



Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Migración de sustancias de un polímero biocompostable a
concentrado de zumo

Autor/es

Luis José Jiménez Chavarriga

Director/es

María Consolación Cristina Nerín de la Puerta

Facultad de Ciencias. Campus Zaragoza. 2021

Índice

1. Introducción y antecedentes
 - 1.1 Fenómenos de migración
 - 1.2 PLA
 - 1.3 Importancia de trabajar con polímeros biodegradables
 - 1.4 Industria de zumos
2. Objetivos
3. Parte experimental
 - 3.1 Muestra
 - 3.2 Material y aparatos
 - 3.3 Instrumentos UPLC
 - 3.4 Método utilizado
4. Resultados
 - 4.1 Selección de los oligómeros
 - 4.2 Verificación del método
 - 4.3 Selección del disolvente de extracción
 - 4.4 Comprobación del filtro
 - 4.5 Efecto matriz
 - 4.6 Extracción dopado principio y final
 - 4.7 Optimización
 - 4.7.1 Número de extracciones
 - 4.7.2 Cantidad de disolvente utilizado
 - 4.7.3 Tiempo de extracción
 - 4.8 Ensayo con muestra real
5. Conclusiones
6. Bibliografía

Resumen

El trabajo va a consistir en comprobar si algunos oligómeros constituyentes del material con el que se plantea fabricar unas cápsulas de zumo concentrado migran a dicho concentrado en cantidades mayores de las que permite la legislación. El material en cuestión es un polímero biodegradable base PLA con algunos otros constituyentes que ayudan a darle consistencia al material.

El alimento que se va a poner en dichas cápsulas es zumo concentrado de naranja el cual al añadirle agua en las proporciones adecuadas se regenera un zumo de naranja natural.

Este trabajo va a empezar con una introducción con intención de dar un contexto al trabajo hablando, entre otras cosas, sobre los fenómenos de migración, la importancia de la implementación de material biodegradable en nuestras vidas, etc.

Desde el punto de vista experimental hay cuatro partes fundamentales:

En la primera de ellas tendrá lugar la identificación de posibles oligómeros migrantes al zumo con objeto de seleccionar los que se vea que más tendencia tienen a migrar para controlarlos.

Luego de ello se procurará crear un método válido para identificar esos oligómeros en el zumo utilizando muestras dopadas.

Después se intentará optimizar dicho método para encontrar el mejor procedimiento antes de empezar el ensayo real.

Por último, se realizará el ensayo de migración real poniendo el concentrado de zumo en las cápsulas e intentando cuantificar la concentración de oligómeros que haya migrado.

Abstract

The work will consist of verifying whether some constituent oligomers of the material used which to make capsules to contain concentrated juice, migrate to the juice in greater quantities than those allowed by the legislation. The material in question is a biodegradable polymer based on PLA with some other constituents that help to provide the material consistency.

The food that is going to be put into capsules is concentrated orange juice which, when adding water in the right proportions, becomes orange juice.

This work will begin with an introduction with the intention of giving a context to the work, speaking among other things, about migration phenomena, the importance of the implementation of biodegradable material in our lives, etc.

From an experimental point of view there are four fundamental parts:

In the first one, the identification of possible oligomers migrating to the juice will take place and selecting those that are known to have the highest tendency to migrate.

After that, an attempt will be made to create a valid method to identify these oligomers in the juice using spiked samples.

Then, an attempt will be made to optimize the method to find the best procedure before starting the actual trial.

Finally, the real test will be executed by putting the concentrated juice in the capsules and trying to analyze the amount of oligomers.

1. Introducción y antecedentes

1.1 Fenómenos de migración

Uno de los fenómenos más importantes de interacción entre el envase que contiene al alimento y el alimento es el fenómeno de migración.

La migración consiste en la transferencia de componentes desde el envase hasta el alimento. El límite de migración global es de 10 mg de constituyentes por dm² de superficie o bien 60 mg/Kg de alimento según Interempresas y está definido por el reglamento 10/2011/EU. (Úbeda et al. 2017)

1.2 PLA

El polímero con el que se va a trabajar es un polímero biodegradable complejo compuesto por PLA y otros componentes. Por razones de confidencialidad no puede revelarse la composición, El PLA es un polímero que se fabrica principalmente a partir de remolacha, trigo, maíz y otros productos ricos en almidón. Su síntesis fue estudiada por Carothers en 1931 y se suele llevar a cabo la síntesis mediante la apertura del anillo del diéster cíclico del ácido láctico según indica la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de la Patagonia.

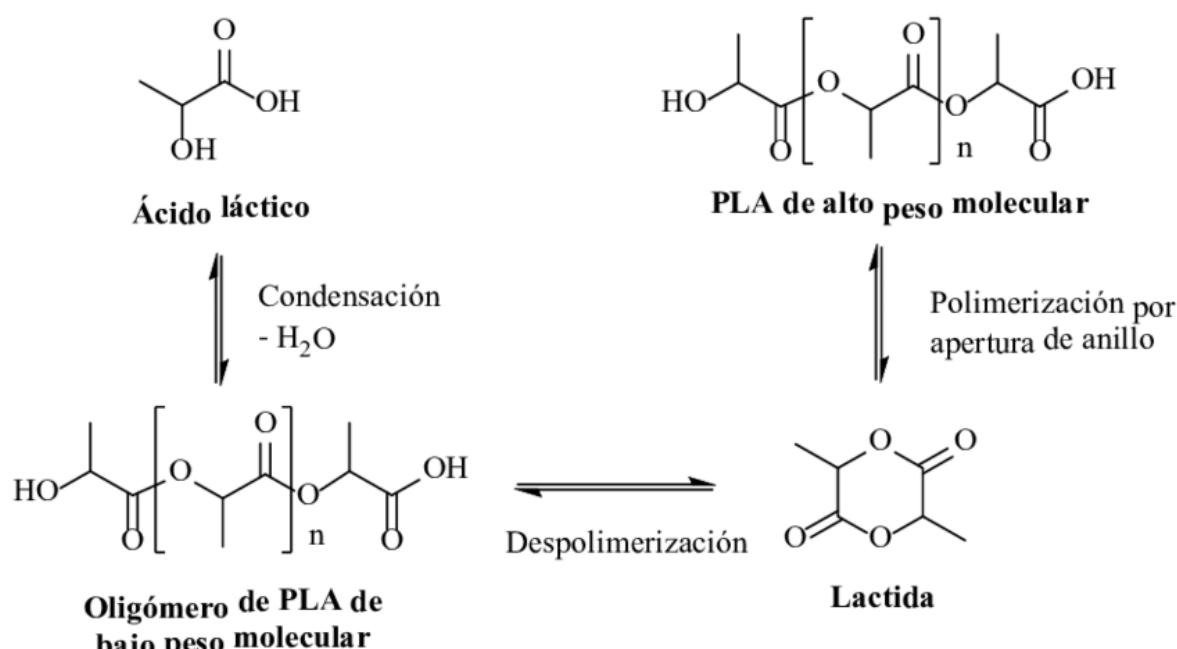


Figura 1. Fabricación de PLA a partir de ácido láctico. (Martín-Ramos Pablo, 2021)

1.3 Importancia de trabajar con polímeros biodegradables

Los plásticos utilizados para los envases son una de las principales causas de la enorme contaminación por plásticos que hay en los océanos, en los que se estima que hay entre 5 y 50 billones de fragmentos de plástico y 5 islas de basura formadas principalmente por plásticos y microplásticos según Ambientum.

Para solucionar este problema cada vez se apuesta más por la utilización de polímeros biodegradables que se pueden definir como aquellos que se degradan en condiciones naturales por la acción de bacterias, hongos, algas etc en un corto periodo de tiempo, dando lugar a H₂O, CO₂, CH₄ (en

condiciones anaeróbicas) sales minerales y biomasa.

Uno de los problemas que implica la implementación de esta clase de polímeros es que al buscar poder degradarse en un corto espacio de tiempo en condiciones ambientales se corre el riesgo de que al contacto con el alimento sean más susceptibles que los plásticos convencionales para la generación de oligómeros, produciéndose la migración de estos hacia el alimento en cantidades perjudiciales para la salud humana

Para intentar que se produzca un desarrollo en la industria del packaging en el que se mantenga el equilibrio entre el cuidado de la salud humana y la reducción de contaminantes en potencia para el medio ambiente es de suma importancia el análisis de compuestos migrantes.

