



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Evaluación de la seguridad de materiales
plásticos destinados al contacto con
alimentos.

Risk assessment of plastic packaging materials
intended to food contact.

Autor:

Álvaro Martínez García

Directora:

Margarita Aznar Ramos

Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza

Grado Química

Año 2022

Índice

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción y antecedentes	4
1.1. Seguridad alimentaria.....	4
1.2. Migración	5
1.3. HS-SPME-GC-MS	6
1.4. Leche materna y almacenamiento	7
2. Objetivos y planteamiento	9
3. Desarrollo experimental.....	10
3.1. Equipos, reactivos y muestras	10
3.1.1. Equipos	10
3.1.2. Disolventes y reactivos	10
3.1.3. Muestras.....	10
3.2. Ensayos de migración	11
3.3. Análisis de las muestras de bolsa de leche	12
3.4. Condiciones de análisis HS-SPME-GC-MS.....	12
3.5. Recta de calibrado.....	13
4. Resultados y discusión	14
4.1. Optimización del método	14
4.2. Recta de calibrado.....	17
4.3. Cuantificación de los analitos en la migración a leche y simulante alimentario D1	18
4.4. Identificación de nuevos migrantes en el simulante alimentario D1 y en la leche.	20
4.5. Identificación de compuestos volátiles antes y después de la migración.....	21
5. Conclusiones.....	24
6. Bibliografía	25

Resumen

En la actualidad, una gran parte de los alimentos se encuentran envasados en materiales plásticos. Los envases plásticos contribuyen a evitar las contaminaciones externas y a alargar la vida útil del alimento, sin embargo los componentes de estos pueden migrar hacia el alimento y poner en riesgo la salud del consumidor.

En este trabajo se evalúa la seguridad de la leche almacenada en bolsas comerciales de polietileno destinadas al almacenamiento de leche materna. El almacenamiento de leche materna ha aumentado con el objetivo de que la mujer pueda conciliar la vida laboral con la lactancia, por lo que es importante garantizar la seguridad de las mismas.

Para ello, se optimizó un método de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza acoplado a cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS) para la determinación de los principales migrantes de las bolsas estudiadas (benceno 1,3-bis (1,1-dimetiletil), 2,6-di-tertbutilbenzoquinona, 2,4-ditertbutilfenol y 2,4-di-t-butil-6-nitrofenol). Estos compuestos provenían principalmente de la degradación del Irgafos 168, un antioxidante comúnmente utilizado en polietileno. Se cuantificaron estos migrantes tanto en simulante alimentario (etanol 50%, v/v) como en leche comercial para 6 tipos de bolsas de leche, observándose que para algunas de las muestras se superaban los valores límite establecidos de migración.

Para completar el estudio se identificaron nuevos migrantes en ambas matrices y se estudiaron las bolsas antes y después de la migración, pudiendo confirmar la disminución de los migrantes estudiados y la de otros compuestos cuya presencia no se vio finalmente en la migración.

Abstract

Nowadays a huge part of food is packaged in plastic materials. Plastic packaging has made an important contribution to avoid external contamination and extend the shelf life of food, however their components can migrate into the food and put customers health at risk.

In this work, the safety of milk stored in commercial polyethylene bags intended for the storage of breast milk is evaluated. The storage of breast milk has increased so that women can reconcile working life with breastfeeding; therefore, it is important to ensure their safety.

Solid phase microextraction method in headspace coupled to gas chromatography with detection by mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was optimized for the determination of the main migrants of the bags studied (benzene 1,3-bis(1,1-dimethylethyl), 2,6-di-tert-butylbenzoquinone, 2,4-di-tert-butylphenol, and 2,4-di-t-butyl-6-nitrophenol). These compounds came from the degradation of Irgafos 168, an antioxidant commonly used in polyethylene. These migrants were quantified in food simulant (ethanol 50%, v/v) and in commercial milk for 6 types of milk bags, observing that for some of the samples the established migration limit values were exceeded.

To complete the study, new migrants were identified in both matrixes and the bags were studied before and after migration, being able to confirm the decrease of the migrants studied and other compounds whose presence was not finally seen in the migration.

1. Introducción y antecedentes

Durante estos últimos años los plásticos han aumentado su presencia en la vida cotidiana. Uno de los ámbitos en los que más se ha incrementado su uso es en la industria alimentaria, empleándose principalmente como envases.

La preocupación social, consecuencia de la detección en los alimentos de sustancias que son transferidas del plástico en contacto con ellos, ha sido la causa de diferentes estudios llevados a cabo por varios grupos de investigación. En este trabajo se aborda el estudio de la seguridad de bolsas de plástico destinadas al almacenamiento de leche materna. Para ello se ha elegido como método de análisis la microextracción en fase sólida en espacio de cabeza acoplado a cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).

1.1. Seguridad alimentaria

En los tiempos actuales, la seguridad alimentaria se ha situado como una de las principales preocupaciones dentro de la sociedad. La seguridad alimentaria, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), *“se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana”*¹.

El sector alimentario ha evolucionado hacia unos alimentos que, en su mayoría, se encuentran envasados, lo que permite que queden en unas condiciones de conservación y manipulación que aseguren la calidad y seguridad alimentaria. Los materiales utilizados para la fabricación de estos envases son múltiples y de características diversas. Aunque la función esencial de un envase es la de contener el producto y mantener la calidad de este, es un requisito indispensable que no produzca interacciones con su contenido².

En el año 2004, con la aprobación del Reglamento (EC) 1935/2004³ sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos se determina que *“cualquier material u objeto destinado a entrar en contacto directa o indirectamente con alimentos ha de ser lo suficientemente inerte para evitar que se transfieran sustancias a los alimentos en cantidades lo suficientemente grandes para poner en peligro la salud humana, o para ocasionar una modificación inaceptable de la composición de los productos alimenticios o una alteración de las características organolépticas de éstos”*, lo que supone un cambio respecto a los controles necesarios sobre los mismos. La aprobación de este reglamento supuso un incremento en las investigaciones con temática en este campo.

A pesar de la existencia de envases alimentarios fabricados a partir de materiales como el vidrio o el cartón, la gran mayoría de los envases son plásticos. A raíz del incremento del uso de estos materiales para la fabricación de envases, se puso en vigor el Reglamento (UE) N°10/2011³, el cual hace referencia a los plásticos destinados a estar en contacto con alimentos. En el campo de la química se entiende por plásticos a aquellos compuestos orgánicos macromoleculares con simplicidad estructural que se obtienen a partir de reacciones de polimerización, en las cuales partimos de una unidad menor denominada monómero. Entre dichos plásticos destacan, por ser más usados en la fabricación de envases, polímeros más convencionales, como el polietileno (PE),

polipropileno (PP), tereftalato de polietileno (PET), o poliestireno (PS); y en los últimos años, biopolímeros como el almidón o el PLA (ácido poliláctico).

Asimismo, con el objetivo de que el material final presente las propiedades finales deseadas, es necesaria la adición de aditivos al polímero.

Los aditivos son sustancias que van dispersas en la matriz polimérica, sin afectar a la estructura molecular, y cuya función es mejorar las propiedades de los materiales plásticos⁴. En el campo de los envases, los aditivos más comunes son antioxidantes, absorbedores UV o plastificantes. Finalmente, he de destacar la importancia del análisis de adhesivos (utilizados en la fabricación de envases multicapa) y tintas de impresión que presentan los envases plásticos, ya que también son susceptibles del proceso migratorio.

El cuerpo humano no es capaz de absorber sustancias con un peso molecular superior a 1000 Da, por lo que el riesgo para la salud reside principalmente en las sustancias de bajo peso molecular que están presentes en el envase y pueden pasar al alimento mediante la migración³.

1.2. Migración

La migración se define como la transferencia de masa de una fuente externa al producto envasado a través de un proceso submicroscópico⁵. En consecuencia, este fenómeno puede provocar una disminución de la calidad de producto envasado siendo peligroso su consumo⁶.

