



**Universidad**  
Zaragoza



## Trabajo Fin de Grado

Migración de sustancias desde materiales en  
contacto con alimentos/ simulantes alimentarios

Autor: Andrea Enguita Rupérez.  
Director: Cristina Nerín De La Puerta  
Margarita Aznar Ramos

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias.  
2020

## Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	4
1. Introducción.....	5
1.1 Migración de sustancias.....	5
1.2 Legislación.....	5
1.3 Bioplásticos.....	6
1.4 Ácido poliláctico.....	7
1.5 Técnica LC-MS.....	9
2. Objetivos y planteamiento.....	12
3. Materiales y metodología.....	13
3.1 Reactivos y muestras.....	13
3.1.1 Compuestos modelo empleados.....	13
3.1.2 Disolventes y disoluciones.....	13
3.1.3 Muestras de PLA.....	13
3.1.4 Muestras de yogurt.....	14
3.2 Instrumentación.....	14
3.3 Procedimiento de extracción del yogurt.....	14
3.4 Análisis por UPLC-MS.....	14
3.4.1 Equipo utilizado para la optimización del método.....	14
3.4.2 Equipo utilizado para la identificación y cuantificación de sustancias.....	15
3.5 Desarrollo experimental.....	16
3.5.1 Ensayos de migración del PLA con simulantes alimentarios en las condiciones del yogurt.....	16
3.5.2 Ensayos de migración del PLA en yogurt.....	16
4. Resultados.....	17
4.1 Optimización de la extracción.....	17
4.1.1 Rectas de calibrado y efecto matriz.....	17
4.1.2 Optimización del tiempo de sonicación.....	19
4.1.3 Optimización del volumen de extracción.....	19
4.1.4 Optimización del disolvente.....	20
4.2 Identificación de migrantes del biopolímero base PLA- poliéster.....	21
4.3 Cuantificación de sustancias migrantes.....	22
4.3.1 Concentración de los migrantes en simulantes alimentarios.....	22
4.3.2 Concentración de los migrantes en muestra de yogurt.....	25
5. Conclusión.....	27
6. Bibliografía.....	28
Anexos.....	30

## **Resumen.**

El ácido poliláctico (PLA), es uno de los polímeros biodegradables más usados en el mercado, en gran parte para la fabricación de envases para alimentos. Al igual que en todos los materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos es muy importante garantizar la calidad y seguridad del alimento envasado y para ello estos materiales deben cumplir los Reglamentos (CE) 1935/2004 y EU/10/2011.

En este estudio se evaluó la migración desde un material de envase basado en ácido poliláctico combinado con un poliéster biodegradable. La migración se llevó a cabo con simulantes alimentarios y con alimentos (yogurt), teniendo en cuenta para los ensayos la legislación establecida. Para el análisis de las muestras de yogurt, se optimizó previamente un método de extracción que permitiera su análisis por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución con detección por espectrometría de masas (UPLC-MS). En el método se optimizaron parámetros como el volumen del disolvente de extracción, tiempo de extracción y disolvente utilizado. Posteriormente se llevaron a cabo los ensayos de migración y se aplicó el protocolo de extracción optimizado a las muestras de yogurt. En los extractos se llevó a cabo la detección y cuantificación de compuestos previamente descritos en la bibliografía como migrantes de este material. Los análisis se realizaron por UPLC-MS.

Normalmente, los ensayos de migración se realizan con simulantes alimentarios, por lo que resulta novedoso comprobar los resultados de estos con los obtenidos en alimentos. Los resultados mostraron la presencia en las muestras de yogurt de compuestos provenientes del material de PLA, siendo un oligómero proveniente del poliéster utilizado en la fabricación del biopolímero el compuesto con mayor migración a la muestra.

## **Abstract**

Poly(lactic acid) (PLA) is one of the most commonly used biopolymers, especially for the manufacturing of food packaging materials. As it happens with all plastic materials intended for food contact, it is very important to guarantee its quality and safety. Thus, they must fulfil the Regulations (CE) 1935/2004 and EU/10/2011.

In this work, migration from a biopolymeric material based on PLA blended with a polyester was evaluated. Migration tests were performed in food simulants as well as in food (yogurt) and following the parameters established in Regulations. For the analysis of yogurt samples, a sample extraction method that allowed the injection of samples in an ultra high performance liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer (UPLC-MS) was previously optimized. In this method, different parameters were optimized, such as solvent extraction volume, extraction time or extraction solvent. Afterwards, migration tests were performed and the optimized protocol was applied to the yogurt samples. In the sample extract, the detection and quantification of the potential migrants of these materials, previously described in the bibliography, was performed. All the analyses were carried out by UPLC-MS.

Usually, migration tests are performed in food simulants, and therefore it is novel to test the migration in real food. The results showed the presence of migrants in yogurt samples coming from the PLA-Polyester blend, being an oligomer from the polyester used in the blend, the migrant with the highest concentration values.

## **1. Introducción**

### **1.1 *Migración de sustancias***

Los envases se interponen entre los productos y su entorno con el fin de protegerlos de factores externos y conservar tanto su integridad como su calidad y sus características. Los envases son imprescindibles para una buena conservación, transporte y comercialización de los alimentos y su efectividad es determinante en el deterioro del producto. No obstante, es imprescindible asegurar a su vez que el contacto entre el alimento y el envase no pueda suponer ningún riesgo para la salud del consumidor (Ariosti et al., 2002).

Un producto envasado es un sistema ternario formado por el envase, el producto y el entorno que rodea al envase. Sea cual sea el material del que está hecho el envase se produce siempre una interacción de éste con el alimento.

Hay diferentes tipos de interacción en este sistema: absorción, permeación y migración. La migración se define como la transferencia de sustancias presentes en el material hasta el alimento. Esta transferencia depende de diversos factores como el tiempo de contacto, la temperatura, el estado del alimento (líquido o sólido) y su naturaleza (polar, no polar, graso, ácido...), el área de contacto, la concentración y las propiedades físico-químicas de los migrantes.

La migración de sustancias puede tener una influencia negativa tanto en la calidad como en la seguridad de los alimentos envasados. Las sustancias “migrantes” pueden resultar en algunos casos de carácter tóxico para el organismo humano, haciendo que el producto no sea apto para el consumo. Es necesario por tanto, estudiar la migración que puede darse en distintos materiales durante el periodo de comercialización que se prevé para un producto (Ariosti et al., 2002).

Se distingue entre migración global y migración específica. La migración global se define como la cantidad total de los componentes del material del envase que son transferidos al alimento en las condiciones de uso menos favorables. En ésta se engloban todos los compuestos transferidos independientemente de su interés o toxicidad particular. La migración global mide la inercia química del material y en ella no se distingue la naturaleza de las sustancias que migran. Por otro lado, la migración específica se refiere a la cantidad de una sustancia concreta e identificable que es transferida al alimento y por tanto significa que debe analizarse cada sustancia que ha migrado individualmente (Ariosti et al., 2002).

Los polímeros base de los materiales plásticos son moléculas de elevado peso molecular, generalmente inertes y de escasa solubilidad tanto en sustancias lipofílicas como hidrofílicas. Incluso si fuesen ingeridos de forma accidental, su absorción en el tracto gastro-intestinal sería mínima y se expulsarían sin sufrir ninguna alteración y sin producir ningún efecto sobre el organismo. Sin embargo, sí que pueden migrar los compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en la matriz polimérica, que pueden clasificarse en dos grupos:

- Compuestos añadidos de forma intencionada al material para mejorar sus propiedades (plastificantes, antioxidantes,...)
- Compuestos no añadidos de forma intencionada (NIAS) que pueden provenir de diferentes orígenes: procesos de degradación del material o de los aditivos, impurezas, productos de reacción o contaminantes (Nerin, Alfaro, Aznar y Domeño, 2013)

### **1.2 *Legislación***

Debido a la incidencia de la migración en la calidad y en la salubridad de los alimentos envasados, se han establecido legislaciones tanto nacionales como internacionales que deben cumplir los materiales destinados a estar en contacto con productos alimenticios.

Todos aquellos materiales destinados al contacto alimentario deben cumplir con el Reglamento (EC) 1935/2004 (European Commission, 2004) que determina que dichos materiales no pueden ceder al alimento sustancias que puedan poner en riesgo la salud del consumidor o modificar las propiedades sensoriales del alimento. En el caso de materiales plásticos, también deben cumplir el Reglamento (UE) N° 10/2011 de la comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. En ella se encuentran regulados distintos aspectos como:

- Listas positivas de sustancias autorizadas para la fabricación de los materiales y objetos destinados al contacto con alimentos
- Límites de migración global
- Límites de migración específica
- Formas de evaluar la migración: ensayos de migración.
- Requisitos sobre la declaración de sustancias no intencionadamente añadidas (NIAS)

Es necesario por tanto realizar un análisis de la cantidad de migrantes presentes en el alimento tras el contacto polímero/alimento durante el tiempo y condiciones reales del problema. Puesto que el análisis de sustancias traza en los alimentos, procedentes de migración específica, resulta una tarea muy compleja, se recurre a ensayos de migración utilizando simulantes alimentarios. Los simulantes son disoluciones simples que poseen un carácter extractivo similar a los alimentos, ajustándose a los siguientes requisitos:

- La migración debe presentar la misma extensión con el simulante que con el alimento.
- Debe permitir un análisis de la migración específica estudiada.
- Los NIAS no se pueden analizar en un alimento y su estudio deberá realizarse inicialmente en los simulantes.
- Una vez identificados los migrantes, se recomienda siempre realizar los ensayos en alimentos.

Según dicha legislación, para los ensayos de migración específica de materiales y objetos que aún no estén en contacto con alimento se tienen que llevar a cabo la elección del simulante alimentario y las condiciones experimentales de exposición/contacto. Para esto último se recogen en dicha legislación tablas con los simulantes alimentarios indicados para cada tipo de alimentos. También se establecen las condiciones de contacto, recogidas en tablas de tiempos y temperaturas de contacto según el alimento y su conservación.

Con estas indicaciones, el usuario o la empresa afectada, deberán seleccionar para los ensayos de migración las condiciones experimentales que mejor representen el caso más desfavorable en el uso real pretendido.

Una vez realizado el análisis, los compuestos que no estén en la lista positiva, anteriormente nombrada, no deberán ser detectados en una cantidad por encima de 10 ng/g.

### ***1.3 Bioplásticos***

Los biopolímeros, también denominados bioplásticos, representan una alternativa efectiva a los materiales de base petroquímica, cuyo uso se quiere reducir debido a su impacto negativo en el medio ambiente

Los biopolímeros engloban todos aquellos polímeros que son biodegradables y/o compostables y también aquellos que provienen de fuentes renovables (Jabeen, Majid y Nayik, 2015). Se denomina biodegradable a un producto o sustancia que puede descomponerse en los elementos químicos que lo conforman, debido a la acción de agentes biológicos como plantas, animales, microorganismos y hongos, bajo condiciones ambientales naturales. Los dos biopolímeros más utilizados en el mercado son el ácido poliláctico (PLA) (que se degrada en planta industrial, no

en condiciones ambientales naturales) y el almidón, representando el 47 y 41 % respectivamente del total del consumo global de biopolímeros (Ashter, 2016).

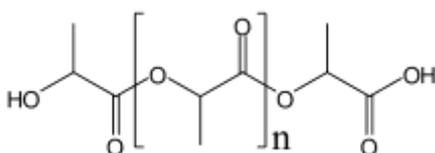
Los materiales compostables, son en los que al menos un 90% del material es transformado en CO<sub>2</sub> en plantas de compostaje, bajo unas condiciones específicas de temperatura u oxígeno en un periodo de 6 meses.

Este estudio está basado en el ácido poliláctico (PLA), el cual se usa para la fabricación de envases para alimentos, y por ello su control es muy importante, ya que garantizará la calidad y seguridad del alimento.