1.4 Industria de Zumos

La industria de jugos y néctares es una industria pujante en España según los datos las exportaciones representan un valor de 730,63 millones de euros con un superávit de 464,78 millones de euros según la revista Aral. Lo cual sumado a su elevado consumo que se estima en 808,15 millones de litros al año (Aral,2018) muestra la importancia en mantener un control de calidad y seguridad alimentaria para mantener la competitividad en un sector como vemos de suma importancia para la industria española.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo consiste en estudiar la migración de oligómeros de un material compostable y comprobar si esta ocurre en cantidades mayores de las que permite la legislación cuando estén en contacto con concentrado de zumo, que es el alimento que se espera van a contener.

Para ello se van a realizar varios pasos:

- Detección de posibles compuestos migrantes procedentes del polímero con el que se van a fabricar las cápsulas.
- Desarrollo y comprobación de la efectividad de un método que permita el análisis de dichos componentes en el concentrado de zumo mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) acoplada a espectrometría de masas-masas (MS-MS) de Triple cuadrupolo (TQ).
- Optimización de dicho método para mejorar el rendimiento del análisis.
- Realización del ensayo de migración con muestra real.

3. Parte experimental

3.1. Muestra

Por un lado se dispone de unas cápsulas fabricadas con un polímero con base de PLA, pero no es PLA puro. Desde estas cápsulas se debe comprobar que no migran oligómeros al contacto con el alimento o simulante alimenticio.



Figura 2. Cápsulas de zumo

Por otro lado se dispone del concentrado de zumo de naranja que se espera que va a ir dentro de las cápsulas mencionadas para así realizar pruebas con muestra real.



Figura 3. Concentrado de zumo.

3.2. Material y aparatos:

El material que vamos a emplear para realizar la separación de los oligómeros se puede dividir en:

Aparatos:

- Baño de Ultrasonidos Branson 3510-DTH: Destinado a agitar mediante ultrasonidos la muestra de zumo para provocar que las fases se pongan en contacto y se realice la extracción de los

oligómeros.



Figura 3. Baño de ultrasonidos.

- Centrifugadora CENTROMIX modelo S-54: Para separar fases



Figura 4. Centrifugadora

- Evaporador: Equipo con varias posiciones para evaporar disolventes en corriente de nitrógeno Cuenta con la opción de poner calor para que los viales estén como en un baño de aluminio.



Figura 5. Evaporador con nitrógeno

- Placa de agitación magnética: Sirve para llevar a cabo agitación mediante agitadores magnéticos. También cuenta con un sistema para calentar los viales mientras tanto.



Figura 6. Placa de agitación

Material de laboratorio:

- Viales de 20ml
- Viales de cromatografía
- Tubos de ensayo
- Agitadores magnéticos
- Tapones de plástico
- Filtros
- Jeringuillas
- Pescador de imanes/ imán grande
- Gradilla
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas
- Puntas de micropipetas

Disolventes y disoluciones:

Los disolventes utilizados han sido

- Hexano (C₆H₁₄) se compró a PanReac Química SLU (Castellar de Vallès, España)
- Etanol (EtOH) se compraron a Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España)
- Agua ultra pura obtenida con un sistema Mili-Q Ultramatic Wasserlab GR 216071 (Madrid, España)
- Diclorometano se compró a PanReac Química SLU (Castellar de Vallès, España)

Aparte se han tenido que preparar las siguientes disoluciones:

- EtOH:H₂O 50:50 disolución que va a ser utilizada principalmente para la redisolución
- Los oligómeros que se van a estudiar se han extraído de la granza del mismo material con etanol (Yi-Qi Liu et al. 2021). Para ello, se extraen 50 g de granza (pellets) del material con el que están hechas las cápsulas con 50 g de Etanol durante 5 días en una estufa a 40°C.

Pasado ese tiempo se separan los pellets filtrando o simplemente por decantación y la disolución resultante debe almacenarse en la nevera cuando no se vaya a emplear, para ralentizar la posible degradación de los oligómeros. Con esta disolución que contiene alta concentración de oligómeros, se dopará el zumo para optimizar el procedimiento de análisis.

3.3 Instrumentos UPLC

La cromatografía se llevó a cabo mediante UPLC Triple cuadrupolo, con un cromatógrafo Acquity de Waters (Milford, Mariland, Estados Unidos) y una columna UPLC BEH C18 de 1,7 µm de tamaño de partícula (2.1x100mm). Como detector se utilizó un detector masas Acquity Ultra Performance LC.

Las condiciones usadas fueron:

Condiciones cromatográficas UPLC-MS Triple cuadrupolo

Tabla 1. Condiciones cromatográficas

Caudal	0,3 mL min-1
Temperatura de la columna	40 °C
Volumen de inyección	10 µl

Las fases móviles utilizadas fueron

- Agua con un 0,1% de Ácido Fórmico (Dis B)
- Metanol con un 0,1% de Ácido Fórmico (Dis A)
- Agua: Se utilizó para el proceso de lavado y la purga
- Metanol: Se utilizó para el lavado de las jeringas

El gradiente de fase móvil utilizado fue:

Tabla 2. Gradiente UPLC

Tiempo (min)	% A	%B
0	30	70
1	30	70
4	100	0
10	100	0
10,1	30	70
13	30	70

Parámetros instrumentales UPLC-MS Triple cuadrupolo

Tabla 3. Parámetros UPLC

Modo de adquisición	SIR
Caudal de gas de solvatación	600 L/hora
Caudal gas de cono	60 L/hora
Temperatura gas de desolvatación	450°C
Temperatura de la fuente	120°C
Voltaje del capilar	3,50 kV
Voltaje de cono	30 V

La cromatografía se llevó a cabo mediante UPLC un equipo Acquity de Waters (Milford, MA, USA) y una columna UPLC BEH C18 de 1,7 μ m de tamaño de partícula (2.1x50mm).

Las condiciones cromatográficas fueron en TOF (Elena Canellas et al. 2021):

Tabla 4. Condiciones cromatográficas UPLC-MS (QTOF)

Caudal	0,3 ml min ⁻¹
Temperatura de la columna	40 °C
Volumen de inyección	10 ul

Las fases móviles utilizadas fueron

- Agua con un 0,1% de Ácido Fórmico
- Metanol con un 0,1% de Ácido Fórmico

El gradiente usado fue:

Tabla 5. Gradiente

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0	0,3	97	3
7	0,3	0	100
8	0,3	0	100
8.10	0,3	97	3
10	0,3	97	3

La configuración usada fue:

Tabla 6. Config.

Voltaje del capilar	3kV
Cono de extracción	30 V
Temperatura de la fuente	120 °C
Temperatura de desolvatación	350 °C
Caudal del gas de cono	10 L h ⁻¹
Caudal del gas de desolvatación	600 L h ⁻¹
Modo de adquisición	Modo MS

Los datos se registraron con MassLynx v4.1

3.4 Método utilizado

Se hizo una profunda revisión bibliográfica buscando métodos adecuados para el aislamiento de oligómeros poco polares de muestras de zumos, jugo o frutas principalmente y se plantearon diferentes métodos entre ellos salting out (microextracción por desmezcla), microextracción en fase líquida, utilización de rotavapor etc (Aliaño Gonzalez,2014), (Farajzadeh, Ali.; Alavian, Ali; Dabbagh, 2018), (Zhou, Hong-Wei; Sonego Lilliam; Ben-Aire,Ruth; Lurie, Susan, 1999), (Sara Ubeda, et al. 2020)

. El método escogido fue (Beldi G et al. 2011) (Sanches et al. 2007)

