



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Índice

Índice	0
Resumen	1
Summary.....	2
1. Introducción.....	3
2. Justificación y Objetivos	7
3. Metodología.....	9
3.1. Selección de las condiciones adecuadas para los estudios de migración	9
3.1.1. Vasos de cartón para el consumo de bebidas calientes	10
3.2. Estudios de migración global.....	10
3.3. Análisis de compuestos volátiles presentes en vasos de cartón.....	11
3.3.1. Screening de compuestos volátiles provenientes de vasos de cartón mediante HS-SPME-GC-MS	11
3.4. Estudios de migración específica.....	12
3.4.1. Optimización del procedimiento de análisis de la migración específica mediante SPME-GC-MS.....	12
3.4.2. Evaluación de la migración específica en vasos de cartón para bebidas calientes	13
4. Resultados y discusión	15
4.1. Resultados obtenidos del estudio de migración global.....	15
4.2. Resultados del estudio de los compuestos volátiles presentes en vasos de cartón	16
4.3. Resultados estudios de migración específica.....	21
4.3.1. Resultados de la optimización del procedimiento de análisis de la migración específica mediante SPME-GC-MS.....	21
4.3.2. Análisis de la migración específica mediante SPME-GC-MS de los vasos de cartón para el consumo de bebidas calientes seleccionados	27
4.3.3. Comparación de los resultados obtenidos del análisis de los vasos de cartón y los datos de migración específica.....	32
Conclusiones.....	33
Conclusions	34
Valoración personal.....	35
Bibliografía.....	36

Resumen

La migración de compuestos provenientes de los envases alimenticios, siendo de especial importancia la migración set-off, puede causar alteraciones en la inocuidad y aceptabilidad de los alimentos. Por ello, es de especial importancia su control en la industria alimentaria a través de estudios de migración global y específica. El objetivo de este trabajo ha sido la determinación de la migración de compuestos procedentes de diferentes tipos de vasos de cartón, de uso en máquinas expendedoras de café. Con el fin de cumplir este objetivo, en primer lugar, se han llevado a cabo los estudios de migración global con la selección de los simulantes alimenticios, así como de las condiciones de tiempo y temperatura de los ensayos. Posteriormente, se han llevado a cabo los estudios de migración específica mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases (SPME-GC-MS) seleccionando las condiciones de trabajo, las fibras SPME y las columnas cromatográficas que se iban a utilizar. Además, se han estudiado los compuestos volátiles presentes en los envases de papel mediante microextracción en fase sólida con espacio de cabeza acoplada a cromatografía de gases (HS-SPME-GC-MS). Aquellos compuestos identificados considerados de interés de acuerdo a la legislación se cuantificaron con los patrones correspondientes. Los resultados obtenidos mostraron que, en ningún caso, los compuestos analizados sobrepasaban la normativa legal, y por tanto no se consideró peligroso el uso de dicho material para el consumo de bebidas calientes.

Summary

The migration of compounds from food containers, being of special importance the set-off migration, can cause alterations in the innocuousness and acceptability of the food. Therefore, its control in the food industry through global and specific migration studies is of special importance. The aim of this project has been the determination of the migration of compounds coming from different types of cardboard cups used in coffee vending machines. In order to fulfill this objective, in first place, global migration studies has been done, with the selection of the food simulant as well as the time and temperature conditions for the test. Subsequently, specific migration studies were carried out by solid phase microextraction coupled to gas chromatography (SPME-GC-MS) selecting the microextraction fibers and the chromatographic columns that were to be used. In addition, the volatile compounds present in paper containers were studied by solid phase microextraction with headspace coupled to gas chromatography (HS-SPME-GC-MS). This is quantified with the corresponding patterns. Those identified compounds considered of interest according to the legislation were quantified with the corresponding standards. The results obtained showed that, in no case, the analyzed compounds exceeded the legal regulations, and therefore the use of said material for the consumption of hot beverages was not considered dangerous.

1. Introducción

La migración de compuestos químicos de los envases a los productos alimentarios que contienen, es un proceso submicroscópico de transferencia de masa consecuencia de la tendencia al equilibrio de todo sistema químico (Wan et al., 1995; Catalá & Gavara, 2002). Dicho proceso está controlado por dos mecanismos: partición y difusión (Mannheim & Passy, 1990; Vázquez, 2001; Estacho, 2013).

La partición expresa la distribución del migrante (compuesto químico que migra) entre dos fases cuando se ha establecido el equilibrio dinámico. La constante de partición depende de la solubilidad del migrante con los materiales del envase o con el alimento, la temperatura, la estructura química y tamaño del compuesto, el contenido en grasa y la cristalinidad del alimento. Cuando dicha constante presente un valor inferior a 1 el elemento tendrá una gran tendencia a migrar (Figura 1) (Tehrany & Desobry, 2004; Canellas et al., 2010).

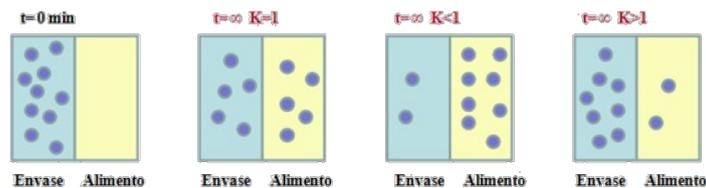


Figura 1. Variación en el mecanismo de partición según los valores de la constante de partición (K). Fuente: Estacho (2013).

La difusión es un parámetro cinético que está relacionado con la movilidad de las moléculas en el material. El coeficiente de difusión dependerá en gran medida del tamaño y peso molecular del compuesto migrante, así como su forma y flexibilidad. Igualmente dependerá de las características de los materiales que componen el envase, su cristalinidad, estado vítreo o gomoso, porosidad, orientación, plastificación y formulación (Reynier et al., 2001a; 2001b; Dole et al., 2006). Cuanto mayor sea el valor de este coeficiente mayor será la migración del compuesto al alimento (Figura 2).

La migración de los envases es un importante objeto de estudio dentro de la industria alimentaria, ya que, puede alterar las propiedades sensoriales de los alimentos, causar efectos tóxicos en los consumidores o incluso cambios en el propio envase (Katan, 1996; Barnes et al., 2006).

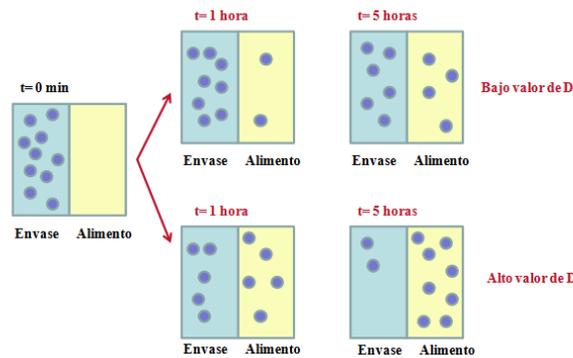


Figura 2. Variación en el mecanismo de difusión con los valores del coeficiente de difusión. Fuente: Estacho (2013).

Los envases alimentarios son a menudo materiales multicapa, que pueden estar compuestos por polímeros plásticos, papel, aluminio, etc. Estas capas se unen mediante distintos adhesivos, y en la mayoría de los envases se aplican tintas y barnices en la capa externa. Todas las capas que contiene el envase pueden migrar al alimento por contacto directo, por difusión de las capas externas a la capa en contacto con el alimento, y por fenómenos de migración set-off (Figura 3) (Nerín et al., 2009; Canellas et al., 2010; Aznar et al., 2011; 2015).

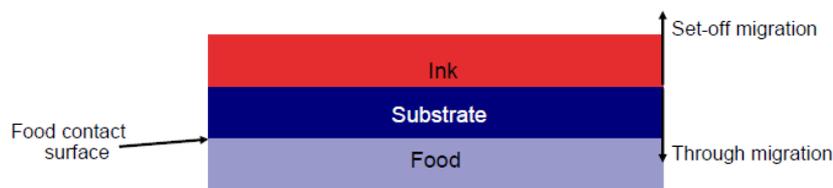


Figura 3. Principales mecanismos de migración envase-alimento.

Los fenómenos de migración set-off consisten en el intercambio de compuestos presentes en las capas externas del envase, normalmente tintas y barnices, hacia la capa interna que está en contacto con los alimentos por contacto directo. Este tipo de migración suele darse durante los procesos de fabricación o almacenamiento en los que los envases se mantienen apilados, hasta su uso, favoreciendo este fenómeno.

Para llevar a cabo el cálculo de la migración de sustancias presentes en el envase hacia el alimento, existen dos formas de llevarlo a cabo, mediante la migración global y la migración específica. El cálculo de la migración global consiste en la cuantificación de todas las sustancias cedidas por el envase y, actualmente no se permite una cantidad superior a 10 mg de compuestos liberados por decímetro cuadrado de superficie de contacto (mg/dm^2), equivalente a una migración de 60 mg/kg. Por otro lado, la migración específica hace referencia a sustancias individuales o a un grupo de ellas (familia) y fija

la cantidad máxima que puede ser cedida al producto alimenticio. Se expresa en mg de sustancia/kg de alimento, en el caso de las sustancias que no tienen una cantidad regulada en el Anexo I del Reglamento (UE) 10/2011, se permite una migración máxima de 60 mg/kg.

Para llevar a cabo los ensayos de migración se utilizan diferentes simulantes alimenticios, tal y como está establecido en el Reglamento (UE) 10/2011. Hay seis tipos de simulantes alimenticios, que se seleccionan según el tipo de alimento que entra en contacto con el envase. Los simulantes alimentarios A, B y C se asignan a alimentos que tienen carácter hidrofílico y son capaces de extraer sustancias hidrofílicas. Los simulantes D1 y D2 se asignan a alimentos que tienen carácter lipofílico y sean capaces de extraer sustancias lipofílicas. El simulante alimentario E se destina para alimentos secos.

Dentro de la gran cantidad de compuestos que pueden migrar desde el envase hacia el alimento destacan de forma importante las tintas, ya que, presentan en su composición: colorantes (pigmentos y tintes), resinas, solventes y adhesivos, si bien se encuentran en muy baja concentración en las tintas de impresión. Actualmente, no existe ninguna legislación que contemple las tintas permitidas en la producción de envases alimentarios. Sin embargo, a raíz del incidente en el que se detectó isopropylthioxanthone (ITX), un compuesto usado en tintas, en una concentración superior a los 250 mg/L en una leche para bebés, a través del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF – the Rapid Alert System for Food and Feed) en 2005, la Asociación Europea de tintas de impresión (EuPIA – European Printing Ink Association) presentó una lista con las tintas permitidas para uso en envases alimentarios (EuPIA, 2018).