#### 1.4 Ácido poliláctico

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster lineal alifático derivado de recursos renovables, como el almidón de maíz o la caña de azúcar. Presenta comportamiento biodegradable bajo ciertas condiciones, tales como la presencia de oxígeno.

La estructura del PLA es la que muestra la figura 1.

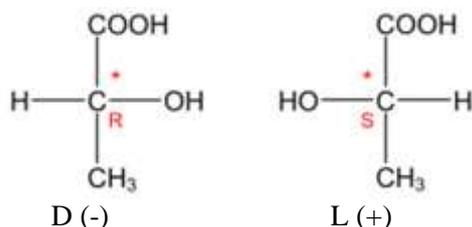


**Figura 1.** Estructura química del PLA.

El desarrollo de este polímero tuvo como impedimento el elevado coste de producción que suponía. Gracias a avances en la fermentación de la glucosa para obtener ácido láctico se produjo una gran bajada del coste, lo que dio lugar a un incremento de interés en el polímero.

En cuanto a la síntesis, el PLA se obtiene a partir del ácido láctico (LA). Existen dos tipos de procesos básicos para obtener ácido láctico: vías químicas y vías biotecnológicas. Actualmente la vía biotecnológica produce el 95% del consumo mundial de LA. Esta ruta de fabricación proporciona polímeros de mayor peso molecular y por eso es más utilizada. Consiste en la fermentación de carbohidratos con bacterias y hongos y transcurre básicamente a través de cuatro etapas: fermentación, hidrólisis del lactato de calcio, esterificación y destilación e hidrólisis del éster.

Así conseguimos obtener el ácido láctico, el cual presenta dos esteroisómeros.



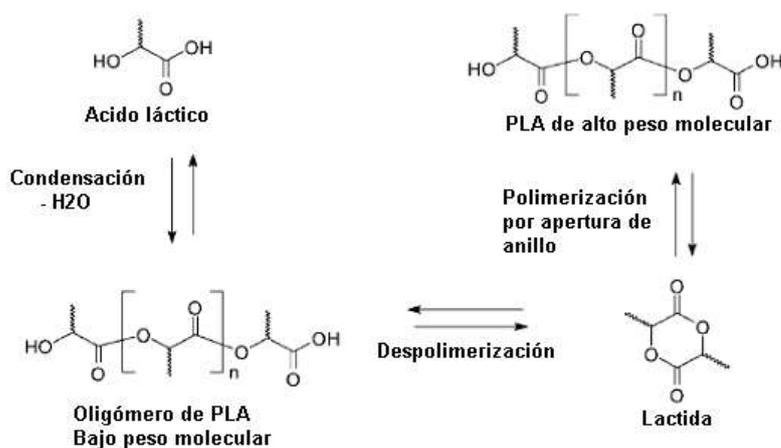
**Figura 2.** Esteroisómeros del ácido láctico.

El grado de cristalinidad y otras muchas características importantes, es principalmente controlado por la relación de enantiómeros D y L que se usa, y en menor medida por el tipo de catalizador utilizado.

Los procesos comerciales de obtención se basan en la utilización de bacterias termófilas de fermentación rápida, que permiten el uso de sustratos baratos. Algunos de los sustratos más

empleados son: sacarosa de caña de azúcar, y de remolacha azucarera, lactosa de lactosueros y dextrosa de almidones hidrolizados.

Una vez obtenido el ácido láctico, dos moléculas de este se someten a una esterificación simple. Luego se cicla catalíticamente para hacer un éster de dilactato cíclico. El PLA se produce por polimerización, por apertura de anillo a partir del éster dilactato (láctida), usando por lo general un catalizador de estaño (ROP ring opening polymerization).



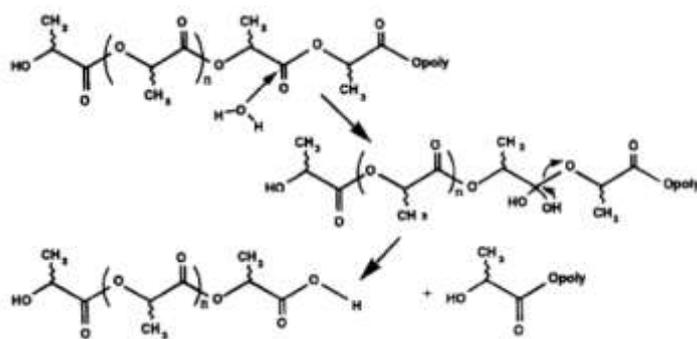
**Figura 3.** Transformación del ácido láctico en PLA.

Otra vía de fabricación del PLA consiste en convertir químicamente el almidón en dextrosa. Después esta se fermenta a ácido láctico seguido de un proceso de policondensación. Una vez que se han obtenido los pellets de PLA se siguen distintos procesos para transformarlos en el producto final, tales como moldeado por inyección o extrusión.

El PLA tiene buenas propiedades físicas, similares a las de polímeros como el poliestireno (PS) o el polietilentereftalato (PET). Tiene también algunas desventajas en cuanto a sus características, como baja resistencia a la permeación del oxígeno o fragilidad. Esto se puede solventar con la combinación del PLA con otros poliésteres, que provengan también de combustibles fósiles. Además para mejorar sus propiedades se le pueden adicionar diferentes aditivos: agentes plastificantes como glicerol [8] (Erdohan, Cam, y Turhan, 2013) acetil tributil citrato (Coltelli et al, 2008), tributil citrato (Ljungberg, Wesslen, 2002) o polietilen glicol (Choi, Choi, Han, Park, y Ha, 2013). Estos compuestos podrían luego migrar al alimento. Una de las características más interesantes, ya comentada anteriormente, es su capacidad de biodegradarse bajo las condiciones adecuadas, lo que le otorga una gran ventaja desde el punto de vista ecológico, que se suma al hecho de que sea un polímero obtenido de recursos renovables.

Las botellas son la aplicación más novedosa del PLA, sobre todo para aguas, leche y yogurt, aceite vegetal y zumos frescos. También se usa para la fabricación de otro tipo de envases alimentarios. Otras aplicaciones son para uso biomédico o para productos derivados de la industria petroquímica. Aunque el PLA es más costoso que muchos materiales convencionales derivados del petróleo, su precio ha ido disminuyendo a medida que aumenta la producción y el precio del petróleo.

Por último cabe destacar un hecho relevante en su degradación y en la migración de sustancias de este a los alimentos, teniendo en cuenta de que el estudio está basado en oligómeros. El PLA es un poliéster alifático y por tanto sus grupos éster pueden degradarse por hidrólisis en presencia de agua, produciendo la formación de oligómeros y ácido láctico. El grado de degradación por hidrólisis dependerá de factores intrínsecos, como peso molecular, grado de cristalinidad, presencia de aditivos o procesado térmico, y de factores externos como la humedad, el pH y la temperatura.



**Figura 4.** Hidrólisis del PLA.

Se han realizado diversos estudios sobre la degradación por hidrólisis del PLA y a la modificación que esto implica en sus propiedades físicas así como en la formación de los oligómeros (Lazzari, Codari, Storti, Morbidelli, Moscatelli, 2014) (Dopico- García et al, 2013) (Bor, Alin, Hakkarainen, 2012) (Mutsuga, Kawamura, Tanamoto, 2008), que pueden migrar posteriormente.

Los oligómeros se definen como moléculas formadas por un número reducido de unidades del monómero y han sido detectados en la migración de otros polímeros tales como el PET (Hoppe, Fornari, Boogt, Franz, 2017) (Kim, Lee, 2012) (Ubeda, Aznar, Nerín, 2018), poliuretanos (Ubeda et al, 2017) o poliamidas.

Por esta razón, este estudio se ha centrado en el análisis de oligómeros, aparte de analizar también otras sustancias.

### **1.5 Técnica LC- MS**

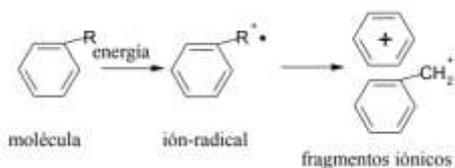
La cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica de química analítica que combina las capacidades de separación física de la cromatografía líquida (LC) con la detección por espectrometría de masas (MS). Este acoplamiento conlleva muchos beneficios, como la mejora de la sensibilidad y de la certeza de la identificación, ya que además del tiempo de retención cromatográfico (RT), se dispone del espectro de masas.

La cromatografía engloba a todo un conjunto de técnicas de separación dinámicas que tienen en común la distribución de los analitos entre dos fases, una de las cuales es móvil y la otra permanece estacionaria. La técnica LC es una cromatografía líquido-sólido, ya que la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna, donde se encuentra la fase estacionaria sólida. La separación cromatográfica se produce como resultado de las interacciones entre las moléculas de la muestra y las que componen ambas fases. Dentro de la cromatografía de líquidos, la cromatografía de ultra alta resolución (UPLC) permite una mayor eficiencia en la separación ya que se trabaja con columnas de menor tamaño de partícula y utiliza una mayor presión de bombeo (Ferreira et al., 2007).

La espectrometría de masas nos permite obtener información específica de la molécula, el detector mide la relación masa-carga ( $m/z$ ) de las partículas cargadas (iones). Es por esto que posee una alta selectividad.

Consiste en ionizar la muestra, lo que da lugar a distintos fragmentos cargados positiva (modo positivo) o negativamente (modo negativo).

Existen distintos sistemas de ionización: ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) y fotoionización por presión atmosférica (APPI).



**Figura 5.** Ionización en espectrometría de masas.

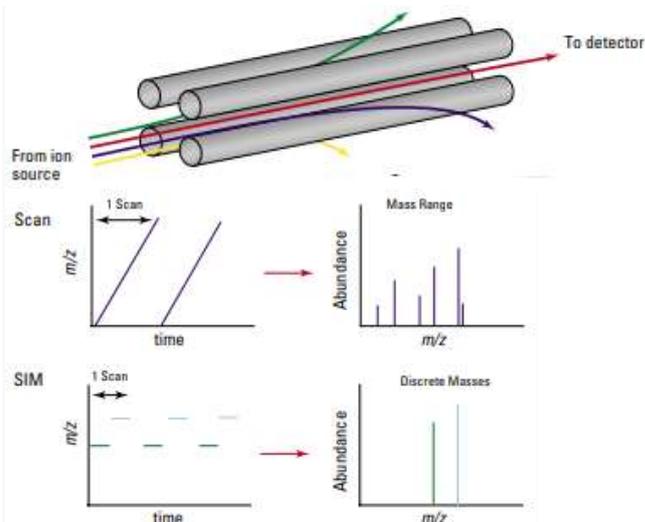
Los iones producidos son conducidos a un analizador donde mediante campos eléctricos o magnéticos se clasifican en función de su relación carga/masa. Por último el detector mide y amplifica la corriente de iones con el fin de calcular la abundancia de cada ión.



**Figura 6.** Componentes de un espectrómetro de masas.

Dos de los tipos de analizadores de masas más frecuentes son el cuadrupolo (Q) y el de tiempo de vuelo (TOF), que son los que se han utilizado en este estudio.

