



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Optimización de la técnica de extracción FPSE para  
la determinación de compuestos no volátiles  
presentes en la migración de biopolímeros basados  
en ácido poliláctico (PLA)

Autor: Paula Molés Gascón

Director: Margarita Aznar Ramos  
Celia Domeño Recalde

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias  
2020

# Índice

Resumen.....	1
Abstract .....	2
1. Introducción.....	3
1.1. FPSE ( <i>Fabric Phase Sorptive Extraction</i> ) .....	3
1.2. Envase alimentario.....	4
1.3. Migración.....	6
1.3.1. Oligómeros .....	7
1.4. UPLC-QTOF-MS .....	7
2. Objetivos y planteamiento .....	9
3. Materiales y metodología .....	10
3.1. Muestras .....	10
3.1.1. Biopolímero basado en PLA.....	10
3.1.2. Zumo.....	10
3.2. Medios FPSE.....	10
3.3. Reactivos y disoluciones.....	10
3.3.1. Reactivos .....	10
3.3.2. Compuestos modelo.....	11
3.3.3. Disoluciones .....	11
3.4. Instrumentación.....	12
3.5. Análisis por UPLC-QTOF-MS.....	12
3.5.1. UPLC.....	12
3.5.2. QTOF-MS.....	12
3.6. Desarrollo experimental .....	13
3.6.1. Protocolo de extracción por FPSE .....	13
3.6.2. Ensayos de migración .....	13
4. Resultados y discusión .....	14
4.1. Optimización de la FPSE .....	14
4.1.1. Optimización del tiempo de extracción .....	14
4.2. Eficacia de la FPSE .....	15
4.2.1. Enriquecimiento de los oligómeros detectados en el simulante .....	15
4.2.2. Detección de nuevos oligómeros.....	16
4.3. Factor de enriquecimiento y % Recuperación .....	16
4.3.1. Factor de enriquecimiento y % recuperación en simulante B .....	17
4.3.2. Factor de enriquecimiento y % recuperación en zumo.....	18
4.4. Identificación de las sustancias migrantes.....	18
4.5. Cuantificación de las sustancias migrantes .....	20
4.5.1. Concentración de los migrantes en el simulante alimentario .....	20
4.5.2. Concentración de los migrantes en el zumo.....	21
4.6. Comparación de resultados y evaluación de la seguridad .....	23
5. Conclusiones.....	24
6. Bibliografía.....	25
Anexos.....	28

## **Resumen**

En la actualidad, los polímeros biodegradables se utilizan cada vez más como material de envase alimentario por ser amigables con el medioambiente. Entre ellos destaca la producción a gran escala del ácido poliláctico (PLA). Este polímero, al igual que cualquier material plástico destinado a estar en contacto con alimentos, debe cumplir con los requisitos establecidos por la Legislación EU/10/11 para garantizar la calidad y seguridad del alimento.

En este estudio se evaluó la migración de los compuestos no volátiles procedentes de una mezcla de PLA-poliéster en simulantes alimentarios y muestras de zumo. Para ello, se desarrolló un método de extracción basado en la FPSE (Fabric Phase Sorptive Extraction), como técnica de preconcentración que permitiera su posterior identificación y cuantificación en el equipo UPLC-QTOF-MS.

Los ensayos realizados mostraron que los compuestos que migraban en el simulante y en el zumo eran similares, siendo los oligómeros cíclicos procedentes del poliéster de naturaleza no renovable los que presentaban una mayor concentración. Se observó también migración de oligómeros provenientes del PLA, tanto con estructura cíclica  $[LA]_n$ , siendo LA, el ácido láctico; como con estructura lineal HO- $[LA]_n$ -H, debidos a la hidrólisis del polímero en contacto con simulantes acuosos. Este hecho refleja la eficacia de los simulantes para recrear la migración de los compuestos químicos del material de envase al alimento.

## **Abstract**

Currently, biodegradable polymers are being increasingly used as food packaging materials because they are environmentally friendly. Among them, the large-scale production of polylactic acid (PLA) stands out. This polymer, like any plastic material intended to be in contact with food, must comply with the requirements established by Legislation EU/10/11 to guarantee the quality and safety of food.

In this study, the migration of non-volatile compounds from a PLA-polyester blend to food simulants and juice samples was evaluated. For this, an extraction method based on FPSE (Fabric Phase Sorptive Extraction) was developed as a preconcentration technique that allowed its subsequent identification and quantification in UPLC-QTOF-MS equipment.

Tests carried out showed that compounds which migrated in food simulant and juice were similar, with cyclic oligomers from non-renewable nature polyester having the highest concentration. Migration of oligomers from PLA was also observed, both with a cyclic structure  $[LA]_n$ , with LA being lactic acid; as with linear structure  $HO-[LA]_n-H$ , due to the hydrolysis of the polymer in contact with aqueous simulants. This fact reflects the effectiveness of food simulants to recreate the migration of chemical compounds from the packaging material to food.

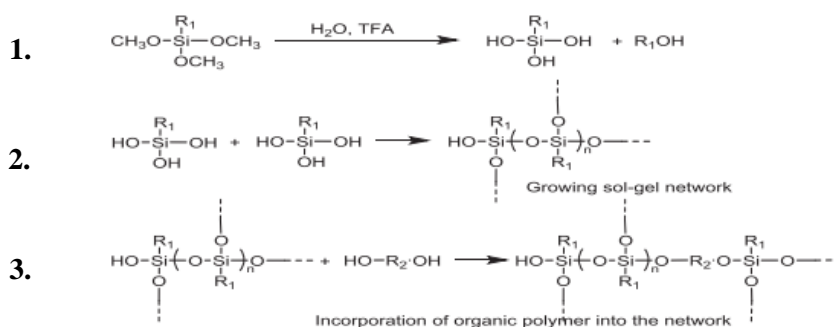
## 1. Introducción

### 1.1. *FPSE (Fabric Phase Sorptive Extraction)*

La FPSE es una técnica de microextracción desarrollada por Kabir y Furton<sup>1</sup>, en la que un sorbente híbrido orgánico-inorgánico es inmovilizado químicamente sobre una tela natural o sintética que actúa como sustrato.<sup>2</sup>

La superficie del sustrato, principalmente de celulosa, poliéster o fibra de vidrio, sufre un proceso de mercerización, tratamiento que aumenta la disponibilidad de los grupos hidroxilo para mejorar su reactividad química y permitir la unión del sorbente a través de la tecnología de recubrimiento sol-gel introducida por Malik y colaboradores.<sup>3,4</sup>

El proceso de recubrimiento sol-gel sobre el sustrato de tela implica las siguientes reacciones: (1) hidrólisis catalítica controlada del precursor sol-gel; (2) policondensación del precursor hidrolizado, lo que conduce a una creciente red tridimensional sol-gel; (3) incorporación aleatoria de polímero activo en la red; (4) inmovilización química de la red sol-gel en los sustratos flexibles mediante condensación.<sup>5</sup>

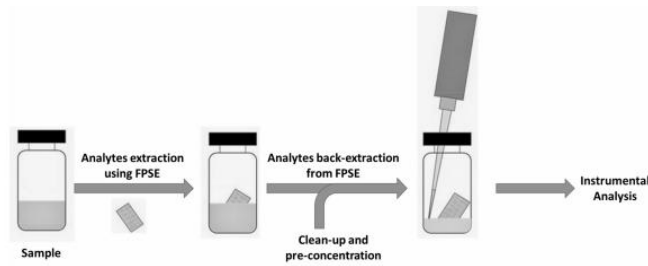


**Figura 1.** Esquema de reacción general para crear un revestimiento orgánico-inorgánico híbrido de sol-gel sobre el sustrato. Siendo  $R_1$  el precursor inorgánico modificado y  $R_2$  el polímero orgánico activo.<sup>6</sup>

La fortaleza del enlace covalente entre el sorbente poroso y el sustrato flexible y permeable hace que esta técnica solventa las principales limitaciones de los procedimientos de preparación de muestra convencionales.<sup>7</sup> Combina las ventajas de la extracción de equilibrio y la extracción exhaustiva para minimizar el consumo de disolventes orgánicos tóxicos y cumplir con los principios de la Química Analítica Verde: miniaturización, automatización y simplificación.<sup>8,9</sup>

Facilita su inserción directa en muestras complejas sin la necesidad de un tratamiento de muestra previo, requisito que es imprescindible en la extracción en fase sólida (SPE), reduciendo así las etapas y el coste. Proporciona un equilibrio de extracción rápido y eficiente que aumenta la capacidad de retención del analito a diferencia de la microextracción en fase sólida (SPME) donde la carga de sorbente es limitada y esto afecta a la sensibilidad.<sup>10</sup> Además, la sinergia sustrato-sorbente permite la estabilidad del medio FPSE en cualquier ambiente químico sin sufrir alteraciones, y su posterior reutilización.<sup>11</sup>

Esta técnica de preparación de muestra presenta como etapas principales la extracción y desorción. En la primera, la muestra es puesta en contacto con los medios FPSE para la retención de los analitos en el sorbente, y en la segunda, los medios FPSE se sumergen en un pequeño volumen de disolvente orgánico que extrae los analitos, favoreciendo así su posterior análisis. Este procedimiento se ve influido por factores termodinámicos (características del material sorbente y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés) y cinéticos (área de contacto muestra/sorbente).<sup>9,12</sup>



**Figura 2.** Procedimiento general de extracción FPSE.<sup>8</sup>

La FPSE se ha utilizado en la extracción de una amplia variedad de analitos de diferentes muestras, como anfenicoles<sup>13</sup> y sulfonamidas<sup>14</sup> residuales en leche cruda; estrógenos<sup>10</sup> y benzodiacepinas<sup>15</sup> en fluidos biológicos; andrógenos y progestágenos<sup>16</sup>, alquilfenoles<sup>17</sup> en muestras ambientales; estabilizadores y filtros UV<sup>18</sup> en aguas naturales y residuales. Siendo de gran ayuda en la determinación de contaminantes emergentes de productos farmacéuticos y de cuidado personal,<sup>12,19</sup> y de aditivos plásticos comunes.<sup>5</sup>

## 1.2. *Envase alimentario*

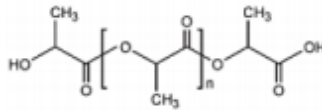
El envase alimentario tiene como función principal proteger y preservar la calidad de los alimentos de los efectos ambientales externos.<sup>20</sup> El uso de materiales para su contacto con alimentos (FCM) ha aumentado en los últimos años, siendo los polímeros plásticos los más utilizados por su facilidad de producción y versatilidad.<sup>21</sup>

En su mayoría se producen a partir de recursos derivados del petróleo (no renovables), como el polipropileno (PP) y el polietileno (PE), por su bajo coste, sus excelentes propiedades mecánicas y físicas, y por ser capaces de actuar como barrera a compuestos aromáticos y gases. El principal inconveniente es su resistencia a la degradación, generando gran cantidad de materiales de desecho, y provocando la contaminación del medio ambiente.<sup>22</sup> Como alternativa a los plásticos convencionales se han desarrollado materiales de carácter más sostenible donde cabría nombrar a los bioplásticos. A pesar de esta ventaja, estos requieren un estudio más exhaustivo porque no son tan rentables económicamente debido a su complejidad de producción, así como, su inestabilidad y fragilidad.<sup>23</sup>

Los bioplásticos son materiales que provienen de polímeros con una componente natural (bio-based), son biodegradables o presentan ambas propiedades. Se entiende por polímeros biodegradables aquellos que experimentan una destrucción gradual de su cadena convirtiéndose en monómeros y finalmente transformándose en dióxido de carbono y agua.<sup>22</sup> La dificultad de conseguir una degradación completa hace que el futuro de los bioplásticos se centre en evaluar el tiempo de compostaje, período requerido para que ocurra un nivel aceptable de desintegración del material.<sup>20</sup>

Los polímeros biodegradables están compuestos en su mayoría por almidón, polihidroxialcanoatos (PHAs) y poliésteres alifáticos. Este último grupo es el más estudiado, y en él se incluyen polímeros como el ácido poliláctico (PLA).