El proceso de migración se debe a la difusión de los analitos, basada en las leyes de Fick, y a los procesos de equilibrio entre envase-alimento. Estos procesos dependen de las propiedades fisicoquímicas tanto del envase como del alimento, de las condiciones de temperatura y tiempo o del tipo de interacción con el analito. Dentro de migración podemos diferenciar entre la migración global, que hace referencia a la cantidad total de componentes que migran, y la migración específica, la cual evalúa únicamente una sustancia concreta⁷.

El Reglamento (UE) N°10/2011 es el documento que establece la normativa a nivel europeo para la fabricación y comercialización de materiales y objetos plásticos que van a estar en contacto con alimentos. El reglamento abarca una lista positiva de sustancias autorizadas para la producción de materiales plásticos destinados al contacto con los alimentos, así como su límite de migración específica (LME) expresado en mg/kg³.

Dentro de las sustancias recogidas se abarcan tanto las sustancias añadidas de forma intencionada durante la fabricación del material de envase (IAS, *Intentionally Added Substances*), como aquellas sustancias provenientes de impurezas, degradación, productos de reacción o contaminación (NIAS, *Non Intentionally Added Substances*)⁸.

El Reglamento, a la hora de establecer las condiciones de los ensayos de migración, tiene en cuenta "*las peores condiciones previsibles de uso y toxicidad*" y establece para cada sustancia, un límite de migración específica con el fin de garantizar la seguridad³.

Los ensayos se basan en la aplicación de condiciones normalizadas de duración, temperatura y medio de ensayo. Este medio corresponderá a un simulante alimentario

que dependerá del alimento que vaya a estar en contacto con el envase. La **Tabla 1** muestra los diferentes simulantes alimentarios que puede ser utilizados³.

Tabla 1. Lista de simulantes alimentarios del Reglamento (UE) Nº10/2011.

Simulante alimentario	Abreviatura
Etanol 10% (v/v)	Simulante alimentario A
Ácido acético 3% (w/v)	Simulante alimentario B
Etanol 20% (v/v)	Simulante alimentario C
Etanol 50% (v/v)	Simulante alimentario D1
Aceite vegetal	Simulante alimentario D2
Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno), tamaño de partícula 60-80 malla, tamaño de poro 200 nm	Simulante alimentario E

Como se ha nombrado anteriormente, el reglamento recoge en su anexo I, una lista positiva de sustancias autorizadas para la producción de materiales plásticos destinados al contacto con los alimentos, así como el límite de migración específica (LME). Para aquellas sustancias que no presenten un valor específico de LME, se establece de manera general el valor del límite de migración global (LMG), 60 mg/kg de alimento. Las sustancias ausentes en la lista positiva deben encontrarse por debajo de 10 µg/kg en migración.

1.3. HS-SPME-GC-MS

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica de separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles, la elución se produce al pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna, donde en función de la composición de esta, retendrá más o menos a los compuestos que interaccionen con ella. Es en la actualidad el método más usado para separar compuestos volátiles y semivolátiles. En función del sistema de introducción de muestra empleado permite el análisis de compuestos volátiles presentes en matrices gaseosas, líquidas o sólidas. En los análisis realizados la inyección de la muestra se realizó mediante microextracción en fase sólida (SPME).

La SPME permite la extracción de la fracción volátil de las muestras quedando retenida en la fibra de sílice recubierta de un sorbente, para posteriormente desorberlos en la cabeza de la columna mediante una desorción térmica. Son numerosas las ventajas que presenta este sistema de extracción, gran capacidad de preconcentración, bajo coste, volúmenes de muestra pequeños, capacidad de automatización o su versatilidad permitiendo analizar muestras y analitos muy diferentes, únicamente teniendo que cambiar la fibra (el sorbente)⁹.

Puesto que la matriz de este trabajo era leche, una matriz compleja, se utilizó el modo Head Space (HS) o espaciado de cabeza. Este modo implica el tratamiento térmico y/o mecánico de la muestra para que esta libere los compuestos volátiles que presenta. Los volátiles se encontrarán en un espacio gaseoso dentro del recipiente (hermético) que contenga la muestra. Posteriormente se introducirá la fibra para extraerlos.

Esta técnica presenta una elevada versatilidad, ya que existen diferentes fibras comercializadas para las cuales su sorbente cambia permitiendo aplicaciones y análisis

más específicos y con mejores resultados. La elección de la mejor fibra según el análisis que se vaya a realizar es uno de los primeros puntos de partida en las investigaciones que emplean SPME.

En la cromatografía de gases se pueden utilizar una gran variedad de columnas. Estas varían en la fase estacionaria que recubre las paredes o en las dimensiones (longitud, diámetro interno y espesor de la fase estacionaria). Actualmente predominan las capilares que presentan una mayor longitud pero menor espesor y diámetro interno, ya que proporcionan una mayor resolución¹⁰.

Por último, la espectroscopía de masas es una técnica de detección que permite diferenciar los iones en función de la relación masa/carga. El analizador de masas permite obtener una señal selectiva y sensible a partir de la fragmentación de los compuestos iniciales. La fuente de iones más común en cromatografía de gases es la de impacto electrónico. Los analitos al recibir estos impactos se suele fragmentar, formando diferentes iones. Las roturas se producen en los enlaces más débiles de cada molécula, por lo que cada una presentara unos patrones de ruptura diferentes.

La corriente de iones entra posteriormente en el analizador de masas, siendo el cuadrupolo (Q) el más común.

El cuadrupolo está formado por cuatro barras metálicas enfrentadas 2 a 2 formando un pasillo a través del cual pasara la corriente de iones. En función del voltaje aplicado se consigue discriminar los iones según su relación masa/carga.

Existen dos modos principales de trabajo, el modo SIM (Single Ion Monitoring) donde se determinarán únicamente los iones con una determinada relación masa/carga y el modo SCAN o modo barrido donde se determinarán todos los iones en un intervalo de relaciones masa/carga.

1.4. Leche materna y almacenamiento

La leche materna es el alimento ideal para los bebés desde su nacimiento hasta los 6 meses. En la actualidad, muchas madres se ven obligadas a interrumpir la lactancia por diversas causas, por lo que el almacenamiento de la leche permite evitar la discontinuidad de la lactancia¹¹.

El periodo de mayor vulnerabilidad del ser humano es la infancia, etapa de maduración y desarrollo de órganos vitales. Los recién nacidos basan su nutrición en la leche materna, ya que contiene múltiples factores que modulan y promueven el desarrollo del sistema inmunitario infantil¹².

La Organización Mundial de la Salud (OMS) aconseja la alimentación exclusiva de leche materna en recién nacidos hasta los 6 meses, a partir de ese momento recomienda comenzar el destete de forma gradual hasta los 2 o 3 años, ya que los niños presentan otras necesidades alimenticias a esa edad¹³.

El almacenamiento de leche materna surge con el objetivo de permitir a las mujeres reincorporarse a su trabajo una vez finaliza su baja maternal, sin la necesidad de interrumpir la lactancia. También permiten a aquellas madres que bien porque no produzcan la cantidad suficiente o presenten alguna enfermedad, que la lactancia de sus hijos no se vea interrumpida¹⁴.

Los bancos de leche humana son los centros especializados en el almacenamiento de la leche donada. La Academia de Medicina de Lactancia Materna (ABM) establece las condiciones óptimas de almacenamiento para garantizar que la leche materna conserve sus propiedades biológicas y organolépticas¹⁵. La **Tabla 2** recoge estas condiciones.

Tabla 2. Guías para el almacenamiento de leche.

Lugar de almacenamiento	Temperatura	Recomendación de máxima duración de almacenamiento
Temperatura ambiente	16-29 °C (60-85 °F)	3-4 horas óptimo 6-8 horas aceptable en condiciones muy limpias
Refrigerador	< 4 °C (39 °F)	72 horas óptimo 5-8 días bajo condiciones muy limpias
Congelador	< -17 °C (0 °F)	6 meses óptimo 12 meses es aceptable

La ABM pauta unas recomendaciones de descongelación si la leche ha sido almacenada en el congelador. Para descongelar la leche se puede mantener durante una noche en el refrigerador o sumergirla en agua caliente unas horas. No se recomienda el uso del microondas ya que es difícil lograr un control de la temperatura y no se produce un calentamiento uniforme en toda la superficie¹⁵.