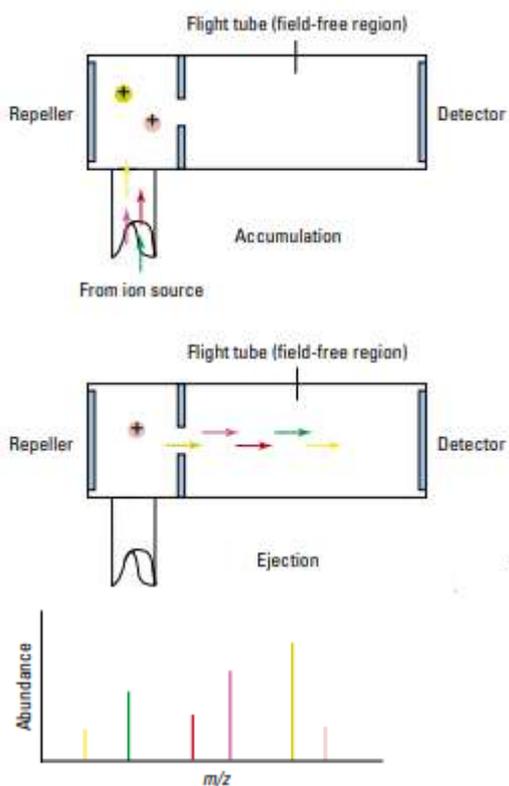
Los cuadrupolos tienden a ser los analizadores más simples y menos costosos. Un cuadrupolo está formado por cuatro barras paralelas dispuestas en un cuadrado. Cuando los iones del analito entran en el cuadrupolo, se aplican voltajes a las barras que generan campos magnéticos y estos campos determinan que relación masa-carga de iones puede pasar a través del mismo en un determinado momento. Pueden operar de dos modos: modo de escaneo (SCAN) y modo de monitorización selectiva de iones característicos (SIM o SIR). En el modo SCAN, el analizador monitoriza un rango de relaciones de masa/carga. En el modo SIM, el analizador monitoriza solo unas pocas relaciones de masa/carga. El modo SIM es significativamente más sensible pero proporciona información sobre un número menor de iones. El modo SIM se usa para cuantificar y monitorizar compuestos determinados, mientras que el modo SCAN se usa para análisis cualitativos o para cuantificaciones de analitos cuyas masas no se conocen de antemano.



**Figura 7.** Modos en los que puede operar un cuadrupolo (Agilent Technologies, 2001)

Existen los analizadores con tres cuadrupolos (QqQ), en ellos se puede introducir un gas de colisión en el cuadrupolo central. Cuando el gas es inerte, la energía interna se transfiere al ion entrante y este se fragmenta. Los productos son analizados por el tercer cuadrupolo. Cuando el gas es reactivo, se pueden inducir reacciones de iones-moléculas. Los productos de reacción son también analizados por el tercer cuadrupolo.

En un analizador de masa de tiempo de vuelo (TOF), se aplica una fuerza electromagnética uniforme a todos los iones del analito al mismo tiempo, haciéndolos acelerar por un tubo. Los iones más ligeros viajarán más rápido y llegarán primero al detector. Por tanto, las relaciones masa-carga de los iones se determinan por el tiempo que tardan en llegar. Estos analizadores son muy precisos en sus mediciones de masa y se denominan analizadores de alta resolución. Su utilización permite conocer la masa exacta del analito y gracias a ella, su composición elemental.



**Figura 8.** Analizador de masa de tiempo de vuelo (TOF) (Agilent Technologies, 2001)

## **2. Objetivos y planteamiento**

Debido a un incremento en el uso de bioplásticos biodegradables y/o compostables para envases de alimentos, resulta de especial interés realizar un estudio acerca de la migración de sustancias que se produce al estar en contacto el bioplástico con el alimento.

El objetivo de este trabajo es evaluar la migración de un biopolímero basado en PLA, centrándose en la migración de los oligómeros. Los ensayos de migración se suelen realizar empleando simulantes alimentarios, pero cada vez más se insiste en que deben comprobarse los resultados de migración en los alimentos. En este proyecto se realizará el estudio en alimentos. El alimento que se va a estudiar es yogurt.

Para alcanzar este objetivo global, se van a llevar a cabo los siguientes pasos:

- Ensayos de migración del biopolímero basado en PLA con simulantes alimentarios en las condiciones de almacenamiento del yogurt
- Desarrollo de una metodología que permita la extracción e identificación de los migrantes en el yogurt. Se llevará a cabo la optimización de distintos parámetros de la extracción, usando para ello tres compuestos de estructura y comportamiento similar a las sustancias que esperamos encontrar
- Ensayos de migración del PLA en yogurt
- Análisis de la migración en ambos ensayos, utilizando la técnica LC-MS y basándose en un estudio realizado anteriormente
- Interpretación de los resultados obtenidos
- Comparación de la migración de sustancias en los simulantes con la migración en el yogurt

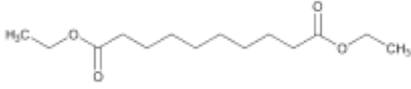
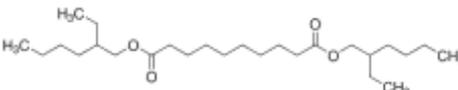
### 3. Materiales y reactivos

#### 3.1 *Reactivos y muestras*

##### 3.1.1 *Compuestos modelo empleados*

Tanto para comprobar la eficacia de la extracción como para optimizarla es necesario el uso de compuestos similares a las sustancias de interés (estructura y comportamiento parecidos), ya que no se dispone de patrones comerciales de los oligómeros del PLA. También se han usado para realizar las rectas de calibrado. Los compuestos utilizados son los expuestos en tabla 1.

**Tabla 1.** Compuestos de dopaje.

Compuesto	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Estructura	Nº CAS
Dibutil sebacato (DBS)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	314,46		109-43-3
Bis(2-etilhexil) sebacato (EHS)	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	426,67		122-62-3
Dimetil sebacato (DMS)	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	230,30		106-79-6

Los compuestos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Química (Barcelona, España).

##### 3.1.2 *Disolventes y disoluciones*

A continuación se presentan los disolventes usados para llevar a cabo el método:

- Agua ultra pura obtenida con un sistema Mili-Q Ultramatic Wasserlab GR 216071 (Madrid, España)
- Metanol para la optimización del disolvente fue adquirido en Baker (Deventer, Holanda).
- Etanol (EtOH) y ácido acético (calidad HPLC) usados como simulantes se compraron a Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España)
- Acetonitrilo (calidad HPLC) usado para la extracción del método se obtuvo en Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri,EE.UU).

También fue necesaria la preparación de las siguientes disoluciones:

- EtOH/agua ultrapura 50% (v/v) y Ácido acético/agua ultrapura 3% (v/v) usados para preparar simulantes alimentarios para el ensayo de migración.
- Acetonitrilo/ agua ultrapura 50%(v/v) utilizada para la extracción del yogurt
- Acetonitrilo, acetonitrilo/agua ultrapura Q 50%(v/v), metanol y metanol/agua ultrapura 50%(v/v) para la elección del disolvente en la optimización de la extracción.

##### 3.1.3 *Muestras de PLA*

El método se llevo a cabo con muestras de un biopolímero basado en PLA y un biopolíéster.

### 3.1.4 Muestras de yogurt

El desarrollo del método y su optimización se realizó con yogurt líquido. Este yogurt contenía como ingredientes: leche desnatada rehidratada, leche semidesnatada, azúcar (7,3%), glucosa (0,6%), sólidos lácteos, fermentos lácticos, vitaminas (D y B9) y sales minerales. Su contenido en grasas era 1,6 g, de las cuales 1,1g eran saturadas.

Los ensayos de migración se realizaron con dos tipos de yogures, uno sólido y otro líquido. El yogurt líquido usado en este caso contenía como ingredientes: leche parcialmente desnatada, azúcar (9%), aroma, colorante (E150d), fermentos lácticos, vitaminas (D y B6). Su contenido en grasas era 1,4 g, de las cuales 0,8 g eran saturadas. El yogurt sólido contenía los siguientes ingredientes: leche pasteurizada, nata, leche en polvo desnatada y fermentos lácticos. Su contenido en grasas era 3,9 g, de las cuales 2,4 g eran saturadas.

### 3.2 Instrumentación

La instrumentación usada es la siguiente:

- Centrifugadora CENTROMIX modelo S-549
- Centrifugadora Microfuge<sup>®</sup> 18 Centrifuge
- Agitador digital VortexMixer OHAUS<sup>®</sup>
- Baño de ultrasonidos Branson 3510-DTH

### 3.3 Procedimiento de extracción del yogurt

Tras las optimizaciones realizadas, las cuales se exponen en el apartado 4.1, el protocolo final de extracción del yogurt es el siguiente:

Se pesa 1 gramo del yogurt a estudiar en un tubo de centrifugación de 10 ml y se añaden 8 ml de acetonitrilo/agua (50:50, v/v). El contenido del tubo se mezcla durante un minuto (vortex) y se sonica durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos. La mezcla obtenida se centrifuga con una velocidad de 8000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se traspara a tubos Eppendorf<sup>™</sup> y, tras dejarlos una hora en la nevera, se realiza una segunda centrifugación. Esta se lleva a cabo durante 15 minutos en la microcentrifuga a una velocidad de 14000 rpm. Por último, la disolución resultante, ya totalmente transparente, se traspara a un vial y se inyecta en el equipo.

### 3.4 Análisis por UPLC-MS

#### 3.4.1 Equipo utilizado para la optimización del método

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

Las condiciones cromatográficas fueron:

**Tabla 2.** Condiciones cromatográficas UPLC-MS (QqQ).

Caudal	0,3 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura de la columna	40 °C
Volumen de inyección	10 $\mu$ l

Las fases móviles que se utilizaron:

- Metanol con 0,1 % de ácido fórmico (fase A)
- Agua con 0,1 % de ácido fórmico (fase B)

El gradiente usado fue:

**Tabla 3.** Gradiente UPLC-MS (QqQ)

Tiempo (min)	% A	% B
0	10	90
1	10	90
7	100	0
10	100	0
10.10	10	90
12	10	90

El equipo de UPLC fue conectado mediante una sonda ESI a un detector de espectrometría de masas QqQ con un analizador de masas triple cuadrupolo de Waters (Milford, MA, USA).

Los parámetros instrumentales usados en cuantificación son descritos en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Parámetros instrumentales UPLC-MS (QqQ)

Modo de adquisición	SIR
Caudal del gas de solvatación	600 L hr <sup>-1</sup>
Caudal del gas de cono	60 L hr <sup>-1</sup>
Temperatura del gas de desolvatación	450 °C
Temperatura de la fuente	120 °C
Voltaje del capilar	3,50 kV
Voltaje de cono	30 V

Los datos se registraron con el software MassLynx v4.1.

### 3.4.2 *Equipo utilizado para la identificación y cuantificación de sustancias*

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

Las condiciones cromatográficas fueron:

**Tabla 5.** Condiciones cromatográficas UPLC-MS (QTOF)

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

Las fases móviles que se utilizaron:

- Agua con 0,1 % de ácido fórmico (fase A)
- Metanol con 0,1 % de ácido fórmico (fase B)

El gradiente usado fue:

**Tabla 6.** Gradiente UPLC-MS (QTOF).

Tiempo (min)	% A	% B
0	98	2
1	98	2
8	0	100
10	0	100
10,10	98	2
12	98	2

El equipo de UPLC fue conectado mediante una sonda ESI a un espectrómetro de masas Xevo G2 QTOF de Waters con un analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF).

La configuración del instrumento fue:

**Tabla 7.** Parámetros instrumentales UPLC-MS (QTOF).

Voltaje del capilar	3 kV
Cono de extracción	30 V
Temperatura de la fuente	120°C
Temperatura de desolvatación	350°C
Caudal del gas de cono	10 L hr <sup>-1</sup>
Caudal del gas de desolvatación	600 L hr <sup>-1</sup>
Modo de adquisición	Modo MS <sup>E</sup>

Los datos se registraron con el software MassLynx v4.1.

