



UNIVERSIDAD
DE BURGOS

**ESTRATEGIAS QUIMIOMÉTRICAS
APLICADAS A TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS PARA EL
ANÁLISIS DE MONÓMEROS Y
ADITIVOS**

TESIS DOCTORAL

María del Mar Arce Antón

DIRECTORAS:

María de la Cruz Ortiz Fernández

Silvia Sanllorente Méndez

Departamento de Química

Área de Química Analítica

Burgos, Diciembre de 2020



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Química, Área de Química Analítica

Dña. María de la Cruz Ortiz Fernández, Catedrática de Química Analítica en el Área de Química Analítica, y Dña. Silvia Sanllorente Méndez, Profesora del Área de Química Analítica, del Departamento de Química de la Universidad de Burgos,

Certifican:

Que el trabajo de investigación presentado en esta memoria bajo el título "Estrategias quimiométricas aplicadas a técnicas cromatográficas para el análisis de monómeros y aditivos" por la graduada y masterizada Dña. María del Mar Arce Antón, ha sido realizado bajo su dirección y autorizan la presentación como Tesis Doctoral para optar al título de Doctor en Química Avanzada por la Universidad de Burgos.

Burgos, a 16 de diciembre de 2020

Fdo: María de la Cruz Ortiz Fernández

Fdo: Silvia Sanllorente Méndez

Todo pasa por algo, y si no pasa también es por algo.

*Nada sucede por casualidad,
en el fondo las cosas tienen su plan secreto,
aunque nosotros no lo entendamos.*

Carlos Ruiz Zafón

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a la Junta de Castilla y León y al Fondo Social Europeo por el contrato predoctoral concedido (Orden EDU/1100/2017). Considero que esta ayuda ha supuesto un incentivo añadido en mi intención de seguir formándome académicamente.

De la misma manera, mostrar mi agradecimiento al MINECO de España (AEI/FEDER, UE) y a la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León, por el apoyo financiero aportado al grupo de investigación dónde he desarrollado mi tesis a través de los proyectos CTQ2014-53157-R, BU012P17, CTQ2017-88894-R y BU052P20 (todos cofinanciados con Fondos Europeos de Desarrollo Regional).

Además, reflejar el apoyo por parte de la Facultad de Ciencias, la Escuela de Doctorado y la Universidad de Burgos en cuanto a las gestiones, instalaciones y demás necesidades a lo largo del periodo predoctoral, que han sido facilitadas por su parte.

Igualmente transmitir mi agradecimiento a mis directoras **Cruz** y **Silvia** por la experiencia que me habéis aportado en este periodo. No solamente por los nuevos conocimientos adquiridos sino también por incorporarme al equipo de trabajo como una más, aunque tengo que reconocer que todavía en ocasiones mi cabeza os sigue considerando como "profes" del grado.

Gracias también al resto de miembros del grupo de investigación de Quimiometría y Cualimetría (Q&C). Aunque no he colaborado estrechamente con todos los integrantes, me han transmitido cercanía y afecto.

Seguramente no le llegue este agradecimiento, pero igualmente me apetece expresarlo. Gracias a la profesora de Física y Química de mi instituto **A.Z.** Los dos cursos que me dio clase me ayudaron en la decisión de continuar mis estudios de grado en la rama de la Química.

Ahondando en lo personal, continúo con los agradecimientos, como no puede ser de otra manera, mencionando a mi familia. A mis padres. De no ser por ellos yo no estaría hoy aquí escribiendo esta memoria y tampoco hubiera alcanzado mis objetivos y metas sin su apoyo. Pero además quiero agradecerles que de manera inconsciente, o quién sabe si un poco a sabiendas de mi incipiente potencial, lograsen que me gustasen tanto los números y las matemáticas. Creo que escuchar siendo niña todas las noches para ir a dormir cintas de casete con los números, las horas y las tablas de multiplicar, así como los paseos jugando a sumar matrículas hicieron de mí una apasionada de los números. Para la artista de la casa también quiero dedicar unas líneas. Gracias por los momentos compartidos y por ser mi mitad. Pase lo que pase, la distancia que nos separe o los meses que pasemos sin vernos, estaremos siempre ahí, las dos, mano a mano. **ByM.**

La siguiente persona a la que no puedo dejar de nombrar es mi inseparable e inestimable amiga desde el cole. Nuestra amistad ha tenido altos y bajos, pero lo importante es que continúa. Hemos estado en las buenas y muy buenas (allá quedaron nuestros viajes y verbenas), pero también en las que no lo fueron tanto para ninguna de las dos. Gracias **M**.

Especial mención a mis compañeras (y amigas) durante el Grado en Química. Esos años hubiesen sido tan diferentes y duros sin vosotras. Muchos días al entrar en la "uni" me parece que nos vamos a encontrar otra vez las cinco, sentadas en una de las primeras filas de la clase. También me ocurre cada vez que veo los microondas de la facultad y pienso en esos días que hacíamos intensivo cerrando la sala de estudio y bromeábamos con instalarnos una tienda de campaña allí. Gracias **I. L. R. Z**.

Por supuesto que Malula Baby no podía faltar. Me habéis aportado tanto durante estos años de tesis. A nivel profesional me habéis ayudado en la vuelta al laboratorio y he aprendido mucho de vosotras, pero también hemos compartido experiencias personales que me han hecho crecer. Aunque ya no trabajemos juntas, todavía siento vuestra presencia en el "labo". Gracias **L. L**.

*Cada persona que pasa por nuestra vida es única.
Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros.*

Habrán los que se llevarán mucho, pero no habrá de los que no nos dejarán nada.

Esta es prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad.

Jorge Luis Borges

Agradezco, por tanto, a todas esas **personas que pasaron por mi vida**. Todas ellas me han aportado algo para ser quién soy ahora, continúen o no a mi lado.

Almes, Calamares, mi gente cercana de baile y de la peña, Italianini, amigas del trabajo, Corteliga.

Seguro que me olvido de nombrar a alguien, pero espero sepa perdonarme y de antemano le doy las gracias también.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.	Introducción y objetivos	1
I.1.	Marco normativo de una tesis doctoral	5
I.2.	Contextualización	6
I.3.	Objetivos	7
I.4.	Contenido	9
CAPÍTULO II.	Marco legal y sustancias analizadas	13
II.1.	Migración	15
II.1.1.	Proceso de migración	15
II.1.2.	Condiciones de ensayo de migración desde FCM	19
II.1.3.	Sustancias de interés y/o reguladas	22
II.1.4.	Migración desde otros materiales	23
II.2.	Familias de compuestos analizados	23
II.2.1.	Agentes mutagénicos. Fenol	24
II.2.2.	Agentes carcinogénicos. Melamina y formaldehído	26
II.2.3.	Disruptores endocrinos. Bisfenol A	29
II.3.	Normativas	31
II.3.1.	Fenol	31
II.3.1.1.	Juguetes	31
II.3.1.2.	Alimentación	31
II.3.1.3.	Cosméticos	32
II.3.1.4.	Exposición laboral	32
II.3.1.5.	Biocidas	32
II.3.1.6.	Contaminantes	33
II.3.1.7.	Otros	33
II.3.2.	Melamina	33
II.3.2.1.	Textil	33
II.3.2.2.	Alimentación	33
II.3.2.3.	Cosméticos	34
II.3.2.4.	Otros	34
II.3.3.	Formaldehído	35
II.3.3.1.	Juguetes	35
II.3.3.2.	Materiales en contacto con alimentos (FCM)	35
II.3.3.3.	Cosméticos	35
II.3.3.4.	Exposición laboral	36
II.3.3.5.	Biocidas	36
II.3.3.6.	Contaminantes	37
II.3.3.7.	Otros	37
II.3.4.	Bisfenoles: BPA	37
II.3.4.1.	Juguetes	38

II.3.4.2.	Materiales en contacto con alimentos (FCM)	38
II.3.4.3.	Cosméticos	38
II.3.4.4.	Exposición laboral	39
II.3.4.5.	Papel térmico	39
II.3.4.6.	Agua de consumo humano	39
II.3.4.7.	Otros	39
II.4.	Referencias	40
 CAPÍTULO III. Fundamentos teóricos		57
III.1.	Diseño de experimentos	59
III.1.1.	Elementos, modelo y validación de un diseño de experimentos	59
III.1.2.	Diseños "a medida": diseños D-óptimo	63
III.1.3.	Optimización multirrespuesta: frente Pareto	65
III.1.4.	Representación mediante coordenadas paralelas	67
III.2.	Análisis de factores paralelos	68
III.2.1.	PARAFAC/PARAFAC2	68
III.2.2.	Determinación del número de factores	72
III.2.3.	Calibrado basado en una descomposición PARAFAC	73
III.3.	Tecnología Analítica de Procesos y Calidad Diseñada	74
III.3.1.	Calidad Analítica Diseñada, AQbD	76
III.4.	Referencias	79
 CAPÍTULO IV. Instrumentación		85
IV.1.	Introducción	87
IV.2.	Disolventes de la fase móvil	89
IV.3.	Sistema de bombeo	89
IV.4.	Sistema de inyección de la muestra	89
IV.5.	Columna	90
IV.6.	Detector	91
IV.7.	Procesador	93
IV.8.	Referencias	96

CAPÍTULO V. Procedimiento sencillo para optimizar un método cromatográfico. Aplicación en la determinación de bisfenol A y fenol en juguetes mediante cromatografía líquida con detección de fluorescencia	97
V.1. Resumen	99
V.2. Palabras clave	99
V.3. Introducción	100
V.4. Experimental	103
V.4.1. Reactivos químicos	103
V.4.2. Instrumental	103
V.4.3. Disoluciones patrón y muestras	104
V.4.4. Software	104
V.5. Resultados y discusión	105
V.5.1. Optimización del procedimiento experimental	105
V.5.1.1. Diseño de experimentos D-óptimo y modelos ajustados	105
V.5.1.2. Representación y exploración de las funciones de respuesta	108
V.5.1.3. Cómo obtener información del sistema cromatográfico a través del gráfico de coordenadas paralelas	110
V.5.2. Validación del método	112
V.5.2.1. Rectas de calibrado y de exactitud	112
V.5.2.2. Límite de decisión y capacidad de detección	114
V.5.3. Análisis de juguetes y otras muestras	114
V.6. Conclusiones	115
V.7. Anexo A	116
V.8. Apéndice A. Datos del material suplementario	118
V.9. Referencias	119
CAPÍTULO VI. Ensayos de migración de melamina y formaldehído y sus cinéticas de migración en utensilios de cocina. Análisis univariante y multivariante de datos obtenidos mediante HPLC-DAD	123
VII. Modelos cinéticos con datos de cromatografía líquida de la migración de melamina y formaldehído desde utensilios de cocina de melamina	127

VI.I.1. Resumen	127
VI.I.2. Palabras clave	128
VI.I.3. Introducción	128
VI.I.4. Material y métodos	131
VI.I.4.1. Reactivos químicos	131
VI.I.4.2. Instrumental	132
VI.I.4.3. Disoluciones patrón y muestras	133
VI.I.4.4. Software	136
VI.I.5. Resultados y discusión	136
VI.I.5.1. Validación del método	136
VI.I.5.1.1. Rectas de calibrado y de exactitud	136
VI.I.5.1.2. Límite de decisión y capacidad de detección	136
VI.I.5.1.3. Identificación inequívoca de analitos	138
VI.I.5.2. Test de migración	139
VI.I.5.3. Curvas cinéticas de migración	144
VI.I.6. Conclusiones	148
VI.I.7. Referencias	149
VI.II. Descomposición PARAFAC, con datos de tres vías cromatográficas, para la identificación inequívoca y cuantificación de compuestos en un marco regulado	155
VI.II.1. Resumen	155
VI.II.2. Introducción	156
VI.II.3. Software y experimental	157
VI.II.3.1. Software	157
VI.II.3.2. Instrumental y detalles experimentales	157
VI.II.3.2.1. Caso IV (HPLC-DAD)	157
VI.II.4. Teoría	158
VI.II.4.1. Modelos PARAFAC/PARAFAC2	158
VI.II.4.2. Varias regulaciones obligatorias relacionadas con la identificación inequívoca	159
VI.II.4.3. Identificación inequívoca y cuantificación a través de PARAFAC/PARAFAC2	162
VI.II.5. Resultados y discusión	164
VI.II.5.1. Caso IV: Test de migración y cinética de migración para melamina con HPLC-DAD	164
VI.II.6. Conclusiones	170
VI.II.7. Referencias	171

VI.III. Análisis univariante versus multivariante en cromatografía líquida. Aplicación en la migración desde materiales en contacto con alimentos	175
VI.III.1. Introducción	175
VI.III.2. Búsqueda de modelos	177
VI.III.3. Validación de modelos	182
VI.III.4. Estudio comparativo de la melamina migrada	182
VI.III.5. Conclusiones	189
VI.III.6. Referencias	190
CAPÍTULO VII. Un nuevo enfoque basado en la inversión de un modelo PLS para buscar un perfil analítico predeterminado. Aplicación en la determinación de cinco bisfenoles mediante HPLC-DAD	193
VII.1. Resumen	195
VII.2. Palabras clave	196
VII.3. Introducción	196
VII.4. Material y métodos	200
VII.4.1. Reactivos químicos	200
VII.4.2. Instrumental	200
VII.4.3. Disoluciones patrón y muestras	201
VII.4.4. Software	201
VII.5. Procedimiento general	201
VII.5.1. Diseño de experimentos	202
VII.5.2. Selección de condiciones experimentales	205
VII.6. Resultados y discusión	207
VII.6.1. Datos experimentales	207
VII.6.2. Modelo PLS2	208
VII.6.3. Inversión del modelo PLS2 para obtener los CMP para un ATP deseado	209
VII.6.4. Verificación experimental de los CMP obtenidos	213
VII.6.5. Análisis comparativo	217
VII.7. Conclusiones	219
VII.8. Referencias	220

CAPÍTULO VIII. Determinación de la migración de cinco bisfenoles en vasos de policarbonato "libre de BPA" mediante HPLC-DAD y PARAFAC	229
VIII.1. Resumen	231
VIII.2. Palabras clave	232
VIII.3. Introducción	232
VIII.4. Material y métodos	235
VIII.4.1. Reactivos químicos	235
VIII.4.2. Disoluciones patrón y muestras	235
VIII.4.3. Instrumental	236
VIII.4.4. Análisis de factores paralelos (PARAFAC)	237
VIII.4.5. Software	238
VIII.5. Resultados y discusión	238
VIII.5.1. Modelos PARAFAC	238
VIII.5.2. Identificación inequívoca	242
VIII.5.3. Validación del método	243
VIII.5.3.1. Rectas de calibrado y de exactitud	243
VIII.5.3.2. Límites de decisión y capacidad de detección	243
VIII.5.3.3. Recuperación del procedimiento	244
VIII.5.4. Test de migración	245
VIII.6. Conclusiones	252
VIII.7. Referencias	253
CAPÍTULO IX. Conclusiones generales	261
Publicaciones	267
Artículos	269
Comunicaciones a congresos	270
Libros	271
Divulgación científica	271

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Vivir bien es, entre otras cosas, vivir despierto, vivir con los ojos abiertos, darse cuenta de quienes somos y dónde estamos, practicar la virtud de la lucidez.

Vivir bien implica dar rienda suelta a nuestra curiosidad, asumir nuestra dimensión espiritual y participar en la aventura intelectual de nuestro tiempo.

En efecto, a pesar de todos sus horrores, nuestro tiempo es una época dorada del espíritu, una fiesta del conocimiento.

Jesús Mosterín
Ciencia viva. Reflexiones sobre la aventura intelectual de nuestro tiempo
Espasa, 2001

I.1. Marco normativo de una tesis doctoral

La presentación y defensa de esta memoria preceptiva para poder obtener el grado académico de doctor se realiza en el ámbito legal definido por el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado en España. El artículo quinto del Real Decreto 99/2011 relaciona las competencias que debe adquirir un doctorando durante su formación como investigador:

1. Comprensión sistemática de un campo de estudio y dominio de las habilidades y métodos de investigación relacionados con dicho campo.
2. Capacidad de concebir, diseñar o crear, poner en práctica y adoptar un proceso sustancial de investigación o creación.
3. Capacidad para contribuir a la ampliación de las fronteras del conocimiento a través de una investigación original.
4. Capacidad de realizar un análisis crítico y de evaluación y síntesis de ideas nuevas y complejas.
5. Capacidad de comunicación con la comunidad académica y científica y con la sociedad en general acerca de sus ámbitos de conocimiento en los modos e idiomas de uso habitual en su comunidad científica internacional.
6. Capacidad de fomentar, en contextos académicos y profesionales, el avance científico, tecnológico, social, artístico o cultural dentro de una sociedad basada en el conocimiento.

Además, la obtención del título de doctor debe proporcionar una alta capacitación profesional en ámbitos diversos, especialmente en aquellos que requieren creatividad e innovación. Los doctores habrán adquirido, al menos, las siguientes capacidades y destrezas personales para:

1. Desenvolverse en contextos en los que hay poca información específica.
2. Encontrar las preguntas claves que hay que responder para resolver un problema complejo.
3. Diseñar, crear, desarrollar y emprender proyectos novedosos e innovadores en su ámbito de conocimiento.
4. Trabajar tanto en equipo como de manera autónoma en un contexto internacional o multidisciplinar.
5. Integrar conocimientos, enfrentarse a la complejidad y formular juicios con información limitada.
6. La crítica y defensa intelectual de soluciones.