2. Objetivos y planteamiento

Los estudios previos realizados sobre la migración de compuestos presentes en los envases plásticos a los alimentos confirman la necesidad de su evaluación para garantizar la seguridad de los consumidores. Por otro lado, la importancia de la leche materna en el crecimiento y desarrollo de los recién nacidos hace necesario en muchas ocasiones el uso de bolsas plásticas de almacenamiento, cuya migración ha de ser analizada para poder garantizar la seguridad de los lactantes. Es por ello por lo que se plantea este trabajo, en el que se ha evaluado la migración, tanto a un simulante alimentario como a leche, de un total de 6 bolsas de almacenaje de leche materna de diferentes marcas comerciales.

Tomando como punto de partida los resultados obtenidos previamente en el estudio de la migración de los compuestos volátiles en leche que habían sido realizados en el grupo de investigación donde he desarrollado este trabajo¹⁶, se plantearon los siguientes objetivos:

- Optimización del método HS-SPME-GC-MS para la determinación de: benceno 1,3-bis (1,1-dimetil)etil, 2,6-di-tertbutilbenzoquinona, 2,4-ditertbutilfenol y 2,4-di-t-butil-6-nitrofenol. Estos compuestos fueron los principales migrantes en el estudio previo.
- Cuantificación de los analitos citados anteriormente en la migración a simulante alimentario D1 (etanol 50%) y a leche de 6 bolsas de leche materna de diferentes marcas comerciales.
- Identificación de compuestos volátiles presentes en las 6 bolsas de leche materna seleccionadas.
- Identificación de nuevos migrantes en el simulante alimentario D1 (etanol 50%) y la leche procedentes de las 6 bolsas de leche seleccionadas.
- Evaluación del riesgo en bolsas estudiadas.

3. Desarrollo experimental

3.1. Equipos, reactivos y muestras

3.1.1. Equipos

Para la optimización y el posterior análisis de muestras y ensayos de migración se empleó un cromatógrafo de gases-masas con inyector SPME automático, cuyas especificaciones son las siguientes:

- Inyector automático Combipal de la marca CTC Analytics®.
- Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas HP 5973 Mass Selective Detector de la casa Agilent®

La fibra utilizada fue una fibra SPME de 75 µm Carboxen/PDMS de la casa comercial Supelco® y la columna, una columna Carbowax con medidas 30m x 0,250mm x 0,250µm de la casa comercial Agilent®.

3.1.2. Disolventes y reactivos

Durante la realización del trabajo se emplearon varios disolventes y medios, entre los que encontramos:

- Etanol marca Panreac® (calidad HPLC).
- Agua destilada miliQ tomada del sistema Ultramatic de la casa Wasserlab®.
- Leche de vaca entera comercial de la marca Central Lechera Asturiana®.

Para el estudio de las condiciones a optimizar en el método y la cuantificación de las sustancias migrantes, se emplearon los compuestos mostrados en la **Tabla 3**. Todos ellos fueron adquiridos en Sigma Aldrich Química (Barcelona, España).

Tabla 3. Patrones empleados en las disoluciones mix1 y mix2.

Compuesto	Abreviación	CAS
1,3-Di-tert-butilbenceno	1,3-dtBB	1014-60-4
2,6-Di-tert-butilbenzoquinona	2,6-dtBBQ	719-22-2
2,4-Di-tert-butilfenol	2,4-dtBP	96-76-4
2,4-Di-tert-butil-6-nitrofenol	2,4-dtBNP	20039-94-5

A partir de estos reactivos se prepararon las disoluciones patrón denominadas mix1 (8 mg/kg) y la mix2 (15 mg/kg).

Estas disoluciones patrón se prepararon a partir de una disolución madre de 1000 mg/kg para cada uno de los compuestos, estos patrones se prepararon mediante pesada utilizando metanol como disolvente.

3.1.3. Muestras

Las muestras analizadas corresponden a diferentes bolsas de leche materna de 6 casas comerciales, adquiridas vía internet y otras adquiridas en farmacias. Todas ellas estaban fabricadas con polietileno y contenían tintas de impresión.

Las muestras se etiquetaron de la forma indica en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Identificación Muestras.

Identificación
BLM 01
BLM 02
BLM 03
BLM 04
BLM 05
BLM 06



Imagen 1. Muestra

3.2. Ensayos de migración

Los ensayos de migración se realizaron en todas las muestras con el propósito de cuantificar los migrantes que ya habían sido detectados en los estudios anteriores y de identificar posibles nuevos migrantes.

La migración se evaluó tanto en el simulante alimentario D1, como en la leche entera comercial de la marca Central Lechera Asturiana®. Esta leche no presenta las mismas propiedades que la leche materna, sin embargo, se trata de una aproximación aceptable que permite compararla con el simulante. El Reglamento (UE) nº10/2011 de la Comisión, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, nombra en su anexo III al simulante D1, etanol en un 50% (v/v), como el simulante correspondiente a la leche³.

Las condiciones de los ensayos fueron seleccionadas en base al protocolo de almacenamiento de leche materna de la ABM, que indica que se puede guardar la leche refrigerada (tiempo máximo: 5-8 días) o congelada (tiempo máximo: 6 meses).

En este trabajo se evaluó únicamente la migración de la leche almacenada de forma refrigerada, por considerarse la situación más desfavorable. Todas las bolsas fueron sometidas a las mismas condiciones de migración, se depositaron en la nevera envueltas por papel de aluminio para evitar posibles contaminaciones, a una temperatura de 4-5°C durante el periodo de 7 días.

Para cada muestra se rellenaron 6 bolsas con 60mL (dosis media que consumen los bebés¹⁵), 3 de ellas contuvieron el simulante D1 y las otras 3 la leche.

Una vez transcurridos el tiempo establecido, se procedió a abrir las bolsas y verter su contenido a viales herméticos de vidrio para su posterior análisis.

En el análisis de la migración en leche se trasvasaron 6 mL del volumen de la bolsa al vial hermético de vidrio de 20mL. Por su parte, en las muestras del simulante etanol 50% requirió una dilución previa con agua para evitar dañar la fibra y la saturación de la misma. Se realizó una dilución 2:6 (v/v), tomando 2 mL del simulante y 4mL de agua mili-Q. Finalmente se realizó el análisis de estas muestras mediante HS-SPME-GC-MS, utilizando el método con las condiciones optimizadas y el analizador de masas se empleó el modo SCAN y el modo SIM.

3.3. Análisis de las muestras de bolsa de leche

Las bolsas se trocearon en pequeños fragmentos de menos de 0.5 cm² y se introdujeron 0,3 gramos en viales herméticos de vidrio para sus posterior análisis. Esta operación se realizó en las bolsas antes de realizar el ensayo de migración y también tras el mismo, para lo que previamente se aclararon con agua milliQ. De esta forma, se pudieron identificar los potenciales migrantes, así como la posibilidad de absorción de compuestos de la leche en las bolsas durante el almacenamiento.

Para el análisis se utilizó el analizador de masas en modo SCAN con un rango de m/z entre 45 y 450.

3.4. Condiciones de análisis HS-SPME-GC-MS

Todos los análisis realizados en los ensayos de migración y en los plásticos fueron mediante la misma técnica analítica, HS-SPME-GC-MS, con el mismo programa tanto en el inyector como en el horno y en el detector.

El análisis con SPME constó de tres etapas:

- Incubación: 5min, 90°C, agitación 500rpm.
- Extracción: 30min,90°C, agitación 500rpm
- Desorción: 2min,250°C en splitless

El programa del horno del cromatógrafo utilizado presentaba las siguientes condiciones:

- 1) 2 minutos a 50°C
- 2) Rampa de 10°C/min hasta alcanzar los 300°C

Para la adquisición de datos, se empleó el analizador de masas en modo SCAN con un rango de m/z de entre 45 y 450, y en modo SIM, en el que se seleccionaron las siguientes masas para los analitos a cuantificar:

Tabla 5. Parámetros Analizador Masas para análisis SIM.