Actualmente, el consumo de bebidas calientes (café solo, café con leche, etc.) procedentes de máquinas expendedoras se ha convertido en una práctica habitual en los lugares de trabajo y de ocio. En este tipo de máquinas, los vasos, generalmente de cartón con un recubrimiento plástico y tintados en la parte externa con lo requerido por las empresas de vending, se encuentran apilados en el interior de la máquina dispensadora hasta que el cliente compra el producto. Favoreciendo así, los posibles fenómenos de migración set-off, lo cual, si se suma a la elevada permeabilidad de este tipo de material, favorece que migren compuestos del propio envase al producto, es decir, a la bebida caliente.

2. Justificación y Objetivos

Dado el elevado consumo de bebidas calientes procedentes de máquinas expendedoras, aquí mismo en la Universidad de Zaragoza, y siendo los vasos de cartón materiales susceptibles a la migración por su colocación en las máquinas y por la elevada permeabilidad del material. Se ha considerado interesante llevar a cabo un Trabajo fin de Grado, dados los pocos estudios llevados a cabo sobre este tema, donde se evalúe la migración que tiene lugar en este tipo de envases.

Como objetivo principal de este trabajo se ha planteado la determinación de la migración de compuestos procedentes de diferentes tipos de vasos de cartón de uso en máquinas expendedoras de café mediante la utilización de simulantes alimenticios y las condiciones de migración establecidos en el Reglamento (UE) N°10/2011. Con un posterior análisis de la migración específica que ha podido tener lugar, mediante la microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases con detector de masas (SPME-GC-MS).

Con el fin de desarrollar dicho objetivo principal se han establecido los siguientes objetivos específicos que se exponen a continuación:

- Estudio de la migración global proveniente del contacto entre el envase alimentario (vasos de cartón para bebidas) y los simulantes líquidos seleccionados.
- Análisis (“screening”) del material del que están hechos los vasos para bebidas mediante microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a cromatografía de gases GC-MS.
- Optimización de las condiciones de trabajo óptimas para la determinación del mayor número de compuestos volátiles mediante SPME-GC-MS, para los ensayos de migración específica seleccionados.
- Evaluación de la migración específica proveniente del contacto entre el envase (vasos de cartón para bebidas) y los simulantes líquidos seleccionados.

3. Metodología

3.1. Selección de las condiciones adecuadas para los estudios de migración

El presente trabajo fin de grado se centra en el estudio de la posible migración de compuestos químicos, presentes en el material del que están hechos los vasos de cartón de las máquinas expendedoras de bebidas calientes, hacia el alimento (bebida) que contienen. Para ello, lo primero que se hizo fue seleccionar dos tipos de bebidas calientes diferentes que se consumen en las máquinas expendedoras. En este caso se seleccionaron, como ejemplo de algunas de las bebidas calientes más consumidas, café solo largo “gourmet” y café cortado “gourmet” con el fin de seleccionar el/los simulantes alimenticios adecuados para el estudio y los parámetros de los ensayos de migración para cada tipo de producto, establecidos en el Reglamento (UE) N°10/2011.

Para fijar las condiciones de los ensayos de migración se realizó, en primer lugar, una medición de la temperatura y del valor del pH de los dos tipos de café seleccionados (café solo y cortado), inmediatamente después de su obtención de la máquina expendedora, utilizando para ello un pH-metro portátil con sonda de temperatura (pH & Ion-metro GLP 22, Crison, Barcelona, España), obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados medición pH y temperatura de las bebidas calientes seleccionadas.

Tipo bebida caliente	pH	Temperatura
Café solo largo “gourmet”	5,66	56,8°C
Café cortado “gourmet”	-	58,7°C

Al tratarse de un producto alimenticio que se consume a una temperatura entre los 40°C y 70°C y, que no requiere de un tiempo de almacenamiento posterior, de acuerdo con el Capítulo 2.1.3. del Reglamento (UE) N°10/2011, se seleccionaron como condiciones de contacto al usar simulantes alimentarios: tiempo de contacto en las peores condiciones previsibles de uso (2 horas) y temperatura de contacto (70°C).

Una vez fijadas las condiciones de los ensayos de migración, se procedió a la selección de los simulantes alimenticios adecuados para las dos bebidas calientes a estudiar (con un pH > 4,5) según el Anexo III del Reglamento (UE) N°10/2011. En el caso del café solo largo “gourmet”, se seleccionó el simulante C (20% etanol), ya que se engloba en el apartado Bebidas claras: aguas, sidras, zumos de frutas o de hortalizas claros, simples o concentrados, néctares de frutas, limonadas, jarabes, bíter, infusiones, café, té, cervezas,

bebidas sin alcohol, bebidas energéticas y similares, aguas aromatizada, extracto de café líquido. En el caso del café cortado “gourmet” se seleccionó el simulante D1 (50% etanol), ya que se trata de una bebida a base de leche que se engloba en el apartado Leche: leche y bebidas a base de leche enteras, parcialmente deshidratadas y desnatadas o parcialmente desnatadas.

Finalmente, para seleccionar el volumen que se iba a utilizar en los ensayos de migración (global y específica) se midió el volumen de bebida caliente que se obtenía de la máquina expendedora en el caso de los productos seleccionados, que fueron de 42 mL en el caso del café solo largo “gourmet” y de 64 mL para el café cortado “gourmet”. De acuerdo con los volúmenes de café medidos, se seleccionó para el estudio un volumen de 50 mL de simulante alimenticio.

3.1.1. Vasos de cartón para el consumo de bebidas calientes

Para el desarrollo de este trabajo fin de grado se seleccionaron dos tipos diferentes de vasos de cartón proporcionados por dos empresas de “vending” que ofrecen bebidas calientes en máquinas expendedoras. A lo largo de todo el trabajo se hará referencia a los vasos tipo A (empresa A) y a los vasos tipo B (empresa B). Ambos tipos de vasos son de papel/cartón con la cara exterior impresa con los dibujos propios de la empresa y recubiertos en su interior por una película de plástico, indispensable para su uso alimenticio.

3.2. Estudios de migración global

Para llevar a cabo los estudios de migración global se prepararon, por triplicado, vasos tipo A y tipo B con 50 mL de simulante C (20% EtOH) y se tuvieron durante 2 h a 70°C en estufa (Serie FP Classic.Line, Binder, Tuttlingen, Alemania) con temperatura controlada. El mismo ensayo se realizó con el simulante D1 (50% EtOH). En ambos casos se incluyó un blanco de ensayo, mismo simulante y mismas condiciones, pero en un vaso de cristal. Con el objeto de evitar pérdidas por evaporación del etanol al trabajar a 70°C, los vasos de cartón llenos del simulante seleccionado, se introdujeron en botes de conserva con sellado hermético antes de meter en la estufa, tal y como se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Botes herméticos para llevar a cabo ensayos de migración.

Una vez terminado el tiempo de ensayo, cada una de las muestras se trasvasó a vasos de vidrio, previamente tarados, y se llevaron a ebullición en una placa calefactora hasta su total evaporación. Por último, se dejaron enfriar durante un tiempo y cuando alcanzaron la temperatura ambiente se pesaron, con objeto de calcular la migración global por diferencia de pesada.

3.3. Análisis de compuestos volátiles presentes en vasos de cartón

Previamente a la realización de los estudios de migración específica se decidió analizar los compuestos volátiles presentes en los vasos de cartón y, susceptibles de migrar al alimento que contienen, en las condiciones de ensayo seleccionadas. Para ello, en primer lugar, se seleccionó la zona del vaso que siempre está en contacto con el alimento, de acuerdo a los 50 mL de simulante utilizado, se recortó en trozos de aprox. 0,5 cm², y se introdujeron en viales de 20 mL para su posterior análisis (Figura 5).



Figura 5. Preparación de las muestras de vasos de cartón para el análisis de volátiles.

3.3.1. Screening de compuestos volátiles provenientes de vasos de cartón mediante HS-SPME-GC-MS

Estudios previos, llevados a cabo con el objeto de identificar compuestos volátiles en materiales de envase plásticos, han utilizado la microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS) por espacio de cabeza (HS) o inmersión directa (Canellas et al., 2016; Domeño et al., 2017). A partir de estos trabajos y para llevar a cabo el “screening” de compuestos volátiles provenientes de los vasos sometidos a estudio, lo primero que se hizo fue seleccionar tres tipos diferentes de fibras SPME, con características diferentes: fibra roja

(Polydimethylsyloxane: PDMS) adecuada para analitos volátiles apolares; fibra blanca (Polyacrilate: PA) adecuada para analitos volátiles polares y fibra gris (Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsyloxane: DVB/CAR/PDMS) adecuada para ambos tipos de analitos. Y con objeto de cubrir el mayor rango posible de compuestos a identificar, se decidió trabajar con dos cromatógrafos de gases acoplados a sistema HS-SPME (5973 Mass selective detector, HP, California, Estados Unidos; 5975 Series MSD, Agilent Technologies, California, Estados Unidos) con dos columnas diferentes, una HP-5 para compuestos principalmente apolares y una BP-20 para compuestos con características polares.

Las condiciones de trabajo utilizadas para llevar a cabo el estudio fueron las siguientes, para el módulo HS-SPME: tiempo de incubación 2 min, temperatura 80°C, tiempo de extracción 15 min y tiempo de desorción 2 min (Canellas et al., 2016); y en el cromatógrafo GC-MS: 50°C 5 min, rampa de 10°C/min hasta los 300°C, mantener 5 min (HP-5) y hasta los 200°C, mantener 10 min (BP-20). En ambos casos se adquirió en modo SCAN ($m/z=50-600$). La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo utilizando la biblioteca de espectros presente en el software de los equipos (NIST Chemistry WebBook).

El “screening” se llevo a cabo para cada uno de los dos tipos de vasos (A y B) por triplicado, con las tres fibras SPME (gris, roja y blanca) y en las dos columnas cromatográficas (HP-5 y BP-20).

3.4. Estudios de migración específica

Para llevar a cabo los estudios de migración específica, la preparación, los simulantes y las condiciones de ensayo fueron las mismas que para la migración global (simulantes C y D1, a 70°C durante 2 h). Si bien, una vez terminado el ensayo de migración, para la migración específica las muestras se trasvasan directamente a un vial de 20 mL y se analizaron mediante SPME-GC-MS.