La adquisición de estas competencias conduce a hacer viable, desde el punto de vista del doctorando, la afirmación contenida en el preámbulo del mismo Real Decreto: *"El doctorado debe jugar un papel fundamental como intersección entre el Espacio de Educación Superior y el Espacio Europeo de Investigación, ambos pilares fundamentales de la sociedad basada en el conocimiento"*.

Es decir, la formación doctoral debe procurar que el futuro doctor sea capaz de responder a una cuestión nunca antes planteada. Esto es clave para actuar de forma eficiente en el ámbito de la investigación, el desarrollo y la innovación.

La investigación recogida en esta Tesis Doctoral, se ha desarrollado en la Universidad de Burgos, en el Área de Química Analítica del Departamento de Química, y por ello, en el contexto del Código de Buenas Prácticas de la Escuela de Doctorado. Este código tiene como finalidad promover que el proceso de formación de investigadores se desarrolle en las mejores condiciones y concluya satisfactoriamente en la defensa de una Tesis Doctoral con el rigor científico exigible al pensamiento universitario. El artículo cuarto del preámbulo afirma: *"Se parte de una concepción antropológica en virtud de la cual el mundo de la investigación, el progreso científico y el avance del conocimiento debe plegarse al servicio del ser humano y al respeto escrupuloso a la dignidad de la persona y a la razón; teniendo en cuenta el acervo histórico-cultural común, el cuidado del medioambiente y la sostenibilidad como parámetros rectores de actuación. Este Código de Buenas Prácticas invoca, pues, postulados morales complementando o inspirando la filosofía que debe animar al ámbito formal de la legislación en materia de investigación"*.

En resumen, la formación doctoral no sólo ha de contribuir a formar en competencias a las personas que liderarán el avance en el conocimiento y su transferencia a la sociedad, a la innovación y al desarrollo, sino que, además, ha de contribuir al crecimiento moral del doctorando para que el ejercicio de su liderazgo profesional sea ejemplar.

I.2. Contextualización

Una de las finalidades de la Química Analítica es la identificación inequívoca y la cuantificación de sustancias de interés en el ámbito económico, ambiental o de la seguridad alimentaria. Esto supone un conflicto, nunca resuelto del todo, al enfrentarnos a la matriz en el que se encuentran estos analitos y como todo conflicto requiere instrumentos, táctica y estrategia para resolverlo.

En el diccionario, estrategia y táctica aparecen definidas en un contexto militar, pero su significado es aplicable a cualquier tarea necesaria para resolver un conflicto. Se puede afirmar que estrategia es el arte para dirigir un asunto y táctica es arte de disponer y emplear los instrumentos para una tarea. Los libros de Análisis Químico en general se centran en describir las "tácticas" analíticas propias del Área

(espectroscopía, cromatografía, etc.), mientras que la "estrategia" trata de aspectos más generales y sobre todo de la cuestión de qué táctica y cuándo usarla.

La estrategia en Química Analítica, en el sentido antes mencionado, se ha impuesto por la necesidad de manejar señales multivariantes y/o multivía, por lo que el conflicto al que se enfrenta todo analista, identificar y cuantificar analitos, se desarrolla en medios siempre complejos que exigen combinar esfuerzos tácticos (por ejemplo, empleo de técnicas cromatográficas con detectores multivariantes). Y por supuesto, no tiene sentido separar el uso de los instrumentos del análisis de los datos que los mismos nos proporcionan. Una vez definido el problema analítico es necesario tener presente la estructura de los datos experimentales y su relación con la finalidad de la investigación. Necesitamos tener la seguridad de que los datos son relevantes para el problema que queremos resolver y que el problema es relevante como objetivo científico. Es mejor que el análisis de nuestros datos conduzca a una respuesta aproximada a la cuestión propuesta, que un magnífico análisis para una cuestión mal planteada.

En lo referente a los análisis de datos, no es razonable la adhesión ciega a una estrategia que se supone consolidada, pero tampoco lo es demostrar la destreza en el manejo de datos mediante el uso indiscriminado de tácticas exóticas. Se tiene que buscar la aproximación más simple y efectiva, sobre todo para evitar que la respuesta sea un completo artefacto matemático.

Sin duda la estrategia en el ámbito del análisis químico está asociada a la Quimiometría, que siempre sugerirá el uso de señales multivariantes y/o multivía. El uso, de información multivariante y de las optimizaciones multirrespuesta permite convertir en información útil la ingente cantidad de datos proporcionada por la instrumentación moderna.

En este contexto, búsqueda de estrategias necesarias que organizan las tácticas para resolver el conflicto permanente de identificar y cuantificar inequívocamente analitos, se desarrolla la investigación recogida en esta memoria.

I.3. Objetivos

Objetivo general. Diseñar procedimientos de medida cromatográficos con bajo coste económico y medioambiental, utilizando como marco de referencia la reglamentación legal en el campo de los migrantes. Haciendo especial hincapié en lo referente a la identificación inequívoca de los mismos junto con el cumplimiento de los criterios de funcionamiento de los métodos analíticos siguiendo normativas europeas. Se utilizarán y/o desarrollarán distintas herramientas quimiométricas multivariantes (PARAFAC, PARAFAC2, diseños D-óptimos, frente Pareto, algoritmos genéticos, coordenadas paralelas) para obtener la información contenida en los datos químicos.

Este objetivo general se desglosa en seis objetivos específicos:

1. Desarrollar una metodología sostenible que permita ahorrar costes tanto económicos como medioambientales cuando se utiliza una técnica cromatográfica (HPLC-FLD y HPLC-DAD) en la determinación de fenol y bisfenoles (en material en contacto con alimentos, juguetes y material clínico).
2. Abordar el problema de la identificación inequívoca y de la cuantificación cuando se hacen ensayos de migración de formaldehído y melamina desde material que va a estar en contacto con los alimentos, y en cuyos extractos de migración se espera encontrar interferentes que coeluyan y posean espectros similares cuando se utiliza una técnica de HPLC-DAD. Se utilizará la técnica quimiométrica PARAFAC (PARAFAC2) para aprovechar la "ventaja de segundo orden" que tienen las mismas.
3. Proponer y evaluar la ventaja de utilizar una descomposición PARAFAC (PARAFAC2) para construir las curvas cinéticas de migración con datos de cromatografía líquida cuando se va a determinar melamina desde utensilios de cocina de resina de melamina.
4. Comprobar que existe sobreestimación de la cantidad migrada desde los materiales en contacto con los alimentos (FCM, por sus siglas en inglés) al simulante cuando se utiliza un método univariante para realizar los calibrados "area de pico *versus* concentración" en vez de utilizar la metodología multivariante proporcionada por las descomposiciones PARAFAC utilizando "loading muestral *versus* concentración" en matrices complejas donde coeluyan interferentes.
5. Desarrollar nuevas metodologías de diseño de experimentos y de inversión de modelos de predicción en variables latentes, en el ámbito de la Calidad Analítica Diseñada (AQbD). Se propondrán las características deseadas para el cromatograma en el denominado "perfil analítico objetivo" (ATP) para obtener los "parámetros de control del método" (procedimiento cromatográfico) (CMP) y se aplicará a la determinación de una familia de cinco bisfenoles con una técnica de HPLC-DAD.
6. Comparar las distribuciones de poblaciones de concentración encontrada en ensayos de migración hechos con vasos de policarbonato "libre de bisfenol A" frente a las obtenidas con blancos analíticos para poder evaluar estadísticamente las probabilidades de dar falsos positivos o falsos negativos con los procedimientos analíticos que se han puesto a punto.

I.4. Contenido

La memoria recoge los contenidos de los objetivos mencionados en la sección anterior y está organizada en ocho capítulos además de esta introducción.

El Capítulo II se dedica a describir el marco legal y las sustancias analizadas en esta memoria. Se reseñan aspectos de las normativas sobre migrantes, tanto en materiales en contacto con alimentos, FCM, así como en otras sustancias como juguetes. Se detalla la normativa sobre ensayos de migración y dependiendo del tipo de alimento que vaya a estar en contacto con el FCM se indican los tipos de simulantes establecidos en el Reglamento 10/2011 junto con las condiciones de ensayo de migración. Para finalizar, se describen las sustancias determinadas y los posibles efectos nocivos para la salud humana, ya que muchos de ellos son agentes posiblemente mutagénicos como el fenol, carcinogénicos (melamina y formaldehído) o disruptores endocrinos (bisfenol A) y otros cuatro bisfenoles pendientes de clasificación.

El Capítulo III, continúa con los aspectos más relevantes de las técnicas quimiométricas utilizadas en el desarrollo de todos los trabajos de investigación contenidos en la memoria (Capítulos V a VIII). Después de una revisión exhaustiva, se hace especial hincapié en la importancia que tiene la técnica de PARAFAC/PARAFAC2 por su "propiedad de segundo orden" para poder identificar inequívocamente las sustancias de interés cumpliendo con la reglamentación legal. Se describe cómo realizar un diseño D-óptimo por su importancia en la reducción del número de experimentos a realizar en el laboratorio, lo que incide en la reducción del coste, tanto desde el punto de vista económico como medioambiental. Se expone qué es y cómo se obtiene un frente Pareto de soluciones optimales, para finalizar el capítulo hablando de la Tecnología Analítica de Procesos (PAT) y Calidad Diseñada (QbD) y su paralelismo con la AQbD (Calidad Analítica Diseñada) en procedimientos analíticos cuando se utiliza una técnica cromatográfica (HPLC-DAD/HPLC-FLD).

El Capítulo IV, es una mera descripción de la técnica instrumental utilizada en el desarrollo de los trabajos.

Los Capítulos V a VIII, muestran los resultados de la investigación realizada. Todos tienen la misma estructura, un breve resumen, una introducción que contiene una revisión bibliográfica mostrando el estado del arte de la investigación en cada caso, una descripción de la parte experimental, para acabar con los resultados y las conclusiones.

El Capítulo V, describe un procedimiento sencillo para optimizar un método cromatográfico para determinar bisfenol A y fenol, mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Se utiliza un diseño de experimentos de varios factores a diferentes niveles, y en las condiciones optimizadas se determina el contenido de fenol

y BPA migrado desde juguetes utilizando dos simulantes diferentes. Asimismo se han determinado ambos analitos en ampollas de suero fisiológico y bolsas de suero salino para uso médico.

El Capítulo VI a su vez se subdivide en tres epígrafes, con identidad propia cada uno de ellos, pero con un nexo común, el análisis de migrantes en utensilios de resina de melamina-formaldehído.

En el Epígrafe VI.I se recogen los resultados obtenidos de ensayos de migración de melamina y formaldehído y de las cinéticas de migración encontradas para utensilios de cocina de resina de melamina. El trabajo muestra que la cantidad acumulada de melamina y formaldehído alcanzó los límites de migración específica, incluso cuando el número de ciclos realizados no era elevado.

En el Epígrafe VI.II se muestra la importancia del uso de la metodología multivía cuando se analizan matrices complejas, para resolver problemas de interferentes que coeluyen junto a la melamina, que muestran absorción en el mismo rango espectral, en determinaciones realizadas mediante HPLC-DAD. En este caso la matriz proviene de la migración en recipientes de cocina ("melaware") empleando simulante alimentario.

En el Epígrafe VI.III se realiza un análisis para contrastar los valores obtenidos mediante un análisis univariante convencional (utilizando las áreas de pico como respuesta) y los procedentes de la descomposición PARAFAC/PARAFAC2. La comparativa muestra que hay una sobreestimación de la concentración de melamina cuantificada cuando se utiliza un análisis univariante.

El Capítulo VII, muestra un nuevo enfoque basado en la inversión de un modelo PLS2 para buscar un perfil analítico predeterminado (ATP) que se ha aplicado en la determinación de cinco bisfenoles mediante HPLC-DAD. Se logra mediante lo que se conoce como Calidad Analítica Diseñada, es decir, encontrar qué valores de la fase móvil ternaria y del flujo de la misma (factores del procedimiento) han de ser seleccionados para obtener unas características predefinidas en el cromatograma consiguiendo que la resolución entre picos contiguos sea excelente y además un tiempo de análisis corto. En el capítulo se desarrolla por completo desde el diseño del D-óptimo inicial para elegir los cromatogramas con los que construir el modelo PLS2, hasta la inversión del mismo utilizando un algoritmo genético para obtener el frente Pareto de las soluciones óptimas.

El Capítulo VIII, con la metodología puesta a punto en el capítulo anterior se realizan ensayos de migración desde vasos de policarbonato "libre de bisfenol A" según su etiquetado. Se muestra la comparación entre poblaciones (concentraciones) obtenidas de blancos analíticos y las de las muestras resultantes de los test de migración. Esta comparación se ha realizado ajustando las distribuciones de probabilidad para ambas

poblaciones (blancos analíticos y muestras de test de migración) para cada uno de los cinco bisfenoles analizados.

Las conclusiones se recogen en el Capítulo IX de la memoria, figurando al final de la misma las tres publicaciones que han dado origen los trabajos de investigación y otros dos artículos que están en este momento en proceso de revisión, así como los congresos en los que se ha participado y algunos otros trabajos de divulgación científica.

CAPÍTULO II

MARCO LEGAL Y SUSTANCIAS ANALIZADAS

II.1. Migración

II.1.1. Proceso de migración

El término migración se define de forma generalizada como movimiento o desplazamiento, y puede aplicarse en el ámbito de las especies animales, los humanos, la informática y la ciencia [1].

En el campo científico se entiende por migración el movimiento de partículas pequeñas (átomos, iones, moléculas) desde una matriz relativamente estática hacia fuera de la misma. En este proceso ocurre el transporte o transferencia de masa pero también de energía (térmica) e intervienen diversos fenómenos sujetos a un control cinético y termodinámico, algunos físicos como la difusión (que puede describirse mediante la segunda Ley de Fick) o la conducción, pero también químicos como pueden ser las fuerzas de van der Waals [2-4].

Este término por tanto, puede aplicarse al movimiento de contaminantes hacia los alimentos desde cualquier material que se encuentre en contacto con los mismos, entendiendo como "en contacto" la existencia de alguna vía (aunque no signifique implícitamente un contacto físico) a través de la cual se produce la transferencia de masa desde la matriz al exterior [2]. De aquí en adelante el acrónimo FCM se utilizará para hacer referencia a todos los materiales y artículos destinados a entrar en contacto con alimentos, iniciales que provienen del inglés Food Contact Materials.

Existen múltiples factores que influyen en la migración de sustancias químicas desde los FCM a los alimentos, los cuales se pueden agrupar en cinco categorías [3-6]:

- Naturaleza del FCM.

En el proceso de migración pueden influir propiedades como tamaño, forma o grosor del material, cuyos parámetros modifican los coeficientes de partición y de distribución, los cuales dependen a su vez de la concentración del migrante. Además, factores intrínsecos como la naturaleza, localización, movilidad y reactividad molecular, así como el grado de cristalinidad del material, también afectan a la transferencia de masa.

Según la movilidad de los migrantes se puede distinguir tres tipos de materiales [3] (ver Figura II.1).

(A) Materiales impermeables.

Metal, vidrio y cerámica pertenecen a este grupo, que podría considerarse como materiales "duros". No existe migración desde el interior, únicamente se limita a un fenómeno superficial.

(B) Materiales permeables.

En esta categoría se incluyen los materiales "plásticos" como cauchos, elastómeros y plásticos en general. La migración tiene lugar tanto desde la superficie como desde el interior del material.

(C) Materiales porosos.

Este grupo lo forman materiales de papel y cartón, que presentan una estructura a modo de red abierta por cuyos huecos migran con rapidez las moléculas, sobre todo aquellas de bajo peso molecular.

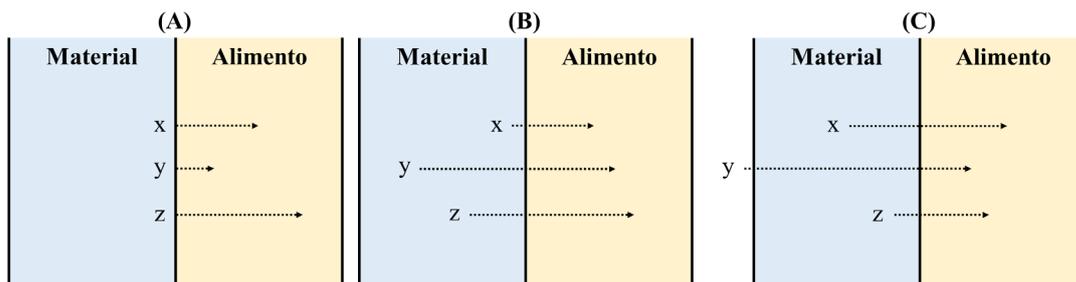


Figura II.1. Clasificación de los materiales en contacto con alimentos según la movilidad de los migrantes desde la matriz hacia el exterior.

Por otro lado, para los FCM multicapa se debe considerar también que la presencia de una capa barrera puede retrasar o evitar que ocurra la migración. Sin embargo, en ocasiones durante la comercialización de estos materiales la superficie de contacto con los alimentos se almacena en contacto con la superficie que no está en contacto con los alimentos, situación que puede dar lugar a la transferencia de sustancias, conocida como migración "set-off" [7].

- Naturaleza del alimento.

Sus propiedades físicas (por ejemplo, el estado líquido o sólido) y químicas son factores determinantes en el proceso de migración. Destaca por ejemplo el contenido en grasa.

- Naturaleza del migrante.

La diferente solubilidad según la categoría de alimento (acuoso, ácido, alcohólico, graso o seco) es uno de los aspectos influyente en el proceso de migración.

- Características del contacto.