Analito	MQ (m/z cuantificación)	MC (m/z confirmación)	Dwell time (s)
1,3-dtBB	175.2	190.2	60
2,6-dtBQ	177.2	220.0	60
2,4-dtBP	191.2	206.2	60
DNBP	208.1	236.1 251.2	60

3.5. Recta de calibrado

La construcción de la recta de calibrado fue llevada a cabo para realizar la cuantificación de los analitos dispuestos en la **Tabla 3**. Esta se elaboró en ambas matrices, simulante D1 y leche, asumiendo la posibilidad de efectos matriz. Partiendo de la disolución mix 2 (15 mg/kg), se prepararon 3 disoluciones intermedias de 0.1, 1 y 10 mg/kg. Estas disoluciones fueron ya preparadas en su matriz correspondiente para evitar la presencia de diferencias en la composición de la matriz entre los puntos de la recta y la muestra.

Finalmente se elaboró una recta de calibrado que abarcó desde los 0 µg/kg hasta los 200 µg/kg.

Para la construcción de las rectas se aplicaron los criterios estadísticos en el estudio de las rectas. En primer lugar, se buscó la posible existencia de algún posible error accidental para la posterior aplicación del Test Q de Dixon, al no encontrarse ningún punto correspondiente a este tipo de errores se prosiguió con el análisis de la regresión en Excel.

En este análisis en primer lugar se observa el análisis de la varianza, al obtener una F experimental superior a la F crítica se cumple la hipótesis nula, implicando que hay una relación lineal entre la concentración y la señal. Continuamos observando los residuos estándares, para cumplir el criterio de homocedasticidad (indica que las incertidumbres de las señales son independientes de la concentración) ningún residuo estándar debe superar el valor de $|2|$, esto permite aplicar mínimos cuadrados.

Al cumplirse estos requisitos y cumpliéndose la condición de homocedasticidad, podemos usar la recta para cuantificar.

Adicionalmente se realizó un estudio de ajuste fino de las rectas para verificar que las zonas altas de la recta no son significativamente diferentes a la parte baja de esta. El criterio que se establece es que la diferencia entre las pendientes debe ser menor del 20%.

4. Resultados y discusión

4.1. Optimización del método

Con el propósito de realizar las determinaciones de los analitos seleccionados con la mayor sensibilidad posible, se llevó a cabo una optimización del método de análisis.

La técnica HS-SPME-GC-MS presenta diferentes variables que influyen el proceso, siendo las más importantes las siguientes¹⁷:

- Tipo de fibra: la naturaleza del analito determina la fibra que se debe de utilizar para lograr una mayor extracción.
- Temperatura de extracción: se trata de la temperatura a la cual tiene lugar la extracción de los compuestos volátiles. Es un parámetro muy importante, se ha demostrado que afecta a la cinética de extracción y a la constante de equilibrio, y por ende a la sensibilidad del proceso.
- Tiempo de equilibrio: tiempo previo a la extracción en el que la muestra se somete a la temperatura de extracción y los compuestos alcanzan el equilibrio
- Tiempo de extracción: tiempo durante el cual la fibra extrae los compuestos evaporados en el espacio de cabeza. Este parámetro también es clave en la extracción.
- Tiempo de desorción: es el tiempo necesario para desorber en el inyector los compuestos retenidos en la fibra.

Además se estudiaron otros parámetros como:

- Presencia de sal
- Dilución de la muestra

En el primer paso se busca seleccionar aquella fibra que presente un recubrimiento que mejore las propiedades de extracción de la fibra para los volátiles seleccionados. Las fibras apolares de PDMS se recomiendan en la extracción de compuestos volátiles más apolares, a diferencia de las fibras polares de PA adecuadas en la extracción de compuestos más polares¹⁷. Existen a su vez fibras que combinan varios sorbentes haciéndolas más versátiles.

Las fibras comerciales que se utilizaron para la optimización fueron las siguientes:

- Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm de espesor.
- Fibra de carboxen / polidimetilsiloxano de 75 μm de espesor (CAR/PDMS).
- Fibra de divinilbenceno / carboxen / polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 μm

El criterio de selección se sustentó en la obtención de la mayor respuesta para los compuestos seleccionados.

Para la selección de la fibra se analizaron 3 réplicas de 20 μL de la disolución mix1 con cada una de las fibras de estudio.

Los primeros experimentos desarrollados para la optimización del método presentaron el objetivo de permitir discernir sobre que fibra utilizar, para lograr una mejor extracción de los analitos en función del sorbente que presenten.

La figura 1 muestra las áreas de los 4 compuestos seleccionados para cada una de las fibras estudiadas: PDMS, CAR/PDMS y DVB/ CAR/PDMS.

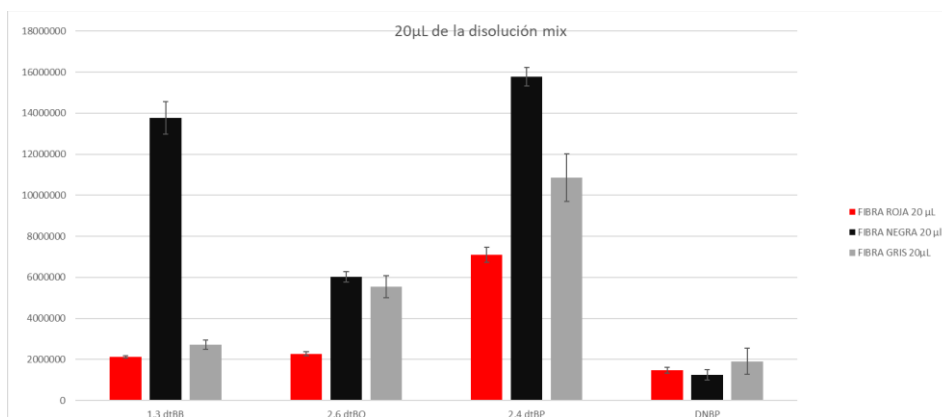


Figura 1. Áreas de los compuestos seleccionados para las fibras SPME estudiadas.

Estos resultados muestran que la fibra negra, cuyo recubrimiento es una mezcla de Carboxen y polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), es la más adecuada para realizar las extracciones en estos ensayos, ya que presenta para la mayoría de los analitos una mayor respuesta.

Una vez elegida la fibra, se procedió con la optimización de los parámetros de extracción, para ello se realizó un diseño experimental que permitió estudiar las variables dentro del rango establecido, permitiéndonos determinar las condiciones óptimas para cada variable, así como, si influyen o no y de qué manera en la respuesta.

Las condiciones de partida (OPT0) se obtuvieron en parte del trabajo de fin de grado de Luis Vivas Barreiro¹⁶ y otra parte en artículo de investigación publicado en *Microchemical Journal* en 2011¹⁸.

Tabla 6. Optimizaciones parámetros.

	Tª extracción (°C)	Tiempo extracción (min)	Tiempo equilibrio (min)	Tiempo desorción (min)	NaCl	Dilución
OPT0	70	30	10	2	No	No
OPT1	50	30	10	2	No	No
OPT2	90	30	10	2	No	No
OPT3	70	15	10	2	No	No
OPT4	70	45	10	2	No	No
OPT5	70	30	10	2	2 g/L	No
OPT6	70	30	10	2	5 g/L	No
OPT7	90	30	5	2	No	No
OPT8	90	30	15	2	No	No
OPT9	90	30	10	1	No	No
OPT10	90	30	10	1.5	No	No
OPT11	90	30	10	2	No	No
OPT12	90	30	10	2	No	5:1
OPT13	90	30	10	2	No	4:2
OPT14	90	30	10	2	No	3:3

Cada uno de estos experimentos de optimización fueron medidos por triplicado en disoluciones que contenían 6 mL de leche y 100 μ L de la disolución mix2 (10 mg/kg).