3.4.1. Optimización del procedimiento de análisis de la migración específica mediante SPME-GC-MS

Después de llevar a cabo el “screening” de compuestos volátiles provenientes de vasos de cartón, se descartó el uso de la fibra SPME blanca y se seleccionaron para continuar los estudios, las fibras SPME gris y roja. En la optimización de las condiciones de análisis de la migración específica mediante SPME se fueron modificando el tiempo y

temperatura de extracción de dicha etapa (Tabla 2). En todos los casos, se adicionó 2 g de cloruro sódico (NaCl) para ajustar la fuerza iónica, agitación 500 rpm, tiempo de incubación 2 min y tiempo de desorción de 2 min. Las condiciones cromatográficas (GC-MS) fueron las descritas en el apartado 3.3.1.

Tabla 2. Tiempo y temperatura de extracción mediante SPME de las muestras de migración específica.

<i>Columna GC</i>	<i>Fibra SPME</i>	<i>Tiempo y temperatura de extracción</i>				
HP-5	gris	70°C	70°C	70°C	60°C	80°C
	roja	15 min	20 min	30 min	20 min	20 min
BP-20	gris	70°C	70°C	70°C	60°C	80°C
	roja	15 min	20 min	30 min	20 min	20 min

Para llevar a cabo la optimización se prepararon 20 muestras, divididas en 4 grupos, dos fibras SPME (gris y roja) y dos columnas cromatográficas (HP-5 y BP-20), de 5 muestras cada uno, con 50 mL de simulante alimenticio (C y D1) con cada tipo de vaso (A y B) y se introdujeron en la estufa a 70°C durante 2 h. Para las muestras ensayadas con simulante C, terminado el ensayo se rellenó completamente el vial de 20 mL y se adicionaron los 2 g de NaCl. Para el caso de las muestras con simulante D1, el uso de fibras SPME no da buenos resultados si el % EtOH de la disolución es del 50%, por lo que en este caso se diluyó a un 20% de etanol con H₂O destilada hasta rellenar el vial de 20 mL, como en el caso del simulante C.

Se llevó a cabo un análisis cualitativo de los compuestos volátiles identificados utilizando la biblioteca de espectros, con objeto de seleccionar las condiciones más óptimas para la identificación de aquellos compuestos de interés que se consideren provenientes de la migración de tintas presentes en los vasos de cartón estudiados. Además de la identificación de compuestos, se llevó a cabo la integración de aquellos picos cromatográficos que se consideraron de interés con objeto de comparar las áreas y con todo ello, seleccionar las condiciones óptimas de análisis mediante SPME-GC-MS.

3.4.2. Evaluación de la migración específica en vasos de cartón para bebidas calientes

Tras la etapa de optimización, las condiciones de trabajo para llevar a cabo la evaluación de la migración específica, que se fijaron en el módulo SPME fueron: fibra SPME gris, temperatura de extracción 70°C, tiempo de incubación 2 min, agitación 500 rpm, tiempo

de extracción 20 min, tiempo de desorción 2 min, y selección de la columna HP-5 para el análisis mediante GC-MS.

Analizados los extractos de migración específica de las muestras mediante SPME-GC-MS, se procedió a la identificación de los compuestos presentes en los cromatogramas obtenidos. Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de espectros, de cada uno de los picos cromatográficos encontrados, con el fin de proceder a la identificación, de la manera más exacta posible, de los compuestos que pudieran considerarse de interés, por su procedencia según estudios de otros autores (Lago & Ackerman, 2016; Clemente et al., 2016; García et al., 2018) o que presenten límites de migración específica (LME) según Reglamento (UE)10/2011 y Real Decreto 847/2011

Una vez identificados los compuestos y seleccionados los que se consideraron de mayor interés, desde el punto de vista de la migración específica, se prepararon disoluciones de concentración conocida (1000 $\mu\text{g/g}$ en EtOH) de aquellos compuestos de los que se disponía de patrón en el laboratorio. Para llevar a cabo la cuantificación de dichos compuestos en las muestras, se prepararon las correspondientes curvas de calibración que fueron analizadas siguiendo el mismo procedimiento que las muestras de extractos de migración específica. Por último, se procedió primero a la confirmación de la identificación de dichos compuestos en los cromatogramas obtenidos y, posteriormente a la cuantificación de dichos compuestos en las muestras reales.

4. Resultados y discusión

4.1. Resultados obtenidos del estudio de migración global

En las Tablas 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos de la migración global llevada a cabo, con los dos tipos de simulantes y los dos tipos de vasos estudiados. Para el cálculo de la migración global se procedió a calcular la migración por diferencia de pesada tras la evaporación y se dividió por la cantidad de simulante que se obtuvo tras el periodo de calentamiento, en las unidades establecidas por el Reglamento (UE)10/2011.

Tabla 3. Resultados migración global obtenidos para el simulante C en vasos A y B.

<i>Muestra</i>	<i>g simulante</i>	<i>g vaso antes evaporación</i>	<i>g vaso después evaporación</i>	<i>Diferencia pesada (g)</i>	<i>Migración global (mg/kg)</i>
Vaso A.1	46,9937	53,9198	54,1884	0,2686	0,0050
Vaso A.2	46,9830	55,7610	54,3233	-1,4378	-0,0265
Vaso A.3	45,9120	52,8887	52,8871	-0,0016	-0,0000
Vaso B.1	46,5739	53,9191	53,9174	-0,0017	-0,0000
Vaso B.2	46,6450	55,7605	55,7570	-0,0035	-0,0001
Vaso B.3	47,1770	52,8890	52,8859	-0,0031	-0,0001

Tabla 4. Resultados migración global obtenidos para el simulante D1 en vasos A y B.

<i>Muestra</i>	<i>g simulante</i>	<i>g vaso antes evaporación</i>	<i>g vaso después evaporación</i>	<i>Diferencia pesada (g)</i>	<i>Migración global (mg/kg)</i>
Vaso A.4	38,0010	53,9312	53,9312	-0,0132	-0,0002
Vaso A.5	37,9860	55,7836	55,7580	-0,0256	-0,0005
Vaso A.6	37,6405	52,8935	52,8864	-0,0071	-0,0001
Vaso B.4	37,3930	53,9206	53,9187	-0,0019	-0,0000
Vaso B.5	37,1740	55,7632	55,75,84	-0,0048	-0,0001
Vaso B.6	37,0860	52,8918	52,8865	-0,0053	-0,0001

Tal y como puede observarse en los resultados de las tablas anteriores, en prácticamente todos los casos, los datos que se obtienen de migración global son negativos, si bien muestran un valor muy cercano al cero (valor en la cuarta cifra decimal). La explicación a estos resultados está en que los datos de la pesada de los vasos tras la evaporación, se hizo a temperatura ambiente y sin estar un tiempo en estufa, para eliminar la humedad, y posteriormente en un desecador hasta pesada constante. Únicamente se evaporaron en placa calefactora y se dejaron enfriar en el laboratorio, antes de pesarlos de nuevo. En los primeros ensayos se dejaron 30 min, mientras que, en el resto de ensayos, tras observar

los que sucedía, se dejaron 24 h antes de volver a pesarlos. Todos los resultados obtenidos mostraron que no existe migración global cuantificable para estos ensayos de migración, tanto con el simulante C como con el simulante D1.

En lo que respecta a los límites de migración global establecidos en el Reglamento (UE)10/2011, se puede observar que en ningún caso se observan niveles de migración superiores a 60 mg/kg y por tanto los vasos cumplen la legislación vigente en lo referente a la migración global.

4.2. Resultados del estudio de los compuestos volátiles presentes en vasos de cartón

De acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1. se llevó a cabo el análisis de los compuestos volátiles presentes en los vasos de cartón sometidos a estudio, de acuerdo a la metodología seleccionada.

Las Tablas 5 a 8 muestran los resultados obtenidos de la identificación de los compuestos volátiles para cada uno de los dos tipos de vasos, con las tres fibras SPME estudiadas (gris, roja y blanca) y las dos columnas cromatográficas utilizadas (HP-5 y BP-20). En cada una de las tablas aparece el número total de compuestos identificados, y está marcada en azul la fibra con la que se obtienen mejores resultados (mayor número de compuestos de interés). Los compuestos señalados con (*) están presentes en el Reglamento (UE)10/2011 y es importante controlarlos, ya que algunos de ellos presentan límites de migración específica.

De acuerdo con los resultados que se muestran en las Tablas 5 a 8, el mayor número de compuestos volátiles identificados se consigue con la fibra SPME gris, para los dos tipos de vasos, salvo en el caso de los vasos B y la columna HP-5 donde se identifican mayor número de compuestos con la fibra SPME roja (5 frente a 3 en la fibra SPME gris), aunque en lo que se refiere a los compuestos de interés ambas fibras presentan unos resultados muy similares. Por lo que, como se pretende determinar la posible migración set-off proveniente de los vasos de café, y pueden aparecer compuestos que bajo las condiciones de análisis mediante HS-SPME-GC-MS, con el que se han analizado los vasos, no se estén identificando se decidió seguir utilizando las dos fibras SPME (gris y roja) y las dos columnas cromatográficas (HP-5 y BP-20) para determinar la migración específica mediante SPME-GC-MS. Lo que si se descartó fue el uso de la fibra SPME blanca.

Tabla 5. Identificación de compuestos volátiles en los vasos A analizados mediante HS-SPME-GC-MS columna HP-5.

Compuesto	tR (min)	Nº CAS	Fibra gris	Fibra roja	Fibra blanca
α -methylstyrene*	6,84	98-83-9	✓		
2-ethyl, 1-hexanol*	8,03	104-76-7	✓		
Undecane	9,38	1120-21-4	✓		
Nonanal*	9,63	124-19-6	✓		
Dodecane	11,16	112-40-3	✓		
Tridecane	12,70	629-50-5	✓		
Longiciclene	13,74	1137-12-8	✓	✓	
Isolongifolene	14,00	1135-66-6	✓	✓	
Tetradecane	14,08	629-59-4	✓		
Longifolene	14,22	475-20-7	✓	✓	
2,5-cyclohexadien-1-one,2,6-bis(1,1dimethylethyl)-4-hydroxy-4-methyl	14,88	-	✓		
Butylated hydroxytoluene*	15,41	128-37-0	✓	✓	
Naphthalene 1,2,3,4-tetrahydroxy-1-phenyl	18,59	3018-20-0			✓
Phthalic acid, hept-4-yl isobutyl ester	19,46	-			✓
5-isopropyl-2,4-omidazolodonedione	19,68	16935-64-5			✓
Benzoic acid, 4-(4butycyclohexyl)-4-butoxi-2,3-dicyanophenyl ester	20,24	75941-90-1		✓	✓
Isophthalic acid, di(2-fluorophenyl) ester	20,41	-		✓	
Phthalic acid, di(2-propylpentyl)ester	25,26	-			✓
Diisooctyl phthalate	25,28	131-20-4		✓	
Total compuestos identificados			12	7	5

Tabla 6. Identificación de compuestos volátiles en los **vasos A** analizados mediante HS-SPME-GC-MS columna BP-20.