### **3.5 Desarrollo experimental**

De acuerdo a lo establecido en la legislación los simulantes correspondientes al yogurt son: B y D1. El simulante B corresponde a ácido acético 3% (v/v) y el simulante D1 corresponde a etanol 50% (v/v). El tiempo de contacto está dentro del intervalo  $3 \leq t \leq 30$  días ya que los yogures tienen una caducidad de 28 días, y, por lo tanto, la duración del ensayo será de 10 días. La temperatura del ensayo fue de 5°C, que es la que corresponde a alimentos almacenados a  $T \leq 5^\circ\text{C}$ , que es la temperatura a la que suelen estar las neveras.

#### **3.5.1 Ensayo de migración del PLA con simulantes alimentarios en las condiciones del yogurt**

Se realizaron los ensayos con dos simulantes diferentes: etanol 50 % y ácido acético 3 %. Para los ensayos se pusieron en contacto en el interior de un vial de vidrio de 20 mL, 18 mL de simulante y un trozo de film de PLA (5 x 2 cm), que se cerró herméticamente. Se prepararon igualmente blancos de migración, introduciendo únicamente los 18 mL del simulante en el vial. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **3.5.2 Ensayo de migración del PLA en yogurt**

En este caso se pusieron en contacto dentro de los viales de 20 mL, 18 ml de yogurt con un trozo de film de PLA (5 x 2 cm). Los blancos de migración se realizaron introduciendo únicamente 18 mL de yogurt en el vial. Los ensayos se realizaron con dos yogures distintos, uno líquido y otro sólido.

Todas las muestras se introdujeron en la nevera a 5°C durante un periodo de 10 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 4 Resultados

### 4.1 *Optimización de la extracción*

Se optimizaron distintos parámetros con el fin de aumentar el rendimiento de la extracción. La optimización se llevo a cabo de forma secuencial. El protocolo de extracción base a partir del cual se optimizaron los diferentes parámetros estaba basado en el método propuesto por Filazi et al. (Filazi, Sireli, Can, y Karagoz, 2012). El protocolo de extracción base es el que se expone a continuación:

Se pesa una porción de yogurt ( $1 \pm 0,01$  g) en un tubo de centrifugación de polipropileno y se añaden 5 ml de acetonitrilo/agua (50:50, vol / vol). La mezcla se agita durante 1 minuto, se sonica durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos y se agita nuevamente en un mezclador Vortex durante 1 minuto. El homogeneizado se centrifuga durante 5 minutos a temperatura ambiente con una velocidad de 8000 rpm. El sobrenadante se traspasa a tubos Eppendorf<sup>TM</sup> y se realiza una segunda centrifugación. Esta se lleva a cabo durante 15 minutos en la microcentrífuga a una velocidad de 14000 rpm. Por último, la disolución resultante se traspasa a un vial y se inyecta en el equipo.

Para la optimización, se utilizaron los tres compuestos citados en el apartado 3.1.1 en la tabla 1, los cuales fueron elegidos, en cuanto a estructura y comportamiento, por similitud con las sustancias que se esperaba encontrar. Los análisis se llevaron a cabo por UPLC-MS con analizador de masas triple cuadrupolo (QqQ). La adquisición se llevó a cabo en modo SIR (single ion recording), seleccionando la masa protonada de los compuestos estudiados. El programa usado fue el siguiente:

**Tabla 8.** Condiciones de análisis en modo SIR para el análisis de los compuestos de dopaje.

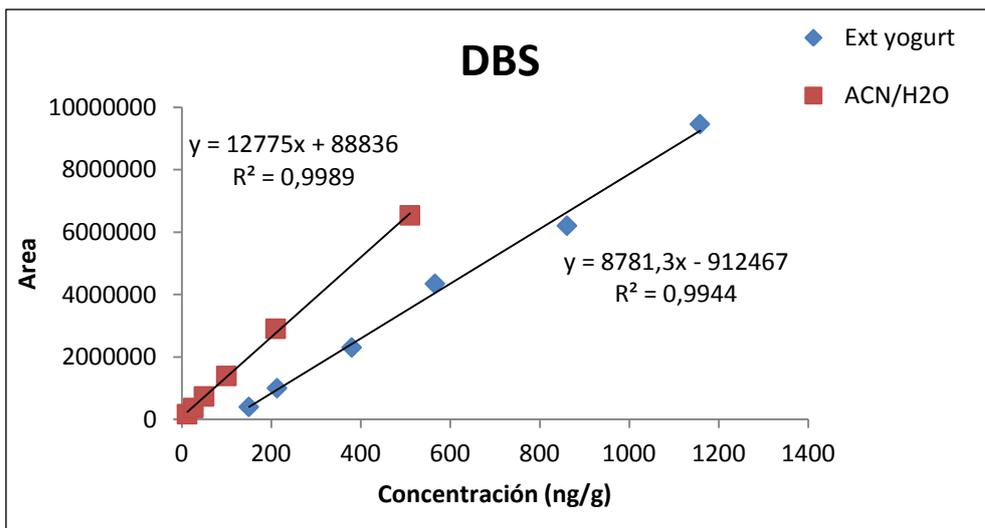
Compuesto	Masa (m/z)	Masa H+ (m/z)	Dwell (s)	Cono (V)
Dibutil sebacato (DBS)	314,46	315,5	0,105	30
Dimetil sebacato (DMS)	230,30	231,3	0,105	30
Bis(2-etilhexil) sebacato (EHS)	426,67	427,7	0,105	30

Para calcular las recuperaciones se realizó una recta de calibrado para cada uno de los compuestos anteriormente mencionados, que nos permitiera calcular las concentraciones de estos compuestos en las muestras analizadas.

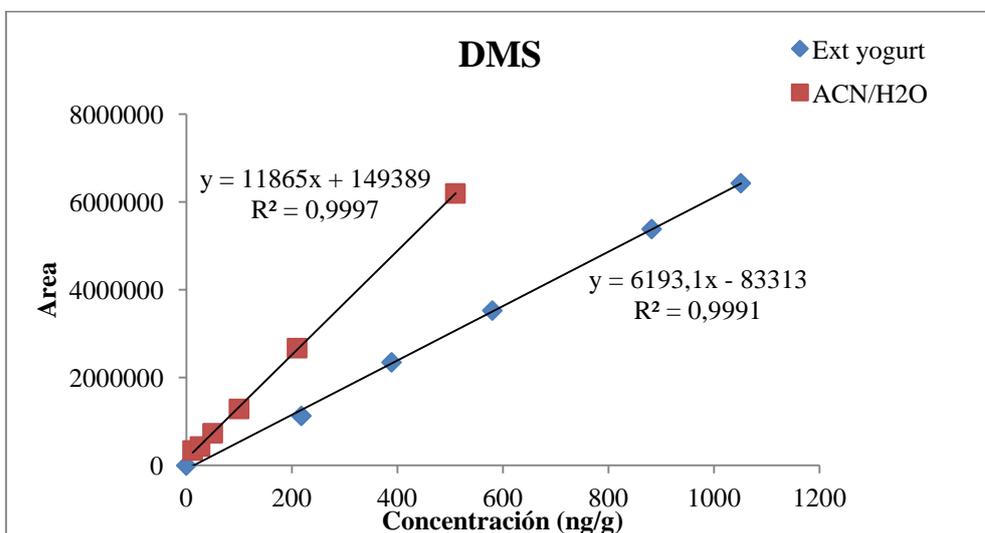
#### 4.1.1 *Rectas de calibrado y efecto matriz*

El efecto matriz se define como el efecto de los componentes de la muestra, distintos al analito, en una medida. Cuando se aplica un método analítico este efecto se traduce en una diferencia de sensibilidad del entre una recta de calibrado en un disolvente y a una preparada en el mismo entorno que la muestra. La sensibilidad se mide con la pendiente de la recta de calibrado, por lo que la diferencia entre las pendientes de la recta de calibrado en un disolvente determinado y en la matriz de la muestra indica la presencia de efecto matriz.

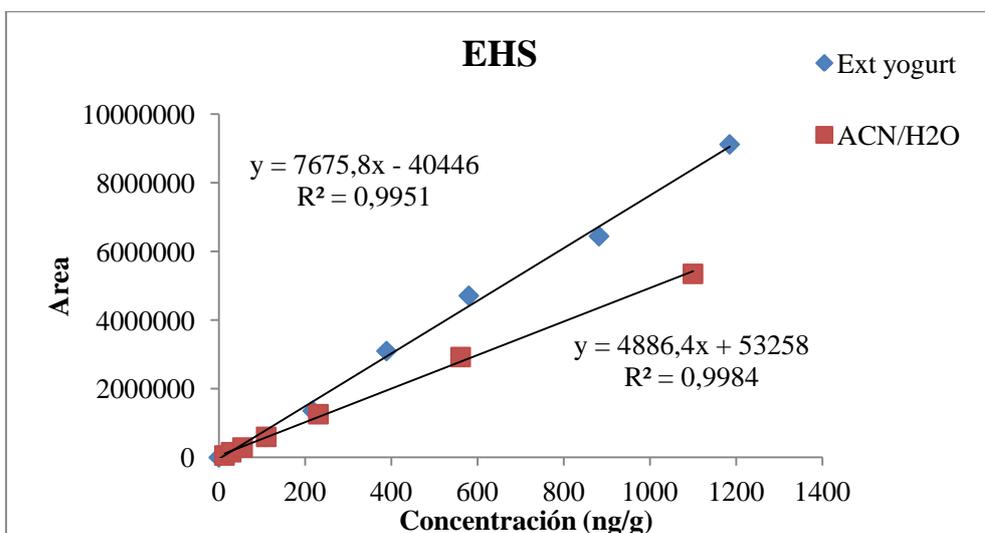
Para comprobar dicho efecto se hizo una recta de calibrado con distintas concentraciones de una disolución de los compuestos modelo anteriormente citados, usando acetonitrilo/agua MiliQ como disolvente, y se comparó con una recta hecha dopando un extracto de yogurt con la misma disolución. A continuación se exponen conjuntas ambas rectas para cada uno de los compuestos.



**Figura 9.** Rectas de calibrado del DBS en extracto de yogurt y en acetonitrilo/agua



**Figura 10.** Rectas de calibrado del DMS en extracto de yogurt y en acetonitrilo/agua



**Figura 11.** Rectas de calibrado del EHS en extracto de yogurt y en acetonitrilo/agua

Como se puede observar en las gráficas, hay una clara diferencia entre la pendiente de ambas rectas, lo que se traduce en la existencia de efecto matriz. Es por ello que tanto en la optimización del método de extracción como en el análisis de las muestras de migración de yogurt se realizó la recta de calibrado utilizando extracto de yogurt.

Las rectas de calibrado se inyectaron siempre en la misma secuencia que las muestras analizadas. Debido al efecto matriz observado, las rectas se realizaron en extractos de yogurt obtenidos mediante el protocolo de extracción base.

#### **4.1.2 Optimización del tiempo de sonicación**

Se probó con tres tiempos distintos (15, 30 y 60 minutos) con el fin de ver cuál era el más idóneo. Para ello se realizó el proceso de extracción con los tres tiempos sobre un gramo de yogurt dopado con 100 µl de una disolución de 25 ppm de dibutil sebacato, bis (2etilhexil) sebacato y dimetil sebacato.

Las recuperaciones obtenidas para cada compuesto con los distintos tiempos fueron:

**Tabla 9.** Recuperaciones obtenidas con distintos tiempos de sonicación.

<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de sonicación</b>	<b>% Recuperación</b>
<b>DBS</b>	15 minutos	39,82
	30 minutos	41,54
	60 minutos	41,84
<b>DMS</b>	15 minutos	50,80
	30 minutos	59,60
	60 minutos	62,30
<b>EHS</b>	15 minutos	1,70
	30 minutos	1,72
	60 minutos	1,94

Se observó un aumento en la recuperación al utilizar 30 minutos en lugar de 15 para el DMS, pero el aumento era mínimo al aumentar a 60 minutos, incrementando mucho el tiempo de análisis. Para el DBS los resultados fueron muy similares con los 3 tiempos, aunque se observó una leve mejoría al aumentar de 15 a 30 minutos. Se observó también que el protocolo no era adecuado para la extracción del EHS ya que las recuperaciones obtenían valores muy reducidos. De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó 30 minutos como tiempo de extracción óptimo.