- Tomar 5 ml de concentrado de zumo y ponerlos en un vial de 20 ml, poner 8 ml de extractante tapar con tapón y agitar con un agitador magnético en una placa magnética durante 25 minutos al principio, durante ese tiempo cada 10 minutos y al final realizar una agitación manual.
- Pasado ese tiempo se colocan durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos sin calentar, solo sonicando. Tras esto, se agita manualmente una última vez y se traslada el líquido de los viales a tubos de ensayo que se tapan con un tapón y se colocan en una centrifugadora durante 5 minutos a 700 rpm.
- Cuando salga de la centrifugadora las dos fases acuosa y orgánica estarán separadas. Entonces se toma el extractante con una pipeta Pasteur y se vierte en otro vial de 20 mililitros y se pone a evaporar suavemente con N2 en el evaporador a 40°C ya que aun aplicando temperatura suponemos no reaccionarán (Ubeda, S.; Aznar, M.; Alfaro, P.; Nerin, C. 2019) y así se acelera la evaporación.
- Posteriormente, tras llevarlo a sequedad, se añade 1 ml de EtOH:H2O 50:50 y se pone en el baño de ultrasonidos durante 15 minutos.
- Para finalizar se pasa el contenido del vial por un filtro utilizando una jeringa y vertiendo la disolución en un vial de cromatografía. Se inyecta finalmente en el cromatógrafo. (

4. Resultados

4.1 Selección de los oligómeros

Al inyectar el extracto obtenido empleado como dopante en el QTOF se observaron los oligómeros que aparecían en la migración. De estos se seleccionaron 8:

- PLA ácido poliláctico
- PA ácido ftálico
- AA ácido adípico
- BD butadienol
- TPA ácido tereftálico
- LA ácido láctico o lactida (confirmar)
- Oligómeros, siendo n el número de monómeros en el oligómero:
 - Cyclic (LA)_n oligomer n=5: Es un compuesto cíclico del PLA.
 - Cyclic (LA)_n oligomer n=6: Es un compuesto cíclico del PLA.
 - Cyclic (LA)_n oligomer n=7: Es un compuesto cíclico del PLA.
 - Cyclic PA-BD: No pertenece al PLA está formado por ácido Ftálico y butadienol
- NI PLA: No se sabe cual es este compuesto exactamente su estructura pero sabemos que es del PLA.
- Cyclic TPA-BD3-AA2: Es un compuesto cíclico no perteneciente al PLA. Contiene partes de butadienol, ácido adípico y TPA (ácido tereftálico)

- Cyclic PA2-BD5-AA3: Es un compuesto cíclico que contiene partes de ácido ftálico, ácido adípico y butadienol
- Cyclic PA2-BD5-AA2: Es un compuesto cíclico que contiene partes de ácido ftálico, ácido adípico y butadienol

Como se ha dicho antes, las cápsulas no son de PLA puro y eso hace que sea conveniente para el trabajo hacer un seguimiento de oligómeros que no pertenezcan al PLA y que sean derivados de otros componentes, ya que estos también van a poder migrar al zumo concentrado.

Para eso se prepararon 2 disoluciones una de EtOH/ H₂O 0,9ml y 0,1ml de la disolución dopante y otra con 1 ml de EtOH/ H₂O 50:50 que es la del blanco, en el triple cuadrupolo, programando el equipo para detectar de cada compuesto la masa +H (+1) y la masa +Na (+28) que son las que se pueden ver en el masas. Tras observar los resultados, los compuestos Cyclic PA2-BD5-AA3 y Cyclic PA2-BD5-AA2 se descartaron debido a que sus señales eran muy bajas y salían a tiempos demasiado similares a otros picos. En cuanto a los demás se seleccionaron las masas.

Tabla 7. Oligómeros Seleccionados

Compuesto	Masa molecular de los medida (compuesto +Na+/H+)	Tr QqQ	Método sir- Masas
Cyclic PA-BD	221,08	5,19	PABD + H+
Cyclic (LA) _n oligomer n=5	383,09	4,39	Cyclic (LA) _n oligomer n=5 + Na+
Cyclic (LA) _n oligomer n=6	455,12	4,63	Cyclic (LA) _n oligomer n=6 + Na+
Cyclic (LA) _n oligomer n=7:	527,14	4,79	Cyclic (LA) _n oligomer n=7 + Na+
NI PLA	541,26	5,83	NI PLA +Na+
Cyclic TPA-BD3-AA2	643,27	5,51	Cyclic TPA-BD3-AA2 + Na+

En cuanto a las áreas observadas de los compuestos seleccionados fueron:

Tabla 8. Áreas Oligómeros Seleccionados

Compuesto	Área
Cyclic PA-BD	936.730,438
Cyclic (LA) _n oligomer n=5	3.198.222,25

Cyclic (LA)n oligomer n=6	3.979.673
Cyclic (LA)n oligomer n=7:	4.259.227,5
NI PLA	1.852.137,5
Cyclic TPA-BD3-AA2	2.695.502

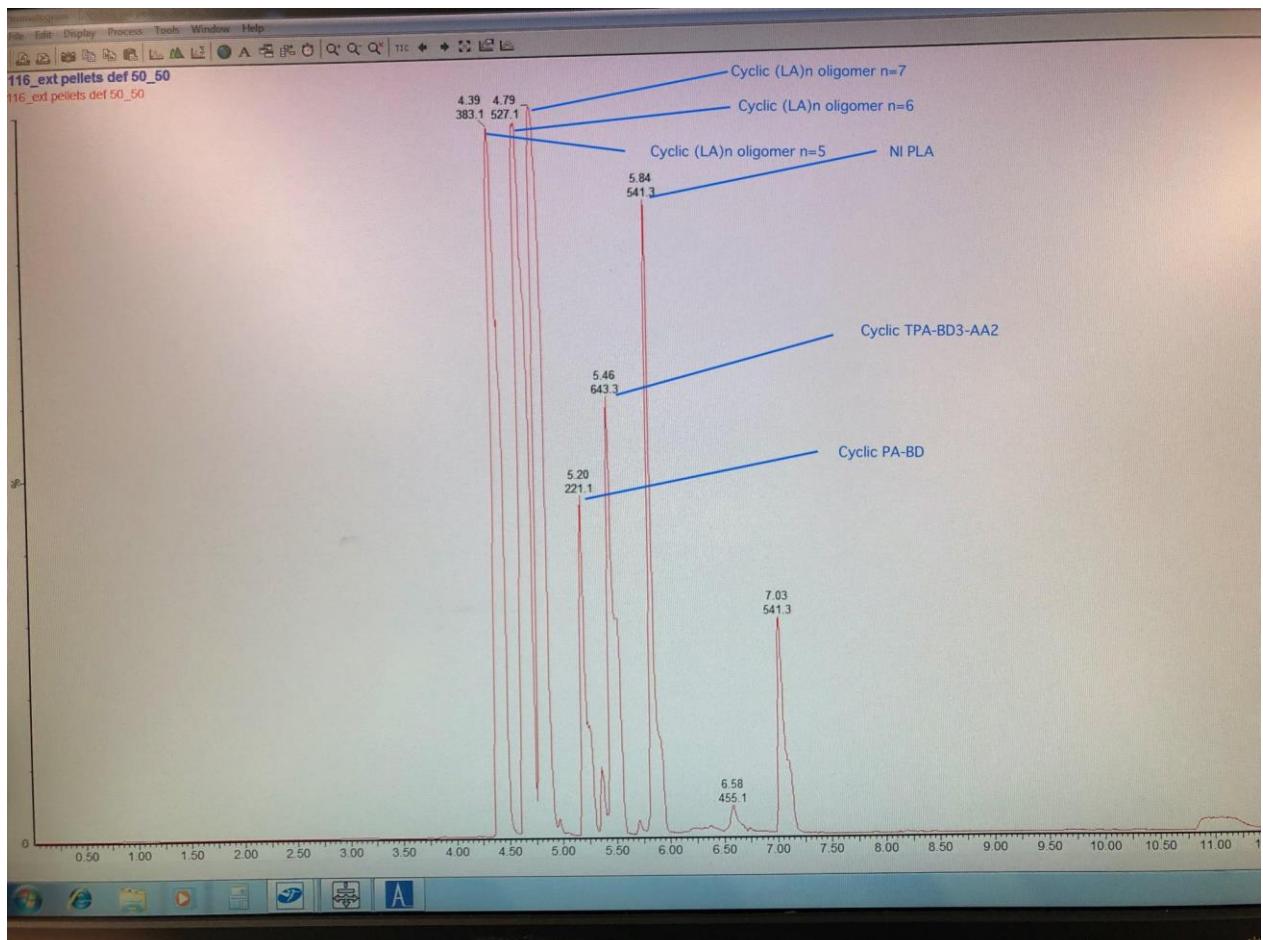


Figura 7. Cromatograma general

4.2 Verificación del método:

Para verificar el método se realizó el procedimiento de extracción poniendo tres réplicas con 5ml de agua y dopando con 0,1 ml de disolución dopante y una muestra de agua sin dopar como blanco y se realizó el procedimiento de extracción mencionado anteriormente. Despues del procedimiento se inyectó en el cromatógrafo y se comprobó que se veían los oligómeros y se separaban bien.