Compuesto	tR (min)	Nº CAS	Fibra gris	Fibra roja	Fibra blanca
2-Propenal	2,31	107-02-8			✓
Methanesulfonylacetonitrile	7,77	2274-42-2			✓
Dodecane	8,29	112-40-3	✓		
Styrene	8,67	100-42-5			✓
Cyclooctatetraene	8,92	629-20-9	✓		
α -methylstyrene*	10,25	98-83-9	✓		✓
Furfural	12,33	98-01-1	✓		
2-ethyl, 1-hexanol*	12,63	104-76-7	✓		✓
Longicyclene	12,94	1137-12-8		✓	
Benzaldehyde	13,15	100-52-7	✓		
Isolongifolene	13,28	1165-66-6	✓	✓	
Longifolene	13,87	475-20-7	✓	✓	✓
Carbitol	14,49	111-90-0	✓		✓
Glycerin	14,01	56-81-5			✓
1-Butanol, 4-(1-methylethoxy)	14,29	31600-69-8			✓
Acetophenone*	14,83	98-86-2	✓		
1-Butanol, 4-butoxy	15,40	4161-24-4			✓
1-Decanol	16,05	112-30-1	✓		✓
Butylated hydroxytoluene*	17,06	128-37-0	✓	✓	
Propanoic acid, 2-methyl, anhydride	18,71	97-72-3			✓
Benzene, 1-butyl-4-[(ethylphenyl)ethylnyl]	18,11	117392-63-9		✓	
Phenol	18,53	108-95-2	✓		
Isopropyl myristate	19,03	110-27-0		✓	
7-methoxy-2,2,4,8-tetramethyltricyclo [5.3.1.0(4,11) undecane]	19,42	-		✓	

Isophthalaldehyde	19,88	626-19-7	✓		
3-methyl-4-isopropylphenol	20,53	3228-02-2		✓	
m-ethylacetophenone	20,86	22699-70-3	✓		
7-acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin (versalide)	20,96	88-29-9	✓	✓	
Benzoic acid, 4-(4butylcyclohexyl)-2,3-dicyano-ethoxyphenyl ester	21,25	86377-40-4		✓	
1-Butanol, 4-butoxy	21,30	4161-24-4			✓
Benzene, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-,cis-	22,84	7694-30-6			✓
Naphthalene,1,2,3,4-tetrahydro-1-phenyl	23,16	3018-20-0			✓
Benzoic acid	23,36	65-85-0	✓		
3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde	24,37	1620-98-0	✓		
Total compuestos identificados			18	10	15

Tabla 7. Identificación de compuestos volátiles en los **vasos B** analizados mediante HS-SPME-GC-MS columna HP-5.

Compuesto	tR (min)	Nº CAS	Fibra gris	Fibra roja	Fibra blanca
Longifolene	14,23	475-20-7	✓	✓	
2,5-cyclohexadien-1one,2,6-bis(1,1 dimethylethyl)-4-hydroxy-4-methyl	14,90	-	✓		
Butylated hydroxytoluene*	15,42	128-37-0	✓	✓	
Phthalic acid, hept-4-yl isobutyl ester	19,49	-		✓	
1-hexadecanol*	19,78	36653-82-4			✓
Benzoic acid, 4-(4butylcyclohexyl)-4-butoxi-2,3-dicyanophenyl ester	20,24	75941-90-1		✓	✓
Tributyl acetyl citrate*	22,97	77-90-7			✓
Phthalic acid, di (2-propenylpentyl) ester	25,28	-			✓
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	25,29	117-81-7		✓	
Total compuestos identificados			3	5	4

Tabla 8. Identificación de compuestos volátiles en los vasos B analizados mediante HS-SPME-GC-MS columna BP-20.

Compuesto	tR (min)	Nº CAS	Fibra gris	Fibra roja	Fibra blanca
1,2-butanediol	7,01	584-03-2	✓	✓	
1,3-dioxoalane	8,25	646-06-0	✓		
Benzaldehyde	13,31	100-52-7	✓		
Longifolene	13,86	475-20-7	✓		
Acetophenone*	14,91	98-86-2	✓		
Butylated hydroxytoluene*	17,60	128-37-0		✓	
Terbutol	17,61	1918-11-2	✓		
Phenol	18,54	108-95-2	✓		
Isopropyl myristate	19,04	110-27-0		✓	
Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-acetate	20,53	6380-28-5		✓	
m-ethylacetophenone	20,87	22699-70-3	✓		
Versalide (7-acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin)	20,97	88-29-9	✓	✓	
Benzoic acid, 4-(4butycyclohexyl)-2,3-dicyano-ethoxyphenyl ester	21,25	86377-40-4	✓	✓	✓
Dibutyl sebacate (decanedioic acid, dibutyl ester)	21,79	109-43-3		✓	
1-hexadecanol*	22,58	36653-82-4	✓	✓	
Tributyl acetylcitrate*	22,97	77-90-7			✓
Benzoic acid	23,38	65-85-0	✓		
Dodecanoic acid	24,26	143-07-7	✓		
Total compuestos identificados			13	8	2

4.3. Resultados estudios de migración específica

4.3.1. Resultados de la optimización del procedimiento de análisis de la migración específica mediante SPME-GC-MS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la optimización de las condiciones más adecuadas para la determinación de la migración específica en los dos simulantes estudiados, tal y como se describen en el apartado 3.4.1.

Con objeto de mostrar los resultados más interesantes de todo el estudio de optimización, y dado el elevado número de compuestos identificados en cada experimento, se han seleccionado para mostrar en las siguientes Figuras 6 a 13 (columna HP-5) y Figuras 14 a 20 (columna BP-20), los compuestos de mayor interés, es decir, aquellos que presentan límites de migración específica (LME) de acuerdo con el Reglamento (UE)10/2011 que se muestran en la Tabla 9, así como algunos contaminantes relacionados con la impresión en el envasado de alimentos identificados por Lago & Ackerman, (2016) que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 9. Legislación referente a los compuestos de interés recogida dentro del Reglamento (UE)10/2011.

<i>Compuesto</i>	<i>Nº CAS</i>	<i>usos</i>	<i>LME (mg/kg alimento)</i>
Hexadecanoic acid	57-10-3	aditivo/monómero	no
Octadecanoic acid	57-11-4	aditivo/monómero	no
Tributyl acetylcitrate	77-90-7	aditivo	máx. 60*
α -methylstyrene	98-83-9	monómero	0,05
Bis(2-ethylhexyl) adipate	103-23-1	aditivo	18
2-ethyl,1-hexanol	104-76-7	monómero	30
Butylated hydroxytoluene	128-37-0	aditivo	3
Tetradecanoic acid	544-63-8	aditivo/monómero	no
1-hexadecanol	36653-82-4	monómero	no

* *Límite máximo de migración en la familia expresado como la suma de las sustancias.*

Tabla 10. Compuestos identificados como relacionados con la impresión en el envasado de alimentos (Lago & Ackerman, 2016).

<i>Compuesto</i>	<i>Nº CAS</i>	<i>Función</i>	<i>Zona envase identifica</i>
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	96-76-4	degradante antioxidante	FCS/PS
2,6-di- <i>tert</i> -butyl-1,4-benzoquinone	719-22-2	degradante antioxidante	FCS/PS
Methyl dehydroabietate	1235-74-1	monómero	FCS/PS
Benzene 1,1'-(1-methyl-1,3-propanediyl)bis-	1520-44-1	degradante antioxidante	FCS/PS
Dehydroabietic acid	1740-19-8	monómero	PS
Naphthalene,1,2,3,4-tetrahydro-1-phenyl-	3018-20-0	co-monómero	FCS/PS
Heptadecane, 3-methyl	6418-44-6	lubricante	FCS
Benzene,1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-, cis	7694-30-6	degradante antioxidante	FCS
Trans-1,2-diphenylcyclobutane	20071-09-4	subproducto monómeros	Set-off

FCS: Food Contact Side; PS: Printed side; Set-off: Both sides.

Simulante C (20% EtOH)-Columna HP-5

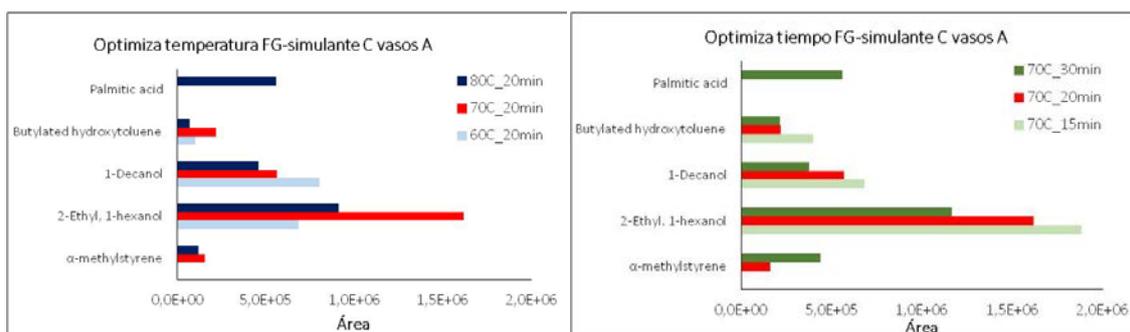


Figura 6. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (**vasos A**) fibra SPME gris.

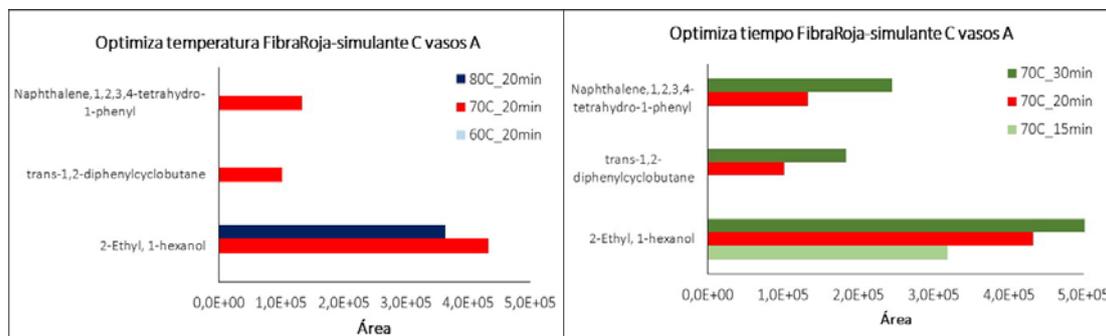


Figura 7. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (**vasos A**) fibra SPME.