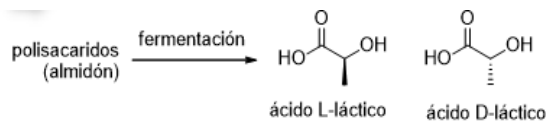
El ácido poliláctico (PLA) es el primer polímero de base biológica producido a escala comercial que posee unas propiedades comparables al tereftalato de polietileno (PET), y por ello resulta de interés para el envase alimentario. El PLA es de carácter hidrófobo por la presencia de los grupos laterales  $-CH_3$  y su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) depende en gran medida de la masa molar y de la relación de enantiómeros D y L, variando sus propiedades de semicristalinas a amorfas.<sup>24</sup>



**Figura 3.** Estructura química del PLA.

Es un polímero reciclable y compostable con una alta transparencia y resistencia a solubilizarse en agua. Se caracteriza por ser termoplástico, permitiendo el procesado de moldeo por inyección o soplado, la extrusión para generar láminas, etc. Al ser permeable al O<sub>2</sub> suele mezclarse con otros poliésteres de naturaleza petroquímica para mejorar sus propiedades mecánicas.<sup>25</sup>

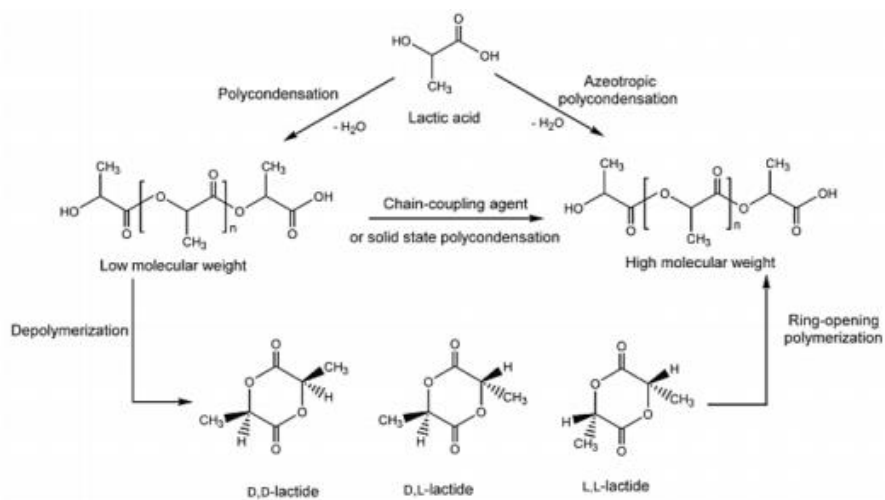
Este poliéster alifático lineal procede de la fermentación de sustancias ricas en almidón como el maíz o el trigo, que permiten obtener los estereoisómeros D y L del ácido láctico (LA), como se muestra en la Figura 4.<sup>23</sup>



**Figura 4.** Producción de los dos estereoisómeros del ácido láctico.

Tal y como se refleja en la Figura 5, el PLA se puede sintetizar por polimerización por condensación del monómero ácido láctico o por polimerización de apertura de anillo de la lactida, un dímero cíclico del ácido láctico. Se prefiere esta última metodología ya que proporciona polímeros de mayor peso molecular.<sup>25</sup>

La calidad del ácido láctico y la lactida, y las modificaciones introducidas son parámetros importantes ya que determinan las propiedades finales del producto y el grado de reciclaje. La naturaleza quiral del ácido láctico proporciona tres formas distintas de lactida: L,L-lactida; D,D-lactida y su mezcla racémica D,L-lactida. La lactida se obtiene mediante un proceso de despolimerización, en el que los oligómeros del PLA se degradan térmicamente.<sup>26</sup>



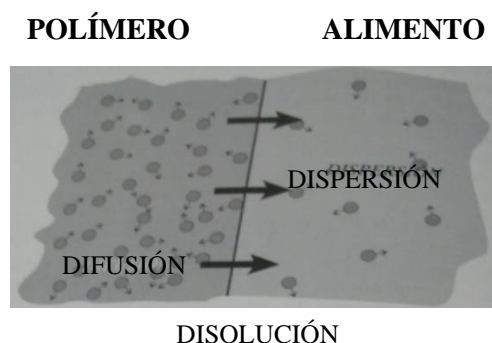
**Figura 5.** Métodos de síntesis de PLA.

Además de verse afectado por fenómenos externos, el PLA es susceptible a la racemización y a hidrolizarse cuando está en contacto con alimentos acuosos. Esto conlleva la formación de oligómeros cíclicos y lineales en baja concentración, pero con capacidad de migrar al alimento. De ahí la importancia de estudiar estos compuestos en detalle y desarrollar metodologías de alta resolución que permitan detectarlos, garantizando así la seguridad del alimento.<sup>27</sup>

### 1.3. Migración

El término migración hace referencia al fenómeno de transferencia de compuestos químicos desde el material de envasado al alimento. Este proceso de transferencia de masa se rige por las leyes de difusión de Fick y se ve influido por las propiedades físicas y químicas de tres componentes (migrante, envase y alimento).<sup>28</sup> Otros factores importantes son la temperatura, el tiempo de contacto y el tipo de interacción.

Las tres principales etapas del proceso de migración son: (1) difusión del migrante en la matriz polimérica; (2) su posterior disolución en la interfase polímero-alimento y (3) dispersión del migrante dentro del alimento.<sup>29</sup>



**Figura 6.** Esquema del proceso de migración en un sistema polímero/alimento.

Estas sustancias migrantes pueden afectar a la calidad de los alimentos y producir posibles efectos adversos en la salud humana, de ahí la necesidad de su identificación y cuantificación.<sup>25</sup> Para ello, el Reglamento EU/10/2011 proporciona una lista de sustancias autorizadas (lista positiva) para la producción de materiales plásticos en contacto con alimentos.<sup>30,31</sup>

La forma de verificar su conformidad con las regulaciones de la Unión Europea (EU) es llevar a cabo ensayos de migración de carácter global o específico. La migración global estudia la cantidad total de compuestos detectados en el alimento que proceden del material de envasado. Por el contrario, la migración específica determina sustancias migrantes concretas.<sup>32</sup> Con el fin de simplificar los análisis, estas pruebas se realizan en primer lugar con simulantes alimentarios, medios de ensayo que imitan las propiedades de los alimentos. Estos se clasifican según la naturaleza del alimento al que representan en hidrófilos (A y B) y lipófilos (C, D1 y D2).<sup>33</sup>

Las sustancias que generalmente migran son aquellas que se añaden al envase de forma intencionada (IAS) o no intencionada (NIAS). En el primer grupo se incluyen aditivos (antioxidantes, plastificantes, agentes estabilizantes, lubricantes, etc.) que modifican las propiedades del envase, aumentando su vida útil y mejorando su estabilidad y procesado.<sup>34</sup>

Los denominados NIAS provienen principalmente de procesos de reacción y degradación de polímeros o aditivos, impurezas de las materias primas utilizadas, productos secundarios generados en el proceso de fabricación o por la interacción alimento-envase, y contaminantes procedentes del proceso de reciclaje.<sup>35</sup>



### 1.3.1. Oligómeros

En estos subproductos generados de manera no intencionada cabe destacar la presencia de oligómeros, moléculas integradas por pocas unidades de monómero. Estos compuestos obtenidos por las diversas vías anteriores migran a los alimentos en una amplia extensión.<sup>30</sup>

La presencia de oligómeros y su grado de migración a simulantes alimentarios se ha estudiado previamente en diferentes tipos de polímeros como los poliuretanos, poliamidas o PET. En PLA, diferentes autores han determinado los factores que podrían afectar a su cinética de degradación, y su clasificación en lineales y cíclicos.

En la actualidad, los oligómeros cíclicos (<1000 Da) suscitan preocupación por su mayor capacidad de absorción en el tracto gastrointestinal.<sup>36</sup> Al no disponer de suficientes estándares comerciales para las pruebas toxicológicas no aparecen en la lista positiva establecida por la EU/10/2011 y deben tener un límite de migración inferior a 0,01 µg/g de alimento.

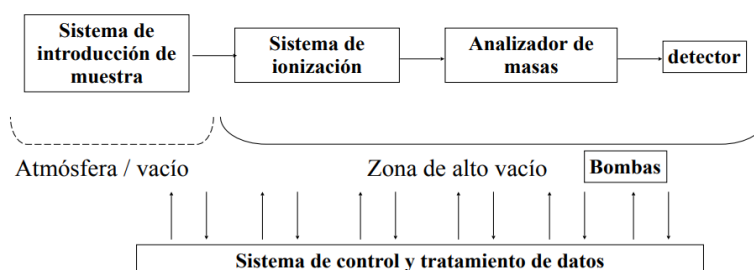
### 1.4. UPLC-QTOF-MS

La cromatografía de líquidos (LC) es una técnica de separación de compuestos que están presentes en disolución. En los últimos años ha cobrado importancia el Cromatógrafo de Líquidos de Ultra-alta Resolución (UPLC) que trabaja con tamaños de partícula más pequeños en la columna cromatográfica. De esta manera se reduce el diámetro de la columna y el caudal necesario (<750 µL/min), consiguiendo así una mayor eficiencia y rapidez. Se utiliza principalmente para compuestos de alto peso molecular y baja polaridad (aceites, grasas, polímeros plásticos, etc.) o para aquellos que son de menor tamaño, pero polares (polisacáridos, ácidos grasos...).