En la migración influye el tipo de contacto (directo o indirecto, físico o no), así como la diferencia de viscosidad entre los dos medios (FCM y alimento). La superficie de contacto también es relevante, sobretodo en proporción al volumen del alimento.

- Condiciones del contacto.

El tiempo y la temperatura son los dos factores más importantes dentro de esta categoría. Además, agentes externos como cambios en el oxígeno, la humedad, la luz y la temperatura del ambiente pueden suponer un incremento en la cantidad de sustancias que se transfieran en el proceso de migración.

Los FCM están diseñados para proteger los alimentos de cualquier contaminación externa (microbiológica o química) y para prolongar su vida útil, así como para facilitar su transporte y almacenamiento. Estos materiales se pueden clasificar en 17 categorías: materiales inteligentes, adhesivos, cerámica, corcho, caucho, vidrio, resinas de intercambio iónico, metales y aleaciones, papel y cartón, plásticos, tintas de impresión, celulosa regenerada, siliconas, productos textiles, barnices y recubrimientos, ceras y madera [3,8,9].

Teniendo en cuenta que muchos envases de papel y cartón presentan laminados de plástico en su interior, y también que la mayoría de envases metálicos están recubiertos de materiales poliméricos, se puede considerar que los plásticos es el material más utilizado en los FCM. Este grupo se encuentra además por encima del resto en cuanto a producción y consumo mundial se refiere. Aunque todavía se utilizan materiales tradicionales como el vidrio, el cartón y los metales, las infinitas fórmulas de los plásticos disponibles en la actualidad en cuanto a los componentes y la proporción en que lo forman permiten abarcar un mayor campo de aplicaciones [3,9].

Aunque dentro de los FCM plásticos los envases sean probablemente el ejemplo más destacable, otros materiales entran en contacto con los alimentos durante toda la cadena de suministro: producción, transporte, almacenamiento, preparación o procesamiento, comercialización y consumo. Algunos de ellos pueden ser recipientes de almacenamiento, cintas transportadoras, superficies de preparación de alimentos o utensilios para cocinar y comer [3,4].

Estos plásticos están formados por una base polimérica compuesta por unidades repetidas de monómeros. Si estas unidades son de un solo tipo el plástico es un homopolímero, mientras que será un copolímero cuando la compongan dos o más unidades diferentes [10]. Además, en la fabricación se emplean aditivos (plastificantes, lubricantes, colorantes, estabilizantes, cargas o rellenos, retardantes de llama, agentes espumantes, modificadores de impacto, agentes antiestáticos, antimicrobianos) para obtener unas determinadas propiedades finales del producto, por ejemplo durabilidad y resistencia a la vez que comodidad y ligereza, pero también para simplificar y abaratar el proceso de producción [11,12].

Resumiendo, en cualquier plástico estarán presentes los monómeros y aditivos, todos ellos conocidos por el fabricante. Sin embargo, también forman parte del mismo Sustancias No Añadidas Intencionadamente (NIAS por sus iniciales en inglés). El origen de estas sustancias puede encontrarse en diversas fuentes: impurezas de la

materia prima, subproductos originados en la fabricación del material (isómeros, oligómeros, productos de reacción o de degradación), o contaminantes incorporados también durante la fabricación [2,3,13].

Por tanto, cualquier sustancia que forme parte del FCM puede migrar al alimento, aunque la importancia reside principalmente en los compuestos con tamaño inferior a 1000 Dalton. Además de a los componentes del material propiamente dicho, se debe prestar atención a los elementos incorporados al mismo para la presentación al mercado y/o al consumidor: adhesivos de laminación, adhesivos para etiquetas, recubrimientos, o tintas [3,6].

Con motivo de garantizar la calidad y la seguridad de los alimentos, debe estar controlada cada una de las etapas por las que atraviesan los FCM, es decir, los primeros fabricantes de la materia prima, convertidores de la misma en el material terminado, proveedores del material (minoristas o empresas de suministro), usuario del material (envasador del alimento), minoristas de alimentos, autoridades de ejecución y por último, y no por ello menos importantes, los consumidores (uso adecuado tanto de los alimentos envasados como de los materiales y artículos utilizados en el hogar). Para evaluar la idoneidad del material desde el punto de vista de la migración se realizan ensayos que simulan la transferencia de sustancias del material plástico a los alimentos. En estos ensayos se utilizan simulantes alimentarios acordes a la composición química y propiedades físicas de cada alimento que va a estar en contacto con los FCM, y se desarrollan en las condiciones normalizadas de tiempo y temperatura que reproduzcan el proceso de migración real (condiciones descritas en detalle en la Sección II.1.2) [2,3,14].

Dentro del proceso de migración hay que distinguir la migración global, que hace referencia a la suma de todos los componentes del FCM que se transfieren al alimento, de la migración específica, que supone la determinación de una sustancia concreta. Para asegurar que la presencia de dichos migrantes en los alimentos no conlleva ningún riesgo para la salud, existen límites máximos permitidos tanto para la migración global (OML por sus siglas en inglés) como para la migración específica (SML por sus siglas en inglés) [14].

Además, la aplicación de modelos de difusión reconocidos (ya que no se dispone de modelos para todos los tipos de polímeros utilizados) puede ejecutarse como herramienta adicional en la determinación de la migración específica de una sustancia, evitando así análisis complejos, costosos y prolongados. Tanto la derogada Directiva 2002/72/CE como el vigente Reglamento 10/2011, ambas relativas al ámbito de los FCM, permiten el empleo de estos modelos cuya aplicación puede realizarse siguiendo las correspondientes guías técnicas [15,16]. Actualmente se encuentran disponibles en el mercado programas computacionales, sencillos de manejar, para aplicaciones prácticas de modelado [3]. Sin embargo, hay que decir que

los modelos presentados en algunas de las guías no reproducen muchas veces la realidad, ya que dada la casuística tan amplia es imposible hacer un modelo universal.

II.1.2. Condiciones de ensayo de migración desde FCM

Tal y como describe el reglamento sobre los FCM de plástico [14], el ensayo de migración debe realizarse en condiciones normalizadas de duración, temperatura y medio de ensayo (simulante alimentario) que representen las peores condiciones previsibles de uso del material.

Un simulante alimentario es un medio de ensayo que mimetiza el comportamiento de un alimento durante un proceso de migración a partir de FCM. Están regulados cinco tipos de simulantes [17] (ver Tabla II.1). La elección del simulante más apropiado depende de la composición química y propiedades físicas del alimento en cuestión.

Tabla II.1. Tipos de simulantes establecidos en el Reglamento 10/2011 para realizar el ensayo de migración.

Simulante	Composición
A	Etanol 10% (v/v)
B	Ácido acético 3% (p/v)
C	Etanol 20% (v/v)
D1	Etanol 50% (v/v)
D2	Aceite vegetal (contenido de materia no saponificable < 1%)
E	Poli(óxido de 2,6-difenil-p-fenileno), tamaño de partícula 60-80 malla, tamaño de poro 200 nm (TENAX®)

De manera generalizada, los simulantes alimentarios A, B y C se utilizan para alimentos hidrofílicos (con afinidad por el agua). El simulante B se usa para alimentos con pH inferior a 4.5, y el C para alimentos alcohólicos de graduación menor o igual al 20% y para aquellos que contienen gran cantidad de ingredientes orgánicos. Los simulantes D1 y D2 se usan para alimentos lipofílicos (afinidad por la grasa), el D1 para alimentos alcohólicos con graduaciones superiores al 20% y para aceite en emulsiones acuosas, mientras que el D2 para alimentos que contienen grasas libres en la superficie. El simulante E se emplea para alimentos secos o en polvo.

Además, de manera concreta se encuentran definidos los simulantes que deben emplearse para la determinación de la migración específica en las distintas categorías de alimentos:

- Bebidas: pueden utilizarse los simulantes B, C, D1 y etanol al 95% dependiendo del grado alcohólico y de la turbidez.

- Cereales y derivados: se emplea el simulante E excepto para productos con grasas en la superficie a los que se asigna el simulante D2.
- Dulces: para productos con chocolate se emplea el simulante D2, para productos de confitería C, D2 y E; y para azúcares y derivados los simulantes A y E.
- Frutas y hortalizas: los cinco tipos de simulante pueden utilizarse en función de si es fresca, transformada, en conserva, o son frutos con cáscara, y también del tipo de transformación y conservación.
- Grasas y aceites: se emplea el simulante D2.
- Productos de origen animal y huevos: para pescados y otros productos del mar pueden emplearse los simulantes A, B, C y D2. Sin embargo, para carnes se emplean los simulantes A, B, D1 y D2; y para huevos C y E.
- Productos lácteos: para la leche se utilizan los simulantes D1 y E. Para leche fermentada (yogur) o batida y nata se emplean B y D1; mientras que para queso se puede usar cualquiera, a excepción del simulante C, en función del tipo de corteza, transformación y conservación.
- Productos diversos: en este grupo se incluyen alimentos variados con su respectivo simulante a utilizar, como por ejemplo, vinagre asociado al simulante B, o helados a los que se asigna el simulante C, entre otros productos.

El tiempo y la temperatura de un ensayo de migración juegan un papel muy importante sobre la cantidad que puede migrar durante el proceso. La elección de estos dos factores siempre va de la mano. En función del tiempo y temperatura de contacto previsible durante el uso real, se eligen las condiciones en las que se realizará el ensayo de migración, de acuerdo a la Tabla II.2 [17].

Como se puede observar en las columnas 1 y 2 de la Tabla II.2, para las situaciones en las que el periodo de contacto supera los 30 días, el ensayo de migración puede realizarse de cinco maneras diferentes. Las condiciones de 10 días a 20°C permiten la simulación de congelado durante cualquier tiempo, y las de 10 días a 40°C cubren la situación de congelado y refrigerado durante cualquier tiempo. Por otro lado, para cualquier contacto a temperatura ambiente si la duración es de hasta 6 meses se lleva a cabo el ensayo durante 10 días a 50°C, mientras que si la duración es mayor será durante 10 días a 60°C. Por último, si existiese algún contacto no recogido por las anteriores condiciones se puede aplicar la formula recogida en la fila 15 de la Tabla II.2, donde t es el tiempo y T la temperatura (r: real, e: ensayo), considerando la temperatura ambiente, de refrigeración y de congelado igual 298, 278 y 258 K respectivamente.

Tabla II.2. Condiciones establecidas en el Reglamento 10/2011 para el tiempo de exposición y la temperatura del simulante a los que se debe realizar el ensayo de migración.

Tiempo		Temperatura	
Real	Ensayo	Real	Ensayo
≤ 5 min	5 min	≤ 5°C	5°C
5 min – 0.5 h	0.5 h	5 – 20°C	20°C
0.5 h – 1 h	1 h	20 – 40°C	40°C
1 h – 2 h	2 h	40 – 70°C	70°C
2 h – 6 h	6 h	70 – 100°C	100°C
6 h – 24 h	24 h	100 – 121°C	121°C
1 día – 3 días	3 días	121 – 130°C	130°C
3 días – 30 días	10 días	130 – 150°C	150°C
> 30 días	10 días a 20°C	150 – 175°C	175°C
	10 días a 40°C	175 – 200°C	200°C
	10 días a 50°C	> 200°C	225°C
	10 días a 60°C		

$$t_e = t_r \cdot \exp \left[9627 \left(\frac{1}{T_e} - \frac{1}{T_r} \right) \right]$$

También en la Tabla II.2, se muestra la temperatura a la que debe encontrarse el simulante durante el proceso de migración. Cabe mencionar que las temperaturas de ensayo por encima de 100°C solo se utilizarán para los simulantes D2 y E; mientras que para el resto de simulantes el ensayo se realizará a 100°C pero durante un tiempo de exposición cuatro veces superior al correspondiente establecido.

Además, en un ensayo de migración también intervienen otros aspectos como el tipo de ensayo (teniendo siempre presente que solo las partes de la muestra que estén destinadas a entrar en contacto con alimentos en su uso real se pondrán en contacto con el simulante o el alimento), la preparación de la muestra o material, y el número de exposiciones. En relación a este último aspecto, si el material está destinado a un uso repetido, se realizarán tres exposiciones o ensayos sobre la misma muestra empleando simulante fresco en cada una de ellas. Los resultados obtenidos no deben ser superiores a los obtenidos en las anteriores exposiciones, es decir, la cantidad encontrada para el tercer ensayo debe ser inferior a la del segundo y esta a su vez inferior a la del primero. Sin embargo, si existen pruebas de que no se sobrepasan los límites de migración en el primer ensayo, no serán necesarios los siguientes [18].

Cuando el foco se centra en la migración desde utensilios de cocina, se pueden encontrar diferentes guías técnicas [19-23] las cuales por ejemplo detallan los tipos de ensayo (inmersión o llenado entre otros), los tipos de muestra (artículo entero o parte de él), así como facilitan la elección del tiempo, temperatura y simulante del proceso de migración en función del tipo de utensilio y su uso real.

II.1.3. Sustancias de interés y/o reguladas

Como ya se ha descrito, existen gran cantidad de sustancias que pueden estar presentes en los FCM y por tanto migrar a los alimentos. De entre todas ellas, varias familias de compuestos captan especialmente la atención (no sólo por parte de los organismos responsables de la salud sino también de los fabricantes y consumidores de estos materiales) con motivo de su alto potencial de migración y sus posibles efectos tóxicos, carcinogénicos o disruptores endocrinos. Estos compuestos pertenecen a las familias de alquiflenoles, ftalatos, bisfenol A y compuestos relacionados, filtros ultravioleta, fotoiniciadores de tinta, compuestos perfluorados, aminas primarias aromáticas, nanopartículas y NIAS [6]. En los trabajos descritos en las Ref. [24-26] se determinan algunos de ellos. Sin embargo, no todas ellas se encuentran reguladas.

Tras la derogación de las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE, los materiales en contacto con alimentos se encuentran regulados por los Reglamentos europeos 1935/2004 y 2023/2006. Mientras que el último [27] hace referencia a la buena praxis en la fabricación de estos materiales, en el primero [8] se recoge un listado de los 17 grupos en los que se pueden dividir los FCM (enumerados en la Sección II.1.1) y se detalla la viabilidad de elaborarse medidas específicas (europeas o nacionales) para cada uno de los grupos.

De las 17 categorías, citadas anteriormente, únicamente existen medidas específicas europeas para 4, que son: materiales inteligentes [28], cerámica [29,30], celulosa regenerada [31] y plásticos (Ref. [14] para plásticos y Ref. [32] para plásticos reciclados).

Como medida específica nacional, en España se formuló un decreto, en 2011, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos [33] mediante el que se regulan los materiales poliméricos relacionados con las categorías de adhesivos, cauchos y elastómeros, resinas de intercambio iónico, siliconas, barnices y revestimientos y ceras. Adicionalmente el Consejo Europeo, en el 2016, desarrolló ciertas políticas referentes a los grupos corcho, cauchos y elastómeros, vidrio, resinas de intercambio iónico, metales y aleaciones, papel y cartón, tintas de impresión, siliconas, barnices y revestimientos y madera [34].

Por otro lado, en el 2018, se elaboraron regulaciones para alguna sustancia y/o FCM concreto como ocurre con el bisfenol A en recubrimientos de FCM [35] o en biberones de policarbonato [36], derivados epoxi en FCM [37], sustancias que pueden transformarse en o son ya N-nitrosaminas en FCM de caucho [38], o FCM que contengan el monómero cloruro de vinilo [39].

Otros documentos oficiales a tener en cuenta en la migración desde los FCM son por ejemplo el reglamento sobre contaminantes alimenticios [40], así como la última recomendación europea sobre FCM [41] que es del año 2019.

II.1.4. Migración desde otros materiales

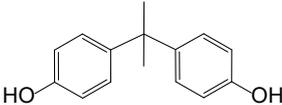
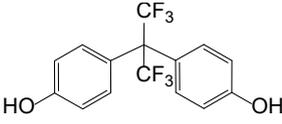
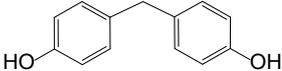
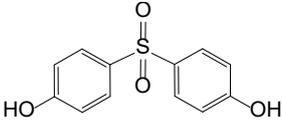
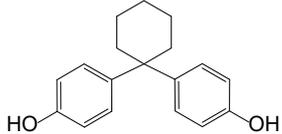
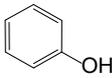
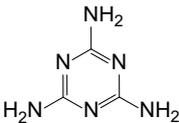
De la misma manera que se aplica el término de migración a la transferencia de sustancias desde los FCM al alimento, este proceso puede tener lugar en otros objetos de uso cotidiano, siendo estos por tanto, fuentes adicionales de introducción de sustancias indeseables al organismo o al medio ambiente.

A continuación se citan algunos ejemplos de materiales desde dónde puede ocurrir el proceso de migración. i) Cosméticos, productos de cuidado personal o productos farmacéuticos: el proceso de migración ocurre desde el envase hasta el producto [42]. ii) Juguetes: transferencia de sustancias desde el propio juguete, actuando como vía de ruta la saliva de bebés y niños [43]. iii) Papel térmico: exposición dérmica a la migración de compuestos utilizados tanto en la tinta de impresión de tickets de compra (para los cuales se emplea el papel térmico) como del propio papel [44]. iv) Ropa: el contacto a través de la piel hace posible la migración [45]. v) Mobiliario: en estas situaciones en la que la exposición es dérmica, el sudor es un factor a tener en cuenta en el proceso de migración [46]. vi) Material dental: en ocasiones se utilizan resinas en aplicaciones dentales, por lo cual, cualquier compuesto presente en ellas puede migrar [47]. vii) Dispositivos médicos: muchos elementos utilizados en sanidad se fabrican con plástico, por tanto, todo lo comentado previamente para FCM de plástico puede aplicarse a este modo de migración [48]. viii) Material para inseminación artificial en ganadería: la migración de algunos componentes desde el material empleado (también de plástico) para esta práctica afecta a la fertilidad [49].