4.3 Selección de disolvente de extracción:

Se procede a comprobar si el diclorometano es mejor extractante que el hexano realizando la extracción con ambos disolventes y comprobando los resultados

Tabla 9. Selección de Extractante

RECUPERACIÓN		
Compuesto	Hexano	DCM
Cyclic PA-BD	124,44 %*	Sale en Blanco
Cyclic (LA) _n oligomer n=5	86,73%	71,07 %
Cyclic (LA) _n oligomer n=6	99,82 %	99,51 %
Cyclic (LA) _n oligomer n=7:	79,92 %	101,88 %*
NI PLA	121,08 %*	Sale en Blanco
Cyclic TPA-BD3-AA2	121,36 %*	69,97 %

Se seleccionó el hexano, puesto que en el diclorometano era difícil el procedimiento, por incompatibilidad del disolvente con LC-MS. Además, utilizando ese disolvente se observaba que había una mayor desviación estandar en algunos compuestos aparte de que el PABDH y el NI PLA aparece señal significativa en el blanco de diclorometano.

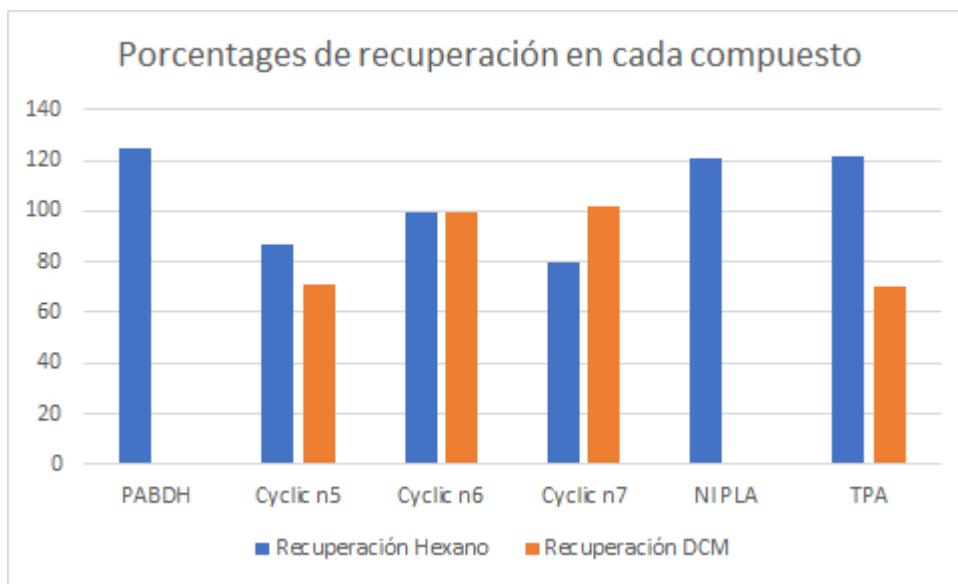
*Al no realizarse por pesada y ser de días diferentes en las inyecciones en el cromatógrafo de la muestra sin extracción y con extracción se ve una desviación con respecto al resultado real, que sin embargo se puede considerar tolerable, ya que el experimento tenía como objetivo establecer una comparación entre DCM y Hexano.

Tabla 10. Datos Hexano

HEXANO			
Compuesto	Área	Desv. Estandar	DSR %
PABD	1910966	13925	0,73
Ciclic N5	1107155	101386	9,16
Ciclic N6	2137269	135973	6,36
Ciclic N7	1899683	164559	8,66
NI PLA	1674410	47190	2,82
TPA	1618951	141193	8,72

Tabla 11. Datos DCM

DCM			
Compuesto	Área	Desv. Estandar	DSR %
PABD	Sale en Blanco		
Ciclic N5	907192	226664	24,99
Ciclic N6	2130472	218869	10,27
Ciclic N7	2421514	227253	9,38
NI PLA	Sale en Blanco		
TPA	933315	67864	7,27

**Figura 8.** Recuperación según Extractante

4.4 Comprobación del filtro:

Se quiso asegurar que el filtro no introducía ninguna interferencia significativa que afectara a los picos ni se producía la retención de los oligómeros afectando en gran medida al rendimiento, haciendo necesario la utilización de otro modelo de filtro que no diese estos problemas. Para ello se realizó un ensayo con 0,9 ml de EtOH:H₂O con 0,1 ml de disolución dopante sin filtrar, otro con las mismas cantidades pero filtrando los 0,9 y luego dopándolo y otro filtrando tras mezclar los 0,9 de EtOH:H₂O y la disolución dopante.

El resultado nos indica que el filtro no produce interferencias ni reduce la cantidad de oligómeros detectada.

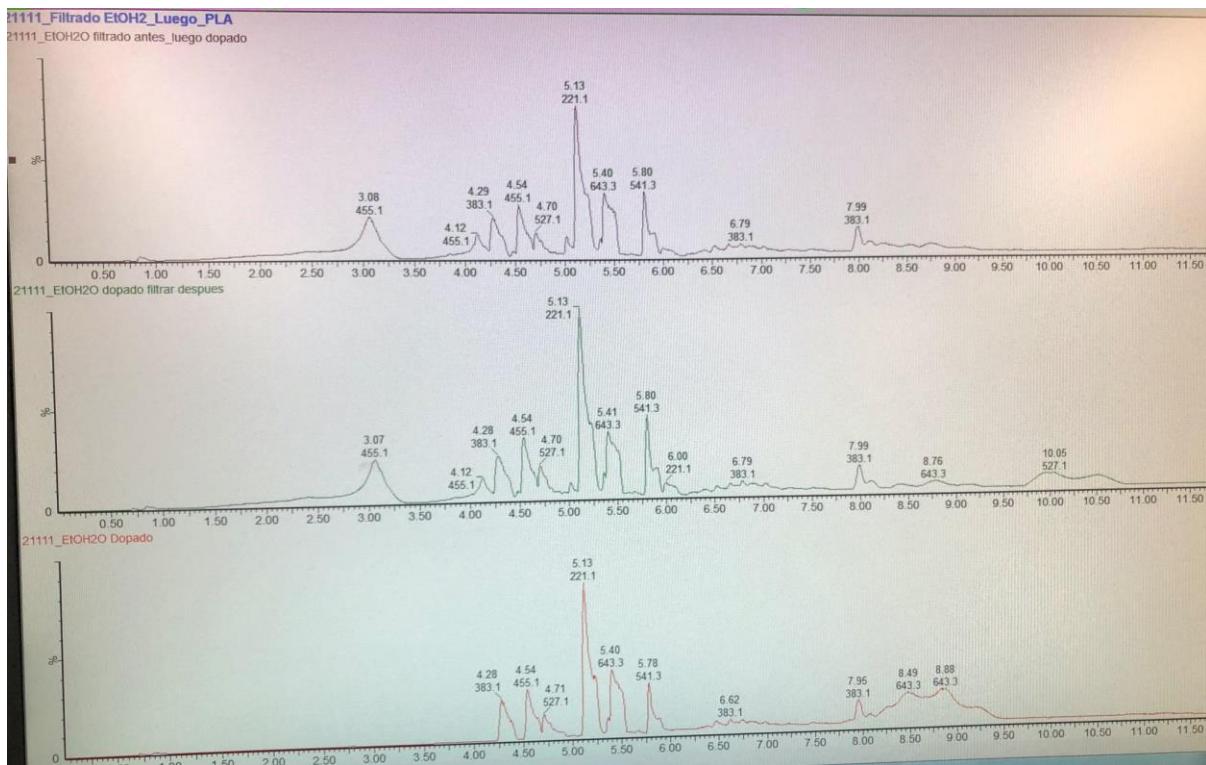


Figura 9. Cromatogramas con y sin filtro

4.5 Efecto matriz:

Se quería comprobar el efecto matriz para ello se contrastó el resultado dado con el EtOH:H2O dopado cuyo vial fue inyectado el mismo día, por si acaso había habido un cambio en la sensibilidad del instrumento respecto al resultado obtenido al realizar el procedimiento de extracción sobre 5 ml de zumo y dopándolo al final. En concreto en la etapa de redisolución en vez de usar 1 ml de EtOH: H2O se usaron 0,9 ml de EtOH:H2O y 0,1 ml de disolución dopante aparte. De este modo tal como se usa un blanco de extracción en zumo sin dopar también se comprueba si el zumo contiene alguno de estos oligómeros o alguna molécula que se extraiga durante el proceso con un pico que pueda confundirse con el de alguno de los oligómeros con los que estamos trabajando.