La espectrometría de masas es una técnica analítica de detección que mide la relación masa (m) /carga (z) de los iones. A través de la fragmentación permite obtener una señal selectiva y sensible de la molécula, así como, aportar información estructural.

Presenta los siguientes componentes principales:

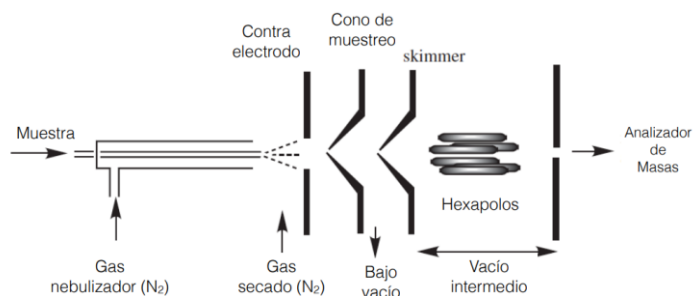
- Un sistema de introducción de muestra.
- Un sistema de ionización, que transfiere energía a una especie neutra para generar el ion en fase gas (ion radical). Gracias a la ionización se consigue manipular la dirección y velocidad de las moléculas mediante campos electromagnéticos.
- Un analizador de masas que separa las moléculas o fragmentos ionizados en función de su m/z.
- Un detector que detecta los fragmentos separados anteriormente.



**Figura 7.** Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas.

Además, son necesarias bombas para conseguir alto vacío, y realizar un tratamiento de los resultados.

Los modos de ionización más utilizados en fase líquida son el Electrospray (ESI) y la Ionización química a presión atmosférica (APCI), consiguiéndose iones cargados positiva y negativamente. Se prefiere el ESI por su versatilidad y por no generar un alto número de fragmentos al ser menos energética. Sin embargo, en el caso de moléculas apolares y estables térmicamente es necesario recurrir al APCI.



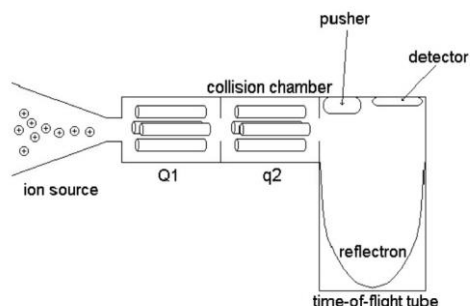
**Figura 8.** Esquema ESI.

Los analizadores de masas más frecuentes son el cuadrupolo (Q) y el analizador de tiempo de vuelo (TOF). El cuadrupolo está formado por cuatro barras metálicas dispuestas de forma paralela. Al aplicarles una relación de voltajes continuo y de radiofrecuencia se consigue que solo aquellos iones con una determinada  $m/z$  atraviesen el cuadrupolo y lleguen al detector. El resto al tener una trayectoria inestable son descargados.

Al utilizar un único cuadrupolo se puede trabajar en modo de adquisición SCAN (barrido) o SIM (selected ion monitoring). El primero recoge todos los fragmentos producidos en la ionización y el modo SIM, al restringir la información espectral, mejora la sensibilidad con respecto al anterior.

Un triple cuadrupolo (QqQ) trabaja en modo MRM (multiple reaction monitoring). El primer cuadrupolo selecciona el ion de una determinada  $m/z$ ; el segundo actúa como celda de colisión, donde un gas inerte choca con el ion aislado fragmentándolo; el tercero solo deja pasar algunos de los fragmentos producidos. Desde el punto de vista del análisis cuantitativo se consigue una alta selectividad y sensibilidad porque solo llegan al detector los iones que cumplen estos requisitos.

El Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo (QTOF) se diferencia del QqQ en el tercer cuadrupolo. En este caso es sustituido por un tubo de tiempo de vuelo (TOF) que separa los iones, no por las relaciones de voltaje, sino según la velocidad a la que recorren el tubo. Los iones se dirigen en el tubo en los dos sentidos, es decir, recorren el doble de la altura del tubo. Al aumentar la distancia recorrida se alcanza una mayor separación entre iones y en consecuencia una mayor resolución. Además, el QTOF permite llevar cabo un análisis retrospectivo que resulta de gran importancia en seguridad alimentaria y medioambiental.



**Figura 9.** Esquema de un analizador QTOF.

## **2. Objetivos y planteamiento**

Dado el crecimiento en la utilización de biopolímeros biodegradables como material de envasado, es de gran importancia garantizar su seguridad cuando estos van destinados al contacto con alimentos. El objetivo principal de este trabajo es evaluar la seguridad de un biopolímero basado en PLA (ácido poliláctico) para su uso como material de envase de zumos. Debido a la naturaleza del PLA y estudios previos del material, el trabajo se centró en el estudio de la migración de oligómeros.

Para cumplir el objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la migración del biopolímero basado en PLA en simulantes alimentarios.
- Desarrollar un método de extracción basado en la FPSE (Fabric Phase Sorptive Extraction) para el análisis de zumos.
- Determinar la migración del biopolímero basado en PLA en zumos.
- Evaluar el riesgo de la migración del biopolímero a simulantes y zumo.
- Comparar los resultados obtenidos en el simulante y en el zumo.

### 3. Materiales y metodología

#### 3.1. Muestras

##### 3.1.1. Biopolímero basado en PLA

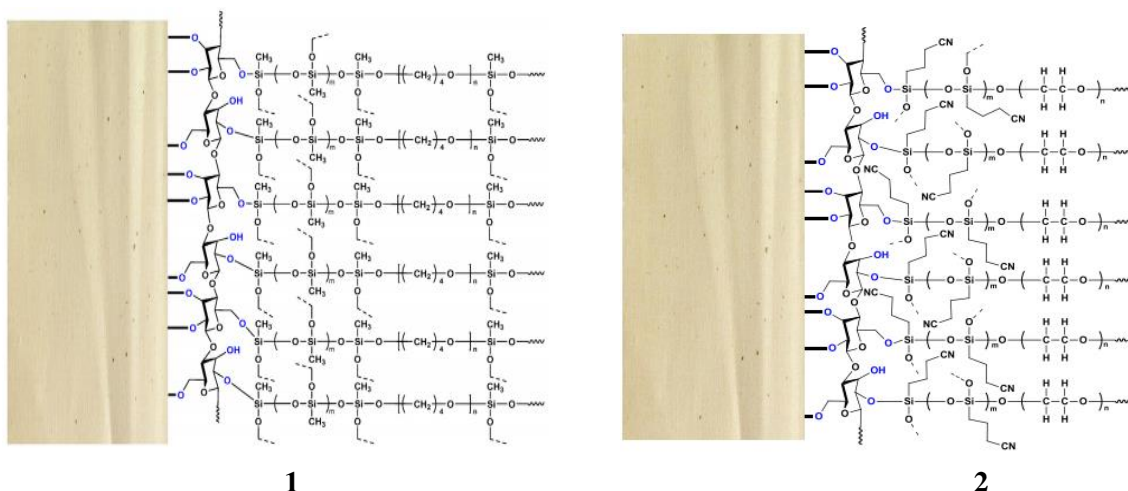
Biopolímero formado por una mezcla de PLA (18%) y un poliéster de base fósil. De acuerdo a estudios previos realizados en el laboratorio este polímero se identificó como poli (adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT). Este polímero fue suministrado por una empresa fabricante de envases y certificado como material biodegradable.

##### 3.1.2. Zumo

Zumo de piña adquirido en un supermercado que presenta los siguientes ingredientes: concentrado de zumo (50%), agua, 11.2 g de azúcar, acidulante (ácido cítrico), estabilizante (pectina), antioxidante (ácido ascórbico), 0.2 g de proteínas y 12 mg de Vitamina C.

#### 3.2. Medios FPSE

Los reactivos utilizados en la preparación de los medios FPSE fueron telas de celulosa y distintos sorbentes sol-gel. El sorbente de polaridad media PTHF se compone principalmente del polímero orgánico activo poli (tetrahidrofurano) (PTHF). El sorbente de polaridad alta Carbowax20 estaba integrado principalmente por poli(etilenglicol) (Carbowax 20M). Estos medios FPSE permiten extraer de forma eficiente los analitos objetivo al cubrir todo un rango de polaridades.



**Figura 10.** Representación esquemática de los medios FPSE recubiertos con sol-gel PTHF (1) y Carbowax20 (2).

#### 3.3. Reactivos y disoluciones

##### 3.3.1. Reactivos

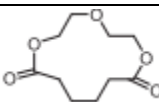
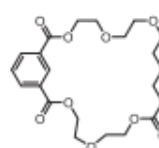
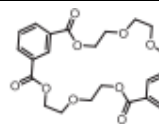
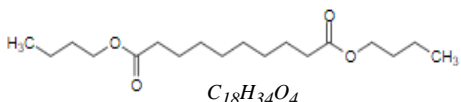
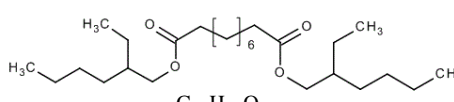
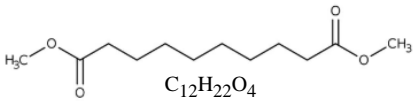
Los reactivos comerciales que se utilizaron en el procedimiento experimental fueron:

- Ácido acético (calidad HPLC) procedente de Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España).
- Agua ultra pura obtenida a partir de un sistema Milli-Q Ultramatic Wasserlab GR 216071 (Madrid, España).
- Acetonitrilo (calidad HPLC) comprado en Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Metanol como disolvente de extracción adquirido en Baker (Deventer, Holanda).

### 3.3.2. Compuestos modelo

Al no disponer de patrones comerciales de los oligómeros del PLA se emplearon 6 compuestos con unas propiedades químicas semejantes. Estos compuestos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Química (Madrid, España) y se exponen a continuación.

**Tabla 1.** Compuestos modelo.

Compuesto	Estructura y fórmula	Peso molecular (g/mol)	Nº CAS
AA-DEG	 $C_{10}H_{16}O_5$	216,23	6607-34-7
AA-DEG-IPA-DEG	 $C_{22}H_{28}O_{10}$	452,45	
DEG-IPA-DEG-IPA	 $C_{24}H_{24}O_{10}$	472,44	
Dibutil sebacato (DBS)	 $C_{18}H_{34}O_4$	314,46	109-43-3
Bis (2-etilhexil) sebacato (EHS)	 $C_{26}H_{50}O_4$	426,67	122-62-3
Dimetil sebacato (DMS)	 $C_{12}H_{22}O_4$	230,30	106-79-6

AA: ácido adípico; DEG: dietilenglicol; IPA: ácido isoftálico.

### 3.3.3. Disoluciones

Además, fue necesaria la preparación de las disoluciones descritas a continuación:

- Ácido acético al 3% (v/v) que actuó como simulante alimentario B en el ensayo de migración y se preparó a partir de los reactivos ácido acético/agua ultrapura mencionados anteriormente.
- Acetonitrilo/agua ultrapura (50:50, v/v) utilizada para la limpieza del medio de extracción FPSE.
- Metanol/agua ultrapura (50:50, v/v) para rediluir la muestra antes de proceder a la inyección en el sistema UPLC-QTOF-MS.