II.2. Familias de compuestos analizados

Esta sección se ha estructurado en función de los posibles efectos sobre el organismo derivados de la exposición a migrantes. Las diferentes sustancias determinadas en muestras de migración a lo largo de todo el periodo doctoral (ver resumen en Tabla II.3) se han dispuesto en agentes mutagénicos, agentes carcinogénicos y disruptores endocrinos.

Tabla II.3. Resumen de las sustancias determinadas en muestras de migración a lo largo de todo el periodo doctoral.

Nombre	CAS	Estructura
Bisfenol A	80-05-7	
Bisfenol AF	1478-61-1	
Bisfenol F	620-92-8	
Bisfenol S	80-09-1	
Bisfenol Z	843-55-0	
Fenol	108-95-2	
Formaldehído	50-00-0	
Melamina	108-78-1	

II.2.1. Agentes mutagénicos. Fenol

La mutagenicidad se refiere a la inducción de cambios transmisibles permanentes en la cantidad o estructura del material genético de células u organismos. Estos cambios irreversibles pueden involucrar un solo gen o segmento de gen, un bloque de genes o cromosomas completos [50-52].

El tipo de célula dónde ocurre el cambio genético determina el alcance de la mutación, es decir, una mutación en las células germinales de un organismo que se reproduce sexualmente puede transmitirse a la descendencia, mientras que una mutación en las células somáticas puede transferirse solo a las células hijas [51,53].

Las mutaciones en las células somáticas pueden causar cáncer si afectan a la función de genes específicos encargados de la supresión de tumores o de respuesta al daño del ADN. La acumulación de daño en el ADN en este tipo de células puede conducir a afecciones degenerativas, como el envejecimiento acelerado, la disfunción inmunológica, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. En cuanto a las células germinales, el daño en el ADN puede provocar abortos espontáneos, infertilidad, malformación o daño hereditario en las generaciones futuras que origina enfermedades genéticas, como síndrome de Down, hemofilia y fibrosis quística [50,54].

Frecuentemente los términos mutagénico y genotóxico se usan de manera indistinta, pero se debe aclarar que no son lo mismo. La mutagenicidad está englobada en la genotoxicidad. Por ello, genotoxicidad es un término más amplio que hace referencia a procesos que alteran la estructura, el contenido de información o la segregación del ADN y no están necesariamente asociados con mutagenicidad. Tanto es así, que los eventos genotóxicos no siempre conducen a mutagenicidad (cambios irreversibles), e incluso pueden no tener efectos perceptibles o duraderos en la célula [50-53].

Los ensayos de mutagenicidad permiten identificar sustancias que pueden causar alteraciones genéticas en células somáticas y/o germinales. Teniendo en consideración el resultado de estos ensayos, además del grado de daño por mutaciones que pueden producir estos agentes y la frecuencia y el alcance de la exposición humana, se han desarrollado guías técnicas [52,55] y regulaciones [56-58] por parte de las autoridades competentes [50].

Los datos de mutagenicidad se utilizan en todo el mundo en la toma de decisiones regulatorias para: i) la aprobación y registro de plaguicidas (pesticidas y biocidas), productos farmacéuticos, dispositivos y productos de uso médico, ingredientes de aditivos alimentarios, productos químicos industriales, cosméticos y nanomateriales; y ii) el establecimiento de estándares para niveles aceptables de exposición en el aire, el agua y los alimentos [50,51].

La clasificación de agentes mutagénicos establecida por la Unión Europea agrupa a estas sustancias o mezclas en las siguientes categorías [58]:

- Categoría 1A: Sustancias de las que se sabe que inducen mutaciones hereditarias en las células germinales humanas en base a pruebas en humanos.

Hasta el momento ningún compuesto está clasificado en esta categoría.

- Categoría 1B: Sustancias de las que se considera que inducen mutaciones hereditarias en las células germinales humanas en base a pruebas en animales.

A esta categoría pertenecen sustancias como el benceno (empleado en la fabricación de plásticos, resinas y fibras sintéticas; y en lubricantes, tintes,

detergentes y pesticidas) y el benzo(α)pireno (puede encontrarse en diversos alimentos debido al proceso de elaboración o cocinado de los mismos).

- Categoría 2: Sustancias que son motivo de preocupación porque pueden inducir mutaciones hereditarias en las células germinales humanas en base a pruebas en animales.

En este grupo se encuentran clasificados la hidroquinona (se utiliza en la fabricación de colorantes, en el revelado fotográfico y puede encontrarse en productos de bronceado artificial o de uñas) o el fenol (empleado en cosméticos, en la producción de laminados decorativos, o como monómero en resinas fenólicas para la fabricación de madera aglomerada para juguetes).

Centrando la atención en la categorización del fenol, cabe citar las regulaciones europeas implicadas en dicho proceso. En 1994 fue recogido en la primera lista de sustancias prioritarias que requieren atención para evaluar su riesgo [59]. Años más tarde, en febrero de 2008, la Unión Europea publicó documentos tanto de la evaluación del riesgo [60] como de las medidas de reducción del riesgo [61]. Así, a finales del mismo año se incluía al fenol en la categoría 2 de la clasificación de mutagenicidad [58]. En gran parte motivado por la pertenencia del fenol a la categoría 2, existen diversas normativas europeas (descritas en la Sección II.3.1) que regulan el empleo del fenol en múltiples ámbitos y/o aplicaciones.

II.2.2. Agentes carcinogénicos. Melamina y formaldehído

Los agentes carcinogénicos son aquellas sustancias químicas o mezclas de éstas que inducen cáncer, aumentan la incidencia y/o malignidad de tumores, o acortan el tiempo de aparición de los mismos. Las vías de exposición a carcinógenos son las habituales: inhalación, ingesta, cutánea e inyección [52,62].

Algunos factores como el individuo que estuvo expuesto, la dosis que recibió y la ruta, duración y frecuencia de la exposición condicionan el efecto que un carcinógeno puede ejercer sobre el organismo. Pero también se deben considerar los factores genéticos, más complicados de evaluar pero que suponen un factor importante en el riesgo a desarrollar cáncer [52,53].

De manera simplificada, la carcinogénesis es debida a una serie de factores exógenos: agentes químicos, físicos o biológicos, así como de factores endógenos: factor hereditario, factor inmunitario, factores hormonales que pueden estar modificados por cambios en el estilo de vida y factores nutritivos muy relacionados con la alimentación y hábitos como tabaco o alcohol. Incluso hay autores que afirman que una enfermedad está relacionada no solo con la interacción de varios agentes causales y las respuestas biológicas del organismo, sino también con los factores sociales, culturales y psicológicos y con los patrones de práctica médica en la comunidad. Además, otro

aspecto importante es la exposición simultánea a varios agentes, sobre la que existen estudios que muestran efectos multiplicativos sobre el individuo [63,64].

Aunque existen diferentes teorías sobre el origen del cáncer, la que actualmente presenta mayor fuerza es la que considera un proceso de al menos tres etapas: iniciación, promoción y progresión. En base a esta teoría existen agentes iniciadores, promotores y carcinógenos completos (inducen cáncer por sí mismos ya que presentan propiedades de iniciación y promoción, y algunos además también de progresión) [53,63,64].

La identificación de los agentes carcinogénicos se realiza a través de estudios epidemiológicos, experimentos con animales y otros medios que pueden incluir análisis cuantitativos de relaciones estructura-actividad y extrapolación de sustancias estructuralmente similares. La valoración conjunta de los datos experimentales obtenidos y la evaluación del riesgo conlleva la elaboración, por parte de los organismos pertinentes, de regulaciones sobre aire, agua, alimentación (aditivos e impurezas), biocidas o suelo [52,53]. En las Secciones II.3.2 y II.3.3 se citan algunas regulaciones para dos compuestos concretos.

Existen dos clasificaciones de agentes carcinógenos, dependiendo del organismo encargado de regularlas: el Parlamento y el Consejo Europeos o la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés). La clasificación establecida por la Unión Europea [58] agrupa a estas sustancias o mezclas en las siguientes categorías:

- Categoría 1A: Sustancias que se sabe que son carcinógenos para el hombre en base a pruebas en humanos.

En esta categoría se incluye el benceno (ya mencionado).

- Categoría 1B: Sustancias que se supone que son carcinógenos para el hombre en base a pruebas en animales.

A este grupo pertenece el formaldehído (principalmente utilizado en la producción de resinas, además se puede encontrar en materiales aislantes o en barnices, pinturas y colas).

- Categoría 2: Sustancias que se sospecha que son carcinógenos para el hombre en base a pruebas en humanos y en animales.

En este grupo se encuentra clasificada la anilina (se emplea en plaguicidas, pinturas, polímeros, fármacos, industria textil y materiales en contacto con alimentos).

Sin embargo, la clasificación realizada por la IARC establece cuatro categorías. Además, la agencia indica que tanto para los agentes pertenecientes al grupo 3 como para los no clasificados no se debe suponer la premisa de no carcinogenicidad y

tampoco la de seguridad general. Habitualmente la incorporación de una sustancia en la categoría 3 significa que se necesita más investigación [65,66].

- Grupo 1: Carcinógeno para los seres humanos.
 - i) Sustancias con suficiente evidencia en humanos. ii) Sustancias con menos que suficiente evidencia en humanos pero suficiente en animales, y actúa a través de un mecanismo relevante para humanos.

En este grupo se incluye el formaldehído (ya mencionado).

- Grupo 2A: Probablemente carcinógeno para los seres humanos.
 - i) Sustancias con limitada evidencia en humanos pero suficiente en animales.
 - ii) Sustancias con inadecuada evidencia en humanos pero suficiente en animales, y actúa a través de un mecanismo que también se lleva a cabo en humanos.

A esta categoría pertenece la anilina (ya mencionada).

- Grupo 2B: Posiblemente carcinógeno para los seres humanos.
 - i) Sustancias con limitada evidencia en humanos y menos que suficiente en animales. ii) Sustancias con inadecuada evidencia en humanos pero suficiente en animales. iii) Sustancias con inadecuada evidencia en humanos y limitada en animales, de las que se aportan evidencias de otros datos relevantes.

En este grupo se encuentra la melamina (su uso habitual es la síntesis de resina de melamina-formaldehído entre cuyas aplicaciones se encuentran la fabricación de muebles, adhesivo para hacer madera aglomerada y contrachapada y elaboración de utensilios de cocina).

- Grupo 3: No clasificable en cuanto a su carcinogenicidad en humanos.
 - i) Sustancias con inadecuada evidencia en humanos e inadecuada o limitada en animales. ii) Sustancias con inadecuada evidencia en humanos pero suficiente en animales, y el mecanismo de actuación no se produce en humanos.

En esta categoría está recogida la atrazina (generalmente utilizada como herbicida).

Focalizando la revisión hacia los compuestos melamina y formaldehído, ambos han sufrido cambios en su clasificación en cuanto a carcinogenicidad se refiere. En el caso de la melamina, la cual no se encuentra en ninguna categoría de la clasificación de la Unión Europea [58], inicialmente estaba considerada como sustancia no clasificable (grupo 3 de la IARC) [67] hasta que en el año 2019 fue incluida en la categoría 2B como posible carcinógeno para humanos [68]. En cambio el formaldehído ha sido clasificado por ambas instituciones. La Unión Europea comenzó considerando este compuesto como sospechoso carcinógeno (grupo 2) [58] para después incluirlo en la categoría 1B de sustancias que se supone que son carcinógenos [69]. Desde IARC el formaldehído se evaluó como probable carcinógeno para los seres humanos

(categoría 2A) [67] hasta 2006, cuando pasó a ser considerado carcinógeno para los seres humanos (grupo 1) [70].

II.2.3. Disruptores endocrinos. Bisfenol A

Un compuesto disruptor endocrino (EDC por sus siglas en inglés) se define como un agente químico exógeno, o mezcla de varios, que interfiere en las funciones habituales de las hormonas. La complejidad del sistema endocrino no facilita el estudio y la comprensión del mecanismo de actuación de los EDC, pero aun así hay diversos aspectos que actualmente se conocen en el ámbito científico [71].

Las hormonas naturales del cuerpo actúan de manera coordinada y son las encargadas de la regulación de numerosos procesos biológicos como el desarrollo, el crecimiento, la reproducción, el metabolismo, la inmunidad. Según su estructura química se pueden distinguir tres grupos de hormonas: amínicas, peptídicas o proteicas y esteroideas. Numerosos contaminantes ambientales presentan similitudes estructurales con las hormonas esteroideas y compiten por la unión a los receptores hormonales, en concreto, los estudios recogen sobretudo la actividad de los EDC en relación a los estrógenos, los andrógenos y las hormonas tiroideas [72].

La exposición a los EDC no se relaciona directamente con la muerte ya que la mayoría de estos compuestos no están considerados como letales ni cancerígenos. A pesar de ello, las alteraciones que provocan en el sistema endocrino pueden conllevar la aparición de enfermedades en el propio individuo (generalmente mucho después de producirse la exposición) y también en sus hijos y sucesivas generaciones [71,73].

En los efectos producidos por la exposición a EDC influyen muchos factores. Algunos pueden considerarse obvios, como el tiempo o la edad de exposición (feto, prenatal, bebé, niño, adolescente, adulto). Sin embargo, hay otros aspectos relevantes, por ejemplo, si la exposición ha sido frente a un solo agente o a una mezcla de compuestos EDC, o las consecuencias a largo plazo y en generaciones posteriores derivadas de la exposición. Además, hay que tener en cuenta que la respuesta es diferente en cada individuo o tejido afectado, y también que pequeñísimas dosis pueden generar efectos adversos [74].

Los EDC actúan generalmente imitando a las hormonas naturales, pero hay compuestos que se oponen al funcionamiento de las mismas, impidiendo o modificando la actividad habitual de las hormonas, provocando ambas actuaciones la aparición de enfermedades. Estas enfermedades, como ya se ha comentado están asociadas al desarrollo y funcionamiento de los sistemas reproductivo, neurológico, cardiovascular, respiratorio e inmunológico. Un gran registro de éstas se relacionan con la reproducción: disminución de la capacidad reproductiva y mayor riesgo de cáncer de próstata o de testículo en hombres; mayor riesgo de endometriosis, cáncer de mama y alteraciones en el ciclo menstrual en mujeres. Anomalías en los patrones

de crecimiento, efectos adversos en el sistema tiroideo y óseo, obesidad o diabetes, son otros tipos de alteraciones que pueden aparecer a causa de la exposición a los EDC [75,76].

La exposición del ser humano a los EDC se produce a través de las vías habituales: ingestión (la cadena alimentaria, teniendo en cuenta la bioacumulación de los EDC a lo largo de los niveles tróficos), inhalación (de gases, polvo y partículas en el aire, además de la exposición laboral) o dérmica. Pero estos compuestos también se pueden transferir al feto durante el embarazo a través de la placenta, o a un bebé a través de la leche materna [71,77].

Estos compuestos están contenidos en numerosos productos de uso diario. Están presentes en alimentos y envases (de plástico y metal), cosméticos, productos de cuidado personal y para el hogar, pesticidas y herbicidas, productos farmacéuticos y dietéticos, textiles y juguetes, y dispositivos médicos y dentales. Parabenos, ftalatos, alquilfenoles, dioxinas, triclosan o bisfenol A (BPA) son algunos de los compuestos clasificados como EDC [71,78].

Por tanto, la exposición a los EDC es de tal magnitud que resulta inevitable la creciente preocupación que existe al respecto desde hace varias décadas. En 1999 se aprobó en Europa una estrategia comunitaria relacionada con los EDC [79], proponiéndose la presentación de informes periódicos por parte de la Comisión Europea sobre los avances efectuados en los campos de investigación, cooperación internacional, información pública y adopción de medidas políticas adecuadas.

En años posteriores se fueron publicando los correspondientes informes sobre los progresos realizados (2004, 2007, 2011, 2016, 2018, 2019), emitiendo el primero de todos ellos en 2001 [80]. En él se incluyó una lista provisional de sustancias con evidencias (potenciales o efectivas) de comportamiento disruptor endocrino, categoría 1, en la que se encontraba clasificado el BPA. Sin embargo, para otros bisfenoles como BPF y BPAP no se disponía de datos suficientes para categorizarlos de EDC. Años más tarde, en 2007, se clasificó al BPF en la categoría conjunta 3a y 3b [81], continuando siendo considerado como sustancia sin datos o insuficientes en cuanto a efectos disruptores endocrinos se refiere.

Gracias a todo el esfuerzo realizado por la comunidad científica y a la actuación de los dirigentes europeos, desde el año 2017, existen regulaciones específicas para la identificación de EDC en biocidas [82] y en productos fitosanitarios desde 2018 [83]. Pese a que para otras fuentes de exposición, como materiales en contacto con alimentos (FCM), cosméticos o juguetes, no hay disposiciones para los EDC de forma general, sí existen normativas reguladoras individuales para sustancias con actividad endocrina (para el ejemplo del BPA éstas se recogen en la Sección II.3.4).

II.3. Normativas

II.3.1. Fenol

Aunque el fenol es un compuesto que no está considerado ni carcinógeno [84] ni disruptor endocrino [80], entre otros efectos presenta mutagenicidad en humanos en base a pruebas realizadas en animales [58], como se detalla en la Sección II.2.1.