#### **4.1.3 Optimización del volumen de extracción**

Se optimizó a continuación el volumen del disolvente de extracción. Se realizaron los experimentos con cuatro volúmenes distintos: 3, 5, 8 y 10 ml. Al igual que para optimizar el tiempo de sonicación, se realizó el proceso con los cuatro volúmenes sobre un gramo de yogurt dopado con 100 µl de una disolución de 25 ppm de los tres compuestos.

Las recuperaciones obtenidas para cada compuesto fueron:

**Tabla 10.** Recuperaciones obtenidas con distintos volúmenes de disolvente.

Compuesto	Volumen de disolvente	% Recuperación
<b>DBS</b>	3 ml ACN	21,38
	5 ml ACN	35,47
	8 ml ACN	47,71
	10 ml ACN	47,23
<b>DMS</b>	3 ml ACN	46,17
	5 ml ACN	54,96
	8 ml ACN	61,30
	10 ml ACN	57,52
<b>EHS</b>	3 ml ACN	1,05
	5 ml ACN	3,55
	8 ml ACN	10,32
	10 ml ACN	10,18

Para todos los compuestos se observó una mejora en la recuperación cuando el volumen de disolvente aumentó desde 3 a 8 ml, mientras que no se observaron mejoras al aumentar a 10 ml. Por ello, se seleccionó 8 ml como volumen óptimo de disolvente de extracción.

#### 4.1.4 Optimización del disolvente

Se probó con cuatro disolventes distintos: metanol, metanol/ agua mili Q (50:50, v/v), acetonitrilo y acetonitrilo/ agua mili Q (50:50, v/v). Realizando el proceso de extracción de la misma manera que en las optimizaciones anteriores, dopando 1 g de yogurt con 100 µl de la disolución de 25 ppm de de los 3 compuestos, las recuperaciones obtenidas fueron:

**Tabla 11.** Recuperaciones obtenidas con distintos disolventes.

Compuesto	Disolvente	Recuperación%
<b>DBS</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	48,84
	ACN	26,21
	MEOH/H <sub>2</sub> O 50/50	17,63
	MEOH	21,62
<b>DMS</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	61,77
	ACN	36,72
	MEOH 50	12,23
	MEOH	10,62
<b>EHS</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	10,60
	ACN	15,25
	MEOH/H <sub>2</sub> O 50/50	1,13
	MEOH	8,75

Salvo para EHS, donde se obtuvieron valores bajos de recuperación, las mejores recuperaciones se obtuvieron para la mezcla de acetonitrilo/agua 50/50. Es por ello que se seleccionó esta mezcla para el protocolo de extracción.

## 4.2 Identificación de migrantes del biopolímero base PLA-poliéster

Para la identificación de los migrantes, las muestras se analizaron por UPLC-MS(QTOF). El analizador de masas utilizado en este equipo es de alta resolución y permite medir la masa exacta de los iones.

La identificación de sustancias tanto en la migración en simulantes como en la migración en yogurt está basada en un estudio anteriormente realizado por Aznar et al (Aznar, Ubeda, Dreolin y Nerín, 2019). En dicho estudio se llevó a cabo la migración desde el mismo biomaterial PLA-poliéster a simulantes alimentarios pero en distintas condiciones de almacenamiento: 10 días, 60°C. Las sustancias identificadas se recogen en la tabla del Anexo I.

De los compuestos identificados en el estudio mencionado se han encontrado en los ensayos realizados los compuestos expuestos en la Tabla 15. Entre los compuestos encontrados se identificaron diferentes aditivos del polímero así como oligómeros del poliéster y del PLA. Los oligómeros del PLA presentaban 3 estructuras diferentes en las que se repetían las unidades del monómero del ácido láctico (LA):

- HO-[LA]<sub>n</sub>-H (lineal)
- CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-[LA]<sub>n</sub>-H (lineal)
- [LA]<sub>n</sub> (cíclico)

En la tabla 15 se pueden encontrar también los tiempos de retención obtenidos.

**Tabla 12.** Compuestos detectados en la migración de PLA

t <sub>r</sub> masa exacta (Artículo)	Aducto	Fórmula molecular	Candidatos	Detectado en extracto de yogurt	Detectado en simulantes
3.60_331.0711	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	No candidatos	NO	NO
4.50_257.0635	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	HO-[LA] <sub>3</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	NO
4.59_259.1160	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	1,3,6,9,11,14-hexaoxaciclohexadecano CAS 74485-37-3 (Glycol)	NO	NO
4.88_303.1421	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	Poli (trimetilolpropanadipato) CAS 28301-90-8	NO	NO
4.98_241.1043	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	dietileno, glicol, dipropionato CAS 6942-59-2	SÍ	SÍ
5.09_213.0723	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>2</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	SÍ
5.29_391.1943	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	no candidatos	NO	NO
5.31_329.0840	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	HO-[LA] <sub>4</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	SI
5.68_281.1480	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Familia piridinas	SI	SI
5.71_285.0946	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>3</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	NO
5.77_313.162	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	Bis(2-etoxietil) adipato CAS 109-44-4	SI	SI
5.87_401.1044	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	HO-[LA] <sub>5</sub> -H ( <i>lineal</i> )	SI	SI
6.19_269.1373	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	2,2'(oxibis((metil-2,1etanodil)oximetileno))	NO	NO

			CAS 41638-13-5		
6.24_473.1271	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	HO-[LA] <sub>6</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	SI
6.26_357.1161	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>4</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	NO
6.40_383.0955	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[LA] <sub>5</sub> ( <i>cíclico</i> )	NO	SI
6.58_545.1499	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	HO-[LA] <sub>7</sub> -H ( <i>lineal</i> )	SI	SI
6.61_429.1371	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>5</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	NO
6.80_455.1155	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	[LA] <sub>6</sub> ( <i>cíclico</i> )	SI	SI
6.82_617.1703	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>17</sub>	HO-[LA] <sub>8</sub> -H ( <i>lineal</i> )	SI	SI
6.92_513.2671	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	Bis[1(2butoxi)etoxi]propanil	SI	SI
6.94_501.1603	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>6</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	NO
6.99_481.2522	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Uretano dimetacrilato UDMC CAS 72869-86-4	SI	SI
7.05_527.1373	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	[LA] <sub>7</sub> ( <i>cíclico</i> )	SI	SI
7.12_461.1782	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	No candidatos	SI	SI
7.21_401.2183	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	[AA-BD] <sub>2</sub> ( <i>cíclico</i> ) CAS 78837-87-3	SI	SI
7.30_599.1591	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	[LA] <sub>8</sub> ( <i>cíclico</i> )	SI	SI
7.32_645.1956	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>17</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>8</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	NO
7.34_533.2356	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	No candidatos	SI	SI
7.44_671.1793	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	[LA] <sub>9</sub> ( <i>cíclico</i> )	SI	SI
7.45_717.2216	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>9</sub> -H ( <i>lineal</i> )	NO	NO
7.62_681.3568	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	No candidatos	SI	SI
7.71_443.1676	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	[PA-BD-AA-BD] ( <i>cíclico</i> )	SI	SI
7.84_601.3229	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>12</sub>	[AA-BD] <sub>3</sub> ( <i>cíclico</i> ) CAS 1135871-65-6	SI	SI
8.20_643.2741	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>12</sub>	[PA-BD-AA-BD-AA-BD] ( <i>cíclico</i> )	SI	SI
8.45_843.3785	[MNa] <sup>+</sup>	No formula	No candidatos	NO	SI
8.58_663.2416	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> O <sub>12</sub>	No candidatos	NO	SI

PA: ácido ftálico; BD: butanodiol; AA: ácido adípico; LA: ácido láctico

En el Anexo II se pueden encontrar también los distintos cromatogramas tanto para el extracto en yogurt sólido y líquido como para los dos simulantes utilizados.

### 4.3 Cuantificación de sustancias migrantes

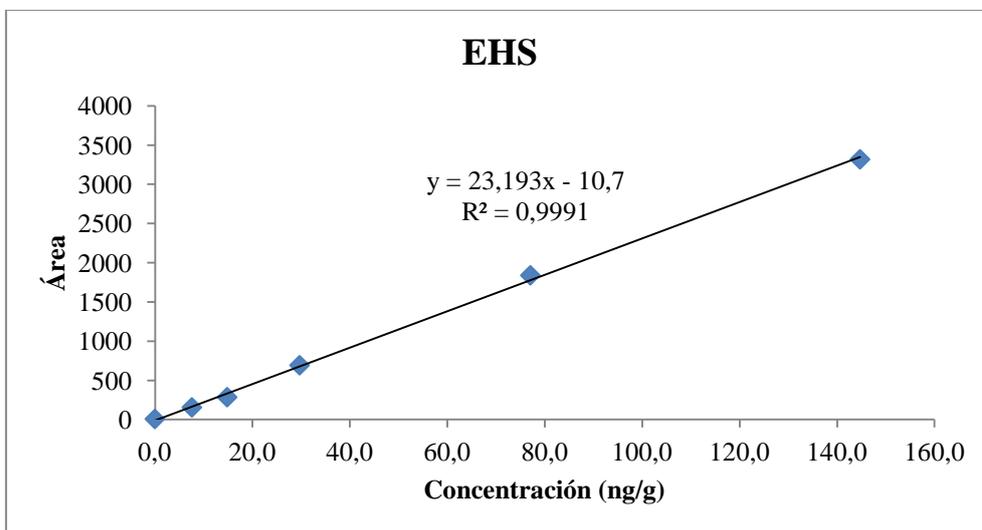
#### 4.3.1 Concentración de los migrantes en simulantes alimentarios

Se realizó un análisis semicuantitativo de los compuestos detectados, debido a que no se disponía de patrones de las sustancias obtenidas en la migración.

Las rectas de calibrado se realizaron con el bis(2-etilhexil) sebacato (EHS), ya que por peso molecular era el más similar a los compuestos detectados en las migraciones. Las rectas se analizaron por UPLC-MS(QTOF) utilizando las mismas condiciones de análisis que en las

inyecciones de las muestras de migración. Se realizaron rectas de calibrado tanto con disoluciones en etanol-agua (para cuantificar la migración en simulantes) como con el extracto del yogurt (para cuantificar la migración en el yogurt).

A continuación se muestra la recta en etanol-agua con la que se ha realizado la cuantificación en los simulantes. En los anexos se exponen también las rectas de calibrado obtenidas para los otros 2 compuestos.



**Figura 12.** Recta de calibrado del compuesto EHS en acetonitrilo/agua.

Se calculó el límite de detección del EHS. El límite de detección se describe como aquella concentración de analito que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de blanco. Una señal inferior a la del límite de detección no permite asegurar la presencia del analito en la muestra medida, mientras que el límite de cuantificación suele considerarse el límite inferior de concentraciones para obtener resultados cuantitativos. Por esto, la interpolación en las curvas de calibrado con la finalidad de obtener resultados cuantitativos se debe de realizar únicamente en el intervalo comprendido entre el límite de cuantificación y el de linealidad.

Se consideró el límite de detección como la concentración a la que la señal del analito era 3 veces mayor a la de la línea base y el límite de cuantificación cuando la señal era 10 veces mayor a la de a línea base.

$$LD = \frac{y_b + 3 * s_{bl}}{b}$$

$$LC = \frac{y_{bl} + 10 * s_{bl}}{b}$$

De acuerdo a estos cálculos, el límite de detección para el EHS fue 1,5 ng/g y el límite de cuantificación 5 ng/g. El intervalo lineal de medida fue de 5 a 150 ng/g. En aquellos casos que fue necesario, las muestras se diluyeron para poder ser interpoladas en la recta.

