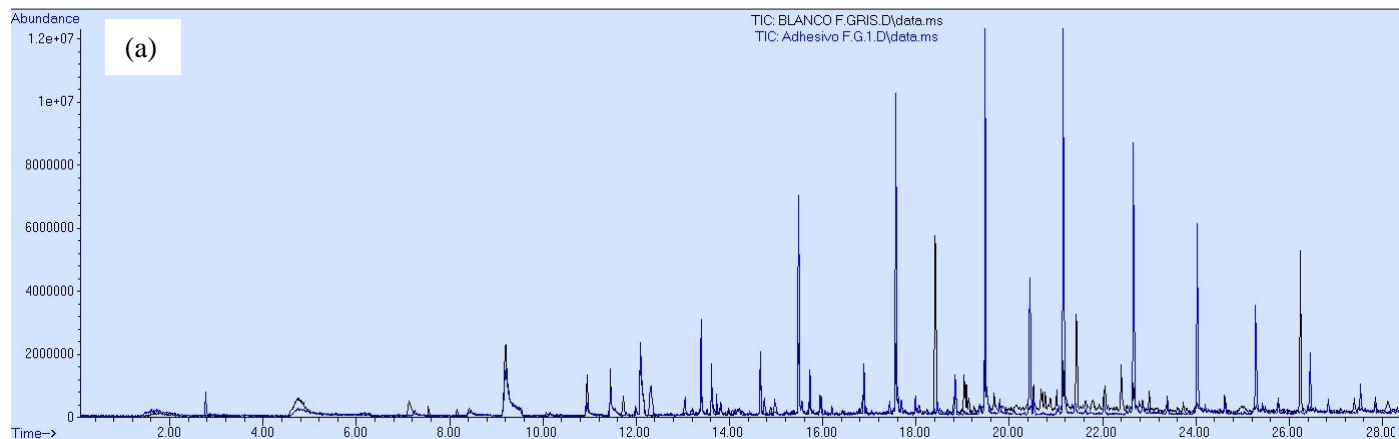
Canellas, E., Vera, P., & Nerín, C. (2019). Ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the identification of non-intentionally added substances in UV varnishes applied on food contact materials. A safety by design study. *Talanta*, 205(June), 120103. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.103>

Canellas, Elena, Vera, P., & Nerín, C. (2015). UPLC–ESI-Q-TOF-MSE and GC–MS identification and quantification of non-intentionally added substances coming from biodegradable food packaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(22). <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8848-2>

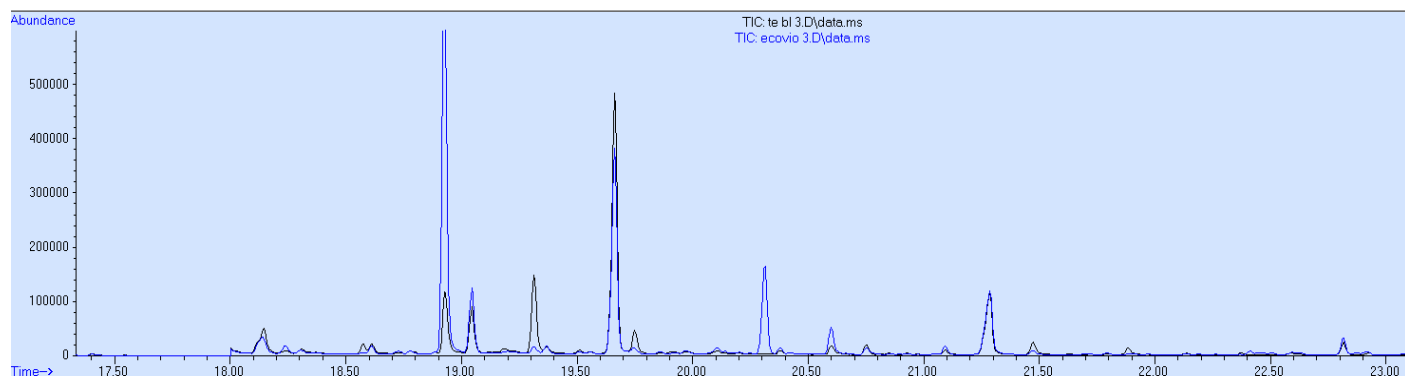
- Canellas, Elena, Vera, P., Song, X. C., Nerin, C., Goshawk, J., & Dreolin, N. (2021). The use of ion mobility time-of-flight mass spectrometry to assess the migration of polyamide 6 and polyamide 66 oligomers from kitchenware utensils to food. *Food Chemistry*, 350(September 2020), 129260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129260>
- Enguita Rupérez, A. (2020). *Migración de sustancias desde materiales en contacto con alimentos / simulantes alimentarios*. Universidad de Zaragoza.
- Kato, L. S., & Conte-junior, C. A. (2021). Safety of Plastic Food Packaging: The Challenges about Identification and Risk Assessment. *Polymers (Basel)*, 1–43.
- Nerin, C., Alfaro, P., Aznar, M., & Domeño, C. (2013). The challenge of identifying non-intentionally added substances from food packaging materials: A review. *Analytica Chimica Acta*, 775, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.028>
- Nilsen-Nygaard, J., Fernández, E. N., Radusin, T., Rotabakk, B. T., Sarfraz, J., Sharmin, N., Sivertsvik, M., Sone, I., & Pettersen, M. K. (2021). Current status of biobased and biodegradable food packaging materials: Impact on food quality and effect of innovative processing technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1333–1380. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12715>
- Ouyang, X., Lu, Z., Hu, Y., Xie, Z., & Li, G. (2021). Research progress on sample pretreatment methods for migrating substances from food contact materials. *Journal of Separation Science*, 44(4), 879–894. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000829>
- Ubeda, S., Aznar, M., Alfaro, P., & Nerín, C. (2019). Migration of oligomers from a food contact biopolymer based on polylactic acid (PLA) and polyester. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(16), 3521–3532. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01831-0>
- Ubeda, S., Aznar, M., Rosenmai, A. K., Vinggaard, A. M., & Nerín, C. (2020). Migration studies and toxicity evaluation of cyclic polyesters oligomers from food packaging adhesives. *Food Chemistry*, 311(July 2019), 125918. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125918>
- Wrona, M., & Ner, C. (2020). Analytical Approaches for Analysis of Safety of Modern Food Packaging : A Review. *Molecules(Basel,Switzerland)*, 25(3), 752.

ANEXOS

Anexo I. Cromatogramas obtenidos al comparar el blanco con la muestra de adhesivo, utilizando (a) fibra de DVB/ Carboxeno en fibra de PDMS 50/30 μm ; (b) fibra de PDMS de 100 μm y (c) fibra de poliacrilatos de 85 μm .



Anexo II. Espectro de la migración del compuesto 1,6-Dioxaciclododecano-7,12-diona frente al blanco, utilizando el laminado Ecovio®.



Anexo III. Cromatograma obtenido de las migraciones de Ecovio® en té analizado por UPLC-IM-Q/TOF donde se representa la migración vs un blanco de té.