### 3.4. Instrumentación

- Baño de ultrasonidos Branson 3510-DTH
- Agitador magnético IKA RT-10
- Agitador digital VortexMixer OHAUS®

### 3.5. Análisis por UPLC-QTOF-MS

#### 3.5.1. UPLC

Se empleó un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra-alta Resolución (UPLC) de la marca comercial *Acquity* perteneciente a Waters (Milford, MA, USA) y una columna apolar UPLC BEH C18 de tamaño de partícula 1,7µm y dimensiones (2.1x50 mm).

Las condiciones cromatográficas fueron:

**Tabla 2.** Condiciones de la columna.

Caudal (mL/min)	0,3
Temperatura de la columna (°C)	40
Volumen de inyección (µl)	10

**Tabla 3.** Fases móviles utilizadas.

Fase A	Agua con 0,1 % de ácido fórmico
Fase B	Metanol con 0,1 % de ácido fórmico

**Tabla 4.** Gradiente UPLC.

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

#### 3.5.2. QTOF-MS

El equipo de UPLC fue conectado mediante un sistema de ionización de Electrospray (ESI) al detector, un espectrómetro de masas con un analizador de tiempo de vuelo (TOF), de modelo *Xevo G2 QTOF* procedente de Waters.

La configuración del instrumento fue:

**Tabla 5.** Parámetros instrumentales QTOF-MS.

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

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

### 3.6. *Desarrollo experimental*

#### 3.6.1. *Protocolo de extracción por FPSE*

Las etapas que se llevaron a cabo son las descritas en el artículo<sup>5</sup>, con ligeras modificaciones por el tipo de muestra que se analizaba:

##### 1. *Limpieza inicial*

El medio FPSE es colocado en un vial de 20 mL, se le añaden 5 mL de disolución acetonitrilo/metanol (50:50, v/v) y una vez tapado se coloca en un baño de ultrasonidos 1 hora. A continuación, este medio se retira con ayuda de unas pinzas, se lava con H<sub>2</sub>O MilliQ y se deja secar al aire.

##### 2. *Extracción*

En un vial de 20 mL se añaden 18 mL de muestra, un núcleo magnético y un medio FPSE de cada tipo (PTHF y CW20) de forma simultánea y se dejan en agitación durante 20 minutos a 700 rpm para conseguir una buena interacción entre los componentes y el medio FPSE.

##### 3. *Desorción*

Con ayuda de unas pinzas estos medios FPSE son extraídos del vial e introducidos en un tubo Eppendorf, al que se le añade 1 mL de metanol. El metanol es el disolvente de extracción más adecuado para estos analitos, un disolvente polar protico con el que se alcanzó un mayor porcentaje de recuperación en estudios anteriores.<sup>7</sup>

La extracción tiene lugar durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos, y tras este tiempo se retiran los medios FPSE del metanol. El metanol se lleva a sequedad bajo una corriente de N<sub>2</sub> y finalmente se rediluye con 500 µL de metanol/agua ultrapura (50:50, v/v), para poder conseguir unos picos con unas áreas mejor definidas. Cada uno de los tubos Eppendorf que contienen metanol/agua ultrapura (50:50, v/v) se agita en un vórtex para garantizar la homogeneidad de la disolución y se trasvasa a un microvial para poder ser inyectado en el sistema UPLC-QTOF-MS.

Las etapas 2 y 3 se realizan con los viales de simulante, zumo y sus respectivos blancos por triplicado.

##### 4. *Limpieza final*

Una vez que las telas han sido retiradas en la etapa 3, se introduce cada una en un vial de 20 mL con 5 mL de disolución acetonitrilo/metanol (50:50, v/v) durante una 1 hora, al igual que sucedía en la limpieza inicial. En el caso de que se hayan utilizado en muestras de zumo conviene realizar esta etapa en dos pasos de 30 minutos, ya que así se renueva la disolución y la limpieza es más efectiva. Finalmente, los medios FPSE son retirados y almacenados en sus correspondientes placas de Petri etiquetadas hasta el siguiente experimento.

#### 3.6.2. *Ensayos de migración*

Se realizó un ensayo de migración específica con el objetivo de determinar si los compuestos presentes en el PLA eran detectados en simulantes alimentarios y en una muestra de zumo. Al ser un material plástico se aplicaron las condiciones marcadas por el reglamento EU/10/2011. Este reglamento indica que, para bebidas claras, como el zumo de frutas, y con un pH inferior a 4.5 los simulantes más adecuados son B (ácido acético 3%) y C (etanol 20%).<sup>33</sup>

En este estudio se seleccionó el ácido acético al 3%, por considerar que la acidez del mismo afectaría en mayor medida a la posible formación de oligómeros debido a la hidrólisis del material y su migración.

El plástico es puesto en contacto con el simulante o la muestra representando las peores condiciones de uso del material sin que éste sufra ningún tipo de cambio. Por ello, aunque la legislación establece como tiempo y temperatura de contacto 10 días a 60 °C, al estar la temperatura de transición vítrea típica del PLA comercial próxima a 60°C, el ensayo se realizó a 40°C para evitar su degradación.

Para realizar los ensayos de migración, en un vial de 20 mL se adicionaron 18 mL de zumo o de simulante y se introdujo una lámina de PLA de tamaño (2 x 5) cm<sup>2</sup>, de tal forma que se cumplía con la relación establecida de 6 dm<sup>2</sup>/1 kg muestra. A continuación, los viales se cerraron herméticamente y se introdujeron en un horno a 40°C durante 10 días. Esta operación se realizó por triplicado y también se prepararon 3 blancos de migración, en los que el zumo o simulante eran sometidos al mismo proceso, pero sin la introducción del biopolímero.

Transcurridos los 10 días se retiró el PLA y se procedió al análisis de las muestras de migración.

#### **4. Resultados y discusión**

Los principales compuestos no volátiles del PLA y su grado de migración en simulantes alimentarios fueron determinados en un estudio previo<sup>25</sup> cuya tabla se recoge en el Anexo I. Dado que las sustancias migrantes se encuentran principalmente a nivel de trazas, los experimentos llevados a cabo pretendían evaluar si la técnica de preparación de muestra FPSE era adecuada para extraer estos compuestos de muestras complejas. Además, se quiso comparar si aquellos que eran potencialmente migrantes en simulantes alimentarios también lo eran en el alimento que representan.

##### ***4.1. Optimización de la FPSE***

###### ***4.1.1. Optimización del tiempo de extracción***

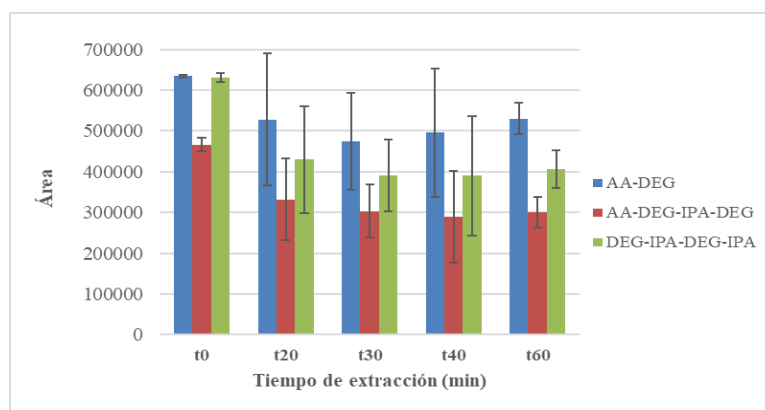
Con el propósito de determinar si se podía aumentar la sensibilidad del método aumentando el volumen de muestra en la etapa de extracción, se incrementó el volumen de 10 mL a 18 mL. Este cambio supuso la optimización del tiempo de extracción. Partiendo de 20 minutos, valor óptimo para 10 mL<sup>5</sup>, se evaluó la retención en los medios FPSE a cuatro tiempos distintos (20, 30, 40 y 60 minutos).

Por su analogía a los posibles migrantes del PLA, se preparó una disolución de 100 ng/g en metanol con 3 oligómeros procedentes del poliuretano (PU) como el AA-DEG, AA-DEG-IPA-DEG y DEG-IPA-DEG-IPA. Las disoluciones iniciales estaban preparadas en metanol y sus concentraciones eran de 19,8, 31,7 y 206,1 mg/Kg, respectivamente.

En un vial de 20 mL se adicionaron 18 mL de disolución mezcla de oligómeros y las telas de CW20 y PTHF. Se tomó una alícuota de 500 µL a  $t_0$  y se trasvasó a un vial. A continuación, la disolución se sometió a una agitación de 700 rpm, recogiendo 500 µL a los cuatro tiempos estudiados. Este procedimiento se realizó por triplicado obteniéndose tres réplicas para cada tiempo. Finalmente, los viales fueron inyectados en un sistema UPLC-QTOF-MS.

Con las áreas promedio de los tres compuestos obtenidas para cada tiempo, tal y como se muestra en la Figura 11, se pudo observar cómo su intensidad disminuía transcurridos los 20 primeros minutos y luego permanecía prácticamente constante hasta los 60. Esto es un claro indicador de que a los 20 minutos se produjo la retención y estabilización de los compuestos en los medios FPSE y por ello no fue necesario aumentar el tiempo de extracción.





**Figura 11.** Área de los oligómeros del PU a  $t_0$ ,  $t_{20}$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{40}$  y  $t_{60}$ .

## 4.2. Eficacia de la FPSE

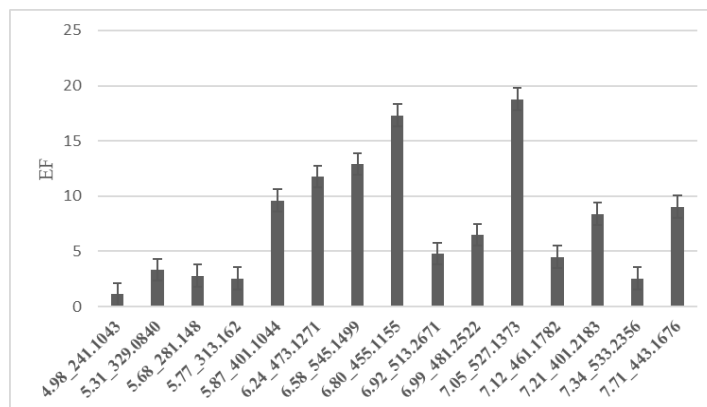
Las muestras de migración en simulante B (ácido acético al 3%), obtenidas siguiendo el apartado 3.6.2, se utilizaron para evaluar la aplicabilidad de la técnica FPSE como método de extracción y concentración previa de sustancias migrantes. Para ello se compararon las áreas de los oligómeros y otros NIAS procedentes del PLA con y sin la utilización de esta técnica de preconcentración, distinguiéndose dos grupos.