La figura 2 muestra como para la temperatura de extracción se observó que existía una mejora significativa al alcanzar los 90 °C (OPT2), mientras que a 70 °C (OPT0) y 50 °C (OPT1) la señal era menor.

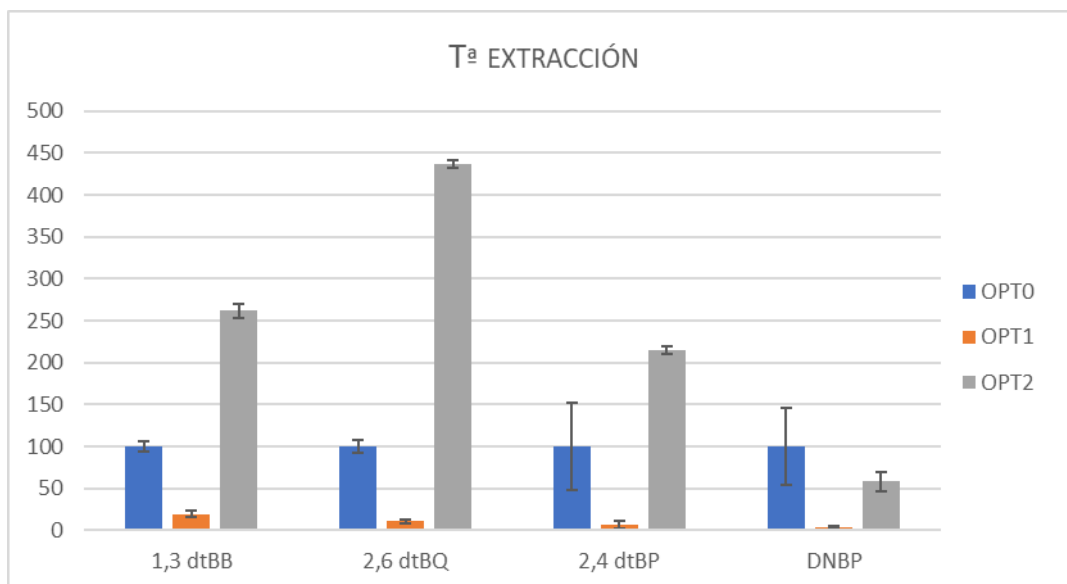


Figura 2. Optimización de la Tª de extracción

El tiempo de extracción optimo corresponde a 30 minutos (OPT 0) A pesar de verse una mejora en alguno de los compuestos para 45 minutos (OPT 4), se desestimó éste como consecuencia del aumento en el tiempo de realización del análisis sin obtener diferencias significativas. Se observó por otro lado que un tiempo de 15 minutos (OPT 3) era insuficiente.

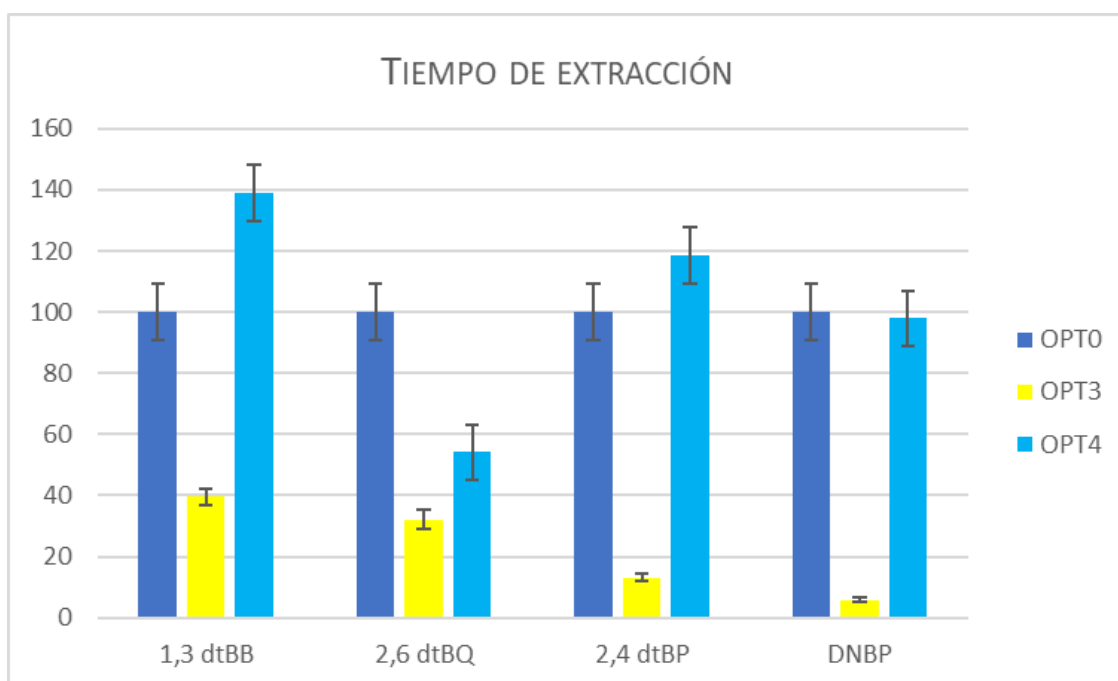


Figura 3. Optimización del tiempo de extracción.

Los resultados de los experimentos correspondientes a la optimización del tiempo de equilibrio y el tiempo de desorción mostraron que los mejores resultados correspondían a 5 minutos de equilibrio y 2 minutos de desorción (Anexo I).

Quedando por tanto el método optimizado con los valores correspondientes a la optimización 7.

Los ensayos para valorar una posible mejora con la adición de sal o diluyendo (OPT12, OPT13, OPT14), demostraron que en ninguno de los casos se producían mejoras claras en la extracción ya que en algunos analitos no mejoraba la señal o las mejoras eran mínimas, suponiendo ambos procesos un mayor tiempo en la preparación de la muestra.

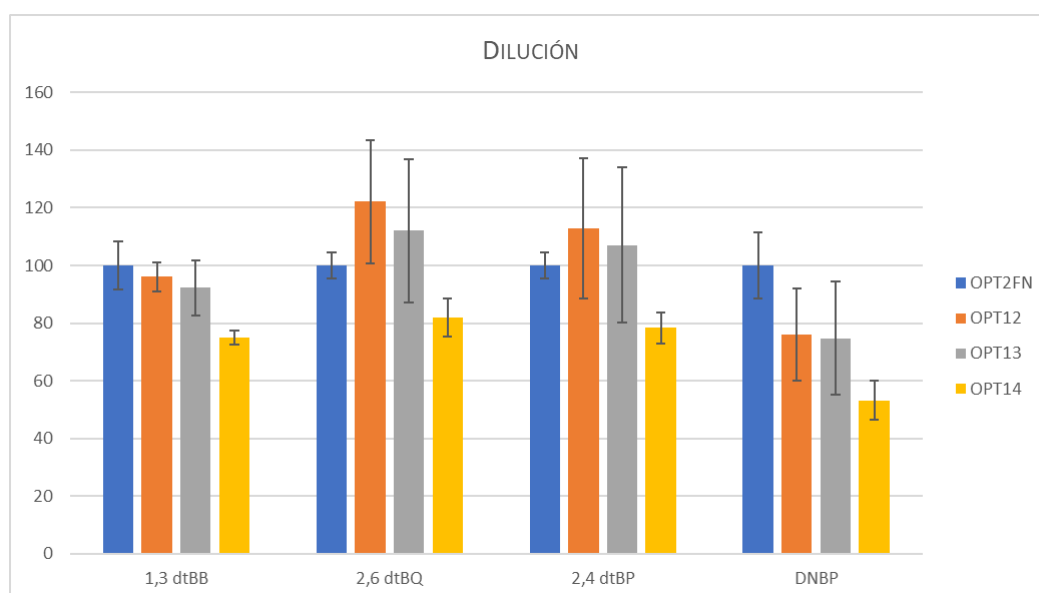


Figura 4. Optimización de la dilución.