Debido a los peligros que entraña la exposición al fenol, su utilización en distintos productos de uso cotidiano así como su presencia en el entorno laboral o su emisión al medioambiente se encuentran regulados por las correspondientes normativas europeas (citadas en los párrafos siguientes).

II.3.1.1. Juguetes

Inicialmente (año 2009) el empleo del fenol en juguetes no presentaba ningún tipo de restricción [85]. Sin embargo, desde 2017 [86] se ha limitado tanto su contenido en el juguete (10 mg L^{-1}) como su migración (5 mg L^{-1}), ya que como indica esta directiva el fenol puede liberarse desde diversos tipos de juguetes como consolas, juguetes fabricados en madera o PVC, o los destinados para el baño, entre otros.

II.3.1.2. Alimentación

Dentro de este apartado se engloban las regulaciones referidas a tres aspectos de la alimentación: i) materiales en contacto con alimentos (FCM), ii) sustancias aromatizantes y iii) aditivos de alimentos para perros y gatos.

Como ya se ha descrito en la Sección II.1.3, el Reglamento 10/2011 es una regulación específica para FCM plásticos, a través del cual se permitió el empleo del fenol como monómero sin imposición de SML, aplicándose por tanto el límite genérico de migración específica de 60 mg kg^{-1} [14]. Sin embargo, en la modificación publicada en 2015 [87] se establece el SML en 3 mg kg^{-1} para el fenol migrado desde FCM de plástico. Recientemente, en 2019 la Unión Europea emitió la recomendación de someter a ensayo artículos de plástico para mesa o cocina, materiales barnizados o revestidos, y materiales de envasado de plástico, papel y cartón impresos para la determinación de fenol [41].

En relación al reglamento que regula las sustancias aromatizantes empleadas en alimentos [88], el fenol se encuentra recogido en la clasificación de compuestos autorizados elaborada por las autoridades europeas siempre que la pureza de la sustancia sea como mínimo del 95% y pudiendo ser utilizada en cualquiera de las categorías de alimentos [89].

Por otro lado, desde la entrada en vigor del Reglamento 1076/2014 hasta el año 2024 está permitido el uso de aroma de humo, con un contenido de fenol entre 0.5 y 1.2%, como aditivo en alimentos para perros y gatos [90].

II.3.1.3. Cosméticos

En 1976 la regulación europea en materia de cosmética declaró al fenol sustancia prohibida pero con la excepción de poder ser empleado en jabones y champús con un contenido máximo del 1% y con la especificación de "contiene fenol" en la etiqueta [91]. Esta directiva fue derogada por el Reglamento 1223/2009 [92] con el que la utilización del fenol en cosméticos quedó prohibida completamente, medida que entró en vigor en 2010 en lugar de en 2013 debido a la clasificación del fenol como mutágeno de categoría 2 [58].

II.3.1.4. Exposición laboral

La exposición profesional se reguló con la directiva del año 2009 [93], que estableció un límite, teniendo en cuenta el volumen del habitáculo y las horas de exposición, de 8 mg m^{-3} y 2 mL m^{-3} en un periodo de 8 horas, y también un límite máximo de 16 mg m^{-3} y 4 mL m^{-3} en un periodo de 15 minutos y por encima del que no debe producirse ninguna exposición. También se indicó que existe la posibilidad de absorción transcutánea del fenol.

Además, al considerarse mutágeno de categoría 2 [58], se debe evitar la exposición al fenol de trabajadoras embarazadas, que hayan dado a luz o se encuentren en período de lactancia [94] y está prohibida la exposición de jóvenes (trabajador menor de 18 años) [94,95].

II.3.1.5. Biocidas

Durante décadas se ha permitido el empleo de biocidas que contenían fenol, ya que inicialmente se había incluido en el listado de sustancias activas existentes comercializadas como biocidas antes del 14 de mayo de 2000 [96], y posteriormente se encontraba incluido en el listado de sustancias activas autorizadas [97]. Sin embargo, en el reglamento emitido el año 2012 [98] se explica que los biocidas no contienen ninguna sustancia de posible riesgo, motivo por el que se excluyó al fenol de la clasificación de sustancias activas al ser un agente mutagénico de clase 2 [58], y por tanto, desde la entrada en vigor en 2013 está prohibido el fenol en biocidas.

II.3.1.6. Contaminantes

La diversidad de aplicaciones del fenol está implícitamente relacionada con una mayor producción y por tanto puede suponer un flujo importante para la contaminación ambiental. El contenido de fenol emitido, cuantificado como masa total de fenol y fenoles simples sustituidos expresada como carbono total, se encuentra limitado a 20 kg año⁻¹ tanto en agua como en suelo, sin embargo no existen restricciones para la atmósfera [99].

II.3.1.7. Otros

Existen otro tipo de regulaciones que no corresponden a la limitación del fenol, pero que hacen referencia a su empleo en productos agrícolas e industriales, como ocurre con el polímero en polvo con código NC: ex 3909 40 00, cuyo contenido de fenol es inferior al 5% [100].

II.3.2. Melamina

En el reglamento sobre clasificación, etiquetado y envasado (CLP por sus siglas en inglés) de sustancias y mezclas se recogen las categorías de los diversos tipos de peligro en las que se encuentran clasificados los compuestos [58]. En este reglamento no consta entrada para la melamina, por tanto, su peligrosidad puede considerarse debida básicamente a la consideración de la IARC como posible carcinógeno para humanos, grupo 2B (ver Sección II.2.2). Pese a no ser un compuesto relacionado con más de una clase de peligro, se han encontrado diversas regulaciones en relación al empleo de la melamina en diferentes sectores.

II.3.2.1. Textil

El empleo de melamina en la industria textil se encuentra regulado desde 2009 [101] al ser incluida en la lista de fibras textiles del Anexo I de la Directiva 2008/121/EC, y descrita como fibra formada por al menos un 85% en masa de macromoléculas reticuladas compuestas por derivados de melamina. La melamina con aplicación de fibra textil también fue contemplada en el reglamento vigente publicado en el año 2011 [102] que derogó ambas directivas antes mencionadas.

II.3.2.2. Alimentación

Este apartado recoge las regulaciones sobre tres elementos vinculados al sector alimenticio: i) materiales en contacto con alimentos (FCM), ii) contaminantes alimenticios y iii) sustancias indeseables en alimentación animal.

Para los FCM de plástico, inicialmente se impuso un límite de migración para la melamina de 30 mg kg^{-1} [14]. También en 2011 con solo unos meses de diferencia, se publicó una modificación que reducía el límite a 2.5 mg kg^{-1} [103]. Además existe una recomendación de la Unión Europea de someter a ensayo artículos de plástico para mesa o cocina, incluyendo aquellos de plástico no convencional como los vasos de café reutilizables que utilicen aditivos en el plástico derivados de fuentes naturales (como el bambú), para la determinación de melamina [41]. Sin embargo, para los FCM de película de celulosa regenerada, el contenido de melamina (empleada en películas del tipo no recubiertas como aditivo de tercera clase con función de agente de anclaje) no puede ser superior a 0.3 mg dm^{-2} [104].

Por otro lado, como consecuencia del hallazgo de pruebas consistentes sobre la adulteración de piensos y preparados para lactantes (niños menores de 12 meses) con melamina, existe un reglamento relativo a contaminantes alimenticios que regula el contenido de melamina en el alimento [105] desde julio de 2012. Se estableció un límite máximo de 1 mg kg^{-1} en preparados en polvo para lactantes y de continuación y de 2.5 mg kg^{-1} para el resto de alimentos. Para el resto de alimentos no se aplicará el límite establecido cuando se pueda demostrar que el contenido de melamina es debido al uso autorizado de ciromazina (cuya estructura química es muy parecida a la de la melamina) como insecticida y que el contenido de melamina no supera al de ciromazina.

En cuanto a la alimentación animal, también se han impuesto limitaciones al contenido de melamina. Así bien, el límite máximo de melamina (considerando un 12% de humedad) en piensos y alimentos enlatados para animales de compañía es de 2.5 mg kg^{-1} [106].

II.3.2.3. Cosméticos

El empleo de melamina en productos de cosmética está permitido ya que no existe entrada para dicho compuesto en la lista de sustancias prohibidas [92]. Se utilizaba en la fabricación de resinas de urea-melamina-formaldehído y de melamina-formaldehído cuya función consistía en controlar la viscosidad y formar películas respectivamente [107]. Esta última regulación ya no se encuentra vigente, pero aun así, la melamina polimerizada sigue siendo utilizada en cosméticos según puede verse en esta Decisión 2019/701 [108].

II.3.2.4. Otros

También se han publicado regulaciones que hacen referencia a la presencia de melamina como componente de varios productos agrícolas e industriales. Este es el caso de la mezcla de polímeros con código NC: ex 3909 20 00, cuyo contenido de

resina de melamina-formaldehído está entre 60 y 75%; o de la hoja reflectante con código NC: ex 3919 10 80, que cuenta una capa de resina acrílica endurecida por un agente reticulante de melamina [109].

II.3.3. Formaldehído

Con motivo de las múltiples aplicaciones del formaldehído [110] y teniendo en cuenta su peligrosidad [111] por estar considerado carcinógeno por la IARC y supuesto carcinógeno por la Unión Europea (Sección II.2.2), además de ser una sustancia motivo de preocupación porque puede inducir mutagenicidad (grupo 2) [69], los organismos responsables han elaborado las regulaciones pertinentes para reducir el nivel de exposición de la población e incluso en algunos sectores o aplicaciones industriales eliminarlo completamente.

II.3.3.1. Juguetes

Teniendo en cuenta que desde 1987 el formaldehído ya estaba considerado como probable carcinógeno para humanos [67], la restricción de su empleo en juguetes ha tardado mucho hasta imponerse en 2019 [112]. La vigente directiva limita la migración desde materiales poliméricos a 1.5 mg L^{-1} , la emisión desde madera ligada con resina a 0.1 mL m^{-3} , el contenido en materiales textiles, de cuero y de papel a 30 mg kg^{-1} , y el contenido en materiales de base acuosa a 10 mg kg^{-1} .

II.3.3.2. Materiales en contacto con alimentos (FCM)

Para los FCM de plástico la migración de formaldehído está limitada a 15 mg kg^{-1} [14] y además, al igual que ocurre con la melamina, se recomienda someter a ensayo artículos para mesa o cocina (incluyendo los fabricados con plástico no convencional) [41]. Por otro lado, el contenido de formaldehído se encuentra limitado a 0.5 mg dm^{-2} para los FCM de película de celulosa regenerada no recubiertas [104].

II.3.3.3. Cosméticos

En materia de cosméticos el formaldehído estaba prohibido tanto en la Directiva 76/768/EEC [91] como en el reglamento que sustituyó a ésta [92]. Sin embargo ambos documentos contemplaban excepciones, permitiendo el uso de formaldehído como: i) endurecedor de uñas con un contenido máximo del 5% y en cuya etiqueta debe indicarse dicho contenido si es superior a 0.05%; ii) conservante en productos bucales (excepto aerosoles) con un contenido máximo del 0.1%; y iii) conservante en otros productos con un contenido máximo del 0.2%. La modificación publicada

en 2019 [113] elimina las excepciones antes permitidas, prohibiendo totalmente el empleo del formaldehído en cosméticos.

II.3.3.4. Exposición laboral

La protección de los trabajadores expuestos a agentes carcinógenos o mutágenos está vinculada a la Directiva 2004/37/EC [114], la cual limita la exposición a serrines de maderas duras a 5 mg m^{-3} en aire en un periodo de 8 horas. La vinculación del formaldehído con esta regulación reside en que las resinas de formaldehído son utilizadas para la fabricación de maderas duras [115].

En 2019 se publicó una modificación de la directiva en la que se estableció para el formaldehído un límite de 0.37 mg m^{-3} y 0.3 mL m^{-3} en un periodo de 8 horas, y también un límite máximo de 0.74 mg m^{-3} y 0.6 mL m^{-3} en un periodo de 15 minutos y por encima del que no debe producirse ninguna exposición. Además se indica que existe la posibilidad de provocar sensibilización cutánea e incluye la excepcionalidad para los sectores de asistencia sanitaria, funeraria y embalsamamiento hasta 2024 de 0.62 mg m^{-3} y 0.5 mL m^{-3} en un periodo de 8 horas [116].

Asimismo, se debe evitar la exposición al formaldehído de trabajadoras embarazadas, que hayan dado a luz o se encuentren en período de lactancia [94] y está prohibida la exposición de jóvenes trabajadores [47,95] con motivo de ser carcinógeno y mutágeno de categorías 1B y 2 respectivamente [69].

II.3.3.5. Biocidas

El empleo de formaldehído en biocidas ha estado permitido a lo largo de varios años. Inicialmente se había incluido en el listado de sustancias activas existentes comercializadas como biocidas antes del 14 de mayo de 2000 [96]. En modificaciones posteriores, siendo la primera en 2005 [117], se puso de manifiesto la necesidad de incluir al formaldehído como sustancia que debe ser examinada en trece tipos de productos (los tipos 1-6, 9, 11-13, 20, 22 y 23 del Anexo V de la Ref. [98]).

En diferentes años se publicaron las Decisiones de la Comisión (2008/681/EC, 2010/675/EU, 2011/391/EU y 2013/204/EU) cuya resolución fue la de no permitir el formaldehído en biocidas de los tipos de productos 1, 4-6, 9, 11-13, 20 y 23. La última modificación vigente respecto al formaldehído [118] continúa proponiéndolo como sustancia que debe examinarse en los tipos de productos 2 (desinfectantes y alguicidas no destinados a aplicarse directamente a personas o animales), 3 (higiene veterinaria) y 22 (líquidos para embalsamamiento y taxidermia).

A pesar de ello, el Reglamento 528/2012 [98] prohíbe indirectamente el uso de formaldehído en biocidas por pertenecer al grupo 1B de carcinogenicidad [69] desde 2014.

II.3.3.6. Contaminantes

El formaldehído es un compuesto orgánico volátil (VOC por sus siglas en inglés), grupo que está considerado como un tipo de sustancias precursoras de ozono. Este ozono emitido a la atmósfera se conoce como ozono troposférico y es un importante contaminante. Por tanto, desde la Unión Europea [119] se recomienda la medición del formaldehído y el seguimiento de la evolución de los valores.

II.3.3.7. Otros

En regulaciones sobre el arancel aduanero de productos agrícolas e industriales también se hace referencia al formaldehído, presente por debajo de 14 mg kg^{-1} en el ácido vanílico [120].

En los Países Bajos está autorizado el uso de formaldehído en la desnaturalización de alcohol, por cada hectolitro de etanol absoluto se emplean cinco litros de una mezcla que contiene 0.5% (v/v) de formalina (solución acuosa con 37% de formaldehído en peso) [121].

Además, el formaldehído está involucrado en alguno de los criterios ecológicos a tener en cuenta para la concesión de la etiqueta ecológica de la Unión Europea, en colchones [122] y productos absorbentes de higiene personal [123] desde 2014 y en mobiliario [124] desde 2016. La etiqueta ecológica puede concederse a productos con un impacto medioambiental reducido durante todo su ciclo de vida.

También se han impuesto desde 2018 restricciones en la fabricación, comercialización y uso del formaldehído. El límite máximo de concentración permitida para materiales homogéneos es de 75 mg kg^{-1} . En ropa o accesorios, calzado u otros textiles en contacto con la piel el contenido máximo autorizado es 75 mg kg^{-1} , no siendo aplicable a cuero y piel natural, decoración no textil, artículos de segunda mano, revestimiento de suelo, equipos de protección individual y productos sanitarios, y textiles desechables o de uso limitado. Asimismo, la concentración en chaquetas, abrigos y tapicería debe estar por debajo de 300 mg kg^{-1} [125].

II.3.4. Bisfenoles: BPA

A consecuencia de las numerosas fuentes de exposición [71] y del acuerdo de adopción de medidas políticas adecuadas en relación a los EDC [79], los organismos responsables, a lo largo de los años, han regulado y limitado el uso industrial del BPA con la intención de eliminar o al menos disminuir el nivel de exposición en la población. Lamentablemente las legislaciones que existen no son de ámbito mundial y en países menos desarrollados la población continúa exponiéndose a fuentes de BPA [126-128] que en la Unión Europea se han prohibido o limitado (desarrolladas a continuación).

II.3.4.1. Juguetes

La evolución en la normativa europea sobre juguetes ha conducido desde, que en origen el uso de BPA no estuviese regulado [85], pasando por la imposición de un límite máximo de 0.1 mg L⁻¹ [129], hasta la regulación actual publicada en 2017 que fija el límite en 0.04 mg L⁻¹ [130].

II.3.4.2. Materiales en contacto con alimentos (FCM)

En el año 2011, se establecieron los límites de migración específica (SML) desde los FCM de plástico en 0.6 mg kg⁻¹ para el BPA y 0.05 mg kg⁻¹ para el BPS [14]. Ese mismo año se prohibió el uso de BPA en biberones de policarbonato para lactantes [36].

En 2018 una nueva modificación del Reglamento 10/2011 dictó la limitación de BPA en 0.05 mg kg⁻¹, y además lo prohibió en FCM destinados a lactantes y niños de corta edad (entre 1 y 3 años) [35]. Al año siguiente, en 2019, la Unión Europea publicó una Recomendación [41] en la que señaló el uso de otros bisfenoles en FCM, como el BPS que se emplea como monómero en la fabricación de plástico de polietersulfona, pero sin regular su uso a excepción de BPA y BPS que ya disponían de SML.