El resultado nos indica que en el blanco no se observan picos que afecten y en cuanto al efecto matriz se calculó dividiendo el área de los picos tras el dopado final y el área de los picos en la disolución EtOH:H2O. EL resultado se muestra en las tablas de 9-11.

Tabla 12. Comparaciones

Oligómero	Dopado final/EtOH:H2O Dopado %
Cyclic PA-BD	84,46
Cyclic (LA) _n oligomer n=5	90,91
Cyclic (LA) _n oligomer n=6	39,09
Cyclic (LA) _n oligomer n=7:	85,18

NI PLA	93,32
Cyclic TPA-BD3-AA2	95,32

Tabla 13. Datos EtOH-H2O 50-50

Compuestos	tr	ETOH/H2O	Dopado	R1	R2	R3	Promedio	Desvest	DSR%
PABDH		5,34		1314485	1352574	1399938	1355665,67	42810,31	3,16
n5		4,54		435544	445328	447521	442797,67	6376,84	1,44
n6		4,78		588771	594448	617119	600112,67	14998,95	2,50
n7		4,94		332691	336350	357045	342028,67	13132,58	3,84
NI PLA		6,04		446201	459964	468024	458063,00	11035,00	2,41
TPA		5,62		772499	786615	805004	788039,33	16299,24	2,07

Tabla 14. Datos Zumo dopado final I

Compuestos	tr	Zumo dopado final	R1	R2	R3	Promedio	Desvest	DSR%
PABDH		5,34	1103861	1174795	1156270	1144975,33	36791,10	3,21
n5		4,54	405775	401509	400415	402566,33	2832,11	0,70
n6		4,77	246133	230237	227351	234573,67	10114,14	4,31
n7		4,94	285972	298754	289277	291334,33	6634,71	2,28
NI PLA		6,03	411793	444005	426563	427453,67	16124,46	3,77
TPA		5,62	725981	763473	764116	751190,00	21834,00	2,91

Los resultados indican que el efecto matriz no es muy importante en la mayoría de los casos, excepto en el compuesto Cyclic (LA)_n oligomer n=6, en el que hay un efecto matriz importante. Si en el ensayo final comprobamos que aparece ese pico habrá que tener el efecto matriz muy en cuenta.

4.6 Extracción del dopado al principio y al final:

Con esto calcularemos la recuperación inicial. Para ello se doparán 5ml de zumo con 0,1ml de disolución de dopante y se harán tres réplicas. En una placa agitadora con un agitador magnético se colocan las réplicas del zumo dopado durante 24 horas para que el dopante se distribuya por todo el zumo, tanto parte acuosa como pulpa, y así evitar que los resultados salgan demasiado bien debido a que los oligómeros no han llegado a mezclarse con la pulpa, donde es de esperar que queden algo más retenidos. La recuperación inicial se calcula dividiendo las áreas de los picos de dopado al principio con las del dopado final. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12:

Tabla 15. Porcentaje extraido

Compuesto	Porcentaje extraido
Cyclic PA-BD	84,5
Cyclic (LA) _n oligomer n=5	61,7
Cyclic (LA) _n oligomer n=6	67,7
Cyclic (LA) _n oligomer n=7:	42
NI PLA	58

Cyclic TPA-BD3-AA2	93,4
--------------------	------

El porcentaje extraído se puede obtener dividiendo los resultados de Zumo dopado al principio por los de Zumo dopado al final.

Tabla 16. Datos Zumo dopado final II

Compuestos	Zumo Dopado Final 1	Zumo Dopado Final 2	Zumo dopado final 3	Mean	Desvest	Dsr%
PABDH	1012483,25	968131,81	1003000	994538,4	23355,1	2,3
Cyclc N5	593106,5	629079,5	597312	606499,3	19667,7	3,2
Cyclc N6	327500	326000	306000	319833,3	12003,5	3,8
Cyclc N7	493031	483000	476652	484227,7	8258,2	1,7
NI PLA	388616,67	318000	360000,95	355539,2	35519,1	10,0
TPA	594214,688	501637,875	462858,5	519570,4	67489,2	13,0

Tabla 17. Datos Zumo dopado al principio

Compuestos	Zumo dopado principio 1	Zumo dopado principio 2	Zumo dopado principio 3	Mean	Desvest	Dsr%
PABD	829897,875	860944,563	828974,3	839938,9	18197,3	2,2
Cyclc N5	402472	336550,469	384324	374448,8	34052,2	9,1
Cyclc N6	227513,203	204012,141	218329,5	216618,3	11843,6	5,5
Cyclc N7	226982	177457,984	205356,8	203265,6	24828,1	12,2
NI PLA	255000	162000	202000	206333,3	46651,2	22,6
TPA	389484	499417	567345,8	485415,6	89753,7	18,5

A pesar de no ser la recuperación esperada, dada la gran sensibilidad del equipo que se está empleando, se ha considerado que se puede continuar con el procedimiento, sobre todo teniendo en cuenta el plan de optimizarlo y obtener rendimiento mejores. En caso de aparecer picos, habrá que tener en cuenta esta recuperación junto con el efecto matriz para realizar el cálculo de la cantidad de oligómeros presentes. Hay dos oligómeros que no son aceptables.

4.7 Optimización:

La optimización es un paso muy importante siempre, pero en especial cuando se quiere realizar análisis de bajas concentraciones en las cuales las pérdidas en el rendimiento ponen en riesgo que se puedan detectar los componentes. Además, si queremos emplear el procedimiento en otras ocasiones lo ideal es conseguir los mejores resultados con el mínimo gasto tanto en recursos, como dinero y tiempo.

Se procedió a optimización en diferentes aspectos

4.7.1 Número de extracciones:

El primer paso en la optimización es si se realizará una extracción o dos extracciones. En principio la hipótesis es que con dos extracciones se podrá obtener más oligómero, es decir, mejor rendimiento global.

Para llevar a cabo la doble extracción lo que se hará será realizar una primera extracción como se ha descrito anteriormente en el procedimiento y la segunda lo que se hace es realizarla en el baño de ultrasonidos durante 30 minutos agitando manualmente al principio y cada 10 minutos. Los resultados se muestran en las tablas 15-17:

Tabla 18. Comparación doble y simple

Oligómero	Extracción doble/extracción simple
Cyclic PA-BD	1,36
Cyclic (LA) _n oligomer n=5	1,24
Cyclic (LA) _n oligomer n=6	0,89
Cyclic (LA) _n oligomer n=7:	1,18
NI PLA	1,25
Cyclic TPA-BD3-AA2	1,17

Tabla 19. 8 mililitros x1

8ml x1			
Compuesto	Área	Desv. Estandar	DSR%
PABD	1068601,54	24096,7788	2,25498259
Ciclic N5	690711,31	25915,5195	3,73734556
Ciclic N6	718219,38	6448,785	0,8868969
Ciclic N7	927874,13	25420,4895	2,845
NI PLA	382500	26954	7,0
TPA	590396,38	45825,5998	7,45436012