La optimización 11 evaluó un cambio en el *dwell* time de los iones seleccionados en el método SIM. Este término hace referencia al tiempo de permanencia del espectrómetro de masas en cada una de las masas objetivo, es un parámetro que también debe optimizarse ya que un aumento en el *dwell* conlleva un aumento en la sensibilidad y precisión del método, pero a su vez tiempos muy altos pueden dar lugar a picos poco definidos.

4.2. Recta de calibrado

Se aplicó el test estadístico t de Student para verificar la presencia de efectos matriz, mediante la comparación de las pendientes. Se obtuvo un valor de t calculado superior al t tabulado al 95%, lo que indicó que las pendientes eran diferentes significativamente y existían efectos matriz, lo que justifica la necesidad de realizar la rectas de calibrado en etanol 50% o leche dependiendo de la muestra de migración

$$t_{calculada} = 78,96 > t_{tabulada} = 2,12$$

Antes de comenzar con la cuantificación de estos analitos, se calcularon los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para cada uno de ellos. El LD se determina como la concentración a la cual la señal de nuestro pico es 3 veces la señal de la línea base y el LC la concentración a la cual la señal de nuestro pico es 3 veces la señal de la línea base.

Tabla 7. Parámetros analíticos recta en leche.

LECHE	1,3 dtBB	2,6 dtBBQ	2,4 dtBP	DNBP
Recta en leche	$y=59731x+2208.3$	$y=2038.5x-7915.8$	$y=2571,8x-665,39$	$y=67,292+282,28$
Sensibilidad ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	59972,58	2038,46	2571,84	67,292
Rango Lineal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,32-118,26	0,63-38,10	1,13-81,55	0,84-162,37
R ²	0.9960	0.9933	0.9967	0.9848
LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,095	0,20	0,34	0,25
LQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,32	0,63	1,13	0,84

Tabla 8. Parámetros analíticos recta en simulante D1.

Recta en EtOH 50%	1,3 dtBB	2,6 dtBBQ	2,4 dtBP	DNBP
Recta	$y=215560x-8040,2$	$y=5991,3+478,83$	$y=59670x-255654$	$y=359,68x+719,09$
Sensibilidad ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	215559,6	5991,32	59670,4	359,68
Rango Lineal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,22-118,27	0,40-152,39	1,57-163,11	0,33-162,4
R ²	0.9906	0.9954	0.9928	0.9994
LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,065	0,12	0,47	0,01
LQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,22	0,40	1,57	0,33

4.3. Cuantificación de los analitos en la migración a leche y simulante alimentario D1

Para poder poner en contextos los valores obtenidos en las cuantificaciones de los compuestos migrantes, se buscaron los límites que no deben de superar en sus migraciones. Estos migrantes no se encuentran regulados por el Reglamento (UE) n°10/2011 de la Comisión, ya que no aparecen dentro de su Anexo I. Esto implica que no deberían ser detectables, estableciéndose en este reglamento el límite de detectabilidad en 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Para compuestos cuya toxicidad no está legislada se plantea la opción de aplicar las reglas de Cramer¹⁹, a través de las cuales es posible estimar la toxicidad teórica de un compuesto a partir de su estructura molecular. Estas reglas establecen 3 grupos de compuestos de acuerdo a su toxicidad: clase I (toxicidad baja), clase II (toxicidad media) y clase III (toxicidad alta). Cada grupo tiene asignada un valor máximo recomendado de ingesta diaria por Kg de peso corporal que garantiza que no va a suponer problemas de salud en el consumidor. A partir de este valor y asumiendo un peso corporal de un bebé 5 kg de acuerdo con la EFSA²⁰ podemos estimar el límite de migración para ese compuesto. La **Tabla 11** muestra los límites para los compuestos estudiados.

Tabla 9. Valores límite para bebés.

tr	Nombre	CAS	Legislado	Clase Cramer	Límite para bebés (µg/kg)
10.865	1,3-Di-tert-butilbenceno	1014-60-4	NO	Clase I	150
13.786	2,6-Di-tert-butilbenzoquinona	719-22-2	NO	Clase II	45
14.363	2,4-Di-tert-butilfenol	96-76-4	NO	Clase I	150
16.547	2,4-Di-tert-butil-6-nitrofenol	20039-94-5	NO	Clase III	10.5

La **Tabla 12** y la **Tabla 13** nos muestran las concentraciones de los analitos estudiados en leche y etanol 50% respectivamente. En aquellos casos donde los valores de las áreas no entraban en el rango lineal de la recta de calibrado las muestras fueron diluidas para poder llevar a cabo la cuantificación. El anexo II muestra dos cromatogramas de la determinación de estos compuestos en leche y simulante.

Tabla 10. Cuantificación de migrantes en leche

MUESTRA	BLM01	BLM02	BLM03	BLM04	BLM05	BLM06
1,3 dtBB	<LC	18,03 ± 0,26	<LC	<LC	307,89 ± 0,49	188,66 ± 16,47
2,6 dtBBQ	<LC	<LC	4,07 ± 0,06	4,32 ± 0,07	6,63 ± 0,08	7,39 ± 0,14
2,4 dtBP	3,24 ± 1,07	77,46 ± 0,97	138,33 ± 6,04	27,76 ± 1,78	153,5 ± 3,52	98,34 ± 7,29
DNBP	<LD	<LC	<LC	<LC	<LC	<LD

Tabla 11. Cuantificación de migrantes en simulante D1.

MUESTRA	BLM01	BLM02	BLM03	BLM04	BLM05	BLM06
1,3 dtBB	<LC	5,55 ± 0,44	<LC	<LC	107,44 ± 0,83	103,60 ± 0,36
2,6 dtBBQ	<LC	1,26 ± 0,09	4,27 ± 0,36	5,41 ± 0,09	12,55 ± 0,54	23,35 ± 0,32
2,4 dtBP	5,07 ± 0,11	37,67 ± 0,76	84,87 ± 2,79	24,42 ± 1,03	106,83 ± 5,29	268,64 ± 2,63
DNBP	<LD	<LC	<LC	<LC	<LC	<LD

4.4. Identificación de nuevos migrantes en el simulante alimentario D1 y en la leche.

Otro de los objetivos marcados en este trabajo era el de la identificación de nuevos migrantes. El análisis de los cromatogramas reveló la existencia de nuevos migrantes en algunas de las muestras.

Tabla 12. Migrantes identificados

Tiempo de retención	Compuesto	Muestra	Matriz
6,774	3-etil-5-(2-etilbutil)-octadecano	BLM01	Leche
7,151	3-careno	BLM03	Leche
7,409	p-cimeno	BLM05	Leche
7,480	1-cloro-5-metil-hexano	BLM06	Leche
10,094	4-metil-undecano	BLM01	Leche
13,903	2-tert-butil-5-(2-metilprop-2-en-1-il) ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	BLM04	EtOH 50%
14,275	Butilato Hidroxitolueno (BHT)	BLM04	EtOH 50%
14,553	Trans-calamenene	BLM03	EtOH 50%
15,254	2,2,4-Trimetil-1,3-pentanodiol diisobutirato (TMPD)	BLM03	EtOH 50%
16,356	2,4-bis-(1,1-dimetilpropil) fenol	BLM04	EtOH 50%

Entre los compuestos identificados se encontraron: alcanos procedentes del polietileno utilizado en la fabricación de las bolsas; el BHT, un antioxidante comúnmente utilizado en la fabricación de plásticos o el TMPD, un intermediario importante en la producción de resinas sintéticas, tintas o fragancias.

4.5. Identificación de compuestos volátiles antes y después de la migración.

Para completar la investigación, se realizó un análisis de las bolsas antes y después de la migración. Con estos resultados se pueden determinar que compuestos presentes en la bolsa disminuyen tras los ensayos de migración con la leche o el simulante alimentario D1 (etanol 50%).

Este análisis consistió en trocear las bolsas antes y después de la migración, en pequeños fragmentos de menos de 0.5 cm² e introducir 0,3 gramos en viales herméticos de vidrio que posteriormente se analizaron por HS-SPME-GCMS.