También en 2019 la Comisión Europea elaboró un Dictamen [131] en el que sugirió que se debe suponer que las sustancias con una estructura similar tienen propiedades toxicológicas tan nocivas como las de la sustancia más tóxica conocida del grupo. Además, también explicó que el BPA está siendo reemplazado por otros bisfenoles (BPS, BPF, BPFL) y exigió la prohibición de los bisfenoles en FCM.

II.3.4.3. Cosméticos

Desde el 2010 se aplicó la prohibición del uso de BPA en cosméticos dictada por el Reglamento 1223/2009 [92]. Pese a que este reglamento no entraba en vigor hasta el 2013, la prohibición pudo aplicarse desde 2010, ya que en el momento de su publicación el BPA estaba considerado como sustancia de la que se sospecha que es tóxica para la reproducción humana (categoría 2) según el reglamento sobre clasificación, etiquetado y envasado (CLP) de sustancias y mezclas [58]. Cabe comentar que en modificaciones posteriores del reglamento sobre CLP, el BPA pasó a la categoría 1B (sustancia de la que se supone que es tóxica para la reproducción humana) [132] y el BPAP se incluyó en el listado de sustancias pero no consta en ninguna categoría en cuanto a efectos sobre la reproducción se refiere [133].

II.3.4.4. Exposición laboral

Otra fuente de exposición de BPA sobre la que se han visto modificados los límites permitidos es el ambiente profesional. La directiva del año 2009 [93] en la que se imponía una exposición máxima de 10 mg m^{-3} en un periodo de 8 horas, fue modificada en 2017, reduciéndose el límite a 2 mg m^{-3} [134].

Adicionalmente, se debe evitar la exposición a este compuesto de trabajadoras embarazadas, que hayan dado a luz o se encuentren en período de lactancia [94] y está prohibida la exposición de jóvenes trabajadores [94,95] al estar considerado tóxico para la reproducción (categoría 1B) [132].

II.3.4.5. Papel térmico

También se han impuesto limitaciones en materiales de uso cotidiano como el papel térmico, utilizado en tickets. La concentración de BPA no puede superar el 0.02% en peso desde el año 2020 [135].

II.3.4.6. Agua de consumo humano

Respecto al agua de consumo, aunque aún no hay legislación en referencia al BPA, sí se han formulado dos propuestas de normativa por parte del Consejo y del Parlamento Europeos. Tras la iniciativa de establecer el límite de BPA en agua de consumo en 0.01 mg L^{-1} , finalmente en marzo de 2019 se publicó la resolución de la propuesta de directiva con un límite de 0.1 mg L^{-1} [136]. Posteriormente, una nueva proposición de normativa se lanzó en febrero de 2020, rebajando el límite a $2.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [137].

II.3.4.7. Otros

Aunque no se corresponden con la limitación de su uso, existen reglamentos que hacen referencia a otros bisfenoles (BPAF y BPS) como productos agrícolas e industriales [109].

II.4. Referencias

- [1] Real Academia Española (RAE), Diccionario de la lengua española, 23th edition, online version 23.3. <https://dle.rae.es> (Last access on 30 November 2020).
- [2] L.L. Katan, Migration from food contact materials, 1st edition, Blackie Academic & Professional, London, 1996. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1225-3>
- [3] K.A. Barnes, C.R. Sinclair, D.H. Watson, Chemical migration and food contact materials, 1st edition, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2007.
- [4] E.L. Bradley, L. Castle, Residues of food contact materials, in: L.M.L. Nollet, F. Toldra (Eds.), Handbook of dairy foods analysis, 1st edition, CRC Press (Taylor & Francis Group), Florida, 2010, pp. 756-779. <https://doi.org/10.1201/9781420046328-45>
- [5] N.M. Emanuel, A.L. Buchachenko, Chemical physics of polymer degradation and stabilization, in: C.R.H.I. de Jonge (Ed.), Serie New concepts in polymer science, 1st edition, VNU Science Press, Utrech, 1987.
- [6] S. Lacorte, M. Cortina, A. Guart, A. Borrell, Food-packaging contaminants, in: O. Nuñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci (Eds.), Fast liquid chromatography-mass spectrometry methods in food and environmental analysis, Imperial College Press, London, 2015, pp. 421-484. https://doi.org/10.1142/9781783264940_0011
- [7] E. Asensio, T. Peiro, C. Nerín, Determination the set-off migration of ink in cardboard-cups used in coffee vending machines, Food and Chemical Toxicology 130 (2019) 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.022>
- [8] Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC, Official Journal of the European Union L 338/4, 2004.
- [9] I. Cooper, P. Tice, Food contact coatings — European legislation and future predictions, Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions 84 (2001) 105-112. <https://doi.org/10.1007/BF02699771>
- [10] A. Rudin, The elements of polymer science and engineering. An introductory text and reference for engineers and chemists, 2nd edition, Academic Press (Elsevier), San Diego, 1999. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-601685->

7.X5000-9

- [11] M. Beltrán, A. Marcilla, Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades, 1st edition, Publicaciones de la Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, 2012.
- [12] S. Qian, H. Ji, X. Wu, N. Li, Y. Yang, J. Bu, X. Zhang, L. Qiao, H. Yu, N. Xu, C. Zhang, Detection and quantification analysis of chemical migrants in plastic food contact products, PLoS ONE 13:12 (2018) e0208467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208467>
- [13] R.J.B. Peters, I. Groeneveld, P.L. Sánchez, W. Gebbink, A. Gersen, M. de Nijs, S.P.J. van Leeuwen, Review of analytical approaches for the identification of non-intentionally added substances in paper and board food contact materials, Trends in Food Science & Technology 85 (2019) 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.010>
- [14] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 12/1, 2011.
- [15] EUR 24514 EN, JRC 59476, Applicability of generally recognised diffusion models for the estimation of specific migration in support of EU Directive 2002/72/EC, European Commission, 2010. <https://doi.org/10.2788/85958>
- [16] EUR 27529 EN, JRC 98028, Practical guidelines on the application of migration modelling for the estimation of specific migration, European Commission, 2015. <https://doi.org/10.2788/04517>
- [17] Commission Regulation (EU) 2016/1416 of 24 August 2016 amending and correcting Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 230/22, 2016.
- [18] Commission Regulation (EU) 2020/1245 of 2 September 2020 amending and correcting Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 288/1, 2020.
- [19] EUR 23814 EN, JRC 51601, Guidelines on testing conditions for articles in contact with foodstuffs (with a focus on kitchenware), European Commission, 2009. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC51601>
- [20] EUR 24815 EN, JRC 64903, Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware, European Commission, 2011.

- <https://doi.org/10.2788/19565>
- [21] JRC 116750, Testing conditions for kitchenware articles in contact with foodstuffs — Part 1: Plastics, European Commission, 2019. <https://europa.eu/!cM98gv>
- [22] JRC 121622, Testing conditions for kitchenware articles in contact with foodstuffs: Plastics and metals, European Commission, 2020. Available at https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/jacobowska_jrc121622_jrc121622-kitchenware-conditions-2020-plasticmetals-protected.pdf
- [23] EN 13130-1, Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics substances subject to limitation. Part 1: Guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants, European Committee for Standardization, 2004.
- [24] A.C. Alp, P. Yerlikaya, Phthalate ester migration into food: Effect of packaging material and time, *European Food Research and Technology* 246 (2020) 425-435. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03412-y>
- [25] N. Negreira, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, Solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of ink photo-initiators in packed milk, *Talanta* 82 (2010) 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.04.037>
- [26] J. Osorio, N. Dreolin, M. Aznar, C. Nerín, P. Hancock, Determination of volatile non intentionally added substances coming from a starch-based biopolymer intended for food contact by different gas chromatography-mass spectrometry approaches, *Journal of Chromatography A* 1599 (2019) 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.007>
- [27] Commission Regulation (EC) No 2023/2006 of 22 December 2006 on good manufacturing practice for materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 384/75, 2006.
- [28] Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 135/3, 2009.
- [29] 84/500/EEC, Council Directive of 15 October 1984 on the approximation of the laws of the Member States relating to ceramic articles intended to come into contact with foodstuffs, *Official Journal of the European Communities* L 277/12, 1984.
- [30] Commission Directive 2005/31/EC of 29 April 2005 amending Council

- Directive 84/500/EEC as regards a declaration of compliance and performance criteria of the analytical method for ceramic articles intended to come into contact with foodstuffs, Official Journal of the European Union L 110/36, 2005.
- [31] Commission Directive 2007/42/EC of 29 June 2007 relating to materials and articles made of regenerated cellulose film intended to come into contact with foodstuffs, Official Journal of the European Union L 172/71, 2007.
- [32] Commission Regulation (EC) No 282/2008 of 27 March 2008 on recycled plastic materials and articles intended to come into contact with foods and amending Regulation (EC) No 2023/2006, Official Journal of the European Union L 86/9, 2008.
- [33] Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, Gobierno de España, BOE núm. 164, 2011.
- [34] EUR 28357 EN, JRC 104198, Non-harmonised food contact materials in the EU: regulatory and market situation, European Commission, 2016. <https://doi.org/10.2788/234276>
- [35] Commission Regulation (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials, Official Journal of the European Union L 41/6, 2018.
- [36] Commission Implementing Regulation (EU) No 321/2011 of 1 April 2011 amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the restriction of use of bisphenol A plastic infant feeding bottles, Official Journal of the European Union L 87/1, 2011.
- [37] Commission Regulation (EC) No 1895/2005 of 18 November 2005 on the restriction of use of certain epoxy derivatives in materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 302/28, 2005.
- [38] Commission Directive 93/11/EEC of 15 March 1993 concerning the release of the N-nitrosamines and N-nitrosatable substances from elastomer or rubber teats and soothers, Official Journal of the European Communities L 93/37, 1993.
- [39] 78/142/EEC, Council Directive of 30 January 1978 on the approximation of

- the laws of the Member States relating to materials and articles which contain vinyl chloride monomer and are intended to come into contact with foodstuffs, Official Journal of the European Communities L 44/15, 1978.
- [40] Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Union L 364/5, 2006.
- [41] Commission Recommendation (EU) 2019/794 of 15 May 2019 on a coordinated control plan with a view to establishing the prevalence of certain substances migrating from materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 129/37, 2019.
- [42] L. Rubio, L. Valverde-Som, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, Improvement in the identification and quantification of UV filters and additives in sunscreen cosmetic creams by gas chromatography/mass spectrometry through three-way calibration techniques, *Talanta* 205 (2019) 120156. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120156>
- [43] M.A. Babich, C. Bevington, M.A. Dreyfus, Plasticizer migration from children's toys, child care articles, art materials, and school supplies, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 111 (2020) 104574. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104574>
- [44] S. Ndaw, A. Remy, F. Denis, P. Marsan, D. Jargot, A. Robert, Occupational exposure of cashiers to bisphenol S via thermal paper, *Toxicology Letters* 298 (2018) 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.026>
- [45] C. Freire, J.M. Molina-Molina, L.M. Iribarne-Durán, I. Jiménez-Díaz, F. Vela-Soria, V. Mustieles, J.P. Arrebola, M.F. Fernández, F. Artacho-Cordón, N. Olea, Concentrations of bisphenol A and parabens in socks for infants and young children in Spain and their hormone-like activities, *Environment International* 127 (2019) 592-600. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.013>
- [46] A. Donchenko, S. Aubin, S. Gagné, M. Spence, L. Breau, J. Lesage, Development of a method for quantification of toluene diisocyanate and methylenediphenyl diisocyanate migration from polyurethane foam sample surface to artificial sweat by HPLC-UV-MS, *Journal of Chromatography B* 1142 (2020) 122027. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122027>
- [47] J.B. Lewis, F.A. Rueggeberg, C.A. Lapp, J.W. Ergle, G.S. Schuster, Identification and characterization of estrogen-like components in commercial resin-based dental restorative materials, *Clinical Oral Investigations* 3 (1999)

- 107-113. <https://doi.org/10.1007/s007840050087>
- [48] F. Gosetti, B. Bolfi, E. Robotti, M. Manfredi, M. Binotti, F. Ferrero, G. Bona, E. Marengo, Study of endocrine disrupting compound release from different medical devices through an on-line SPE UHPLC-MS/MS method, *Analytica Chimica Acta* 1042 (2018) 141-154. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.028>
- [49] C. Nerín, Q.Z. Su, P. Vera, N. Mendoza, R. Ausejo, Influence of nonylphenol from multilayer plastic films on artificial insemination of sows, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412 (2020) 6519-6528. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02698-2>
- [50] A. Kumar, V.N. Dobrovolsky, A. Dhawan, R. Shanker, *Mutagenicity: Assays and applications*, Academic Press (Elsevier), Oxford, 2018. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02617-2>
- [51] SCCNFP/0755/03, Proposal for recommended mutagenicity/genotoxicity tests for the safety testing of cosmetic ingredients to be included in the Annexes to Council Directive 76/768/EEC, The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers, 2003. Available at https://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/sccp/documents/out253_en.pdf
- [52] Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance, European Chemical Agency (ECHA), 2017. <https://doi.org/10.2823/337352>
- [53] C.H. Hsu, T. Stedeford, *Cancer risk assessment: Chemical carcinogenesis, hazard evaluation, and risk quantification*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470622728>
- [54] J. Evans, A. Fernández, A. Gavilán, I. Ize, M.A. Martínez, P. Ramírez, M. Zuk, *Introducción al análisis de riesgos ambientales*, 1st edition, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, México, 2003. Available at <http://www.paot.org.mx/centro/insemarnat/analisisriesgo.pdf>
- [55] Guidance on a strategy for genotoxicity testing of chemical substances, Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM), 2011. Available at https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/315793/testing_chemicals_for_genotoxicity.pdf

- [56] Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, Official Journal of the European Union L 396/1, 2006.
- [57] Council Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), Official Journal of the European Union L 142/1, 2008.
- [58] Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union L 353/1, 2008.
- [59] Commission Regulation (EC) No 1179/94 of 25 May 1994 concerning the first list of priority substances as foreseen under Council Regulation (EEC) No 793/93, Official Journal of the European Communities L 131/3, 1994.
- [60] 2008/C 34/01, Commission Communication on the results of the risk evaluation and the risk reduction strategies for the substances: piperazine; cyclohexane; methylenediphenyl diisocyanate; but-2-yne-1,4-diol; methyloxirane; aniline; 2-ethylhexylacrylate; 1,4-dichlorobenzene; 3,5-dinitro-2,6-dimethyl-4-tertbutylacetophenone; di-(2-ethylhexyl)phthalate; phenol; 5-tert-butyl-2,4,6-trinitro-m-xylene, Official Journal of the European Union C 34/1, 2008.
- [61] C(2007) 5901, Commission Recommendation of 6 December 2007 on risk reduction measures for the substances: piperazine; cyclohexane; methylenediphenyl diisocyanate; but-2-yne-1,4-diol; methyloxirane; aniline; 2-ethylhexylacrylate; 1,4-dichlorobenzene; 3,5-dinitro-2,6-dimethyl-4-tert-butylacetophenone; di-(2-ethylhexyl)phthalate; phenol; 5-tert-butyl-2,4,6-trinitro-m-xylene, Official Journal of the European Union L 33/8, 2008.
- [62] United Nations Economic Commission for Europe (UN/ECE), Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS), 1st edition, United Nations, Nueva York and Ginebra, 2003. Available at

http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev00/00files_e.html

- [63] A. Senra-Varela, *El Cáncer: Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención*, Ediciones Harcourt (Elsevier), Madrid, 2002.
- [64] P. Boffetta (Ed.), *Cancer*, in: J.M. Stellman (Ed.), *Encyclopaedia of occupational health and safety. Volume I: The body, health care, management and policy*, 4th edition, International Labour Office (ILO), Ginebra, 1998.
- [65] International Agency for Research on Cancer (IARC), *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Agents classified by the IARC Monographs volumes 1-127*. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> (Last update on 26 June 2020, last access on 30 September 2020)
- [66] International Agency for Research on Cancer (IARC), *Preamble to the IARC Monographs*, IARC, Lyon, 1991. Available at <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/PreambleMonographs1991.pdf>
- [67] International Agency for Research on Cancer (IARC), *Overall evaluations of carcinogenicity. Results and conclusions*, in: IARC (Ed.), *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs volumes 1-42, supplement 7*, IARC, Lyon, 1987, pp. 51. Available at <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-Supplements/Overall-Evaluations-Of-Carcinogenicity-An-Updating-Of-IARC-Monographs-Volumes-1%E2%80%9342-1987>
- [68] International Agency for Research on Cancer (IARC), *Melamine. Overall evaluation*, in: IARC (Ed.), *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some chemicals that cause tumours of the urinary tract in rodents*, volume 119, IARC, Lyon, 2019, pp. 160. Available at <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Chemicals-That-Cause-Tumours-Of-The-Urinary-Tract-In-Rodents-2019>
- [69] Commission Regulation (EU) No 605/2014 of 5 June 2014 amending, for the purposes of introducing hazard and precautionary statements in the Croatian language and its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, *Official Journal of the European Union*, L 167/36, 2014.
- [70] International Agency for Research on Cancer (IARC), *The monographs. Formaldehyde. Overall evaluation*, in: IARC (Ed.), *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Formaldehyde*,