### 4.2.1. Enriquecimiento de los oligómeros detectados en el simulante

Al utilizar la técnica de extracción FPSE, los compuestos que ya se detectaban en el Anexo I incrementaron sus áreas considerablemente consiguiéndose un factor de enriquecimiento (Área con FPSE/Área sin FPSE) en algunos casos próximo a 20, como se muestra en la Tabla 6 y se refleja en la Figura 12. Estos valores se alcanzaron principalmente en compuestos cíclicos del tipo  $[LA]_n$  como el  $[LA]_6$  (6.80\_455.1155) y el  $[LA]_7$  (7.05\_527.1373).

**Tabla 6.** Área de los compuestos no volátiles del PLA-poliéster detectados en el simulante B con y sin la utilización de FPSE, junto con el factor de enriquecimiento (EF).

Compuesto	Áreas sin FPSE	Áreas con FPSE	EF
4.98_241.1043	1011 ± 2,7	1125 ± 3,6	1,11 ± 0,050
5.31_329.0840	38 ± 5,8	125 ± 3,2	3,3 ± 0,22
5.68_281.148	585 ± 5,8	1632 ± 9,3	2,8 ± 0,31
5.77_313.162	1200 ± 5,3	3059 ± 9,0	2,5 ± 0,27
5.87_401.1044	54 ± 4,0	514,1 ± 0,40	9,6 ± 0,39
6.24_473.1271	69 ± 3,6	808 ± 14	12 ± 1,7
6.58_545.1499	81 ± 5,0	1045 ± 8,4	13 ± 1,3
6.80_455.1155	70 ± 5,5	1217 ± 12	<b>17 ± 2,2</b>
6.92_513.2671	501 ± 7,1	2401 ± 4,6	4,8 ± 0,41
6.99_481.2522	351 ± 8,1	2283 ± 6,3	6,5 ± 0,67
7.05_527.1373	107 ± 6,8	2006 ± 14	<b>19 ± 3,0</b>
7.12_461.1782	353 ± 7,9	1582 ± 4,3	4,5 ± 0,40
7.21_401.2183	2245 ± 9,0	18856 ± 9,5	8,0 ± 1,1
7.34_533.2356	195 ± 12	496 ± 6,5	2,5 ± 0,35
7.71_443.1676	754,1 ± 0,30	6811 ± 8,4	9,0 ± 0,76



**Figura 12.** Factor de enriquecimiento de los componentes no volátiles del PLA-poliéster.

#### 4.2.2. Detección de nuevos oligómeros

La Tabla 7 expone seis compuestos que no eran detectados al inyectarse directamente en el QTOF (señal/ruido <3) y que fue posible detectarlos gracias a la utilización de la extracción FPSE.

**Tabla 7.** Áreas promedio de migración en simulante B con FPSE.

Compuesto	Áreas con FPSE
6.82_617.1703	498 ± 9,0
7.30_599.1591	1096 ± 20
7.44_671.1793	429 ± 23
7.62_681.3568	653 ± 3,8
7.84_601.3229	3813 ± 21
8.20_643.2741	1403 ± 16

En el Cromatograma 1 del Anexo II se muestra la comparación de los picos obtenidos (se observó un ligero desplazamiento en los tiempos de retención respecto a los indicados en las tablas).

Con los resultados obtenidos, se comprobó la eficacia de la técnica FPSE para la concentración de migrantes procedentes del PLA en simulantes alimentarios.

#### 4.3. Factor de enriquecimiento y % Recuperación

El siguiente paso consistió en ver si la metodología propuesta para la extracción y análisis era compatible con matrices de muestras reales como el zumo. Se llevaron a cabo estudios de recuperación y cálculo del factor de enriquecimiento empleando como estándares los oligómeros indicados en la Tabla 8.

Se preparó una disolución mezcla en agua MilliQ de aproximadamente 400 mg/Kg a partir de los cuatro primeros compuestos indicados en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Concentraciones exactas de los compuestos empleados.

		Concentraciones ( $\mu\text{g/g}$ )
Disolución mezcla	DBS (1009,3 $\mu\text{g/g}$ )	400,38
	EHS (7513,6 $\mu\text{g/g}$ )	385,59
	DMS (1901,7 $\mu\text{g/g}$ )	395,34
	AA-DEG (1764,2 $\mu\text{g/g}$ )	386,88
AA-DEG-IPA-DEG		100,00
DEG-IPA-DEG-IPA		206,09

En un vial de 20 mL se adicionaron 18 mL de zumo, 100  $\mu\text{l}$  de la disolución mezcla, 360  $\mu\text{l}$  de AA-DEG-IPA-DEG y 175  $\mu\text{l}$  de DEG-IPA-DEG-IPA, de tal forma que la concentración final en el zumo fuera de aproximadamente 2 mg/Kg de cada compuesto. Las mismas cantidades de dopante fueron añadidas a un vial de 18 mL de simulante B. En ambos casos este procedimiento se realizó por triplicado. Una vez añadido el dopante se siguió el protocolo de la técnica FPSE descrito en el apartado 3.6.1, y finalmente se inyectaron en el equipo UPLC-QTOF-MS.

#### 4.3.1. Factor de enriquecimiento y % recuperación en simulante B

Para calcular los valores de factor de enriquecimiento (EF) y porcentaje de recuperación (% Rec) se construyeron rectas de calibrado en metanol/agua (50:50, v/v) con los analitos estudiados, cuya concentración inicial era conocida. Los valores de las áreas obtenidas después de aplicar la FPSE al simulante B se interpolaron en estas rectas obteniendo así la concentración final en el extracto. El valor de EF se calculó aplicando la fórmula:

$$EF = C_{FPSE}/C_0$$

Siendo  $C_{FPSE}$  la concentración después de aplicar la FPSE y  $C_0$  la concentración inicial.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación se utilizó la siguiente expresión:

$$\% \text{ Rec} = 100 \times (C_{FPSE} \times m_f) / (C_0 \times m_0)$$

Siendo  $m_f$  la masa final del extracto FPSE y  $m_0$  la masa inicial de la disolución de extracción.

**Tabla 9.** Cálculo de EF y % Rec de los estándares en el simulante.

Compuesto	Ecuación de la recta	Rango lineal ( $\mu\text{g/g}$ )	$C_0$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$C_{FPSE}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	EF	% Rec
AA-DEG	$y = 1274,5x + 1464,1$ $R^2 = 0,9957$	0,05 - 9,9	2,04	0,7	$0,4 \pm 0,13$	$1,0 \pm 1,0$
AA-DEG-IPA-DEG	$y = 4199,7x + 6603,7$ $R^2 = 0,9881$	0,05 - 8,5	1,90	5,1	$2,7 \pm 0,15$	$7,5 \pm 1,1$
DEG-IPA-DEG-IPA	$y = 3051,7x + 1341$ $R^2 = 0,9985$	0,01 - 8,3	2,04	1,4	$0,67 \pm 0,050$	$1,9 \pm 0,38$
DMS	$y = 180,3x + 407,57$ $R^2 = 0,9932$	1,3 - 10,1	2,08	33	<b><math>16,0 \pm 0,84</math></b>	<b><math>45 \pm 6,4</math></b>
DBS	$y = 500,37x + 913,5$ $R^2 = 0,9926$	4,4 - 10,3	2,11	28	<b><math>13,1 \pm 0,70</math></b>	<b><math>36 \pm 5,4</math></b>
EHS	$y = 712,47x - 133,66$ $R^2 = 0,9933$	2,2 - 15,0	2,03	0,2	$0,09 \pm 0,25$	$0,3 \pm 1,9$

Los mejores resultados se obtuvieron para los ésteres lineales dimetil sebacato (DMS) y dibutil sebacato (DBS), mientras que para los oligómeros cíclicos los valores de EF y de recuperación fueron más bajos. Únicamente el AA-DEG-IPA-DEG mostró valores mayores.

#### 4.3.2. Factor de enriquecimiento y % recuperación en zumo

Para calcular los valores de concentración en el extracto FPSE se construyeron rectas de calibrado de los analitos estudiados en extractos de zumo que no habían sido previamente dopados. De esta forma, se corregía el posible efecto matriz debido a la presencia en el extracto de otros compuestos que pudieran modificar la sensibilidad en la detección de los compuestos de interés.

**Tabla 10.** Cálculo de EF y % Rec de los estándares en el zumo.

Compuesto	Ecuación de la recta	Rango lineal (µg/g)	C <sub>0</sub> (µg/g)	C <sub>FPSE</sub> (µg/g)	EF	% Rec
AA-DEG	$y = 647,63x + 822,07$ $R^2 = 0,9995$	0,007 - 17,1	2,17	1,8	$0,83 \pm 0,082$	$2,3 \pm 0,64$
AA-DEG-IPA-DEG	$y = 3485x + 5645$ $R^2 = 0,9956$	0,01 - 8,7	1,88	7,4	$3,9 \pm 0,13$	$11 \pm 1,0$
DEG-IPA-DEG-IPA	$y = 2331,2x + 3522$ $R^2 = 0,9973$	0,009 - 9,2	1,95	0,3	$0,2 \pm 0,12$	$0,4 \pm 0,95$
DMS	$y = 88,827x + 278,34$ $R^2 = 0,9884$	1,9 - 17,5	2,21	50	<b><math>22 \pm 1,6</math></b>	<b><math>62 \pm 12</math></b>
DBS	$y = 270,38x + 865,15$ $R^2 = 0,9942$	4,2 - 17,7	2,24	18,2	<b><math>8,1 \pm 0,39</math></b>	<b><math>23 \pm 3,0</math></b>
EHS	$y = 617,25x + 721,84$ $R^2 = 0,9978$	0,017- 17,0	2,16	<LOD		

LOD: límite de detección.

Del mismo modo que en el simulante, los ésteres lineales DMS y DBS fueron los que presentaron un factor de enriquecimiento y porcentaje de recuperación más alto. Por el contrario, los oligómeros cíclicos mostraron valores inferiores a excepción del AA-DEG-IPA-DEG.

#### 4.4. Identificación de las sustancias migrantes

Una vez que el método FPSE-QTOF-MS fue validado en muestras reales se procedió a la identificación de las sustancias migrantes procedentes del biopolímero PLA-poliéster en el simulante alimentario y en el zumo.

De acuerdo a un estudio previo (Anexo I),<sup>25</sup> los oligómeros que provienen del PLA están integrados por el monómero ácido láctico (LA) y se clasifican en dos grupos en función de su estructura química. El primer grupo incluye oligómeros cíclicos del tipo [LA]<sub>n</sub>; y el segundo está formado por oligómeros lineales, que según sus grupos funcionales pueden ser de dos tipos: OH- [LA]<sub>n</sub> - H y CH<sub>3</sub> - CH<sub>2</sub> - O- [LA]<sub>n</sub> - H.