Interpolando las áreas de los picos correspondientes a las sustancias identificadas en el QTOF, las cuales se han expuesto en el apartado anterior, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Concentración de los migrantes en los simulantes alimentarios

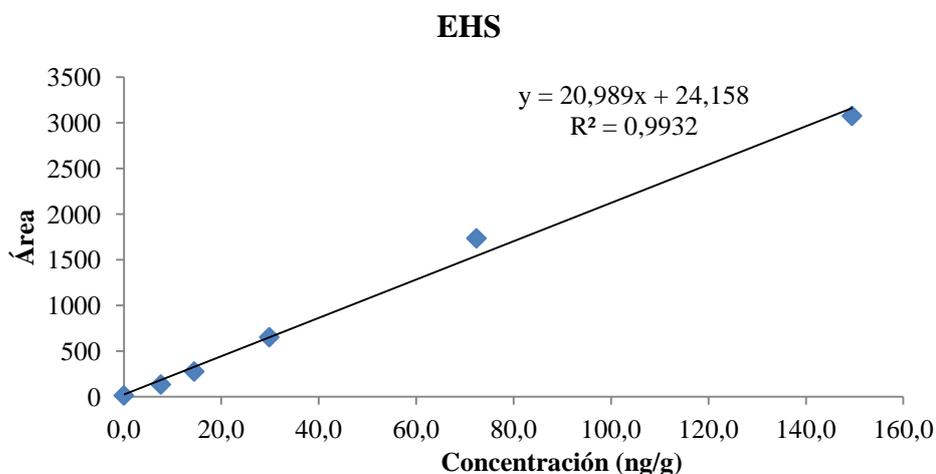
Compuestos	EtOH 50%	Acético 3%
	Concentración media (ng/g)	Concentración media (ng/g)
4.98_241.1043	32,04 ± 5,39	38,83 ± 1,05
5.09_213.0723	5,38 ± 0,88	<LOD
5.31_329.0840	3,48 ± 0,08	<LOQ
5.68_281.148	117,86 ± 11,65	100,41 ± 2,02
5.77_313.162	113,64 ± 14,80	107,16 ± 1,55
5.84_401.1044	5,71 ± 1,29	5,46 ± 0,28
6.24_473.1271	6,13 ± 1,16	<LOQ
6.40_383.0955	5,53 ± 1,41	<LOQ
6.58_545.1499	11,57 ± 1,40	5,15 ± 0,98
6.80_455.1155	40,12 ± 5,36	23,28 ± 0,42
6.82_617.1703	6,74 ± 1,75	<LOQ
6.92_513.2671	168,11 ± 18,37	114,77 ± 2,69
6.99_481.2522	190,26 ± 21,78	104,69 ± 4,14
7.05_527.1373	67,77 ± 10,59	24,98 ± 0,12
7.12_461.1782	84,96 ± 9,62	27,58 ± 1,15
7.21_401.2183	276,03 ± 31,06	130,53 ± 1,16
7.30_599.1591	69,05 ± 12,96	16,83 ± 2,19
7.34_533.2356	202,14 ± 17,95	43,71 ± 0,29
7.44_671.1793	48,01 ± 5,25	7,86 ± 1,80
7.62_681.3568	67,30 ± 7,50	<LOQ
7.71_443.1676	2336,56 ± 173,01	83,48 ± 0,86
7.84_601.3229	83,83 ± 9,97	<LOD
8.20_643.2741	1396,69 ± 107,18	<LOD
8.45_843.3785	476,91 ± 43,63	<LOD
8.58_663.2416	533,88 ± 33,82	<LOD

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación

Se puede observar una mayor migración en el simulante D1 (etanol 50%) que en el B (acético 3%). Esto puede ser debido a que los compuestos migrantes tenían un carácter más lipofílico y su migración era mayor al simulante más graso. Los compuestos con mayor migración fueron 7.71\_443.1676 y 8.20\_643.2741, que correspondían, de acuerdo al artículo, a los oligómeros [PA-BD-AA-BD] y [PA-BD-AA-BD-AA-BD] provenientes del poliéster que estaba combinado con el PLA en el biopolímero.

### 4.3.2 Concentración de los migrantes en muestra de yogurt

Se realizó el mismo proceso para cuantificar los distintos compuestos en el extracto de yogurt. Se utilizó también la recta de calibrado del compuesto EHS por las mismas razones



**Figura 13.** Recta de calibrado del compuesto EHS en extracto de yogurt.

El límite de detección para el EHS fue 1,5 ng/g y el límite de cuantificación 5 ng/g. El intervalo lineal de medida fue de 5 a 150 ng/g.

Las concentraciones calculadas interpolando en esta recta las áreas de los picos obtenidos son las expuestas en la s tabla 19. Se calculó también la concentración en la muestra de yogurt teniendo en cuenta la masa de yogurt extraído y el volumen y densidad del disolvente utilizado.

**Tabla 14.** Concentración de migrantes en yogurt

	extracto yogurt líquido	yogurt líquido	extracto yogurt sólido	yogurt sólido
Compuestos	Concentración (ng/g)	Concentración (ng/g)	Concentración (ng/g)	Concentración (ng/g)
4.98_241.1043	10,18 ± 1,95	73,99 ± 14,15	6,07 ± 0,84	44,12 ± 6,11
5.09_213.0723	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0
5.31_329.0840	<1,5	<1	<1,5	<10,0
5.68_281.148	23,33 ± 2,75	169,63 ± 19,98	19,60 ± 2,13	142,49 ± 15,51
5.77_313.162	37,25 ± 4,63	270,83 ± 33,65	36,41 ± 3,25	264,67 ± 23,60
5.84_401.1044	1,5-5,0	10,9-36,0	1,5-5,0	10,9-36,0
6.24_473.1271	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0
6.40_383.0955	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0
6.58_545.1499	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0
6.80_455.1155	1,5-5,0	10,9-36,0	<1,5	<10,0
6.82_617.1703	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0
6.92_513.2671	7,26 ± 0,45	52,77 ± 3,29	23,16 ± 5,25	168,34 ± 38,16
6.99_481.2522	15,00 ± 2,87	109,06 ± 20,87	9,87 ± 0,43	71,75 ± 3,14
7.05_527.1373	1,5-5,0	10,9-36,0	1,5-5,0	10,9-36,0
7.12_461.1782	6,08 ± 1,08	44,22 ± 7,84	5,47 ± 0,67	39,80 ± 4,90
7.21_401.2183	25,49 ± 1,07	185,29 ± 51,39	24,62 ± 9,18	179,02 ± 66,71

7.30_599.1591	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0
7.34_533.2356	10,59 ± 2,20	76,98 ± 15,96	15,56 ± 2,39	113,15 ± 17,36
7.44_671.1793	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0
7.62_681.3568	1,5-5,0	10,9-36,0	1,5-5,0	10,9-36,0
7.71_443.1676	120,02 ± 23,39	872,58 ± 170,02	60,35 ± 13,35	438,75 ± 97,05
7.84_601.3229	1,5-5,0	10,9-36,0	<1,5	<10,0
8.20_643.2741	13,19 ± 8,35	95,88 ± 60,69	1,5-5,0	10,9-36,0
8.45_843.3785	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0
8.58_663.2416	<1,5	<10,0	<1,5	<10,0

La migración fue muy similar para los dos tipos de yogures, líquido y sólido. Al igual que en las migraciones a simulantes alimentarios, el compuesto con mayor migración a yogurt fue el oligómero [PA-BD-AA-BD] (7.71\_443.1676) proveniente del poliéster que estaba combinado con el PLA en el biopolímero. Se detectaron también los oligómeros [PA-BD-AA-BD-AA-BD] (8.20\_643.2741) y [AA-BD]<sub>2</sub> (7.21\_401.2183) procedente del poliéster y diferentes aditivos como el Bis(2-etoxietil) adipato (5.77\_313.162). Se detectaron 4 oligómeros del PLA, 2 lineales (HO-[LA]<sub>4</sub>-H y HO-[LA]<sub>5</sub>-H) y 2 cíclicos ([LA]<sub>6</sub> y [LA]<sub>7</sub>) pero por debajo del límite de cuantificación, por lo que se estima que su concentración estaba entre 1.5 y 5 ng/g.

Como podemos observar en las tablas, tenemos sustancias tanto en el extracto de yogurt como en los simulantes que no aparecen en la lista positiva del Reglamento EU/10/2011 para materiales plásticos en contacto con alimentos, por lo cual su concentración debería de ser menor de 10 ng/g. Sin embargo, se supera dicha concentración en la mayoría de los casos.

## **5 Conclusión**

Se ha optimizado un tratamiento de muestra que permite la extracción de analitos en muestras de yogurt para su posterior análisis por UPLC-MS. El método nos ha permitido detectar sustancias procedentes de la migración de un biopolímero PLA-poliéster en yogurt, además de realizar una semi-cuantificación de las mismas.

Los resultados obtenidos en los ensayos con simulantes alimentarios mostraron una mayor migración de compuestos en el simulante etanol 50% que en acético 3%, por lo que se prevé una mayor migración de compuestos de este material a alimentos grasos que a alimentos acuosos. Los compuestos que más migraron procedían mayormente del poliéster utilizado junto con el PLA en la fabricación del biopolímero.

En los ensayos llevados a cabo con las muestras de yogurt los migrantes encontrados fueron muy similares a los encontrados en la migración a etanol 50%, lo que es coherente debido a la naturaleza grasa del yogurt. En este caso, los compuestos que más migraron procedían también del poliéster utilizado junto con el PLA en la fabricación del biopolímero. Este hecho indica la efectividad que tiene trabajar con simulantes en vez de usar los propios alimentos.

Los resultados mostraron a su vez la importancia de realizar ensayos de migración en todos los materiales que vayan a ser utilizados para contacto alimentario, de forma que se pueda evaluar la posible transferencia de compuestos y garantizar la salud del consumidor.