Los resultados más interesantes se encontraron para las siguientes bolsas BLM06, BLM05 y BLM04.

Entre los compuestos identificados en la bolsa BLM06, destacan los 3 compuestos que se han ido estudiando a lo largo de este trabajo (1,3-dtBB, 2,6-dtBBQ y 2,4-dtBP) y el isobutil adipato (plastificante). En todos ellos se observa una disminución del área tanto en leche como en etanol 50% respecto al área antes de la migración, lo que indica que estos compuestos han pasado a ambos líquidos del interior.

Se detectan además varios alcanos, destacando el undecano el cual su aumento puede ser debido a su presencia en el etanol utilizado.

No se detectó ninguno compuesto de la leche que pudiera ser retenido en el plástico.

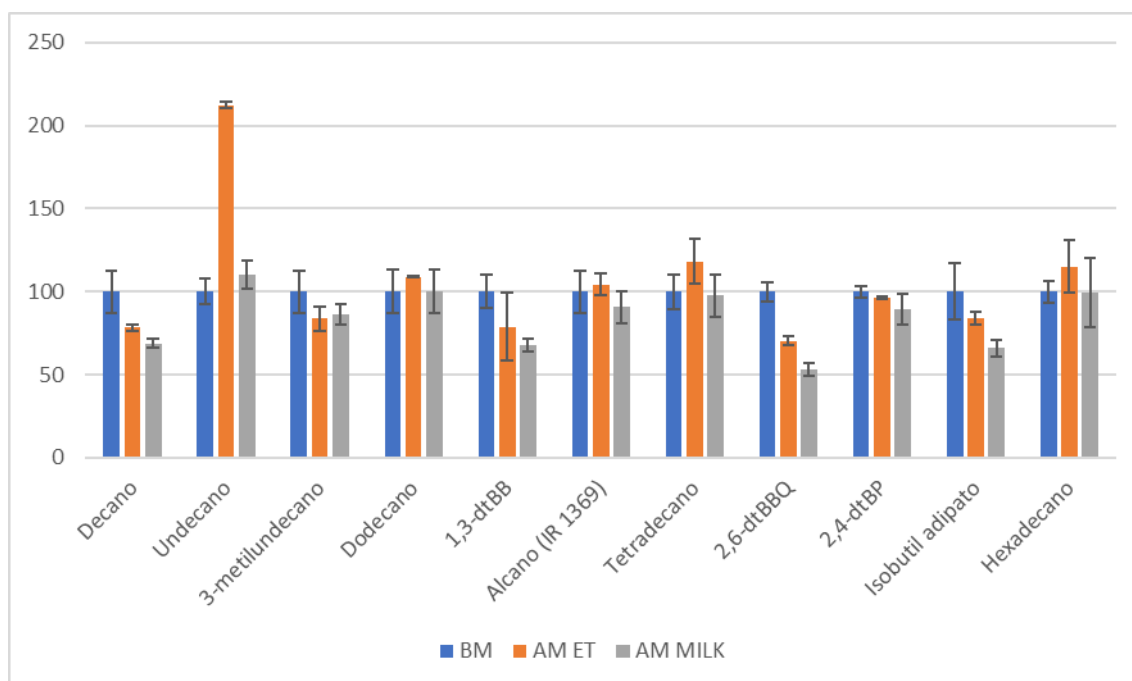


Figura 5. Porcentaje de áreas respecto al área antes (BM) y después de la migración en etanol 50% (AM ET) y en leche (AM MILK) para la bolsa BLM06

Para la muestra BLM05 podemos volver a destacar nuestros analitos y 2 adipatos, plastificantes comúnmente utilizados en los polímeros plásticos. En todos ellos se ve una disminución del área respecto al área antes de la migración, lo que implica que estos compuestos han pasado al simulante/leche.

En el caso del 2,4-dtBP no se ve disminución en la bolsa en contacto con leche pero se observó un pico muy grande en migración. Esto puede ser debido a que el compuesto en la bolsa se encuentre saturado y por ello no sea posible observar una disminución.

Para los alcanos, el aumento de estos en la leche puede deberse a su previo envase en tetrabrick, donde se podría a ver una migración previa a la leche desde este envase.

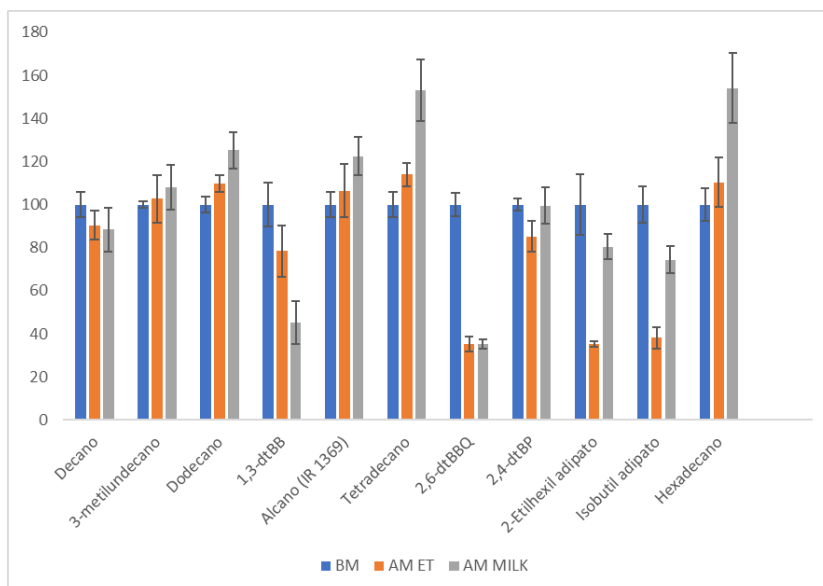


Figura 6. Porcentaje de áreas respecto al área antes (BM) y después de la migración en etanol 50% (AM ET) y en leche (AM MILK) para la bolsa BLM05

En las bolsas BLM04, destacan el 2,4-dtBB, 4-tert-aminifenol (utilizado en fabricación de resinas fenólicas utilizadas en barnices y tintas de impresión) y el surfinol (tensoactivo en recubrimientos y tintas de impresión), en todos ellos se ve una disminución del área respecto al área antes de la migración.

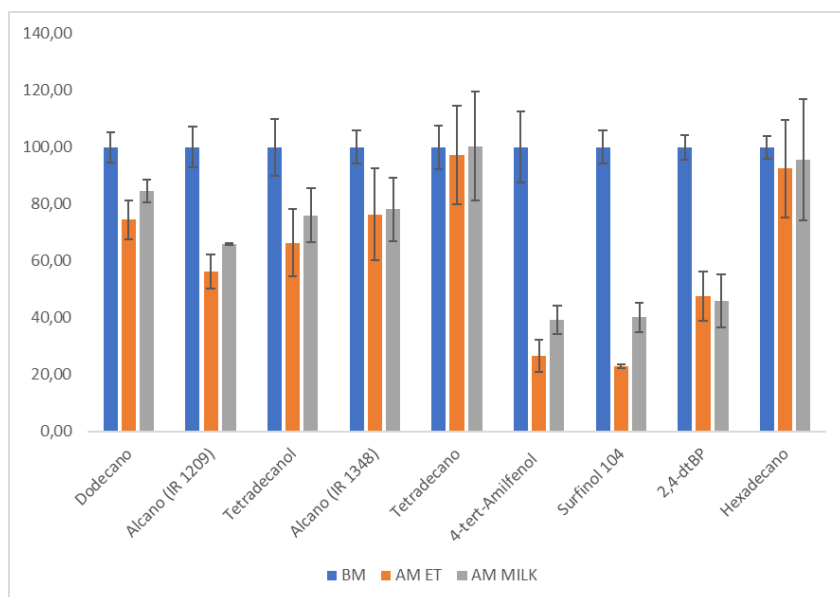


Figura 7. Porcentaje de áreas respecto al área antes (BM) y después de la migración en etanol 50% (AM ET) y en leche (AM MILK) para la bolsa BLM04.