Tabla 20. 8 mililitros x2

8ml x2			
Compuesto	Área	Desv. Estandar	DSR%
PABD	1451600	36176	2,5
Ciclic N5	861834	65198,4	7,6
Ciclic N6	647779	39766,2	6,1
Ciclic N7	1056527	84651,6	8,0
NI PLA	479240	57676,4	12,0

TPA	721955	19870	2,8
-----	--------	-------	-----

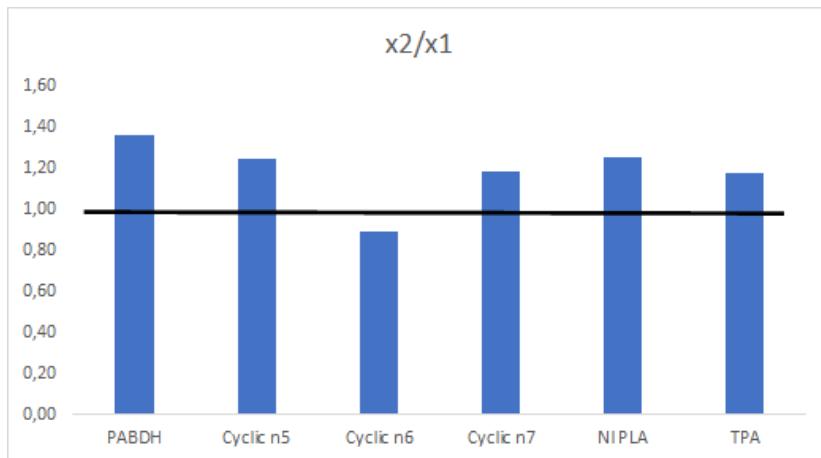


Figura 10. x1 vs x2

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta la recuperación dada, se ha considerado mejor la doble extracción, a pesar de que cueste más tiempo y recursos, a cambio de la mejora en los resultados.

4.7.2 Cantidad de extractante utilizado:

Se consideró importante probar diferentes cantidades de extractante como uno de los pasos de la optimización (S. Ubeda, M. Aznar, C. Nerín*, 2018). Las cantidades de extractante en cada extracción que van a compararse van a ser 8ml, 6 ml y 10 ml. Los resultados han sido:

Tabla 21. Áreas según cantidad de extractante

Compuestos	área 6ml/área 10ml	área 6ml/área 8ml	área 10ml/área 8ml
Cyclic PA-BD	1,08	0,8	0,74
Cyclic (LA) _n oligomer n=5	1	0,92	0,92
Cyclic (LA) _n oligomer n=6	1,15	1,08	0,94
Cyclic (LA) _n oligomer n=7:	0,92	0,85	0,93
NI PLA	1,36	1	0,74
Cyclic TPA-BD3-AA2	1,18	0,96	0,82

Tabla 22. 6ml

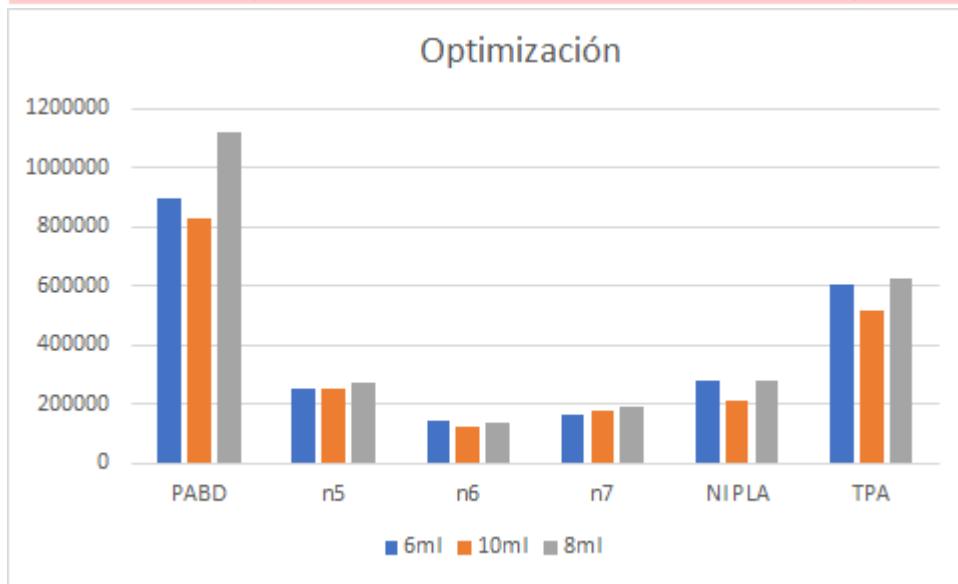
	Zumo Dopado 6ml x2	R1	R2	R3	Media	Desvest	DSR%
tr							
PABDH	5,33	887313	877866	918645	894.608,00	21.345,83	2,39
n5	4,52	245606	237454	267312	250.124,00	15.433,22	6,17
n6	4,75	145258	154281	138769	146.102,67	7.790,42	5,33
n7	4,92	158997	158672	178253	165.307,33	11.212,45	6,78
NIPLA	6,04	315191	247407	285270	282.622,67	33.969,46	12,02
TPA	5,6	603447	598378	612450	604.758,33	7.127,06	1,18

Tabla 23. 10 ml

	Zumo Dopado 10ml x2	R1	R2	R3	Media	Desvest	DSR%
tr							
PABDH	5,33	800534	833359	852947	828946,6667	26483,62053	3,19485217
n5	4,52	228316	247113	273288	249572,3333	22586,64287	9,05013892
n6	4,76	111962	127278	140822	126687,3333	14439,06387	11,3974014
n7	4,92	163744	190615	187522	180627	14702,66741	8,13979494
NIPLA	6,05	207510	221452	195935	208299	12776,78414	6,13386725
TPA	5,6	452344	533286	554691	513440,3333	53982,54316	10,5138883

Tabla 24. 8 ml

	Zumo Dopado 8ml x2	R1	R2	R3	Media	Desvest	DSR%
tr							
PABDH	5,33	1117978	1077929	1159397	1118434,67	40735,92	3,64
n5	4,53	264710	287613	261752	271358,33	14154,44	5,22
n6	4,77	137470	135429	132155	135018,00	2681,23	1,99
n7	4,92	188714	193411	200719	194281,33	6049,64	3,11
NIPLA	6,05	268310	240996	335164	281490,00	48447,78	17,21
TPA	5,6	628862	589691	661779	626777,33	36089,19	5,76

**Figura 11.** 6ml, 8ml y 10 ml

Dados los resultados se ve que lo mejor para la mayoría de los oligómeros es utilizar la doble extracción utilizando 8ml de extractante en cada extracción.

4.7.3 Tiempo de extracción:

El último paso de la optimización va a ser la optimización del tiempo de extracción para ello aparte del tiempo de extracción actual de 30 minutos por cada extracción vamos a probar con

- 15 minutos de extracción: En los cuales en la primera extracción se van a realizar 10 minutos de agitación con el extractante y 5 minutos en baño de ultrasonidos y en la segunda se van a realizar 15 minutos en ultrasonidos con el extractante.
- 45 minutos de extracción: En los cuales en la primera extracción van a ser 40 minutos de agitación con el extractante y 5 minutos en el baño de ultrasonidos y la segunda extracción consistirá en 45 minutos en el baño de ultrasonidos con el extractante.