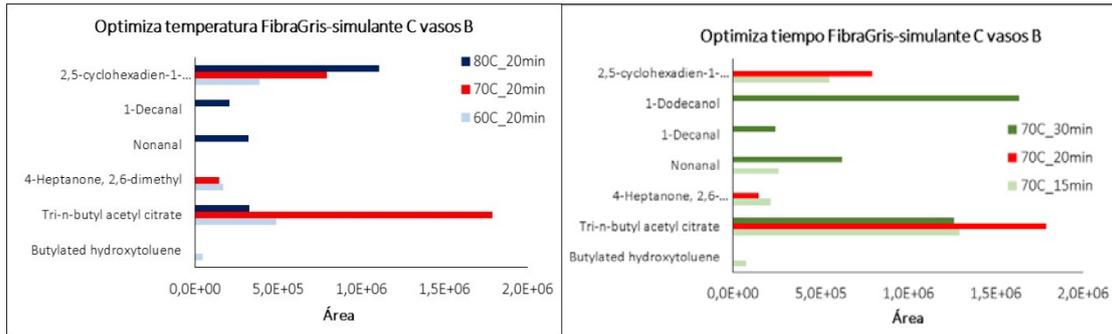


Figura 8. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos B) fibra SPME gris.

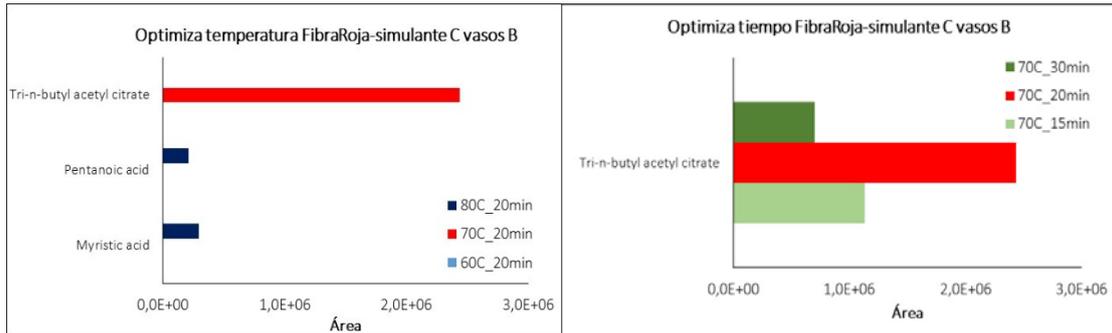


Figura 9. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos B) fibra SPME roja.

Simulante D1 (50% EtOH)-Columna HP-5

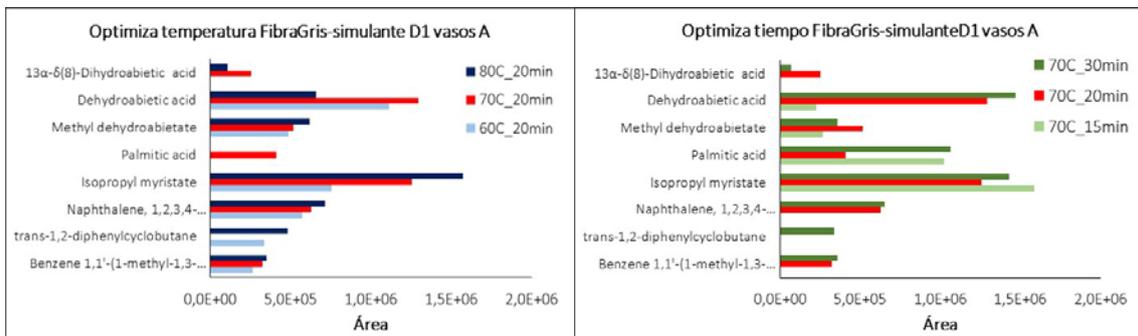


Figura 10. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos A) fibra SPME gris.

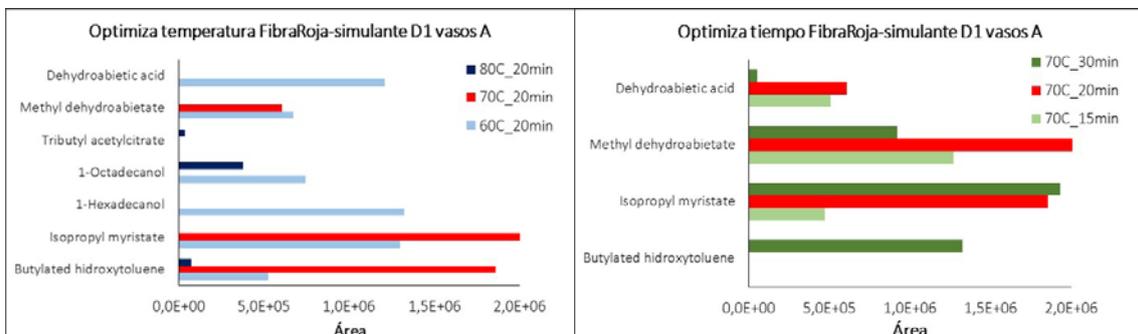


Figura 11. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos A) fibra SPME roja.

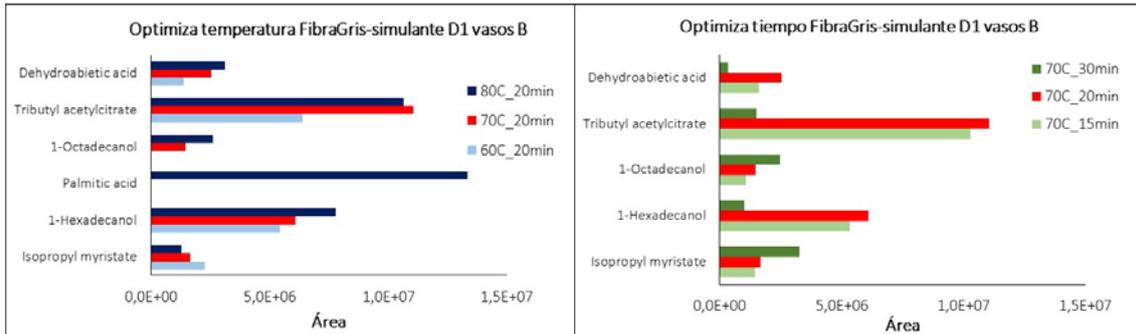


Figura 12. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos B) fibra SPME gris.

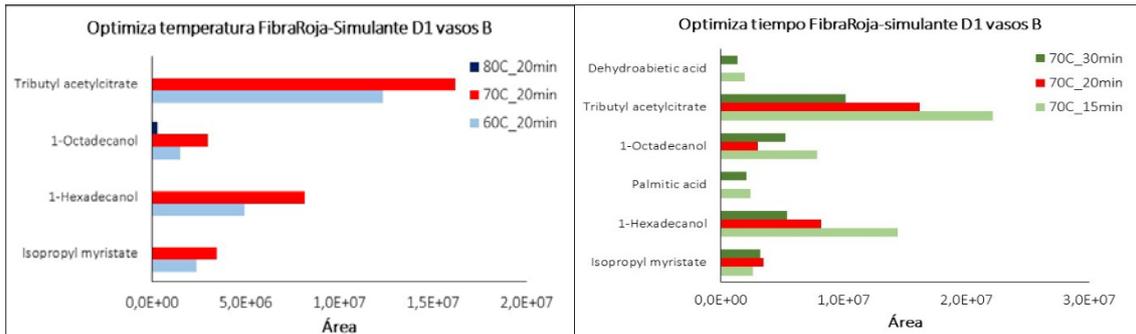


Figura 13. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos B) fibra SPME roja.

Simulante C (20% EtOH)-Columna BP-20

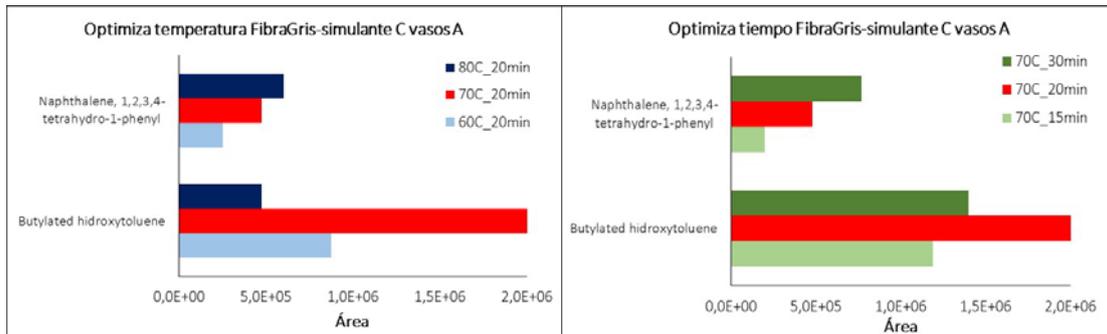


Figura 14. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos A) fibra SPME gris.

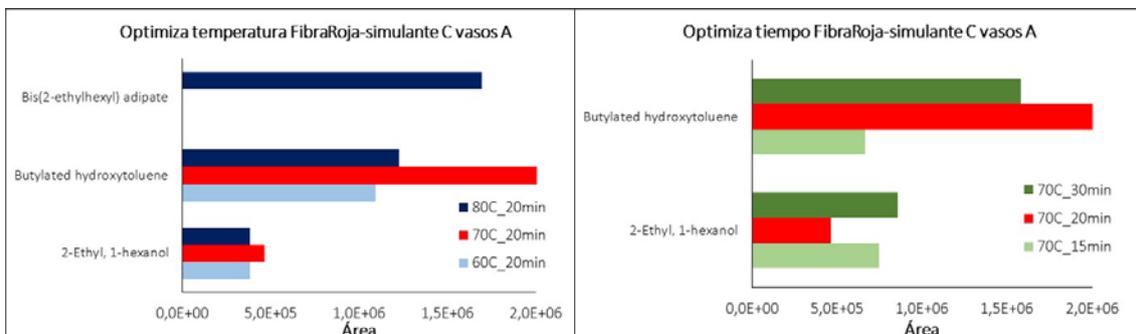


Figura 15. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos A) fibra SPME.