Además, se detectó la presencia de oligómeros procedentes de la parte poliéster de la mezcla, compuestos formados principalmente por ácido adípico (AA), ácido ftálico (PA) y butanodiol (BD). También fueron identificados aditivos como estabilizantes y plastificantes.

De los compuestos identificados en el estudio anterior, la Tabla 11 expone aquellos que han sido detectados en los ensayos realizados junto con su tiempo de retención. En general, las sustancias migrantes identificadas en simulante B (ácido acético al 3%) y extracto de zumo fueron las mismas, a excepción de compuestos como el HO-[LA]<sub>8</sub>-H (lineal) y [LA]<sub>7</sub> (cíclico) que no se detectaron en el zumo.

**Tabla 11.** Compuestos detectados en la migración del PLA-poliéster utilizando FPSE.

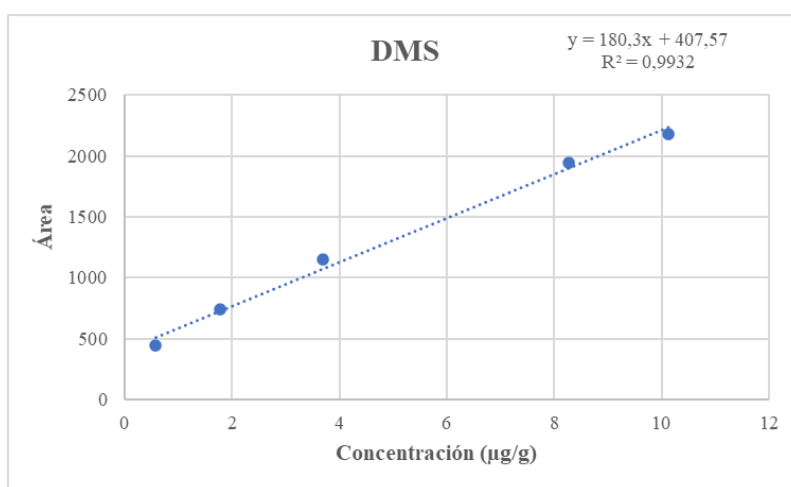
<b>t<sub>r</sub> masa exacta</b>	<b>Aducto</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Candidatos</b>	<b>Detectado en simulante B</b>	<b>Detectado en extracto de zumo</b>
4.98_241.1043	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	dietileno, glicol, dipropionato CAS 6942-59-2	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
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 (lineal)	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 (lineal)	NO	NO
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	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
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	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
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 (lineal)	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
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 (lineal)	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
6.40_383.0955	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[LA] <sub>5</sub> (cíclico)	NO	NO
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 (lineal)	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
6.80_455.1155	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	[LA] <sub>6</sub> (cíclico)	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
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 (lineal)	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
6.92_513.2671	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	Bis[1(2butoxi)etoxi]oxo2propanil]	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
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	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
7.05_527.1373	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	[LA] <sub>7</sub> (cíclico)	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
7.12_461.1782	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	No candidatos	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
7.21_401.2183	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	[AA-BD] <sub>2</sub> (cíclico) CAS 78837-87-3	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
7.30_599.1591	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	[LA] <sub>8</sub> (cíclico)	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
7.34_533.2356	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	No candidatos	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
7.44_671.1793	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	[LA] <sub>9</sub> (cíclico)	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
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	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
7.71_443.1676	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	[PA-BD-AA-BD] (cíclico)	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
7.84_601.3229	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>12</sub>	[AA-BD] <sub>3</sub> (cíclico) CAS 1135871-65-6	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
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] (cíclico)	<b>SÍ</b>	<b>SÍ</b>
8.45_843.3785	[MNa] <sup>+</sup>	No formula	No candidatos	<b>NO</b>	<b>SÍ</b>
8.58_663.2416	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> O <sub>12</sub>	No candidatos	<b>NO</b>	<b>SÍ</b>

#### 4.5. Cuantificación de las sustancias migrantes

Al no disponer de los estándares de estos migrantes, se llevó a cabo un análisis semi-cuantitativo utilizando la recta de calibrado de uno de los patrones estudiados previamente. Por su analogía en cuanto a peso molecular, y por mostrar un factor de enriquecimiento y % de recuperación mayor se seleccionaron los ésteres lineales. Entre ellos se escogió el dimetilsebacato (DMS) por permitir determinar concentraciones más bajas de acuerdo con los rangos lineales indicados en las Tablas 9 y 10.

##### 4.5.1. Concentración de los migrantes en el simulante alimentario

Para cuantificar la migración en el simulante acético al 3% se utilizó la recta de calibrado preparada con una disolución de metanol/agua (50/50, v/v) y que se muestra en la siguiente Figura.



**Figura 13.** Recta de calibrado de DMS en MeOH/H<sub>2</sub>O.

Debido a la utilización de métodos instrumentales en el análisis, fue preciso tener en cuenta dos parámetros analíticos importantes como son el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), que sirven de criterio de identificación y cuantificación de compuestos.

Para garantizar la presencia del analito en la muestra se utiliza el límite de detección, la mínima concentración que puede ser detectada con un cierto nivel de confianza, es decir, aquella que proporciona una señal significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. Por el contrario, para que un resultado sea cuantitativo debe encontrarse por encima del LOQ, la concentración más pequeña que es capaz de cuantificar el instrumento.

Estos valores se calcularon aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{LOD} = \frac{y_{bl} + 3 s_{bl}}{b} \quad \text{LOQ} = \frac{y_{bl} + 10 s_{bl}}{b}$$

Siendo  $y_{bl}$  la señal del blanco del compuesto,  $s_{bl}$  la desviación estándar del blanco del compuesto y  $b$  la pendiente de la recta (sensibilidad) expresada como el inverso de la concentración.

De esta manera se obtuvo que el límite de detección para el DMS en la disolución de metanol/agua era 0,5 µg/g y el límite de cuantificación 1,3 µg/g.

Interpolando las áreas de los compuestos detectados en el apartado 4.4 en la recta de calibrado se obtuvieron las concentraciones en el extracto de simulante. Para el cálculo de la concentración en el simulante se aplicó el factor de dilución ( $m_f/m_o$ ) a la concentración del extracto.

Siendo  $m_f$  la masa final del extracto FPSE y  $m_o$  la masa inicial de la disolución de extracción.

**Tabla 12.** Concentración de los migrantes en el extracto de simulante y en el simulante.

	<b>Extracto de acético al 3%</b>	<b>Acético al 3%</b>
Compuestos	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )
4.98_241.1043	$4,0 \pm 0,29$	$0,111 \pm 0,0081$
5.09_213.0723	< LOD	<0,01
5.31_329.0840	< LOD	<0,01
5.68_281.148	$6,8 \pm 0,30$	$0,189 \pm 0,0084$
5.77_313.162	$14,7 \pm 0,55$	$0,41 \pm 0,015$
5.87_401.1044	< LOQ	$0,016 \pm 0,0099$
6.24_473.1271	$2,2 \pm 0,32$	$0,062 \pm 0,0087$
6.40_383.0955	< LOD	<0,01
6.58_545.1499	$3,5 \pm 0,30$	$0,098 \pm 0,0082$
6.80_455.1155	$4,5 \pm 0,29$	$0,125 \pm 0,0081$
6.82_617.1703	< LOD	$0,014 \pm 0,0099$
6.92_513.2671	$11,1 \pm 0,41$	$0,31 \pm 0,011$
6.99_481.2522	$10,4 \pm 0,39$	$0,29 \pm 0,011$
7.05_527.1373	$8,9 \pm 0,35$	$0,246 \pm 0,0096$
7.12_461.1782	$6,5 \pm 0,30$	$0,181 \pm 0,0083$
7.21_401.2183	<b><math>102 \pm 4,7</math></b>	<b><math>2,8 \pm 0,13</math></b>
7.30_599.1591	$3,8 \pm 0,29$	$0,106 \pm 0,0082$
7.34_533.2356	< LOD	$0,014 \pm 0,0099$
7.44_671.1793	< LOD	<0,01
7.62_681.3568	$1,4 \pm 0,34$	$0,038 \pm 0,0093$
7.71_443.1676	$36 \pm 1,5$	$0,99 \pm 0,042$
7.84_601.3229	$18,9 \pm 0,73$	$0,52 \pm 0,020$
8.20_643.2741	$5,5 \pm 0,29$	$0,153 \pm 0,0081$
8.45_843.3785	< LOD	<0,01
8.58_663.2416	< LOD	<0,01

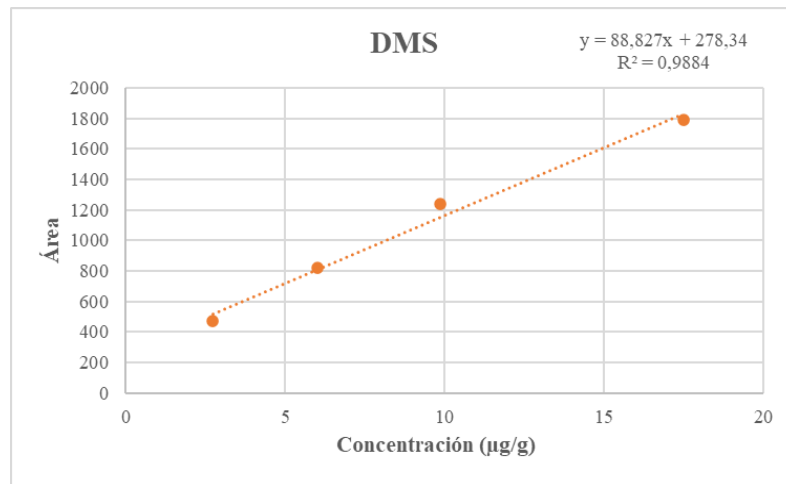
*0,01: valor límite establecido por el Reglamento EU/10/11.*

La Tabla 12 refleja como migrante mayoritario el oligómero cíclico [AA-BD]<sub>2</sub>, (7.21 401.2183), que tal y como se indica en el Anexo I, procede del poliéster de naturaleza no renovable con el que se ha combinado el PLA. Este compuesto se encontró en el simulante B en una concentración de 2,8  $\mu\text{g/g}$ , mientras el resto de migrantes cuantificados estaban por debajo del 35% de su concentración. También se cuantificaron oligómeros lineales del tipo HO-[LA]<sub>n</sub>-H, siendo n = 5 a 8.

#### 4.5.2. Concentración de los migrantes en el zumo

Se siguió el mismo procedimiento que en el simulante, pero en este caso se utilizó la recta de calibrado indicada en la Figura 14. Esta fue preparada con extracto de zumo permitiendo así llevar a cabo la cuantificación de los migrantes en el zumo.