## 6 **Bibliografía**

- 1) Catala, R. and R. Gavara (2002). Fundamentos y Mecanismos de la migración. Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos. R. Catala y R. Gavara (Eds.). Valencia, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), pp. 1-18.
- 2) Ferreira, V. (2007). *Cromatografía: Fundamentos y práctica*. (2ª ed.) Zaragoza: Universidad de Zaragoza
- 3) Filazi, A., Sireli, U.T., Ekici, H., Can, H.Y. y Karagoz, A. (2012). Determination of melamine in milk and dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of dairy Science* , 95, 602-608.
- 4) Nerin, C., Alfaro, P., Aznar, M. y Domeño, C. (2013). The challenge of identifying non-intentionally added substances (nias) from food packaging materials: a review. *Analytica Chimica*, 775, 14-24.
- 5) Jabeen, N., Majid, I. y Nayik, G.A. (2015). Bioplastics and food packaging: A review. *Cogent Foods and Agriculture*, 1, 1-6.
- 6) Aznar, M., Ubeda, S., Dreolin, N. y Nerin, C. (2019). Determination of non-volatile components of biodegradable food packaging material based on polyester and polylactic acid (PLA) and its migration to food simulants. *Journal of Chromatography A*, 1583, 1-8.
- 7) European-Commission, Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament on materials and articles intended to come into contact with food (2004)
- 8) Reglamento (UE) N° 10/2011 de la comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos
- 9) Ubeda, S., Aznar, M., Alfaro, P. y Nerin, C. (2019). Migration of oligomers from a food contact biopolymer based on polylactic acid (PLA) and polyester. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 411 (16), 3521–3532.
- 10) Ashter, S.A. (2016). Commercial Applications of Bioplastics, in: Introduction to Bioplastics Engineering. *Elsevier*
- 11) Erdohan, Z.O., Cam, B. y Turhan, K.N. (2013). Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. *Journal of Food Engineering*, 119, 308-315.
- 12) Coltelli, M.B., Della Maggiore, I., Bertold, M., Signori, F., Bronco, S. y Ciardelli, F. (2008). Poly(lactic acid) properties as a consequence of poly(butylene adipate-co-terephthalate) blending and acetyl tributyl citrate plasticization. *Journal of Applied Polymer Science*, 110, 1250-1262.
- 13) Ljungberg, N. y Wesslen, B. (2002). The effects of plasticizers on the dynamic mechanical and thermal properties of poly(lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 86, 1227-1234.
- 14) Choi, K.M., Choi, M.C., Han, D.H., Park, T.S. y Ha, C.S. (2013). Plasticization of poly(lactic acid) (PLA) through chemical grafting of poly(ethylene glycol) (PEG) via in situ reactive blending. *European Polymer Journal*, 49, 2356-2364.
- 15) Hoppe, M., Fornari, R., Voogt, P.D. y Franz, R. (2017). Migration of oligomers from PET: determination of diffusion coefficients and comparison of experimental versus modelled migration. *Food Additives and Contaminants A*, 1-10.
- 16) Kim, D.J. y Lee, K.T. (2012). Determination of monomers and oligomers in polyethylene terephthalate trays and bottles for food use by using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Polimer Testing*.
- 17) Ubeda, S., Aznar, M. y Nerin, C. (2018). Determination of oligomers in virgin and recycled polyethylene terephthalate (PET) samples by UPLC-MS-QTOF. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 41, 2372-2384.
- 18) Ubeda, S., Aznar, M., Vera, P., Nerin, C., Henriquez, L., Taborda, L. y Restrepo, C. (2017). Overall and specific migration from multilayer high barrier food contact materials Kinetic study of cyclic polyester oligomers migration. *Food Additives and Contaminants A*.

- 19) Lazzari, S., Codari, R., Storti, G., Morbidelli, M. y Moscatelli, D. (2014). Modeling the pH-dependent PLA oligomer degradation kinetics. *Polymers Degradation and Stability*, 110, 80-90.
- 20) Dopico-Garcia, S., Ares-Pernas, A., Otero-Canabal, J., Castro-Lopez, M., Lopez-Vilarino, J.M., Gonzalez-Rodriguez, V. y Abad-Lopez, M.J. (2013). Insight into industrial PLA aging process by complementary use of rheology, HPLC, and MALDI. *Polymers for Advanced Technologies*. 24, 723-731.
- 21) Bor, Y., Alin, J. y Hakkarainen, M. (2012). Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Analysis Reveals Migration of Cyclic Lactide Oligomers from Polylactide Packaging in Contact with Ethanolic Food Simulant. *Packaging Technology and Science*. 25, 427-433.
- 22) Mutsuga, M., Kawamura, Y. y Tanamoto, K. (2008). Migration of lactic acid, lactide and oligomers from polylactide food-contact materials. . *Food Additives and Contaminants A*. 25,1-14.
- 23) Agilent Technologies (2001). Basics of LC/MS (5988-2045EN). U.S.A.

## ANEXOS

Anexo I. Tabla de articulo (Aznar et al, 2019)

Code rt_mass	IPellets	IFilm	Imig	Adduct	Molecular Formula	Candidates	Remarks/Fragments (scores)
3.60_331.0711	Nd	Nd	1	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	No candidates	167.0027, 185.0129
4.50_257.0635	Nd	Nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	HO-[LA] <sub>3</sub> -H (linear)	PLA oligomer
4.59_259.1160	2	Nd	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	1,3,6,9,11,14 - Hexaoxacyclohexadecane CAS 74485-37-3 (Glycol)	PLA plasticizer
4.88_303.1421	1	nd	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	Poly(trimethylolpropane adipate) CAS 28301-90-8	Indirect additives by FDA [23]
4.98_241.1043	1	1	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	Diethylene glycol, dipropionate CAS 6942-59-2	PLA plasticizers
5.09_213.0723	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>2</sub> -H (linear)	PLA oligomer
5.29_391.1943	1	nd	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	No candidates	
5.31_329.0840	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	HO-[LA] <sub>4</sub> -H (linear)	PLA oligomer
5.68_281.1480	2	2	1	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Piperidine family	Detected by Bradley in PLA [5] Hindered piperidines are light stabilizer
5.71_285.0946	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-[LA] <sub>3</sub> -H (linear)	PLA oligomer
5.77_313.162	2	2	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	Bis(2-ethoxyethyl) adipate CAS 109-44-4	Detected by Bradley in starch and cellulose [5]
5.87_401.1044	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	HO-[LA] <sub>5</sub> -H (linear)	PLA oligomer
6.19_269.1373	1	nd	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	2,2'-(oxybis((methyl-2,1-ethanediyloxy)methylene)) bisoxirane CAS 41638-	Indirect additives by FDA [23]

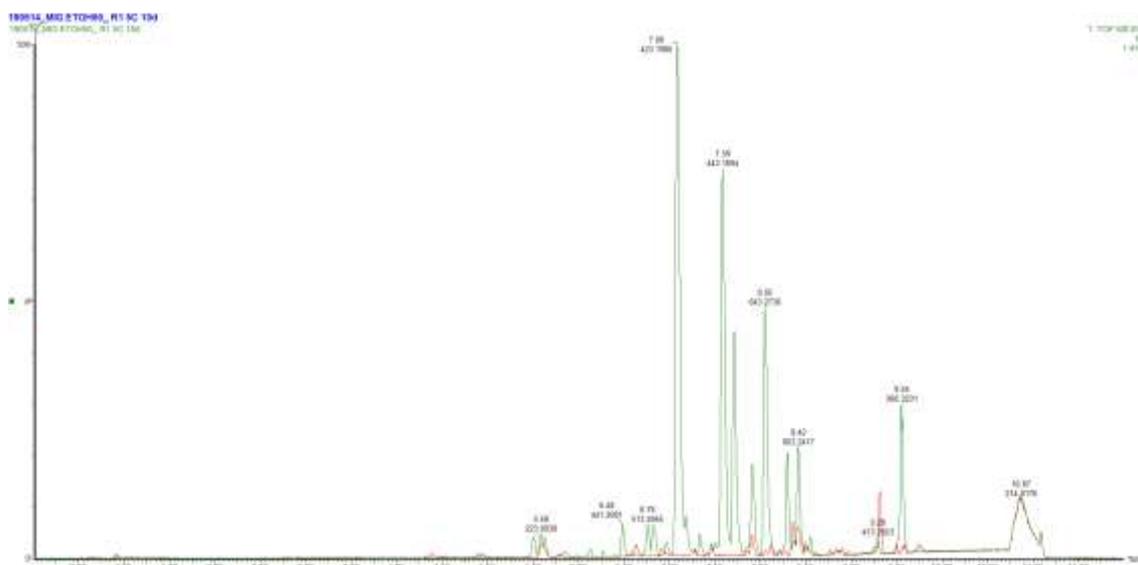
						13-5	
6.24_473.1271	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	HO-[LA] <sub>6</sub> -H ( <i>linear</i> )	PLA oligomer
6.26_357.1161	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O- [LA] <sub>4</sub> -H ( <i>linear</i> )	PLA oligomer
6.40_383.0955	1	1	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[LA] <sub>5</sub> ( <i>cyclic</i> )	PLA oligomer
6.58_545.1499	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	HO-[LA] <sub>7</sub> -H ( <i>linear</i> )	PLA oligomer
6.61_429.1371	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O- [LA] <sub>5</sub> -H ( <i>linear</i> )	PLA oligomer
6.80_455.1155	2	2	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	[LA] <sub>6</sub> ( <i>cyclic</i> )	PLA oligomer
6.82_617.1703	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>17</sub>	HO-[LA] <sub>8</sub> -H ( <i>linear</i> )	PLA oligomer
6.92_513.2671	2	2	1	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	Bis[1-(2- butoxyethox y)-1-oxo-2- propanyl] adipate	Detected by Bradley [5]
6.94_501.1603	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O- [LA] <sub>6</sub> -H ( <i>linear</i> )	PLA oligomer
6.99_481.2522	2	2	1	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Urethane dimethacryla te UDMC CAS 72869- 86-4	Detected by Bradley [5]
7.05_527.1373	2	2	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	[LA] <sub>7</sub> ( <i>cyclic</i> )	PLA oligomer
7.12_461.1782	1	1	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	No candidates	Detected by Bradley [5]
7.21_401.2183	3	3	3	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	[AA-BD] <sub>2</sub> ( <i>cyclic</i> ) CAS 78837- 87-3	Polyester oligomer. Detected by Bradley [5]
7.30_599.1591	1	1	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	[LA] <sub>8</sub> ( <i>cyclic</i> )	PLA oligomer
7.32_645.1956	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>17</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O- [LA] <sub>8</sub> -H ( <i>linear</i> )	PLA oligomer
7.34_533.2356	1	1	1	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	No candidates	
7.44_671.1793	2	2	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	[LA] <sub>9</sub> ( <i>cyclic</i> )	PLA oligomer
7.45_717.2216	Nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O- [LA] <sub>9</sub> -H ( <i>linear</i> )	PLA oligomer
7.62_681.3568	1	1	1	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	No candidates	
7.71_443.1676	3	3	3	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	[PA-BD-AA- BD] ( <i>cyclic</i> )	Polyester oligomer. Detected by Bradley

							[5]
7.84_601.3229	3	3	2	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>12</sub>	[AA-BD] <sub>3</sub> (cyclic) CAS 1135871-65- 6	Polyester oligomer. Detected by Bradley [5]
8.20_643.2741	3	3	3	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>12</sub>	[PA-BD-AA- BD-AA-BD] (cyclic)	Polyester oligomer. Detected by Bradley [5]
8.45_843.3785	1	1	2	[MNa] <sup>+</sup>	No formula	No candidates	
8.58_663.2416	1	1	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> O <sub>12</sub>	No candidates	Detected by Bradley [5]

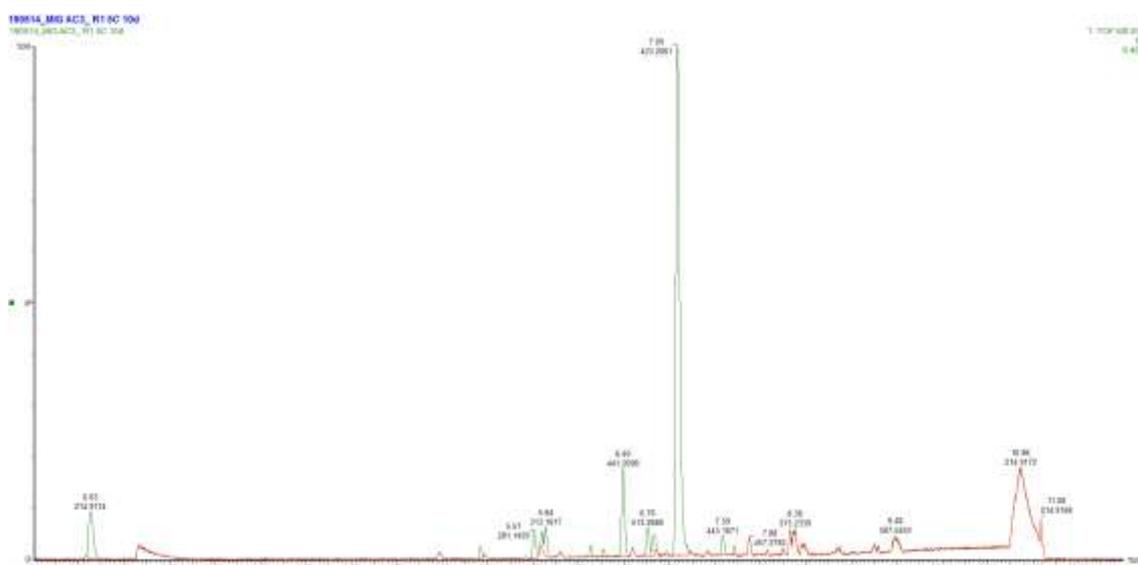
**Anexo II.** Cromatogramas obtenidos en el análisis de migración en simulantes y en extracto de yogurt.