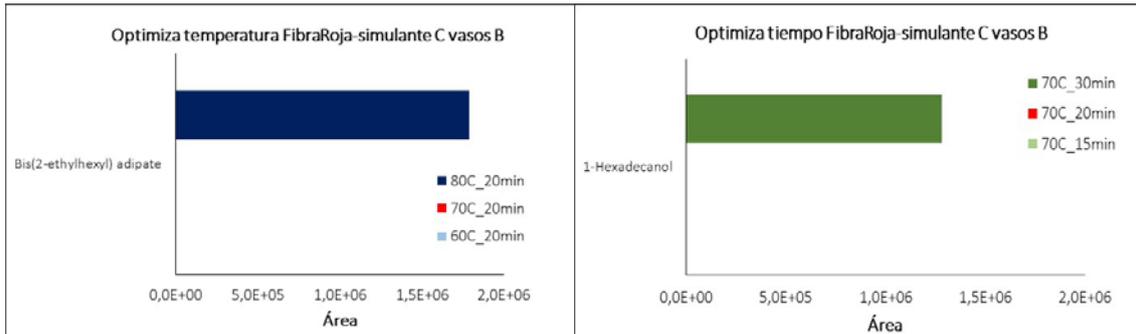


Figura 16. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos B) fibra SPME roja.

Simulante D1 (50% EtOH)-Columna BP-20

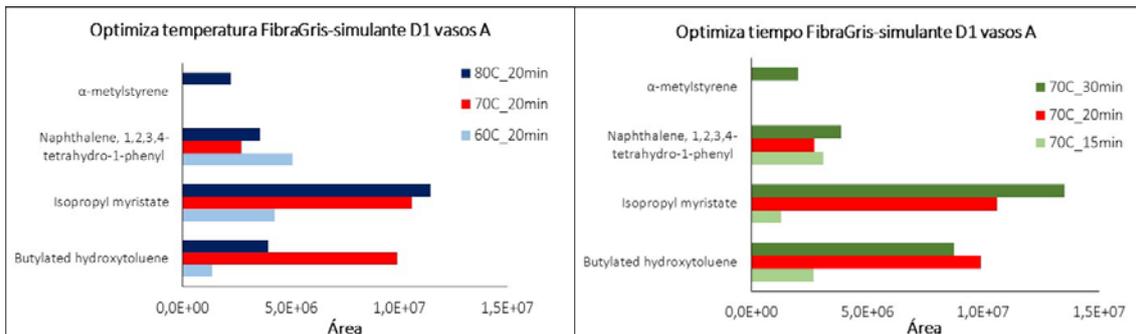


Figura 17. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos A) fibra SPME gris.

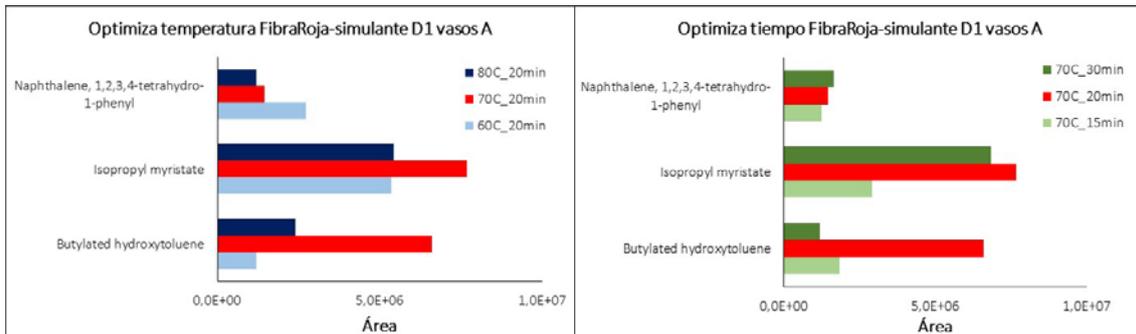


Figura 18. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos A) fibra SPME roja.

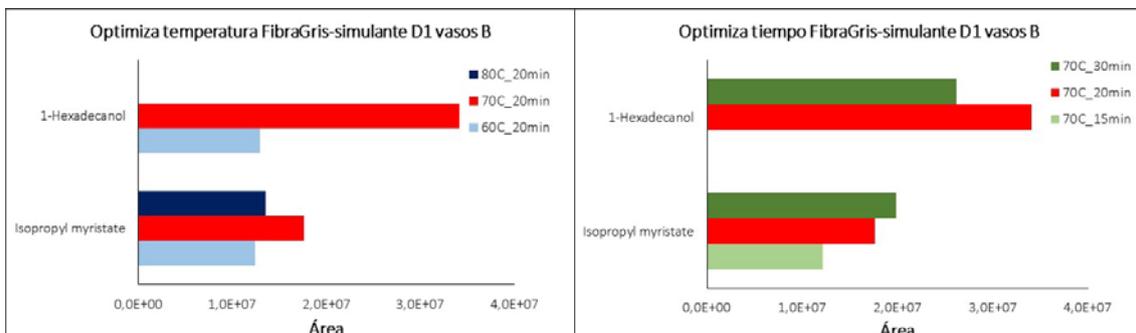


Figura 19. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (vasos B) fibra SPME gris.

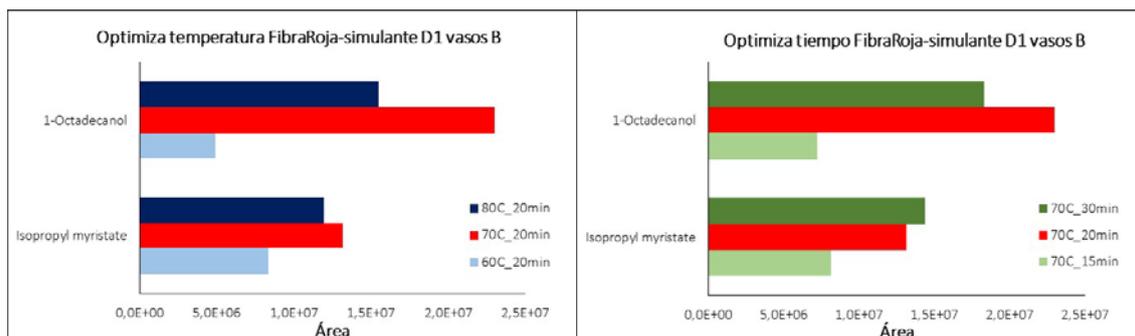


Figura 20. Gráficos de optimización temperatura y tiempo (**vasos B**) fibra SPME roja.

En los **vasos A** con el simulante C, en general, los mejores resultados para los compuestos de interés (2-ethyl, 1-hexanol y α -methylstyrene) se obtuvieron al trabajar con 70°C-20 min con ambas fibras SPME (gris y roja) y las dos columnas cromatográficas. En el caso del simulante D1, se puede observar que la cantidad de compuestos identificados es mucho mayor que en el caso del simulante C (dehydroabietic acid, isopropyl myristate, methyl dehydroabietate...), y las mayores áreas obtenidas al igual que en caso del simulante C, en general, se obtienen trabajando a 70°C-20 min o 30 min. Mencionar que, sólo en el caso del butylated hydroxytoluene (BHT), se identifica en mayor cantidad cuando se trabaja con la columna BP-20 con ambas fibras SPME y en los dos simulantes.

En el análisis de los **vasos B** con el simulante C se observó que se identificaban una mayor cantidad de compuestos de interés utilizando la fibra SPME gris en la columna HP-5, dando las áreas de mayor tamaño trabajando a 70°C-15min y 20 min o a 80°C-20 min. Sin embargo, en el caso de la columna BP-20 no se detectó ningún compuesto de interés en el caso de la fibra SPME gris, mientras que en la fibra SPME roja sí que se identificó la presencia de compuestos legislados (bis (2-ethylhexyl) adipate y 1-hexadecanol) a 80°C-30 min y 70°C-20 min, respectivamente. En el caso del simulante D1 se observó claramente una tendencia, en lo referente a las áreas obtenidas utilizando ambas fibras, ya que, de forma casi total las áreas presentaron un valor superior trabajando a una temperatura de 70°C-20 min en ambas columnas.

Por todo ello, y buscando una solución de compromiso que abarcase el mayor número de compuestos de interés, se seleccionó como condiciones de trabajo para SPME-GC-MS una temperatura de extracción de 70°C y un tiempo de extracción de 20 min. Para seleccionar la fibra SMPE de trabajo, y vistos los resultados anteriores, se decidió trabajar con la fibra SPME gris que, en la mayoría de los casos, logra extraer el mayor número de compuestos de interés y en mayor cantidad.

Por último, se decidió llevar a cabo todos los análisis de migración específica mediante SPME-GC-MS con la columna HP-5 que cubre un mayor número de compuestos de interés identificados. En este caso, la diferencia más destacable se encuentra en el caso del simulante C, ya que con el simulante D1 todos los compuestos detectados en la columna BP-20 fueron detectados en la HP-5, sumando en este caso otros compuestos de interés como el tributyl acetylcitrate, dehydroabietic acid, o el methyl dehydroabietate.

4.3.2. Análisis de la migración específica mediante SPME-GC-MS de los vasos de cartón para el consumo de bebidas calientes seleccionados

Una vez seleccionadas las condiciones más óptimas para la extracción de los compuestos de interés, mediante SPME-GC-MS, y antes de pasar al análisis de los extractos de migración de las muestras de vasos de cartón, para aquellos compuestos de los que se disponía de patrón en el laboratorio, se procedió a la preparación y análisis de las correspondientes curvas de calibración. En todos los casos se adicionó benzophenona (10 μ L, de concentración 1000 μ g/g) como estándar interno, tanto en la recta como en los análisis de las muestras.

En la Tabla 11 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas, para todos los patrones, en el rango de concentraciones estudiado. Con ellas, se cuantificarán posteriormente la migración específica en las muestras reales.

Tabla 11. Rectas de calibrado de los compuestos seleccionados.

Compuesto	Recta calibrado	R ²	Rango lineal
α -methylstyrene	$y = 0,00154 x + 0,00053$	0,9979	13 – 279 ng/g
2-ethyl, 1-hexanol	$y = 0,00014 x - 0,00672$	0,9825	90 – 183 ng/g
Butylated hydroxytoluene (BHT)	$y = 0,02643 x - 0,22511$	0,9856	8 – 182 ng/g
2,6-di- <i>tert</i> -butylphenol	$y = 0,00488 x - 0,03153$	0,9969	6 – 130 ng/g
3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzaldehyde	$y = 0,00248 x - 0,00777$	0,8966	6 – 100 ng/g
2,6-diisopropylnaphthalene	$y = 0,03856 x + 0,38096$	0,9915	6 – 98 ng/g
1-hexadecanol	$y = 0,01607 x - 0,04852$	0,9938	10 – 213 ng/g
Methyl palmitate	$y = 0,11545 x + 1,31415$	0,9971	6 – 141 ng/g
Tributyl citrate	$y = 0,00203 x + 0,01196$	0,9767	6 – 133 ng/g
Tributyl acetylcitrate	$y = 0,00253 x + 0,03398$	0,9925	13 – 1297 ng/g

A continuación, en las Tablas 12 y 13 se muestran los resultados obtenidos del análisis, por triplicado, de los extractos de migración específica para los dos simulantes analizados

mediante SPME-GC-MS (fibra gris, columna HP-5). Aquellos compuestos para los que hay recta de calibrado se han cuantificado y los resultados se muestran en mg/kg simulante \pm desviación estándar.