Los límites de detección y cuantificación para el DMS en el extracto de zumo fueron 0,9 y 1,9  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente.



**Figura 14.** Recta de calibrado de DMS en extracto de zumo.

Las concentraciones en el extracto se obtuvieron interpolando en la recta de calibrado las áreas de los picos detectados anteriormente. Las concentraciones en el zumo se calcularon aplicando el mismo factor de dilución que antes.

**Tabla 13.** Concentración de los migrantes en el extracto de zumo y en el zumo.

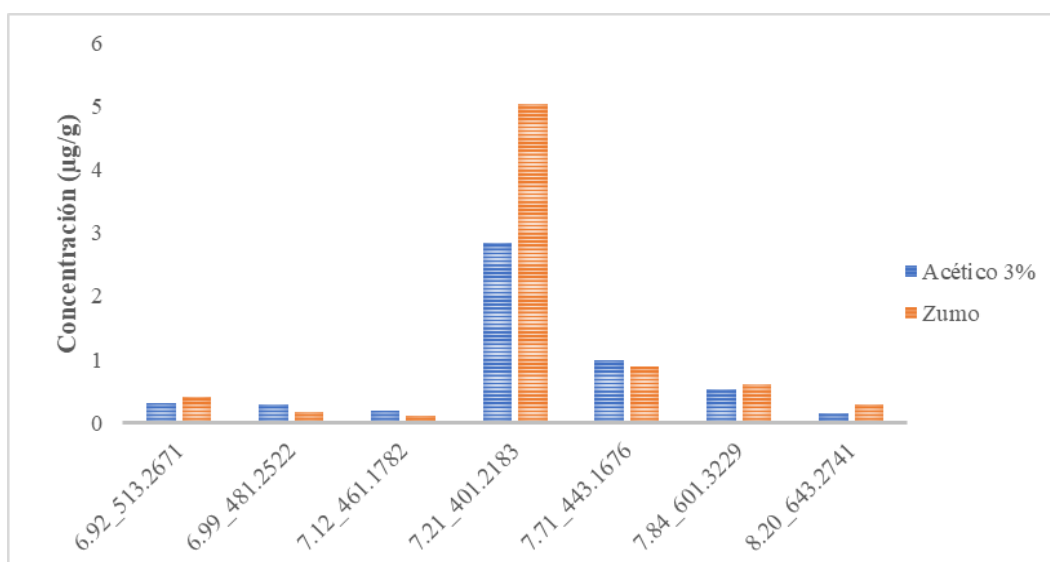
	<b>Extracto de zumo</b>	<b>Zumo</b>
Compuestos	Concentración (µg/g)	Concentración (µg/g)
4.98_241.1043	< LOD	<0,01
5.09_213.0723	< LOD	<0,01
5.31_329.0840	< LOD	<0,01
5.68_281.148	< LOD	<0,01
5.77_313.162	LOD < x < LOQ	<0,01
5.87_401.1044	< LOD	<0,01
6.24_473.1271	< LOD	<0,01
6.40_383.0955	< LOD	<0,01
6.58_545.1499	LOD < x < LOQ	<0,01
6.80_455.1155	LOD < x < LOQ	<0,01
6.82_617.1703	< LOD	<0,01
6.92_513.2671	14,1 ± 0,77	0,40 ± 0,021
6.99_481.2522	5,9 ± 0,68	0,17 ± 0,019
7.05_527.1373	LOD < x < LOQ	<0,01
7.12_461.1782	4,2 ± 0,74	0,12 ± 0,021
7.21_401.2183	<b>181 ± 13</b>	<b>5,0 ± 0,37</b>
7.30_599.1591	< LOD	<0,01
7.34_533.2356	1,1 ± 0,88	0,03 ± 0,025
7.44_671.1793	< LOD	<0,01
7.62_681.3568	1,0 ± 0,89	0,0 ± 0,025
7.71_443.1676	32 ± 1,8	0,88 ± 0,051
7.84_601.3229	22,0 ± 1,2	0,61 ± 0,033
8.20_643.2741	10,7 ± 0,65	0,30 ± 0,018
8.45_843.3785	< LOD	<0,01
8.58_663.2416	< LOD	<0,01



En el caso del zumo, se observaron más componentes por debajo del límite establecido, y sin embargo aquellos que ya se cuantificaban en el simulante mostraron valores similares de concentración en el zumo, o con un ligero incremento. El caso más apreciable fue el del migrante [AA-BD]<sub>2</sub>, que alcanzó un valor próximo a 5 µg/g en comparación con los demás que tomaron valores de migración inferiores a 0,9 µg/g. En el zumo no se cuantificaron oligómeros lineales.

#### 4.6. Comparación de resultados y evaluación de la seguridad

Comparando las Tablas 12 y 13 se llegó a la conclusión de que los compuestos químicos cuantificados fueron similares tanto en los simulantes como en el zumo. En ambos casos se distinguieron como sustancias migrantes principales los oligómeros cíclicos provenientes del poliéster. Aquellos que presentaron los valores más altos de concentración en orden descendente fueron: [AA-BD]<sub>2</sub> (7.21\_401.2183), [PA-BD-AA-BD] (7.71\_443.1676) y [AA-BD]<sub>3</sub>(7.84\_601.3229) como se refleja en la Figura 15.



**Figura 15.** Concentración de los componentes no volátiles presentes en el simulante alimentario B y en la muestra de zumo.

La razón por la que los oligómeros cíclicos estuvieran presentes en una proporción diez veces mayor que los lineales se debe a que estos últimos se producen debido a procesos de hidrólisis al entrar en contacto el polímero y el simulante.

La mayor parte de estas sustancias migrantes no se encuentran incluidas en la lista positiva que establece el Reglamento, por ello su concentración debe ser inferior a 0,01 µg/g. Sin embargo, en la mayoría de los casos esta concentración fue superada, pudiendo suponer un riesgo para la salud.

En el Anexo II se pueden ver los cromatogramas 1 y 2, correspondientes a la migración en simulante B y zumo por inyección en el sistema UPLC-QTOF-MS.

## **5. Conclusiones**

La técnica FPSE resultó ser un buen método de preconcentración de oligómeros y otros NIAS procedentes del biopolímero PLA-poliéster en simulantes alimentarios, ya que permitió intensificar sus áreas y detectar compuestos que se encontraban por debajo de la relación señal/ruido.

Además, la metodología basada en FPSE en combinación con el análisis UPLC-QTOF-MS fue utilizada para el análisis de alimentos como el zumo. Durante la optimización de la misma con diferentes patrones, los ésteres lineales dimetil-sebacato y dibutil-sebacato fueron los que presentaron los valores más altos de porcentaje de recuperación y factor de enriquecimiento. Con estos estándares se prepararon rectas de calibrado en metanol/agua y extracto de zumo para llevar a cabo el análisis semi-cuantitativo de las sustancias migrantes en el simulante y en el zumo, respectivamente.

En su mayoría, los compuestos identificados en el simulante alimentario y en el zumo resultaron ser los mismos, destacando por una mayor concentración los oligómeros cíclicos procedentes del poliéster. Con estos resultados se demostró la efectividad de los simulantes alimentarios para recrear la migración desde el material de envase al alimento.

Al estar estos compuestos en una concentración superior a la permitida, se puso de manifiesto la importancia de realizar ensayos de migración para los materiales plásticos que fueran a estar en contacto con alimentos. En el estudio realizado se demostró que no solo migran los oligómeros provenientes del PLA sino también aquellos que procedían de la parte poliéster de la mezcla, siendo estos últimos los que tuvieron un papel crítico al suponer un alto riesgo para la salud del consumidor.

## 6. Bibliografía

- (1) Kabir, A.; Furton, K. G. Fabric Phase Sorptive Extractors (FPSE). **2014**, *1* (19), 1–22.
- (2) Otoukesh, M.; Nerín, C.; Aznar, M.; Kabir, A.; Furton, K. G.; Es'haghi, Z. Determination of Adhesive Acrylates in Recycled Polyethylene Terephthalate by Fabric Phase Sorptive Extraction Coupled to Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1602*, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.044>.
- (3) Kabir, A.; Mesa, R.; Jurmain, J.; Furton, K. G. Fabric Phase Sorptive Extraction Explained. *Separations* **2017**, *4* (2). <https://doi.org/10.3390/separations4020021>.
- (4) Kabir, A.; Furton, K. G.; Malik, A. Innovations in Sol-Gel Microextraction Phases for Solvent-Free Sample Preparation in Analytical Chemistry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2013**, *45*, 197–218. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.11.014>.
- (5) Aznar, M.; Alfaro, P.; Nerin, C.; Kabir, A.; Furton, K. G. Fabric Phase Sorptive Extraction: An Innovative Sample Preparation Approach Applied to the Analysis of Specific Migration from Food Packaging. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *936*, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.049>.
- (6) Lakade, S. S.; Borrull, F.; Furton, K. G.; Kabir, A.; Fontanals, N.; Marcé, R. M. Comparative Study of Different Fabric Phase Sorptive Extraction Sorbents to Determine Emerging Contaminants from Environmental Water Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2015**, *144*, 1342–1351. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.009>.
- (7) Aznar, M.; Úbeda, S.; Nerin, C.; Kabir, A.; Furton, K. G. Fabric Phase Sorptive Extraction as a Reliable Tool for Rapid Screening and Detection of Freshness Markers in Oranges. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1500*, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.006>.
- (8) Kabir, A.; Locatelli, M.; Ulusoy, H. I. Recent Trends in Microextraction Techniques Employed in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation. *Separations* **2017**, *4* (4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/separations4040036>.
- (9) Roldán-Pijuán, M.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M.; Kabir, A.; Furton, K. G. Stir Fabric Phase Sorptive Extraction for the Determination of Triazine Herbicides in Environmental Waters by Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1376*, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.027>.
- (10) Kumar, R.; Gaurav; Heena; Malik, A. K.; Kabir, A.; Furton, K. G. Efficient Analysis of Selected Estrogens Using Fabric Phase Sorptive Extraction and High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1359*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.013>.
- (11) Kaur, R.; Kaur, R.; Rani, S.; Malik, A. K.; Kabir, A.; Furton, K. G.; Samanidou, V. F. Rapid Monitoring of Organochlorine Pesticide Residues in Various Fruit Juices and Water Samples Using Fabric Phase Sorptive Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecules* **2019**, *24* (6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24061013>.
- (12) Montesdeoca-Esponda, S.; Guedes-Alonso, R.; Santana-Viera, S.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J. J. Applications of Fabric Phase Sorptive Extraction to the Determination of Micropollutants in Liquid Samples. *Separations* **2018**, *5* (3). <https://doi.org/10.3390/separations5030035>.