En este anexo se exponen los cromatogramas obtenidos en el quipo QTOF para cada uno de los ensayos.

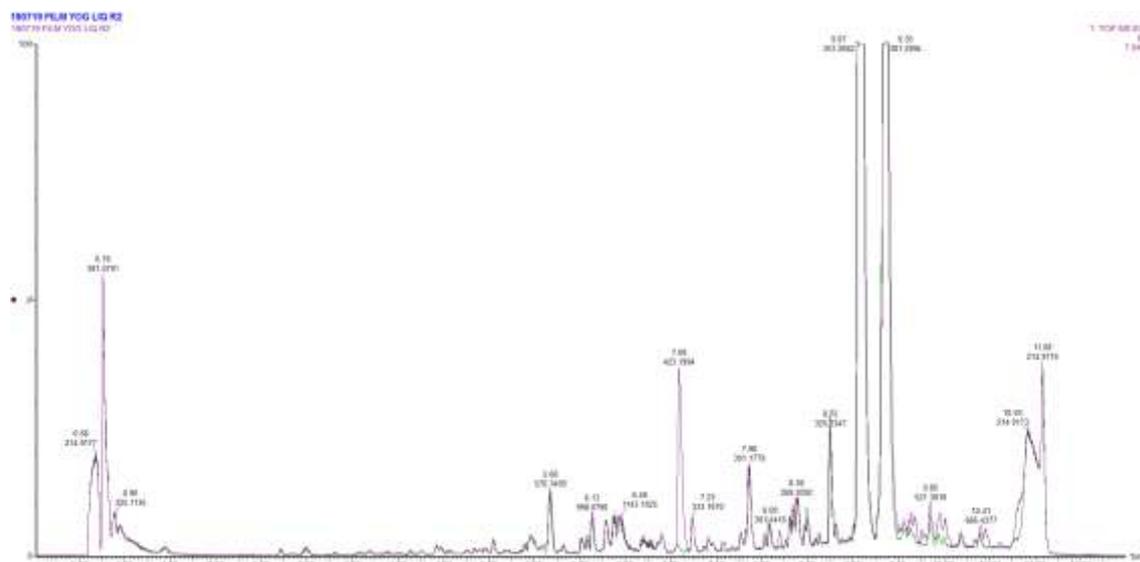
Cromatograma de la migración en simulantes (EtOH50%) obtenido por inyección en UPLC-MS(QTOF)



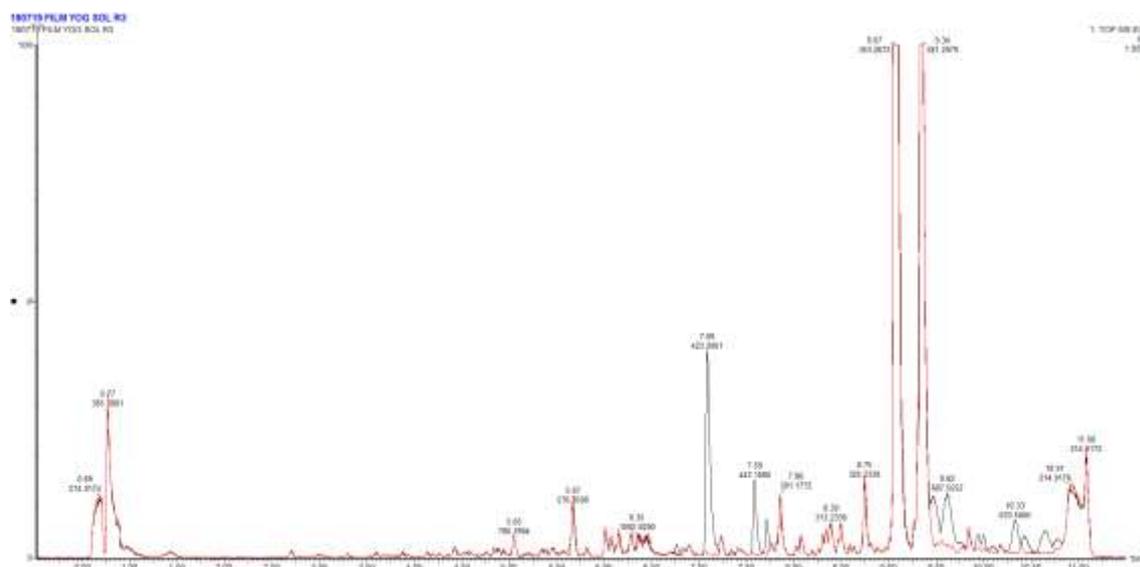
Cromatograma de la migración en simulantes (Ac 3%) obtenido por inyección en UPLC-MS(QTOF)



Cromatograma de la migración en yogurt liquido obtenido por inyección en UPLC-MS(QTOF)



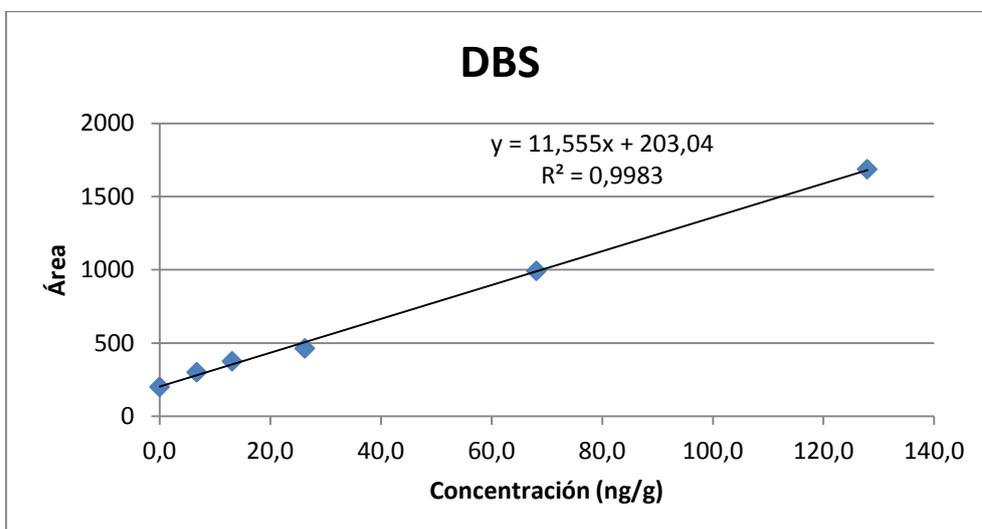
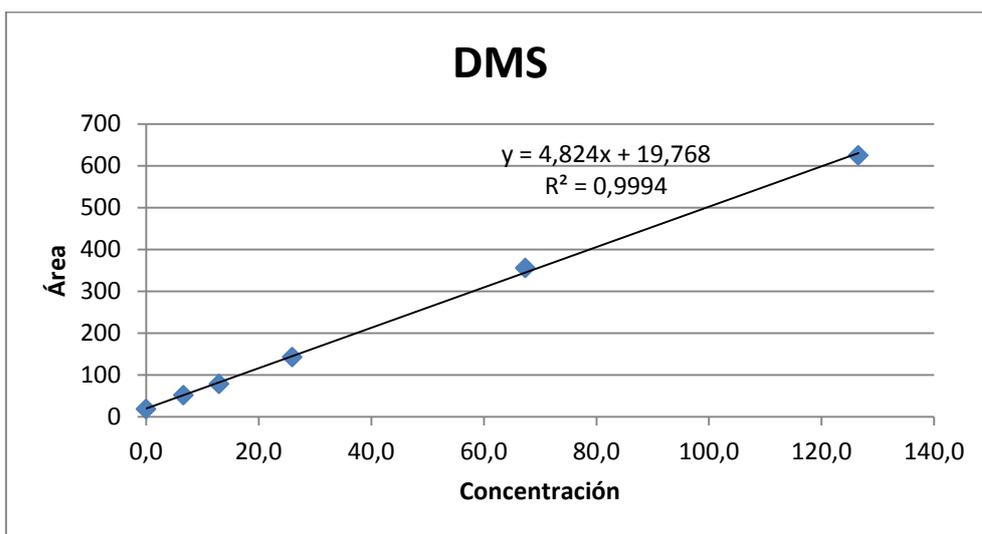
Cromatograma de la migración en yogurt solido obtenido por inyección en UPLC-MS(QTOF)

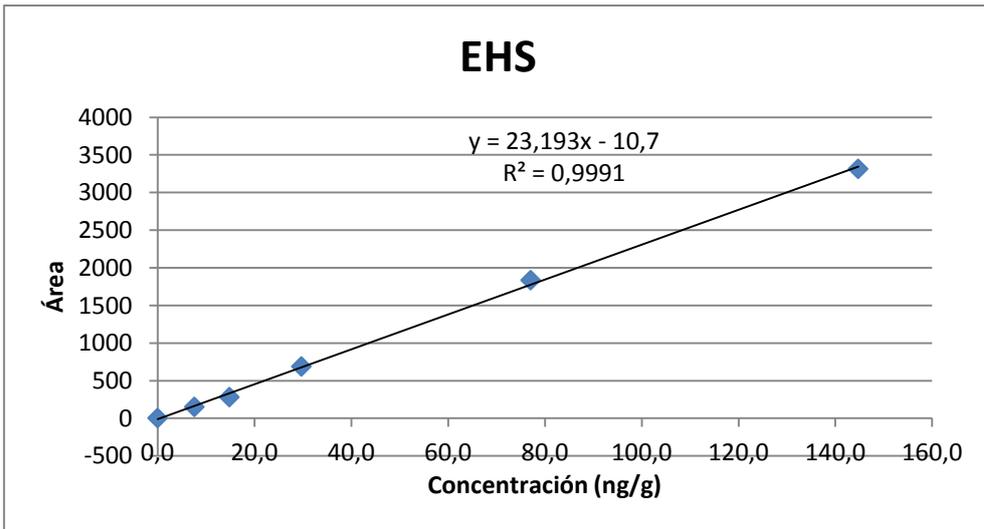


**Anexo III. Rectas de calibrado.**

Rectas de calibrado de los tres compuestos estudiados (DMS, DBS y EHS) en EtOH/H<sub>2</sub>O y en extracto de yogurt para la cuantificación del método.

en EtOH/H <sub>2</sub> O					
DMS		DBS		EHS	
	MNa+		MNa+		MNa+
mz	253,142	mz	337,2349	Mz	449,3566
rt	7,47	rt	8,77	Rt	9,75
Concetración (ng/g)	Área	Concetración (ng/g)	Área	Concetración (ng/g)	Área
0,0	19	0,0	200	0,0	6
6,6	52	6,7	300	7,6	154
13,0	79	13,1	375	14,8	284
26,0	143	26,3	463	29,7	691
67,4	356	68,1	992	77,1	1838
126,5	625	127,9	1686	144,7	3317





en EXT YOG					
DMS		DBS		EHS	
mz	MNa+	mz	MNa+	Mz	MNa+
rt	7,47	rt	8,77	Rt	9,75
Concentración (ng/g)	Área	Concentración (ng/g)	Área	Concentración (ng/g)	Área
0,0	28	0,0	83	0,0	15
6,6	52	6,7	264	7,6	135
12,6	68	12,8	289	14,4	277
26,1	159	26,4	411	29,9	653
63,3	352	64,0	677	72,4	1735
130,7	592	132,1	1203	149,5	3075