Tabla 12. Resultados obtenidos del análisis de los extractos de migración específica mediante SPME-GC-MS en los vasos A con el simulante C y D1.

<i>Compuesto</i>	<i>t_R (min)</i>	<i>Nº CAS</i>	<i>Simulante C</i>	<i>Simulante D1</i>
			<i>Concentración (mg/kg)</i>	<i>Concentración (mg/kg)</i>
α -methylstyrene	10,44	98-83-9	-	0,0029 \pm 0,0008
2-ethyl, 1-hexanol	11,94	104-76-7	0,0618 \pm 0,0069	0,0823 \pm 0,0100
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol*	18,65	96-76-4	0,0173 \pm 0,0033	-
Dodecanoic acid, 1-methylethyl ester	20,42	10233-13-3	-	✓
Benzophenone ^{estándar interno}	20,69	119-61-9		
4-Phenyl-azetidín-2-one	20,87	5661-55-2	✓	✓
3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzaldehyde	21,53	1620-98-0	0,0003 \pm 0,0001	<L.D.
Butylated hydroxytoluene	21,54	128-37-0	0,0018 \pm 0,0002	< L.D.
Benzene, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-,cis-	22,08	7694-30-6	✓	✓
Trans-1,2-diphenylcyclobutane	22,10	20071-09-4	-	✓
Phthalic acid, methyl 3-phenylpropyl ester	22,12	NIST308992	✓	-
Benzene propanoic acid, 3-phenyl propyl ester	22,15	60045-27-4	✓	-
Naphthalene,1,2,3,4-tetrahydro-1-phenyl	22,31	3018-20-0	✓	✓
Isopropyl myristate	22,59	110-27-0	-	✓
Azetidine, 3-methyl-3-phenyl	22,76	5961-33-1	-	✓
2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl	22,82	502-69-2	-	✓
Methyl 2-hydroxy-heptadecanoate	23,19	NIST336201	-	✓
Methyl palmitate	23,63	112-39-0	< L.D.	-
n-Hexadecanoic acid	23,96	57-10-3	-	✓
Benzoic acid, 4-(4-butyl dicyclohexyl)-4-butoxy-2,3-dicyanophenyl ester	24,17	75941-90-1	-	✓
Versalide	24,33	88-29-9	-	✓
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	25,63	60-33-3	-	✓

Bis (2-ethylhexyl) maleate	25,74	142-16-5	-	✓
Octadecanoic acid	25,82	57-11-4	-	✓
Pimaral	26,51	472-39-9	-	✓
Dehydroabietal	27,13	13601-88-2	-	✓
Pimaric acid	27,40	127-27-5	-	✓
4,8,12,16-tetramethyl heptadecan-4-olide	27,55	96168-15-9	-	✓
Methyl dehydroabietate	27,65	1235-74-1	-	✓
2-Propen-1-one,1,2-diphenyl	28,02	4452-11-3	-	✓
Dehydroabietic acid	28,44	1740-19-8	-	✓

*cuantificado con recta 2,6-ditert-butylphenol.

Tabla 13. Resultados obtenidos del análisis de los extractos de migración específica mediante SPME-GC-MS en los **vasos B** con el simulante C y D1.

<i>Compuesto</i>	<i>tR (min)</i>	<i>Nº CAS</i>	<i>Simulante C</i>	<i>Simulante D1</i>
			<i>Concentración (mg/kg)</i>	<i>Concentración (mg/kg)</i>
2-ethyl, 1-hexanol	11,94	104-76-7	0,8142 ± 0,1687	-
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol*	18,65	96-76-4	0,2431 ± 0,0004	-
Dibutyl itaconate	20,06	2155-60-4	-	✓
Dodecanoic acid,1-methyl ethyl ester	20,42	10233-13-3	-	✓
Benzophenone ^{estándar interno}	20,69	119-61-9		
2,6-Diisopropyl naphthalene	21,09	24157-81-1	-	< L.D.
2-Propenoic acid, tridecyl ester	21,19	3076-04-8	-	✓
Heptadecane, 3-methyl	21,48	6418-44-6	-	✓
Benzene,1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-,cis-	22,08	7694-30-6	-	✓
Isopropyl myristate	22,58	110-27-0	-	✓
2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl	22,83	502-69-2	-	✓
1-Hexadecanol	23,17	36653-82-4	-	0,1403 ± 0,0105
Methyl palmitate	23,61	112-39-0	-	< L.D.
Isopimaral	23,81	1686-63-1	-	✓
n-Hexadecanoic acid	23,96	57-10-3	-	✓
Benzoic acid 4-(4-butylcyclohexyl)-4-butoxy-2,3-dicyanophenyl ester	24,17	75941-90-1	-	✓
Versalide	24,33	88-29-9	-	✓
Hexadecen-1-ol, trans-9-	25,15	64437-47-4	-	✓

9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	25,63	60-33-3	-	✓
Tributyl aconitate	25,77	7568-58-3	✓	✓
Tributyl citrate	26,06	77-94-1	-	0,0621 ± 0,0012
Tributyl acetylcitrate	26,63	77-90-7	0,0393 ± 0,0125	1,9425 ± 0,4149
Methyl dehydroabietate	27,66	1235-74-1	-	✓
Dehydroabietic acid	28,45	1740-19-8	-	✓

*cuantificado usando la recta del 2,6-ditert-butylphenol.

En los resultados anteriores se puede observar que la mayor cantidad de compuestos extraídos, tal y como cabría esperar dada su naturaleza, corresponde al simulante D1 (50% EtOH) frente al simulante C (20% EtOH) para ambos tipos de vasos. Cabe destacar que el número de compuestos que han migrado desde los vasos tipo A es mayor, y en algunos casos diferente, que los que han migrado desde los vasos tipo B, marcando una clara diferencia según el tipo de vaso, aunque ambos son de papel/cartón serigrafiados y con un recubrimiento plástico interior (necesario para su uso alimentario).

De acuerdo con el Reglamento (UE)10/2011, el α -methylstyrene sólo se ha identificado en los vasos A con el simulante D1 en una cantidad de 0,0029 mg/kg, muy por debajo del LME fijado en 0,05 mg/kg. En el caso del 2-ethyl, 1-hexanol, en los vasos A se ha identificado en ambos simulantes en concentraciones de 0,0618 y 0,0823 mg/kg respectivamente, y en los vasos B únicamente en el simulante C en una cantidad de 0,8142 mg/kg, bastante superior al caso de los vasos A, pero siempre por debajo del LME que es de 30 mg/kg. El butylated hydroxytoluene sólo se ha identificado en los vasos A y en muy baja concentración, cercana al límite de detección. Por último, únicamente en los vasos B se identifican el 1-hexadecanol en concentración 0,1403 mg/kg en el simulante D1 (no tiene LME) y el tributyl acetylcitrate, en ambos simulantes, en concentraciones 0,0393 y 1,9425 mg/kg respectivamente, mostrando un incremento importante de la cantidad que migra al utilizar el simulante D1, si bien sigue estando por debajo del LME que está fijado en un máx. de 60 mg/kg*.

Además, se han identificado otros compuestos que no tienen LME, pero están contemplados en el Reglamento (UE)10/2011, como es el caso del hexadecanoic acid que se ha identificado en ambos tipos de vasos con el simulante D1; y el octadecanoic acid que sólo se ha identificado en los vasos A y simulante D1.

Por otro lado, Lago & Ackerman, (2016) identifican el 2,6-di-*tert*-butyl-1,4-benzoquinone y el 2,4-di-*tert*-butylphenol como productos de degradación de algunos de

los antioxidantes más comunes como son el Irgafos® 168 y el Irganox® 1010, y como tales, sus estudios sobre seguridad a menudo forman parte de la evaluación del contacto de los alimentos con el aditivo original. Además, relacionan la presencia del benzene,1,1'-(1,2-cyclobutanediyl) bis-, cis-; trans-1,2-diphenylcyclobutane; naphthalene,1,2,3,4-tetrahydro-1-phenyl; methyl dehydroabietate y dehydroabietic acid, con la migración de compuestos provenientes de la impresión presente en el envase y, por tanto, ha podido tener lugar una migración set-off.

En otro estudio realizado por Clemente et al., (2016) donde se llevó a cabo la determinación de la migración específica en varios tipos de materiales plásticos para uso alimentario utilizando el simulante alimentario D1 (50% etanol), los resultados obtenidos mostraron concentraciones para el 2,4-di-*tert*-butylphenol de 0,13 mg/kg (material: PE/aluminio/papel/tinta), del orden de las cuantificadas en este estudio, es decir, 0,0173 y 0,2431 mg/kg en los vasos A y B con simulante C, respectivamente. En el caso del 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde encontraron una concentración de 0,086 mg/kg (material: PE/aluminio/papel/tinta) frente a los 0,003 mg/kg encontrados en los vasos A con simulante C. Para el tributyl acetylcitrate encontraron una concentración de 0,934 mg/kg (material: PE/aluminio/tinta/PET) frente a 0,0393 y 1,9425 mg/kg en los vasos B con simulante C y D1, respectivamente. Y por último identificaron el dibutyl itaconate en material: PE/aluminio/papel/tinta, y en este estudio se identificó en los vasos B con simulante D1.

Recientemente García et al., (2018) han llevado a cabo un estudio sobre la migración de compuestos procedentes de envases plásticos en contacto con alimentos, donde detectaron varios compuestos en común con los obtenidos en la realización de este trabajo, que son los que se exponen en la Tabla 14.