- (13) Samanidou, V.; Galanopoulos, L. D.; Kabir, A.; Furton, K. G. Fast Extraction of Amphenicols Residues from Raw Milk Using Novel Fabric Phase Sorptive Extraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *855*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.036>.
- (14) Karageorgou, E.; Manousi, N.; Samanidou, V.; Kabir, A.; Furton, K. G. Fabric Phase Sorptive Extraction for the Fast Isolation of Sulfonamides Residues from Raw Milk Followed by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Food Chem.* **2016**, *196*, 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.060>.
- (15) Samanidou, V.; Kaltzi, I.; Kabir, A.; Furton, K. G. Simplifying Sample Preparation Using Fabric Phase Sorptive Extraction Technique for the Determination of Benzodiazepines in Blood Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30* (6), 829–836. <https://doi.org/10.1002/bmc.3615>.
- (16) Guedes-Alonso, R.; Ciofi, L.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J. J.; Del Bubba, M.; Kabir, A.; Furton, K. G. Determination of Androgens and Progestogens in Environmental and Biological Samples Using Fabric Phase Sorptive Extraction Coupled to Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1437*, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.077>.
- (17) Kumar, R.; Gaurav; Kabir, A.; Furton, K. G.; Malik, A. K. Development of a Fabric Phase Sorptive Extraction with High-Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Detection Method for the Analysis of Alkyl Phenols in Environmental Samples. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38* (18), 3228–3238. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500464>.
- (18) Celeiro, M.; Acerbi, R.; Kabir, A.; Furton, K. G.; Llompert, M. Development of an Analytical Methodology Based on Fabric Phase Sorptive Extraction Followed by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Determine UV Filters in Environmental and Recreational Waters. *Anal. Chim. Acta X* **2020**, *4*, 100038. <https://doi.org/10.1016/j.acax.2019.100038>.
- (19) Lakade, S. S.; Borrell, F.; Furton, K. G.; Kabir, A.; Marcé, R. M.; Fontanals, N. Dynamic Fabric Phase Sorptive Extraction for a Group of Pharmaceuticals and Personal Care Products from Environmental Waters. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1456*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.097>.
- (20) Pawar, P. a; Purwar, A. H. Biodegradable Polymers in Food Packaging. *Am. J. Eng. Res.* **2013**, No. 05, 151–164.
- (21) Martínez-Bueno, M. J.; Gómez Ramos, M. J.; Bauer, A.; Fernández-Alba, A. R. An Overview of Non-Targeted Screening Strategies Based on High Resolution Accurate Mass Spectrometry for the Identification of Migrants Coming from Plastic Food Packaging Materials. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *110*, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.035>.
- (22) Mangaraj, S.; Yadav, A.; Bal, L. M.; Dash, S. K.; Mahanti, N. K. Application of Biodegradable Polymers in Food Packaging Industry: A Comprehensive Review. *J. Packag. Technol. Res.* **2019**, *3* (1), 77–96. <https://doi.org/10.1007/s41783-018-0049-y>.
- (23) Jabeen, N.; Majid, I.; Nayik, G. A. Bioplastics and Food Packaging: A Review. *Cogent Food Agric.* **2015**, *1* (1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1117749>.
- (24) Siracusa, V.; Rocculi, P.; Romani, S.; Rosa, M. D. Biodegradable Polymers for Food Packaging: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19* (12), 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>.

- (25) Aznar, M.; Ubeda, S.; Dreolin, N.; Nerín, C. Determination of Non-Volatile Components of a Biodegradable Food Packaging Material Based on Polyester and Polylactic Acid (PLA) and Its Migration to Food Simulants. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1583*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.055>.
- (26) Inkinen, S.; Hakkarainen, M.; Albertsson, A. C.; Södergård, A. From Lactic Acid to Poly(Lactic Acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (3), 523–532. <https://doi.org/10.1021/bm101302t>.
- (27) Ubeda, S.; Aznar, M.; Alfaro, P.; Nerín, C. Migration of Oligomers from a Food Contact Biopolymer Based on Polylactic Acid (PLA) and Polyester. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (16), 3521–3532. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01831-0>.
- (28) Canellas, E.; Aznar, M.; Nerín, C.; Mercea, P. Partition and Diffusion of Volatile Compounds from Acrylic Adhesives Used for Food Packaging Multilayers Manufacturing. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (24), 5100–5109. <https://doi.org/10.1039/c0jm00514b>.
- (29) Catalá, R.; Gavara, R. Migración de componentes y residuos de envases en contacto con los alimentos; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos: Valencia, **2002**; pp 8-10.
- (30) Hoppe, M.; de Voogt, P.; Franz, R. Identification and Quantification of Oligomers as Potential Migrants in Plastics Food Contact Materials with a Focus in Polycondensates - A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *50*, 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.018>.
- (31) García Ibarra, V.; Rodríguez Bernaldo de Quirós, A.; Paseiro Losada, P.; Sendón, R. Non-Target Analysis of Intentionally and Non Intentionally Added Substances from Plastic Packaging Materials and Their Migration into Food Simulants. *Food Packag. Shelf Life* **2019**, *21* (December 2018), 100325. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100325>.
- (32) Begley, T.; Castle, L.; Feigenbaum, A.; Franz, R.; Hinrichs, K.; Lickly, T.; Mercea, P.; Milana, M.; O'Brien, A.; Rebre, S.; Rijk, R.; Piringer, O. Evaluation of Migration Models That Might Be Used in Support of Regulations for Food-Contact Plastics. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22* (1), 73–90. <https://doi.org/10.1080/02652030400028035>.
- (33) La Comisión Europea. REGLAMENTO (UE) No 10/2011. *D. Of. la Unión Eur.* **2011**, 89.
- (34) Arvanitoyannis, I. S.; Bosnea, L. Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44* (2), 63–76. <https://doi.org/10.1080/10408690490424621>.
- (35) Peters, R. J. B.; Groeneveld, I.; Sanchez, P. L.; Gebbink, W.; Gersen, A.; de Nijs, M.; van Leeuwen, S. P. J. Review of Analytical Approaches for the Identification of Non-Intentionally Added Substances in Paper and Board Food Contact Materials. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *85* (January), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.010>.
- (36) Zhang, N.; Kenion, G.; Bankmann, D.; Mezouari, S.; Hartman, T. G. Migration Studies and Chemical Characterization of Low Molecular Weight Cyclic Polyester Oligomers from Food Packaging Lamination Adhesives. *Packag. Technol. Sci.* **2018**, *31* (4), 197–211. <https://doi.org/10.1002/pts.2367>.

## Anexos

**Anexo I.** Tabla del artículo “Determination of non-volatile components of a biodegradable food packaging material based on polyester and polylactic acid (PLA) and its migration to food simulants”<sup>25</sup>

Estos ensayos de migración se realizaron a 60°C durante 10 días, y los extractos obtenidos a partir de una metodología basada en disolución/precipitación fueron analizados por UPLC-QTOF-MS. De esta manera se identificaron los principales componentes no volátiles del PLA.

En la tabla se reflejan los compuestos detectados en pellets y láminas de PLA-poliéster, así como, aquellos que se han encontrado en simulantes alimentarios. Las áreas se clasifican de 1 a 3, de mayor a menor intensidad, y también se indica la fórmula molecular junto con los posibles candidatos.

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 ( <i>linear</i> )	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
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 ( <i>linear</i> )	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 ( <i>linear</i> )	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. 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 ( <i>linear</i> )	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
5.87_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 ( <i>linear</i> )	PLA oligomer

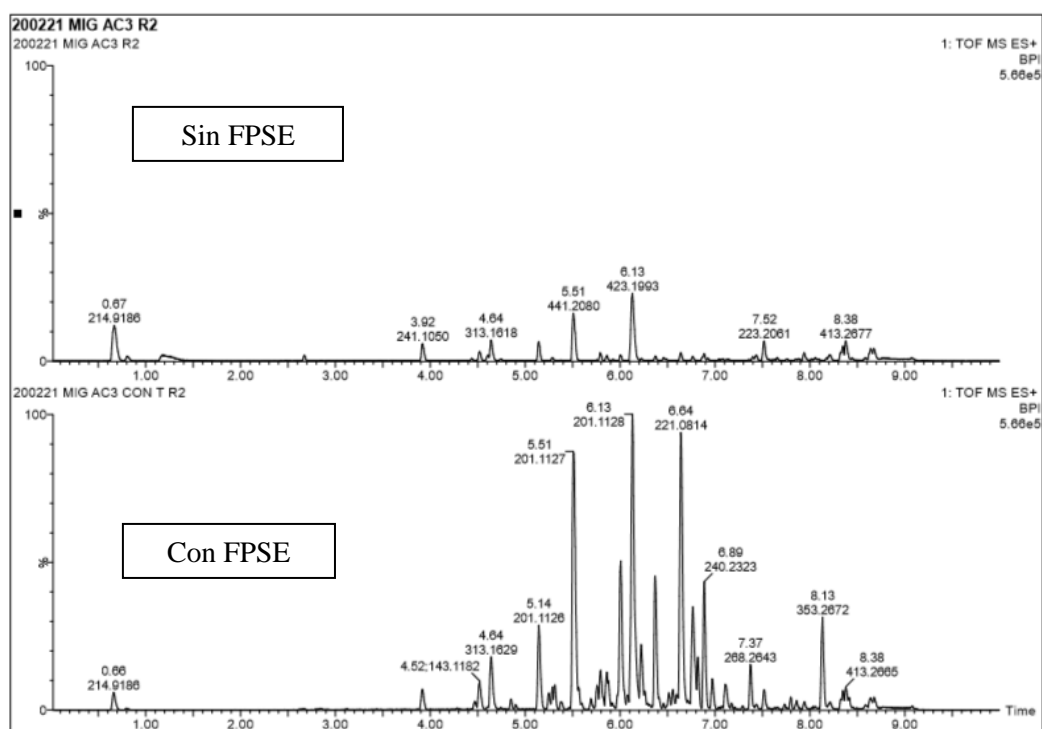
6.19_269.1373	1	nd	nd	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	2,2'-(oxybis((methyl-2,1-ethanediyloxy)methylene)) bisoxirane CAS 41638-13-5	Indirect additives by FDA
6.24_473.1271	nd	nd	2	[MNa] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	HO-[LA] <sub>6</sub> -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-butoxyethoxy)-1-oxo-2-propanyl] adipate	Detected by Bradley
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 dimethacrylate UDMC CAS 72869-86-4	Detected by Bradley
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
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
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

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
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
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

nd: non detected; LA: lactic acid; AA: adipic acid; PA: phthalic acid; BD: butanediol.

**Anexo II.** Cromatogramas obtenidos en el ensayo de migración tanto en el simulante B como en el extracto de zumo por inyección en el sistema UPLC-QTOF-MS.

**Cromatograma 1.** Comparativa de la migración en HAC 3% (simulante B) con y sin FPSE.



**Cromatograma 2.** Migración en extracto de zumo utilizando FPSE.