Al buscar los nuevos compuestos cuyas área disminuyeron tras la migración en la leche y el simulante D1 no fue posible detectarlos. En el futuro se planteará un análisis SIM de estos compuestos para bajar el LD.

En las muestras BLM01, BLM02, BLM03 se observó una disminución en sus áreas tras la migración en leche para el 2,4-dtBP (20,6% de en BLM01), 1,3-dtBB (55.1% en BLM02) y 2,6-dtBBQ del 35.3% de en BLM02. En los casos que no se produce disminución se presupone que es debido a saturación de ese compuesto.

También cabe destacar que se encontraron una serie de compuestos que aparecieron en las bolsas BLM03 y BLM04 tras la migración en leche, pudiendo ser estos compuestos de la misma leche o de migración previa del envase que quedarán retenidos en el polietileno.

Tabla 13. Compuestos observados en bolsas después de la migración en leche.

Tiempo de retención	Compuesto	CAS
7,52	Succinato de dimetilo	106-65-0
7,65	N-Metil-γ-butirolactama	872-50-4
7,65	5-Pentanolactama	675-20-7
9,19	Glutarato de dimetilo	1119-40-0

5. Conclusiones

El análisis por HS-SPME-GC-MS demostró ser una técnica muy eficiente en la determinación de los compuestos seleccionados (benceno 1,3-bis (1,1-dimetiletil), 2,6-di-tertbutilbenzoquinona, 2,4-ditertbutilfenol y 2,4-di-t-butil-6-nitrofenol), tanto en leche como en simulante D1 (etanol 50%). Tras la optimización del método se obtuvieron límites de detección por debajo de 1 µg/kg. Las mejores condiciones de análisis fueron: fibra recubierta de Carboxen y polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), T^a de extracción 90°C, tiempo de extracción 30 minutos, tiempo de equilibrio 10 minutos y tiempo de desorción 2 minutos, sin ser necesario adicionar sal o la dilución de la muestra.

En el análisis de estos migrantes para las muestras seleccionadas, se observa que el 1,3-dtBB y el 2,4-dtBP en algunas muestras superan el valor límite establecido para los bebés. Estos resultados demuestran la importancia de la investigación y análisis de los componentes de estas bolsas y su migración. A su vez plantea la necesidad de la realización de test de toxicidad de estos compuestos para garantizar la seguridad.

Por otra parte, otro punto interesante a investigar sería la cinética de esta migración, de forma que determinara si tiempos más cortos de almacenamiento disminuirían significativamente la migración final de estos compuestos.

El análisis de las bolsas, antes y después de la migración, confirmó la disminución de los migrantes estudiados. Mostró además la disminución de otros compuestos cuya presencia no se vio en migración. En el futuro se plantea un análisis dirigido de estos compuestos para bajar el límite de detección y confirmar sus valores en migración. Se observó también que algunos compuestos de la leche eran absorbidos en las bolsas, lo que indica que compuestos de la leche materna podrían también quedar retenidos durante su almacenamiento.

Finalmente con este trabajo se demuestra la importancia que tiene el análisis de materiales plásticos destinados al contacto con alimentos para garantizar la salud del consumidor.

6. Bibliografía

- [1] FAO. La seguridad Alimentaria: Información Para La Toma de Decisiones. 2011,4.
- [2] SEDÓN GARCÍA, R. Estudio de la migración de distintos componentes de los materiales plásticos a los alimentos. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2005.
- [3] Oficial, D.; Comisi,D.E.L.A.; Europeo, P.; Europea, A.; Alimentaria, S.; Directiva, L.; Directiva, E.; Reglamento, E. 15.1.2011. 2011
- [4] GUTIERREZ ATUNDUAGA, S.R. Los aditivos en los materiales plásticos. *Informador Técnico*, 2002, 65, 32-36. <https://doi.org/10.23850/22565035.897>
- [5] CATALA, R.; GAVARA, R. *Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos*; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos: València, 2002.
- [6] CANELLAS, E.; AZNAR, M.; NERÍN, C.; MERCEA, P. Partition and Diffusion of Volatile Compounds from Acrylic Adhesives Used for Food Packaging Multilayers Manufacturing. *J. Mater. Chem.* 2010, 20 (24), 5100-5109. <https://doi.org/10.1039/c0jm00514b>.
- [7] MOLES GASCÓN, P. Optimización de la técnica de extracción FPSE para la determinación de compuestos no volátiles presentes en la migración de biopolímeros basados en ácido poliláctico (PLA). Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2020.
- [8] PETERS, R. J. B.; GROENEVELD, I.; SANCHEZ, P. L.; GEBBINK, W.; GERSEN, A.; DE NIJS, M.; VAN LEEUWEN, S. P. J. Review of Analytical Approaches for the Identification of NonIntentionally Added Substances in Paper and Board Food Contact Materials. *Trends Food Sci. Technol*, 2019, 85, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.010>.
- [9] PEÑALVER HERNANDO, A. M. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. Tesis Doctoral, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2002.
- [10] MAGDALENA, M. Cromatografía. *Universidad Autónoma del Estado México*, 2017, 0 (0), 1–90.
- [11] MAURY, E.; SEQUERA, S.; SÁNCHEZ, D.; BRAVO, A.; ROMERO, M.; VIZCARRA, M. Variaciones en la composición proteica de la leche materna madura durante el almacenamiento por congelación. *Pediatría (Asunción)*, 2010, 37 (3), 187-194.
- [12] RODRÍGUEZ, D. A.; BARRERA, M. K.; TIBANQUIZA, L.P.; MONTENEGRO, A.F. Beneficios Inmunológicos de la leche materna. *Reciamuc*, 2020, 93-104. <https://reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/440/635>, (última consulta 22-6-2022).
- [13] World Health Assembly. Ending Inappropriate Promotion of Foods for Infants and Young Children. Sixty-Ninth World Heal. Assem. 2016, No. May, 7–9.
- [14] PÉREZ, T.; JIMÉNEZ, M.; RODRÍGUEZ, S.; FERNÁNDEZ, L.; CAMBERO, M. I. Nuevo envase para la recogida y almacenamiento de la leche materna. *Ser. Congr. Alumnos. Reduca*, 2014, 6 (1), 300–304.

- [15] Academy of Breastfeeding Medicine. Almacenamiento de Leche Humana. Información Para El Uso Casero En Bebés a Término. *Protoc. la ABM* 2010, 5 (3), 8.
- [16] VIVAS BARREIRO, L. Análisis de migración de compuestos volátiles desde bolsas de leche materna a muestras de leche y a simulante alimentario. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2021.
- [17] VERA ESTACHO, P. Estudio de adhesivos en envase alimentario: desarrollo de métodos de análisis, difusión y migración de sus componentes a los alimentos envasados. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2013.
- [18] RODRIGUES, F.; MESQUITA, P.; DE OLIVEIRA, L.; DE OLIVEIRA, F.; MENEZES, A.; PEREIRA, P.; ANDRADE, J. Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk. *Microchemical Journal*, 2011, 98 (1), 56-61.
- [19] CRAMER, G.M.; FORD R.A.; HALL R.L. Estimation of toxic hazard--a decision tree approach. *Food Cosmet Toxicol.* 1978, 16 (3), 255-76. DOI: 10.1016/s0015-6264(76)80522-6. PMID: 357272.
- [20] ANTUNOVIĆ, B.; BARLOW, S.; CHESSON, A.; FLYNN, A.; HARDY, A.; JEGER, M.; KNAAP, A.; KUIPER, H.; LOVELL, D.; NØRRUNG, B.; PRATT, I.; RIETJENS, I.; SCHLATTER, J.; SILANO, V.; SMULDERS, F. Guidance on Selected Default Values to Be Used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the Absence of Actual Measured Data; Guidance on Selected Default Values to Be Used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the Absence of Actual Measured Data. *EFSA Journal*. 2012, 10 (3), 1-32, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2579>