Los resultados han sido:

Tabla 25. Comparación tiempos de extracción

Compuestos	área 15min/área 30 minutos	área 45min/área 30 minutos	área 15min/área 45 minutos
Cyclic PA-BD	0,88	0,83	1,05
Cyclic (LA) _n oligomer n=5	0,99	0,98	1,01
Cyclic (LA) _n oligomer n=6	0,95	0,81	1,18
Cyclic (LA) _n oligomer n=7:	1,01	0,99	1,02
NI PLA	1,05	1,01	1,04
Cyclic TPA-BD3-AA2	1,17	1,02	1,14

Tabla 26. 15 minutos

	15 min						
	tr	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Media	Desvest	DSR%
PABDH	5,23	809676	820856	806012	812181,333	7732,6325	0,95208203
Ciclyc N5	4,35	187721	202479	225315	205171,667	18941,0942	9,23182743
Ciclyc N6	4,59	264082	290051	268936	274356,333	13806,9638	5,03249321
Ciclyc N7	4,76	303022	314597	306002	307873,667	6010,20036	1,95216448
NI PLA	5,93	501434	596340	530901	542891,667	48575,9125	8,94762537
TPA	5,49	790125	845080	761789	798998	42348,4978	5,30020073

Tabla 27. 30 minutos

	30 min						
	tr	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Media	Desvest	DSR%
PABDH	5,23	937707	883462	941419	920862,667	32443,0599	3,523116
Ciclyc N5	4,36	198840	202155	219399	206798	11037,944	5,3375487
Ciclyc N6	4,6	276173	302416	284715	287768	13385,2295	4,65139609
Ciclyc N7	4,77	338306	290621	289476	306134,333	27867,3619	9,10298482
NI PLA	5,93	538694	438599	573529	516940,667	70045,9268	13,5500902
TPA	5,49	668363	649974	729253	682530	41494,7934	6,07955597

Tabla 28. 45 minutos

	45 min						
	tr	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Media	Desvest	DSR%
PABDH	5,2	713312	788131	803809	768417,333	48362,1571	6,29373584
Ciclyc N5	4,37	172090	226003	191787	202335	27280,3899	13,4827834
Ciclyc N6	4,61	201511	270893	224266	232223,333	35368,84	15,2305281
Ciclyc N7	4,78	301659	305385	298946	301996,667	3232,75337	1,07045995
NI PLA	5,93	468286	565505	530300	521363,667	49221,713	9,44095574
TPA	5,49	612281	746559	735575	698138,333	74557,1816	10,6794281

Los resultados permiten fácilmente descartar los 45 minutos de extracción.

Entre 15 minutos y 30 minutos al final se ha elegido 30 minutos porque se ha pensado que en el ensayo real, al no verse sometido a agitación, no habría tanta homogeneidad entre la parte más sólida y la más acuosa del concentrado, por tanto costará más tiempo la extracción de los oligómeros que hayan quedado atrapados en la pulpa. Por eso, sería conveniente pensar que el tiempo de extracción algo más largo, habiendo dado resultados parecidos en los ensayos hechos hasta ahora, nos da más seguridad ante esa incertidumbre con respecto al análisis real.

En resumen, al final de todo el proceso de optimización el método seleccionado va a ser una doble extracción secuencial usando 8 ml de hexano por extracción y empleando 30 minutos por cada extracción.

4.8 Ensayo con muestra real:

La misma cantidad de concentrado de zumo se colocó por pesada en cada uno de los recipientes, se cerraron con sus tapas y se envolvieron en papel albal, manteniéndolos en el frigorífico durante 10 días. Transcurrido ese tiempo se sacaron se quitó la tapa de las cápsulas y se tomaron 5 ml de zumo con micropipeta de cada una de ellas. Se vertieron en sendos viales de 20 ml desde donde se procedió con el método de doble extracción con hexano usando 8 ml por extracción y 30 minutos de tiempo.

Los resultados parecen aclarar que no hay cantidades cuantificables de Cyclic (LA)_n oligomer n=5 ni de Cyclic (LA)_n oligomer n=7 puesto que no se ven picos, pero hay una ligera duda con unos picos pequeños que aparecen cerca de donde se esperaban los demás compuestos. Esta cromatografía se realizó con la columna fuera del equipo, debido a problemas técnicos que surgieron con el cromatógrafo. Al contrario que las anteriores, se planteaba la duda de si la diferencia de posición podía ser debida a ese hecho o lo más probable es que fuesen en realidad picos no relacionados con los oligómeros estudiados.

Para comprobar su identificación se dopó la disolución obtenida resultante de la migración, añadiendo 500 ul de una disolución preparada a partir de 0,1 ml de dopante y 0,9 ml de EtOH:H₂O 50:50 en el vial de la réplica 1 del ensayo con zumo real. De esta forma, se puede comprobar si crecen esos picos o crecen otros picos junto a ellos, inyectando también las réplicas 2 y 3 sin dopar. También se inyectó el mismo día una muestra de EtOH:H₂O dopado y filtrado y con uno de los viales de pruebas anteriores en concreto la réplica 1 del dopado al final del proceso para comprobar el tiempo al que salen los picos y cerciorarnos del todo.

El resultado ha sido que, como suponíamos, los supuestos picos aparecen en distinta posición a los picos de los componentes que nos interesan. Por tanto podemos confirmar que no ha habido migración del polímero hacia el concentrado de zumo en cantidades significativas en los oligómeros objeto de este estudio.

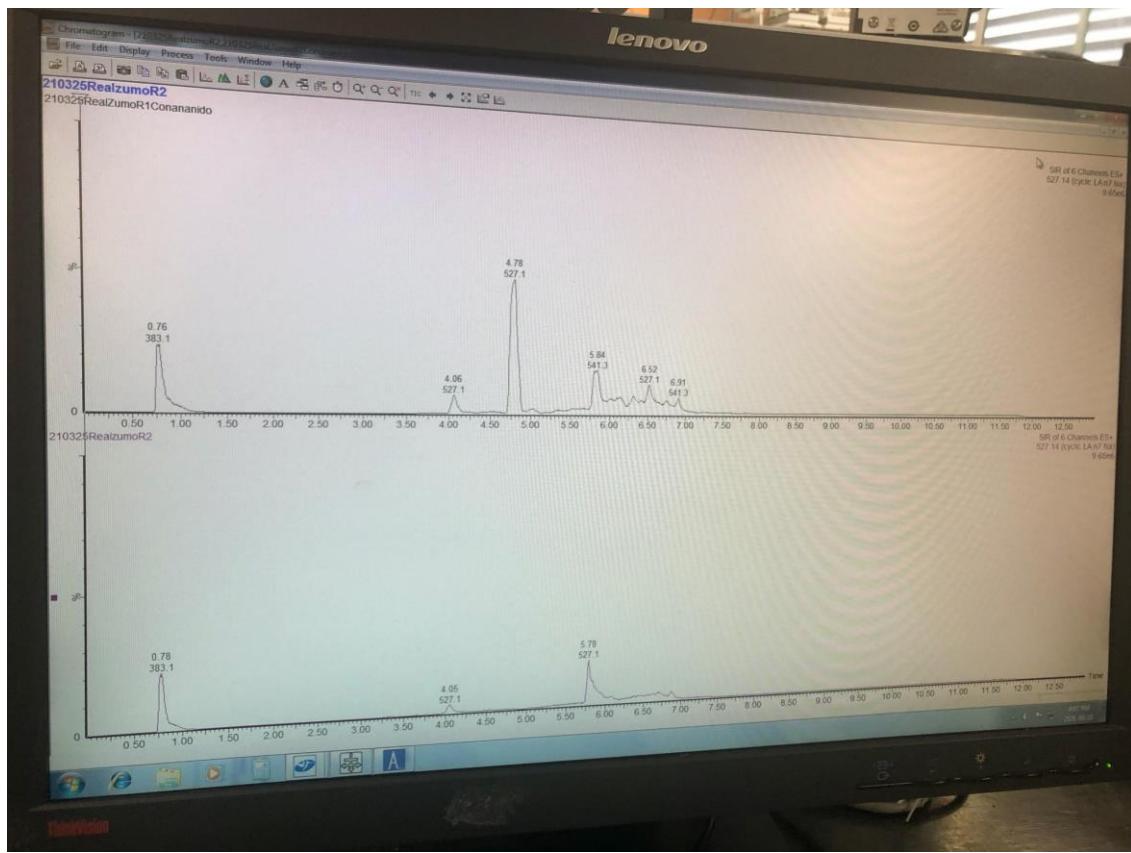


Figura 12. Cromatograma comparado añadido y normal (I)