- 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol, volume 88, IARC, Lyon, 2006, pp. 280. Available at <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Formaldehyde-2-Butoxyethanol-And-1--Em-Tert-Em--Butoxypropan-2-ol-2006>
- [71] S.K. Khetan, *Endocrine disruptors in the environment*, 1st edition, John Wiley & Sons, New Jersey, 2014. <https://doi.org/10.1002/9781118891094>
- [72] P.D. Darbre, *Endocrine disruption and human health*, Academic Press (Elsevier), Reading, 2015. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-19087-3>
- [73] A. Crain, L.J. Guillette, Jr., *Environmental endocrine disruptors: An evolutionary perspective*, edition of 2005, Taylor & Francis, New York, 2000.
- [74] E. Diamanti-Kandarakis, J.P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, A.C. Gore, *Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement*, *Endocrine Reviews* 30:4 (2009) 293-342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- [75] I. Shaw, *Endocrine-disrupting chemicals in food*, 1st edition, Woodhead Publishing Limited, Christchurch, 2009.
- [76] F. Maqbool, S. Mostafalou, H. Bahadar, M. Abdollahi, *Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms*, *Life Sciences* 145 (2016) 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.022>
- [77] C. Monneret, *What is an endocrine disruptor?*, *Comptes Rendus Biologies* 340:9-10 (2017) 403-405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
- [78] C. Frye, E. Bo, G. Calamandrei, L. Calzà, F. Dessì-Fulgheri, M. Fernández, L. Fusani, O. Kah, M. Kajta, Y. Le Page, H.B. Patisaul, A. Venerosi, A. K. Wojtowicz, G.C. Panzica, *Endocrine disruptors: A review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems*, *Journal of Neuroendocrinology* 24 (2011) 144-159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x>
- [79] COM (1999) 706, *Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. Community Strategy for Endocrine Disrupters, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife*, Commission of the European Communities, 1999.
- [80] COM (2001) 262, *Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters, a range of substances suspected of interfering with*

- the hormone systems of humans and wildlife, COM (1999) 706, Commission of the European Communities, 2001.
- [81] SEC (2007) 1635, Commission Staff Working Document on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, (COM (1999) 706), (COM (2001) 262) and (SEC (2004) 1372), Commission of the European Communities, 2007.
- [82] Commission Delegated Regulation (EU) 2017/2100 of 4 September 2017 setting out scientific criteria for the determination of endocrine-disrupting properties pursuant to Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and Council, Official Journal of the European Union, L 301/1, 2017.
- [83] Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1659 of 7 November 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 844/2012 in view of the scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties introduced by Regulation (EU) 2018/605, Official Journal of the European Union L 278/3, 2018.
- [84] International Agency for Research on Cancer (IARC), Phenol. Overall evaluation, in: IARC (Ed.), IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide, volume 71, IARC, Lyon, 1999, pp. 762. Available at <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Re-evaluation-Of-Some-Organic-Chemicals-Hydrazine-And-Hydrogen-Peroxide-Part-1-Part-2-Part-3--1999>
- [85] Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the safety of toys, Official Journal of the European Union L 170/1, 2009.
- [86] Commission Directive (EU) 2017/774 of 3 May 2017 amending, for the purpose of adopting specific limit values for chemicals used in toys, Appendix C to Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards phenol, Official Journal of the European Union L 115/47, 2017.
- [87] Commission Regulation (EU) 2015/174 of 5 February 2015 amending and correcting Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 30/2, 2015.

- [88] Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC, Official Journal of the European Union L 354/34, 2008.
- [89] Commission Implementing Regulation (EU) No 872/2012 of 1 October 2012 adopting the list of flavouring substances provided for by Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council, introducing it in Annex I to Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Regulation (EC) No 1565/2000 and Commission Decision 1999/217/EC, Official Journal of the European Union L 267/1, 2012.
- [90] Commission Implementing Regulation (EU) No 1076/2014 of 13 October 2014 concerning the authorisation of a preparation containing a smoke flavouring extract-2b0001 as feed additive for dogs and cats, Official Journal of the European Union L 296/19, 2014.
- [91] 76/768/EEC, Council Directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, Official Journal of the European Communities L 262/169, 1976.
- [92] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, Official Journal of the European Union L 342/59, 2009.
- [93] Commission Directive 2009/161/EU of 17 December 2009 establishing a third list of indicative occupational exposure limit values in implementation of Council Directive 98/24/EC and amending Commission Directive 2000/39/EC, Official Journal of the European Union L 338/87, 2009.
- [94] Directive 2014/27/EU of the European Parliament and of the Council of 26 February 2014 amending Council Directives 92/58/EEC, 92/85/EEC, 94/33/EC, 98/24/EC and Directive 2004/37/EC of the European Parliament and of the Council, in order to align them to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, Official Journal of the European Union L 65/1, 2014.
- [95] Council Directive 94/33/EC of 22 June 1994 on the protection of young people at work, Official Journal of the European Communities L 216/12, 1994.
- [96] Commission Regulation (EC) No 2032/2003 of 4 November 2003 on the second phase of the 10-year work programme referred to in Article 16(2) of

- Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, and amending Regulation (EC) No 1896/2000, Official Journal of the European Union L 307/1, 2003.
- [97] Commission Regulation (EC) No 1451/2007 of 4 December 2007 on the second phase of the 10-year work programme referred to in Article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Official Journal of the European Union L 325/3, 2007.
- [98] Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Official Journal of the European Union L 167/1, 2012.
- [99] Regulation (EC) No 166/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 January 2006 concerning the establishment of a European Pollutant Release and Transfer Register and amending Council Directives 91/689/EEC and 96/61/EC, Official Journal of the European Union L 33/1, 2006.
- [100] Council Regulation (EU) No 1387/2013 of 17 December 2013 suspending the autonomous Common Customs Tariff duties on certain agricultural and industrial products and repealing Regulation (EU) No 1344/2011, Official Journal of the European Union L 354/201, 2013.
- [101] Commission Directive 2009/121/EC of 14 September 2009 amending, for the purposes of their adaptation to technical progress, Annexes I and V to Directive 2008/121/EC of the European Parliament and of the Council on textile names, Official Journal of the European Union L 242/13, 2009.
- [102] Regulation (EU) No 1007/2011 of the European Parliament and of the Council of 27 September 2011 on textile fibre names and related labelling and marking of the fibre composition of textile products and repealing Council Directive 73/44/EEC and Directives 96/73/EC and 2008/121/EC of the European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Union L 272/1, 2011.
- [103] Commission Regulation (EU) No 1282/2011 of 28 November 2011 amending and correcting Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 328/22, 2011.
- [104] Commission Directive 2007/42/EC of 29 June 2007 relating to materials and articles made of regenerated cellulose film intended to come into contact with foodstuffs, Official Journal of the European Union L 172/71, 2007.

- [105] Commission Regulation (EU) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs, Official Journal of the European Union L 176/43, 2012.
- [106] Commission Regulation (EU) 2017/2229 of 4 December 2017 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for lead, mercury, melamine and decoquinate, Official Journal of the European Union L 319/6, 2017.
- [107] 2006/257/EC, Commission Decision of 9 February 2006 amending Decision 96/335/EC establishing an inventory and a common nomenclature of ingredients employed in cosmetic products, Official Journal of the European Union L 97/1, 2006.
- [108] Commission Decision (EU) 2019/701 of 5 April 2019 establishing a glossary of common ingredient names for use in the labelling of cosmetic products, Official Journal of the European Union L 121/1, 2019.
- [109] Council Regulation (EU) 2018/2069 of 20 December 2018 amending Regulation (EU) No 1387/2013 suspending the autonomous Common Customs Tariff duties on certain agricultural and industrial products, Official Journal of the European Union L 331/4, 2018.
- [110] M. Qu, J. Lu, R. He, Formaldehyde from environment, in: R. He (Ed.), Formaldehyde and cognition, Springer, Dordrecht, 2017, pp. 1-19. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1177-5_1
- [111] Directive 2012/18/EU of the European Parliament and of the Council of 4 July 2012 on the control of major-accident hazards involving dangerous substances, amending and subsequently repealing Council Directive 96/82/EC, Official Journal of the European Union L 197/1, 2012.
- [112] Commission Directive (EU) 2019/1929 of 19 November 2019 amending Appendix C to Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council for the purpose of adopting specific limit values for chemicals used in certain toys, as regards formaldehyde, Official Journal of the European Union L 229/51, 2019.
- [113] Commission Regulation (EU) 2019/831 of 22 May 2019 amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products, Official Journal of the European Union L 137/29, 2019.
- [114] Directive 2004/37/EC of the European Parliament and of the Council of 29

April 2004 on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens or mutagens at work (Sixth individual Directive within the meaning of Article 16(1) of Council Directive 89/391/EEC), Official Journal of the European Union L 158/50, 2004.

- [115] International Agency for Research on Cancer (IARC), Formaldehyde. Summary of data reported and evaluation, in: IARC (Ed.), IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Wood dust and formaldehyde, volume 62, IARC, Lyon, 1995, pp. 332-336. Available at <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Wood-Dust-And-Formaldehyde-1995>
- [116] Directive (EU) 2019/983 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 amending Directive 2004/37/EC on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens or mutagens at work, Official Journal of the European Union L 164/23, 2019.
- [117] Commission Regulation (EC) No 1048/2005 of 13 June 2005 amending Regulation (EC) No 2032/2003 on the second phase of the 10-year work programme referred to in Article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Official Journal of the European Union L 178/1, 2005.
- [118] Commission Delegated Regulation (EU) No 1062/2014 of 4 August 2014 on the work programme for the systematic examination of all existing active substances contained in biocidal products referred to in Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Union L 294/1, 2014.
- [119] Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe, Official Journal of the European Union L 152/1, 2008.
- [120] Council Regulation (EU) 2019/999 of 13 June 2019 amending Regulation (EU) No 1387/2013 suspending the autonomous Common Customs Tariff duties on certain agricultural and industrial products, Official Journal of the European Union L 163/27, 2019.
- [121] Commission Implementing Regulation (EU) No 162/2013 of 21 February 2013 amending the Annex to Regulation (EC) No 3199/93 on the mutual recognition of procedures for the complete denaturing of alcohol for the purposes of exemption from excise duty, Official Journal of the European Union L 49/55, 2013.

- [122] 2014/391/EU, Commission Decision of 23 June 2014 establishing the ecological criteria for the award of the EU Ecolabel for bed mattresses, Official Journal of the European Union L 184/18, 2014.
- [123] 2014/763/EU, Commission Decision of 24 October 2014 establishing the ecological criteria for the award of the EU Ecolabel for absorbent hygiene products, Official Journal of the European Union L 320/46, 2014.
- [124] Commission Decision (EU) 2016/1332 of 28 July 2016 establishing the ecological criteria for the award of the EU Ecolabel for furniture, Official Journal of the European Union L 210/100, 2016.
- [125] Commission Regulation (EU) 2018/1513 of 10 October 2018 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards certain substances classified as carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction (CMR), category 1A or 1B, Official Journal of the European Union L 256/1, 2018.
- [126] S.A. Baluka, W.K. Rumbelha, Bisphenol A and food safety: Lessons from developed to developing countries, *Food and Chemical Toxicology* 92 (2016) 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.025>
- [127] S. Boudalia, M. Oudir, Bisphenol-A: Legislation in industrial countries and in Algeria, *Research Journal of Environmental Toxicology* 10 (2016) 189-192. <https://doi.org/10.3923/rjet.2016.189.192>
- [128] D. Mahamuni, N.D. Shrinithiviahshini, Need for regulatory policies in India, on the use of bisphenol A in food contact plastic containers, *Current Science* 113:5 (2017) 861-868. <https://doi.org/10.18520/cs/v113/i05/861-868>
- [129] Commission Directive 2014/81/EU of 23 June 2014 amending Appendix C of Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards bisphenol A, Official Journal of the European Union L 183/49, 2014.
- [130] Commission Directive (EU) 2017/898 of 24 May 2017 amending, for the purpose of adopting specific limit values for chemicals used in toys, Appendix C to Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards bisphenol A, Official Journal of the European Union L 138/128, 2017.
- [131] 2019/C 404/07, Opinion of the European Committee of the Regions — Towards a comprehensive EU framework on endocrine disruptors, Official Journal of the European Union C 404/34, 2019.

- [132] Commission Regulation (EU) 2016/1179 of 19 July 2016 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, Official Journal of the European Union L 195/11, 2016.
- [133] Commission Regulation (EC) No 790/2009 of 10 August 2009 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, Official Journal of the European Union L 235/1, 2009.
- [134] Commission Directive (EU) 2017/164 of 31 January 2017 establishing a fourth list of indicative occupational exposure limit values pursuant to Council Directive 98/24/EC, and amending Commission Directives 91/322/EEC, 2000/39/EC and 2009/161/EU, Official Journal of the European Union L 27/115, 2016.
- [135] Commission Regulation (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bisphenol A, Official Journal of the European Union L 337/3, 2016.
- [136] P8_TA-PROV(2019)0320, European Parliament legislative resolution of 28 March 2019 on the proposal for a directive of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption (COM(2017)0753 – C8-0019/2018 – 2017/0332(COD)), European Parliament, 2019.
- [137] 6060/1/20 REV 1, Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption - Political agreement, Council of the European Union, 2020.

CAPÍTULO III

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

III.1. Diseño de experimentos

III.1.1. Elementos, modelo y validación de un diseño de experimentos

Es obvio que los procedimientos llevados a cabo en Química Analítica requieren, un rendimiento óptimo de la instrumentación que proporcione un incremento de sensibilidad, selectividad, resolución, reproducibilidad y menores límites de detección [1]. Todo lo anterior es fácil de conseguir si se utiliza la metodología del diseño de experimentos. El diseño de experimentos puede definirse como "*la metodología para hacer experimentos de modo que la información requerida se obtenga del modo más eficiente y preciso posible*" [2].

Es decir, partiendo de unos factores controlables por el analista se realiza el experimento obteniendo una o varias respuestas (instrumentales o de otra naturaleza) que podrán ser optimizadas [3]. Un diseño de experimentos consta fundamentalmente de dos elementos: i) un dominio de interés, región de los factores dónde podrá ser realizado el experimento, que recogerá todas las restricciones tanto instrumentales como de tipo práctico; ii) una función matemática (modelo) mediante la cual se relacionan los factores con las respuestas, en general son suficientes modelos sencillos (polinomios de primer o segundo grado). Las variables del modelo son los factores experimentales codificados. El modelo que se propone tiene que ser validado y a través de él, se decide la posible influencia de los factores sobre la respuesta. Un factor será significativo si el coeficiente de la variable correspondiente, estimado por mínimos cuadrados, es estadísticamente distinto de cero.

Si la respuesta se ajusta a un modelo lineal, éste será del tipo:

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \varepsilon \quad (\text{III.1})$$

donde y es la respuesta experimental, x_i son las variables independientes o factores, β_i son los coeficientes del modelo y ε es el error experimental en la respuesta.

Si la respuesta no es explicada correctamente con el modelo anterior será necesario un polinomio de segundo grado:

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{III.2})$$

donde β_{ii} son los coeficientes del modelo que acompañan a los términos cuadráticos y β_{ij} son los coeficientes que acompañan a las interacciones entre los factores.

Es necesario comprobar que el diseño es adecuado para estimar los coeficientes del modelo con la mejor precisión posible. Se parte de la matriz del diseño (\mathbf{X}) que contiene en cada fila, j , los valores de los factores (variables) x_i , y en su caso de los cuadrados, x_i^2 , y de los productos, $x_i x_j$, en el correspondiente al j -ésimo experimento junto con el valor 1, si el modelo incluye un término independiente como en las Ecuaciones (III.1) y (III.2). El modelo se expresa con notación matricial como en la Ecuación (III.3):

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (\text{III.3})$$

La solución por mínimos cuadrados para el vector de los coeficientes del modelo viene dada por la Ecuación (III.4):

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^t\mathbf{y} \quad (\text{III.4})$$

donde $(\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}$ es denominada matriz de dispersión, que es la inversa de la matriz de información del diseño ($\mathbf{X}^t\mathbf{X}$). La mejor matriz de dispersión es aquella que es diagonal, en este caso se dice que el diseño es ortogonal. La importancia de los diseños ortogonales radica en que la estimación de los coeficientes, que son variables aleatorias, es incorrelada.

Como los coeficientes se calculan a partir de la respuesta experimental (Ecuación (III.3)) tienen incertidumbre, es decir son variables aleatorias. La Ecuación (III.4) estima el valor medio de los mismos y la matriz de sus covarianzas viene dada por la Ecuación (III.5):

$$\text{Cov}(\mathbf{b}) = (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}s^2 \quad (\text{III.5})$$

siendo s^2 la estimación de la varianza de $\boldsymbol{\varepsilon}$ en la Ecuación (III.3). En el caso de que los errores ε_i que forman el vector $\boldsymbol{\varepsilon}$ sean independientes de un experimento a otro y homocedásticos, una estimación de la varianza de $\boldsymbol{\varepsilon}$ puede ser obtenida a partir de los residuos de la regresión por mínimos cuadrados. Para ello es necesario disponer de más puntos experimentales en el dominio que coeficientes en el modelo. Además, para validar el modelo, es decir, para detectar si el modelo propuesto describe los datos, es necesario aplicar el test de significación del modelo y el test de fallo de ajuste, y además se requiere la normalidad de los residuos. El segundo test, exige disponer de réplicas de alguno de los experimentos, que habitualmente suelen hacerse en el punto central del diseño.

Los elementos de la matriz de dispersión $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$ se denominan coeficientes de varianza, se expresan como c_{ii} o c_{ij} según sean elementos de la diagonal principal o de fuera de ella. Únicamente dependen del diseño experimental y del modelo elegido.