Tabla 14. Algunos compuestos identificados en materiales de envase con el nivel de toxicidad de acuerdo a las reglas Cramer (García et al., 2018)

<i>Compuesto</i>	<i>Nº CAS</i>	<i>Toxicidad reglas Cramer</i>
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	96-76-4	I
Dodecanoic acid, 1-methylethyl ester	10233-13-3	I
Butylated hydroxytoluene	128-37-0	II
Isopropyl myristate	110-27-0	I
1-Hexadecanol	36653-82-4	I
Methyl palmitate	112-39-0	I
n-Hexadecanoic acid	57-10-3	I
Octadecanoic acid	57-11-4	I

Tributyl aconitate	7568-58-3	I
Tributyl citrate	77-94-1	III
Tributyl acetylcitrate	77-90-7	I

En los resultados obtenidos en este trabajo fin de grado, además de los controlados por el Reglamento (UE)10/2011, se observa que algunos de los compuestos de la Tabla 14 (dodecanoic acid, 1-methylethyl ester; isopropyl myristate, tributyl aconitate y tributyl citrate) se identifican en los vasos estudiados. Todos ellos se identifican como compuestos que han migrado del envase hacia el alimento. Únicamente podría sugerirse un cierto grado de toxicidad en el caso del tributyl citrate que presenta grado III, pero para el resto de compuestos ninguno presenta un valor superior al grado II por lo que no hay indicios firmes de que puedan producir toxicidad mediante la ingestión oral.

4.3.3. Comparación de los resultados obtenidos del análisis de los vasos de cartón y los datos de migración específica

Si se comparan los resultados obtenidos de la migración específica, en los dos tipos de vasos y los dos simulantes seleccionados, con los datos obtenidos del análisis mediante HS-SPME-GC-MS de los vasos de cartón recogidos en las Tablas 5 y 7, se puede apreciar que muchos de los compuestos de interés identificados están presentes en ambos estudios. Entre los compuestos a controlar según el Reglamento (UE)10/2011 se identifican el α -methylstyrene; 2-ethyl, 1-hexanol y butylated hydroxytoluene en los vasos A y, el 1-hexadecanol y tributyl acetylcitrate en los vasos B.

Además, en los vasos A se identifican, en ambos estudios, algunos de los compuestos identificados como contaminantes provenientes de tintas, como es el caso del naphthalene,1,2,3,4-tetrahydro-1-phenyl; y en los vasos B se identifica en ambos estudios el benzoic acid, 4-(4-butylcyclohexyl)-4-butoxy-2,3-dicyanophenyl ester.

Conclusiones

Del estudio de optimización llevado a cabo para fijar las condiciones más adecuadas para el análisis de la migración específica mediante microextracción en fase sólida (SPME-GC-MS) se ha seleccionado una temperatura de extracción de 70°C durante 20 min, con fibra SPME gris (DVB/CAR/PDMS) y columna cromatográfica HP-5.

Tras llevar a cabo los ensayos de migración global y migración específica, con los simulantes adecuados y bajo las condiciones de ensayo fijadas por el Reglamento (UE)10/2011, en ningún caso los valores obtenidos han superado los valores establecidos por la legislación (LME), por lo que se puede considerar que el uso de vasos de cartón serigrafiados es adecuado para el consumo de café solo largo "gourmet" y café cortado "gourmet".

Una vez cuantificados algunos de los compuestos de interés identificados, sería conveniente la preparación de nuevas rectas de calibrado de menor concentración para el caso del methyl palmitate y el butylated hydroxytoluene, ya que los valores de sus áreas se encontraron por debajo del límite de detección de las rectas de calibrado realizadas. Y sería interesante conseguir patrones con los que cuantificar algunos de los compuestos identificados como provenientes de la migración de tintas hacia el envase, caso del benzene,1,1'-(1,2-cyclobutanediyl) bis-, cis-; trans-1,2-diphenylcyclobutane; naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1-phenyl; methyl dehydroabietate y dehydroabietic acid.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo fin de grado con otros estudios llevados a cabo, se puede decir que los valores de migración específica que presentan los vasos de cartón son, en general, menores que los que presentan envases de plásticos impresos.

Finalmente, comparando los resultados obtenidos del análisis de los vasos mediante HS-SPME-GC-MS con los resultados obtenidos en el estudio de migración específica llevados a cabo mediante SPME-GC-MS, se puede afirmar que una gran parte de compuestos de interés a controlar proceden de los mismos.

Conclusions

From the optimization study carried out to determine the most suitable conditions for the analysis of the specific migration by solid phase microextraction (SPME-GC-MS), an extraction temperature of 70°C was selected for 20 min with a gray SPME fiber (DVB / CAR / PDMS) and HP-5 chromatographic column.

After carrying out the global migration and specific migration tests, with the appropriate simulants and under the test conditions established by Regulation (EU) 10/2011, in no case the values obtained exceeded the values established by legislation (LME), so it can be considered that the use of silk-screened cardboard glasses is suitable for the consumption of long "gourmet" black coffee and "gourmet" coffee with a little milk.

Once some of the identified compounds of interest have been quantified, it would be convenient to prepare new calibrated lines of lower concentration for the case of methyl palmitate and the butylated hydroxytoluene, since the values of their areas were below the limit of detection of the calibrated lines made. And it would be interesting to obtain patterns with to quantify some of the compounds identified as originating from the migration of inks towards the container, in the case of benzene, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-, cis-; trans-1,2-diphenylcyclobutane; naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1-phenyl; methyl dehydroabietate and dehydroabietic acid.

When comparing the results obtained in this end-of-degree work with other studies carried out, it can be said that the specific migration values of cardboard cups are, in general, lower than those of printed plastic containers.

Finally, comparing the results obtained from the analysis of the vessels by HS-SPME-GC-MS with the results obtained in the specific migration study, it can be affirmed that a large part of the compounds of interest to be controlled come from them.

Valoración personal

Personalmente, este trabajo ha supuesto la oportunidad de llevar a cabo un estudio de migración de forma real, ya que a lo largo del grado únicamente lo había estudiado de forma teórica. Además, también me ha permitido ampliar conocimientos en lo referente al uso de diferentes técnicas cromatográficas, así como, una mejora en la capacidad de trabajo en el laboratorio.

Respecto a los resultados, he de decir que a pesar de que en algunas ocasiones haya sido un poco frustrante que fueran inadecuados y por tanto fuera necesaria la repetición de las muestras ralentizando el proyecto, finalmente, me siento bastante satisfecha con ellos y las conclusiones obtenidas.

Por último, agradecer el apoyo constante por parte principalmente de mi tutora Esther Asensio, así como el de mis compañeros, que han estado ayudándome y animándome para obtener los mejores resultados posibles de este proyecto.

Bibliografía

- Aznar M., Vera P., Canellas E., Nerin C., Mercea P. & Stoermer A. (2011). Composition of the adhesives used in food packaging multilayer materials and migration studies from packaging to food. *Journal of Materials Chemistry*, 21:4358-4370.
- Aznar M., Domeño C., Nerin C. & Bosetti O. (2015). Set-off of non-volatile compounds from printing inks in food packaging materials and the role of lacquers to avoid migration. *Dyes Pigments*, 114:85-92.
- Aznar M., Alfaro P., Nerín C., Jones E. & Riches E. (2016). Progress in mass spectroscopy for the analysis of set-off phenomena in plastic food packaging. *Journal of chromatography A*, 1543:124-133.
- Barnes K., Sinclair R. & Watson D. (2006). Chemical migration and food contact materials. Woodhead Publishing, pp: 8-9.
- Canellas E., Aznar M., Nerin C. & Mercea P. (2010). Partition and diffusion of volatile compounds from acrylic adhesives used for food packaging multilayers manufacturing. *Journal of Materials Chemistry*, 20(24):5100-5109.
- Canellas E., Vera P. & Nerín C. (2016). Multiple headspace-solid phase microextraction for the determination of migrants coming from a self-stick label in fresh sausage. *Food Chemistry*, 197:24-29.
- Catalá R. & Gavara R. (2002). Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Capítulo I.
- Clemente I., Aznar M., Nerín C. & Bosetti O. (2016). Migration from Printing inks in multilayer Food packaging materials by GC-MS analysis and pattern recognition with chemometrics. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 33(4):703-14.
- Council of Europe (2007). Packaging inks applied to the non-food contact surface of food packaging. Version 2.
- Council of Europe (2009). Paper and board materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. Version 4.
- Dole P., Feigenbaum A.E., De la Cruz C., Pastorelli S., Paseiro P., Hankemeier T., Voulzatis Y., Aucejo S., Saillard P. & Papaspyrides C. (2006). Typical diffusion behavior in packaging polymers - application to functional barriers. *Food Additives*

- and Contaminants: Part A: Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 23(2):202-211.
- Domeño C., Aznar M., Nerín C., Isella F., Fedeli M., & Bosetti O. (2017). Safety by design of printed multilayer materials intended for food packaging. *Food Additives and Contaminants: Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 34(7): 1239-1250.
- Estacho P.V. (2013). 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) pp:25-27.
- EuPIA European Printing Ink Association (2018). EuPIA Suitability List of Photoinitiators for Compliant Printing Inks and Varnishes.
- García-Ibarra V., Rodríguez-Bernaldo de Quirós A., Paseiro-Losada P. & Sendón R. (2018). Identification of intentionally and non-intentionally added substances in plastic packaging materials and their migration into food products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410:3789-3803.
- Katan L.L. (1996). Migration from food contact material. Springer US. ISBN 978-1-4613-1225-3.
- Lago M.A. & Ackerman L.K. (2016). Identification of print-related contaminants in food packaging. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(3):518-529.
- Mannheim C.H. & Passy N. (1990). Interaction between packaging materials and foods. *Packaging Technology and Science*, 3(3):127-132.
- Nerín C., Canellas E., Aznar M. & Silcock P. (2009). Analytical methods for the screening of potential volatile migrants from acrylic-base adhesives used in food-contact materials. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 26:1592-1601.
- Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos. BOE 11 julio 2011.
- Reglamento (UE) No 10/2011 de la comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.
- Reynier A., Dole P., Humbel S. & Feigenbaum A. (2001a). Diffusion coefficients of additives in polymers. Part I. Correlation with geometric parameters. *Journal of Applied Polymer Science*, 82(10):2422-2433.

-
- Reynier A., Dole P. & Feigenbaum A. (2001b). Additive diffusion coefficients in polyolefins. Part II. Effect of swelling and temperature on the $D = f(M)$ correlation. *Journal of Applied Polymer Science*, 82(10):2434-2443.
- Tehrany E.A. & Desobry S. (2004). Partition coefficients in food/packaging systems: a review. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 21(12):1186-1202.
- Wan J.A.L., Chatwin P.C. & Katan L.L. (1995). Migration from plastic packages into their contents. Part 1. The role of Mathematical-Models'. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 350(1694):379-406.
- Vázquez, M. (2001). Avances en seguridad alimentaria. Editorial Altaga. Capítulo 4:136-146.