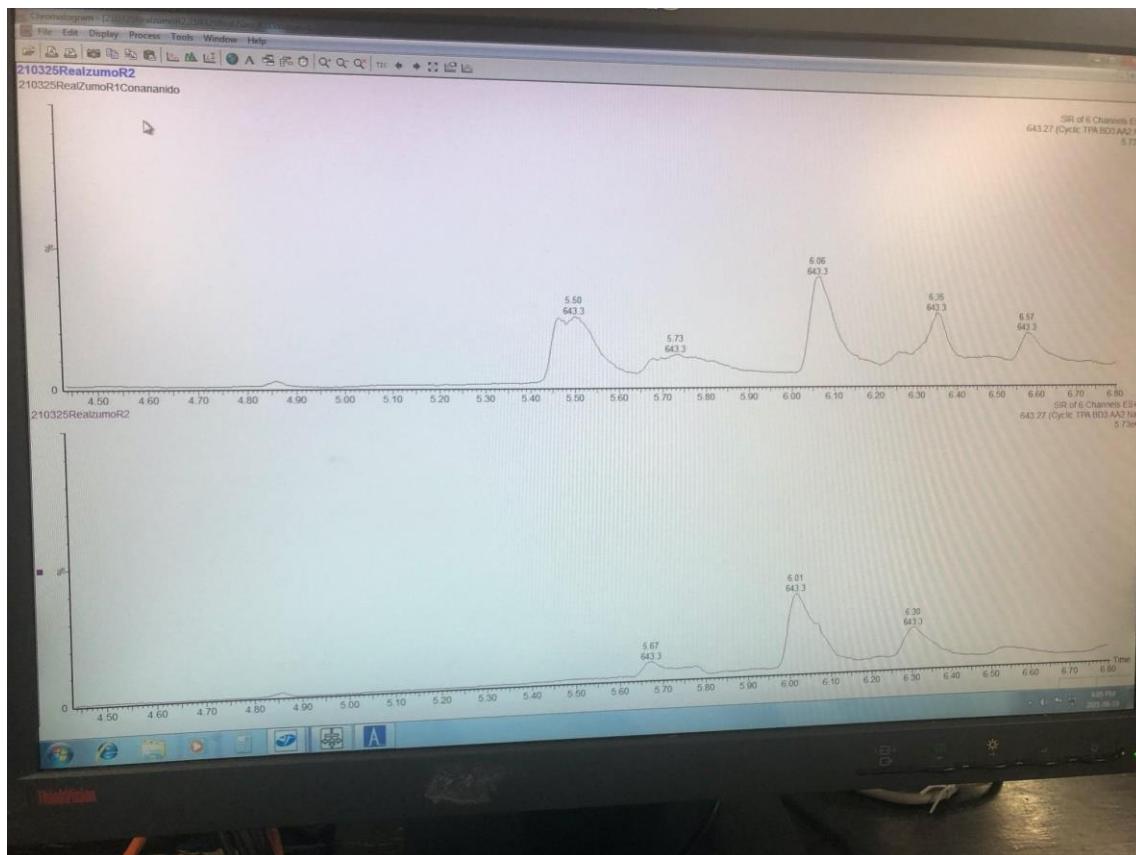


Figura 13. Cromatograma comparado añadido y normal (II)

5. Conclusiones

Se ha desarrollado y probado la efectividad de un método para la extracción y el análisis posterior en UPLC-Triple cuadrupolo de oligómeros en muestras de zumo concentrado de naranja, aunque es probable que el resultado pueda ser extrapolable a otros concentrados de frutas especialmente de Limón o Pomelo, ya que tienen características similares a Naranja.

El método se ha optimizado para obtener un mayor rendimiento en la extracción de dichos oligómeros de tamaño medio y relativamente poco polares haciendo que el análisis pueda detectar cantidades altamente menores que las cantidades que se consideran peligrosas según la legislación en materia de oligómeros migrantes.

Por otro lado se ha comprobado con el citado método optimizado utilizando muestra real, es decir el concentrado de zumo de naranja que se espera vaya en las cápsulas, que no hay migración de componentes de dicho polímero hacia el concentrado en cantidades significativas y que por tanto se puede decir que se cumple la normativa para envases puesto que el instrumento puede detectar una cantidad de oligómeros menor que la cantidad legal permitida por lo tanto su comercialización se puede aceptar en los países de la Unión Europea.

6.Bibliografía

Ambientum.

Datos sobre la contaminación que causa el plástico (acceso February 2021)
<https://www.ambientum.com/ambientum/residuos/contaminacion-plastico.asp>

Aliaño Gonzalez, María

Desarrollo de Técnicas de Extracción y Análisis de Polifenoles y Antocianos en Açaí. TFG
Universidad de Cadiz. 2014

Aral.

La industria de zumos y néctares fundamental en el sector agroalimentario español. (acceso February 2021)
https://www.revistaaral.com/bebidas/la-industria-de-los-zumos-y-nectares-fundamental-en-el-sector-agroalimentario-espanol_380141_102.html

Beldi. G; Pastorelli S; Franchini F y Simoneau C

Time and temperature-dependent migration studies of Irganox 1076 from plastics into foods and food simulants.

Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2012;29(5):836-45. doi: 10.1080/19440049.2011.649304. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22313384.

Canellas, Elena; Vera Paula; Song, Xue-Chao; Nerin, Cristina, Goshawk, Jeff y Dreolin, Nicola

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 2021, 350, 129260, DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129260

Farajzadeh, Ali; Alavian, Ali y Dabbagh M.

Application of vortex-assisted liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets for determination of some pesticides in fruit juice samples. Royal Society of Chemistry 2018

Interempresas.

Identificación de migrantes en plásticos en contacto con alimentos (accessed February 2021)
<https://www.interempresas.net/Plastico/Articulos/41307-Identificacion-de-migrantes-en-plasticos-en-contacto-con-alimentos.html>

Liu, Yi-Qui; Wrona, Magdalena; Su, Qi-Zhi; Vera, Paula; Nerín, Cristina and Hu, Chang-Ying

Influence of cooking conditions on the migration of silicone oligomers from silicone rubber baking molds to food simulants

Food Chemistry 2021, 347,128964, DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128964

Martin-Ramos Pablo

Síntesis de ácido poliláctico (acceso February 2021)
https://www.researchgate.net/figure/Figura-71-Sintesis-de-poliacido-lactico-PLA_fig14_321331624

Sanches A; Cruz Freire; Franz R y Paseiro Losada P

Time-temperature study of the kinetics of migration of diphenylbutadiene from polyethylene films into aqueous foodstuffs.

Food Research International 20

Úbeda, Sara.; Aznar, Margarita.; Alfaro, Pilar.; Nerin, Cristina.

Migration of oligomers from a food contact biopolymer based on polylactic acid (PLA) and polyester.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411, 3521-3532; DOI:10.1007/s00216-019-01831-0

Úbeda, Sara; Aznar, Margarita; Kjerstine Rosenmai, Anna; Vinggaard, Anne Marie; Nerín, Cristina.

Migration studies and toxicity evaluation of cyclic polyesters oligomers from food packaging adhesives

Food Chemistry. 2020, 311, 125918, DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125918

Úbeda, Sara; Aznar, Margarita y Nerín Cristina

Determination of oligomers in virgin and recycled polyethylene terephthalate (PET) samples by UPLC-MS-QTOF

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018; 410 (9): 2377-2384, DOI:10.1007/s00216-018-0902-4

Úbeda, Sara; Aznar, Margarita; Vera, Paula; Nerín, Cristina; Henríquez, Luis; Taborda, Laura y Restrepo, Caludia

Overall and specific migration from multilayer high barrier food contact materials—kinetic study of cyclic polyester oligomers migration.

Food Additives and Contaminants: Part A, 2017, 34(10), 1784-1794.

DOI:10.1080/19440049.2017.1346390

Facultad de Ciencias Universidad Nacional de la Patagonia

Polímeros biodegradables (accessed February 2021)

<http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/fisicoquimica/wp-content/uploads/2017/07/polimeros-biodegradables.pdf>

Zhou, Hong-Wei; Sonego Lilliam, Ben-Aire,Ruth; Lurie, Susan.

Analysis of Cell Wall Components in Juice of ‘Flavortop’ Nectarines during Normal Ripening and Woolliness Development. Journal of the American Society for Horticultural Science 1999

Agradecimientos

Agradezco la ayuda que he recibido por parte de los miembros del grupo GUIA durante el TFG en especial por parte de Cristina, Sara y Magdalena.

A mi familia por el apoyo que me han dado tanto en este el último curso como durante el resto de la carrera.

A mis amigos Sergio y Luis Ignacio.