La varianza de un coeficiente (un elemento de la diagonal de la matriz representada en la Ecuación (III.5)) se obtiene multiplicando la varianza de la regresión por el coeficiente de varianza correspondiente (Ecuación (III.6)):

$$\text{Var}(b_i) = c_{ii}s^2 \quad (\text{III.6})$$

Por lo tanto, cuanto menor sea este último, menor será la varianza del coeficiente y su estimación será más precisa (tendrá menos incertidumbre, lo que se traduce en que su intervalo de confianza es más pequeño). Mientras que la varianza residual depende de la variabilidad experimental (suponiendo que el modelo no tenga fallo de ajuste), el coeficiente de varianza depende únicamente de la matriz de dispersión, es decir, del diseño experimental utilizado y por ello tiene que ser evaluado antes de comenzar a realizar la experimentación propiamente dicha.

La covarianza entre dos coeficientes, según la Ecuación (III.5), es $\text{Cov}(x_i, x_j) = c_{ij}s^2$, de nuevo es el producto de la varianza residual por c_{ij} que sólo depende del diseño. Si el diseño es ortogonal las estimaciones de los coeficientes serán incorreladas porque c_{ij} es cero. En otro caso, es el diseño el que introduce, a través de los c_{ij} , una correlación entre las estimaciones de los coeficientes. Como la interpretación del efecto de los factores experimentales se hace a través de los coeficientes del modelo, si éstos están correlacionados puede que el efecto de uno de ellos se observe a través de otro, con lo que la interpretación será incorrecta. En este sentido un diseño es óptimo cuando la matriz de dispersión es diagonal y además los valores c_{ii} son lo menor posible.

Esto permite comparar un diseño con otro en cuanto a la varianza (precisión) de las estimaciones de los coeficientes, basta que los valores c_{ii} sean menores. Pero estos valores dependen del tamaño del recinto de experimentación. Como consecuencia, se ha definido el factor de inflación de varianza (VIF) que es el coeficiente de varianza estandarizado por el tamaño del dominio experimental para que se puedan comparar diseños distintos. Se expresa como en la Ecuación (III.7):

$$\text{VIF}(b_i) = c_{ii} \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad (\text{III.7})$$

El VIF es un valor acotado inferiormente por uno. Su valor no debe ser mayor que cuatro (o siete según otros autores). La matriz de experiencias que aporta estimaciones de los coeficientes de mayor precisión es la que conduce a un VIF igual a uno.

Si a las hipótesis de independencia e igualdad de varianza para el error ϵ se añade la de normalidad, es posible construir una región de confianza conjunta para el vector de los coeficientes, β , del modelo al nivel de significación α . Esta región (Ecuación (III.8)) es un hiperelipsoide cuyo volumen, forma y orientación dependen de la matriz de información (X^tX):

$$(\beta - \mathbf{b})^t (X^tX) (\beta - \mathbf{b}) \leq ps^2 F_{(\alpha, p, \gamma)} \quad (\text{III.8})$$

siendo s^2 la varianza estimada con γ grados de libertad, p el número de coeficientes del modelo y F el valor crítico al nivel α del correspondiente estadístico de Snedecor.

Las propiedades de la región de confianza se traducen en propiedades de la matriz del diseño X . Se dirá que X es:

1. D-óptima, cuando el volumen de la región de confianza del elipsoide sea mínimo, es decir, cuando el determinante de la matriz de dispersión sea mínimo.
2. A-óptima, cuando la región de confianza del elipsoide posea forma esférica, todos los coeficientes se estiman con la misma precisión.
3. Ortogonal, cuando la orientación sea tal que los ejes del elipsoide sean paralelos a los ejes de coordenadas. En esta situación se cumple que la matriz de dispersión $(X^tX)^{-1}$ es diagonal.

Cuando la experimentación tiene como finalidad optimizar una respuesta, es decir determinar los valores de los factores que conducen al valor de la respuesta que interesa al analista (máximo, mínimo o valor prefijado) es importante conocer la precisión de la respuesta estimada en cualquier punto del dominio experimental, no sólo en aquellos en los que se ha realizado efectivamente la experimentación. Si se denomina \mathbf{u} a un punto en el dominio de los factores en unidades reales y $\mathbf{x}(\mathbf{u})$ al punto correspondiente en unidades codificadas, es decir, en el espacio de las variables predictoras del modelo, la estimación de la respuesta en \mathbf{u} y la varianza de esta estimación se expresarán como en las Ecuaciones (III.9) y (III.10) respectivamente:

$$\hat{y}(\mathbf{u}) = \hat{f}(\mathbf{x}(\mathbf{u})) = \mathbf{x}(\mathbf{u})^t \mathbf{b} \quad (\text{III.9})$$

$$\text{Var}(\hat{y}(\mathbf{u})) = \mathbf{x}(\mathbf{u})^t (X^tX)^{-1} \mathbf{x}(\mathbf{u}) s^2 \quad (\text{III.10})$$

Según la Ecuación (III.10), la varianza de la respuesta estimada depende: i) de la matriz de experimentos seleccionada, ii) del modelo (a través de $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$), iii) de la posición del punto experimental en el dominio y por último iv) de la varianza residual s^2 . Esta varianza se puede escribir también como:

$$\text{Var}(\hat{y}(\mathbf{u})) = d(\mathbf{u}) s^2 \quad (\text{III.11})$$

donde $d(\mathbf{u})$ se denomina función de varianza. Obviamente es deseable que sea lo más pequeña posible ya que ello conducirá a la predicción más precisa de la respuesta. La matriz del diseño será G-óptima cuando sea mínimo el máximo de $d(\mathbf{u})$.

Se dice también que un diseño es rotatable si la función de varianza $d(\mathbf{u})$ en un punto experimental cualquiera $\mathbf{x}(\mathbf{u})$ depende únicamente de la distancia del punto al centro del diseño, de este modo la varianza en la respuesta no dependerá de la dirección que se tome al moverse desde el centro a la frontera del dominio experimental. Recuérdese que el propósito de los diseños de superficie de respuesta es buscar un punto óptimo y "a priori" no se sabe su posición, por ello la propiedad de ser rotatable es de interés práctico.

III.1.2. Diseños "a medida": diseños D-óptimo

Muchas veces no es posible aplicar los diseños clásicos, debido a restricciones, bien en el dominio experimental (incompatibilidad de las condiciones experimentales, umbrales no permitidos en ciertas técnicas instrumentales, material limitado, etc.) o en el número de experimentos (análisis que requieren mucho tiempo, elevado coste). Una alternativa es la utilización de diseños "a medida", que buscan como criterio primario la D-optimalidad, es decir, la estimación conjunta más precisa de los coeficientes del modelo propuesto y como criterio secundario la G-optimalidad para obtener la estimación más precisa de la respuesta estimada. En la bibliografía, estos diseños se conocen también como D-óptimos.

Se inicia la experimentación definiendo, en base al conocimiento del problema, el modelo para poder estimar la respuesta; es decir, los términos lineales, cuadráticos, e interacciones de los que consta, ya que en todo procedimiento analítico no hay que descartar que varios factores puedan interaccionar y que alguno de ellos pueda comportarse de modo no lineal en el dominio elegido. Esto supone fijar el número 'p' de coeficientes del modelo que tendrán que ser estimados, lo que implica establecer en 'p' el número mínimo de experimentos que han de ser realizados. También se establece el dominio experimental de los factores y en él, los 'N_c' experimentos individuales factibles que son los puntos candidatos a formar parte del diseño.

Es necesario comprobar que el diseño con los ' N_c ' puntos es adecuado para estimar el modelo propuesto, evaluando los VIF de los coeficientes, las propiedades de la matriz \mathbf{X} y la función de varianza $d(\mathbf{u})$; en caso afirmativo se procederá a buscar para cada valor de ' n ' en un rango entre N_1 y N_2 ($p \leq N_1 \leq n \leq N_2$), el diseño D-óptimo con ' n ' experimentos extraídos de los ' N_c ' candidatos.

Se ha expuesto anteriormente que un diseño es D-óptimo cuando el volumen de la región de confianza conjunta de los coeficientes es mínimo. El determinante $\mathbf{X}^t\mathbf{X}$ es inversamente proporcional al cuadrado de este volumen, por tanto, si el determinante $\mathbf{X}^t\mathbf{X}$ es pequeño implica una pobre estimación de los coeficientes del modelo, por ello se busca maximizar el mismo. Pero el determinante de la matriz $\mathbf{X}^t\mathbf{X}$, crece también al añadir nuevos experimentos, filas a la matriz \mathbf{X} , por ello se normaliza por el número ' n ' de experimentos del diseño (en la matriz \mathbf{M}) para poder comparar diseños de distinto tamaño. En consecuencia, se busca que ' n ' experimentos de los ' N_c ' candidatos maximicen el determinante de la matriz de momentos \mathbf{M} , que queda descrita por la Ecuación (III.12).

$$|\mathbf{M}| = |\mathbf{X}^t\mathbf{X}|/n^p \quad (\text{III.12})$$

Fedorov [4] demostró cómo escoger un par de puntos \mathbf{x}_1 y \mathbf{x}_2 , siendo \mathbf{x}_1 un punto del diseño actual y \mathbf{x}_2 un punto candidato distinto de los actuales del diseño, de modo que al intercambiarlos se mejore el valor de $|\mathbf{M}|$; este algoritmo de intercambio fue mejorado por Mathieu [5].

De este modo para cada valor de ' n ' se tiene una (o varias) matriz \mathbf{X} , D-óptima, y para elegir el valor de ' n ' (y en su caso entre las del mismo ' n ') se utilizará el criterio G definido anteriormente para asegurar que se tiene la menor varianza de la respuesta estimada.

En el Capítulo V de esta memoria se ha empleado un diseño D-óptimo para optimizar simultáneamente dos factores experimentales en una cromatografía de líquidos (temperatura y flujo de la fase móvil) fijados a tres niveles y otro factor (composición de fase móvil) a cuatro niveles en la determinación de fenol y bisfenol A mediante HPLC-FLD. También ha sido esencial la utilización de un diseño D-óptimo en el Capítulo VII, (en el contexto de AqBd) en un diseño compuesto "diseño mezcla-proceso" para la elección de los puntos experimentales en los que realizar las medidas cromatográficas dentro de un dominio restringido para una mezcla ternaria (composición de una fase móvil agua-metanol-acetonitrilo) y el flujo de la misma, que se tuvo que realizar como paso previo a la construcción de un modelo PLS2 para relacionar los parámetros de control del método con las características de calidad de los cromatogramas. En ambos trabajos es patente la reducción del esfuerzo

experimental conseguido sin disminuir la fiabilidad en la calidad de los cromatogramas.

III.1.3. Optimización multirrespuesta: frente Pareto

Hay muchas situaciones en las que es necesario optimizar varias respuestas conjuntamente, bien maximizando todas, minimizándolas, haciendo máximas unas y mínimas otras o incluso haciendo que una o varias cumplan un valor predeterminado. En general, los valores de los factores que optimizan cada una de las respuestas serán distintos y será necesario llegar a algún tipo de compromiso en las condiciones experimentales de modo que se satisfaga razonablemente la optimalidad de cada respuesta. La solución que se ha venido dando tradicionalmente a este problema de optimización multirrespuesta es la de "convertir" el problema en una optimización con una única respuesta a optimizar. Eso se hace definiendo una función que reúna (con distinta ponderación) todas las respuestas en una única. En esta aproximación al problema, el investigador transforma cada respuesta para expresar su validez. Por ejemplo, dada un área de pico que se requiere que sea máxima, se la transforma en una función que vale uno a partir de un valor b (deseabilidad máxima) y cero hasta otro valor a (no deseabilidad) y varía monótonamente (por ejemplo linealmente) para áreas de pico entre a y b . Finalmente se define la deseabilidad conjunta, como la media geométrica ponderada de las funciones de deseabilidad individuales de cada respuesta que también varía entre cero y uno. La deseabilidad conjunta es la función que se optimiza. Este procedimiento, conocido como método de Derringer [6], se utiliza muy a menudo en el diseño de experimentos, su aplicación en problemas de Química Analítica puede verse en las Ref. [7-10]. El inconveniente de este procedimiento es que la condición experimental óptima se ha obtenido imponiendo "a priori", de modo codificado, la opinión del investigador sobre la validez o no validez de la respuesta (en este caso el área de pico) sin conocer el contexto experimental para las demás.

Una alternativa metodológica consiste en determinar el conjunto de condiciones experimentales que proporcionan valores óptimos en al menos una de las respuestas, este conjunto de soluciones es el conocido como frente Pareto. El análisis del frente Pareto permite considerar explícitamente las ventajas y los inconvenientes de cada solución, así como mantener el criterio de lo que se considera respuesta suficientemente válida desde un punto de vista analítico, pero esto se hace "a posteriori" entre las soluciones óptimas del problema de optimización multirrespuesta. Esta elección de las condiciones "a posteriori" resulta muy útil en análisis químico.

Conviene hacer notar que la mayor diferencia entre la optimización de una única respuesta y la de múltiples respuestas es que en el primer caso se trata de buscar un máximo (o mínimo) en los números reales (valores de la respuesta) mientras que en

el segundo caso se pretende buscar un vector máximo (o mínimo), ya que para cada condición experimental se dispone del vector n -dimensional formado por las ' n ' respuestas. Esto segundo es imposible porque a diferencia de lo que ocurre con los números reales, no es posible definir un orden entre vectores compatible con las operaciones vectoriales (buen orden). En la optimización multirrespuesta en lugar del concepto de orden se utiliza el concepto de "dominación", que es un orden parcial [3]. Supongamos que se quieren hacer máximas dos respuestas, en la Figura III.1 se muestran cuatro soluciones, S_i , es decir los valores de ambas respuestas para cuatro condiciones experimentales distintas. Las soluciones S_1 , S_2 y S_3 son "no dominadas" porque ninguna de ellas tiene valores mayores en ambas respuestas. Si por ejemplo, consideramos la solución S_2 , la solución S_1 tiene mayor la Respuesta 2 pero inferior la Respuesta 1, la solución S_3 es inferior en la Respuesta 2 y superior en la Respuesta 1 y la solución S_4 es inferior en ambas respuestas; por lo tanto, ninguna de las tres soluciones S_1 , S_3 y S_4 domina a S_2 . Otro tanto ocurre con S_1 y S_3 . Sin embargo, la solución S_4 es dominada porque la solución S_2 tiene ambas respuestas mayores.

El frente Pareto es el conjunto de soluciones "no dominadas", marcado mediante una línea continua verde en la Figura III.1. Las soluciones del frente Pareto son óptimas en al menos una respuesta, por ejemplo, entre todas las soluciones con Respuesta 1 igual al valor 'a', la solución P_1 es la que da mayor la Respuesta 2 y también entre las soluciones con Respuesta 2 fijada al valor 'b', la solución P_1 es la de mejor Respuesta 1.

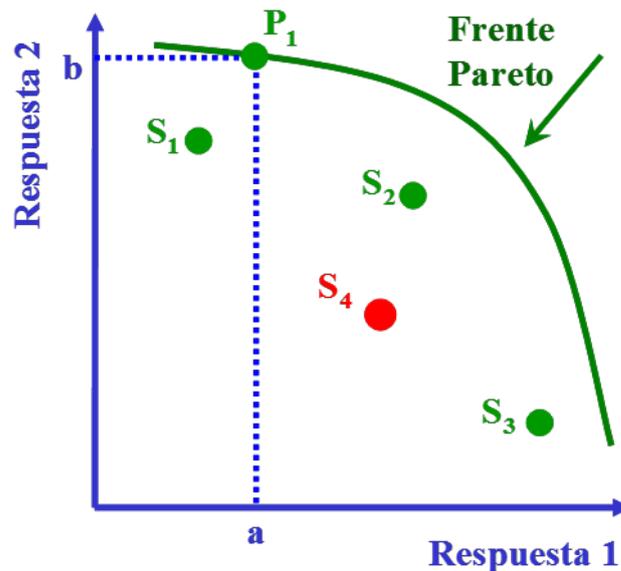


Figura III.1. Frente Pareto para el caso del máximo de dos respuestas.

III.1.4. Representación mediante coordenadas paralelas

Una representación con coordenadas paralelas consiste en representar las soluciones obtenidas en un análisis multirrespuesta, en un único gráfico con tantas líneas verticales como factores y respuestas. De ese modo uniendo las coordenadas de cada factor y la de cada una de las respuestas es posible analizar el comportamiento en un único gráfico. Las coordenadas paralelas permiten explorar el frente Pareto de las soluciones óptimas para seleccionar la que cumple los requisitos de interés y más beneficia al analista. En este sentido las dos herramientas, frente Pareto y coordenadas paralelas, son complementarias. Este tipo de representación también se ha utilizado en los Capítulos V y VII de esta memoria.

La Figura III.2 muestra las soluciones del frente Pareto obtenido en un problema concreto expuesto en el Capítulo VII de esta memoria. Las cuatro primeras coordenadas son las variables del método cromatográfico (factores) y las seis coordenadas siguientes son características de calidad del cromatograma (respuestas).

Como cada variable está en una escala diferente, para su representación en el diagrama se escalan a un rango común. Como referencia, se anota para cada coordenada el mínimo y el máximo de los valores obtenidos anotándolos en la parte inferior y superior de cada línea vertical. En el gráfico cada línea quebrada representa un vector cuyas coordenadas contienen conjuntamente las cuatro coordenadas de las variables del método (proporción de agua, metanol, y acetonitrilo de la mezcla ternaria y el flujo de la fase móvil) y las de las respuestas, seis características de calidad (resolución entre cinco picos contiguos, tiempo inicial y final del cromatograma). La línea continua en azul fue la elegida en este experimento ya que la resolución entre los picos contiguos fue siempre mayor de 1.1 y el tiempo inicial y final muy cortos.

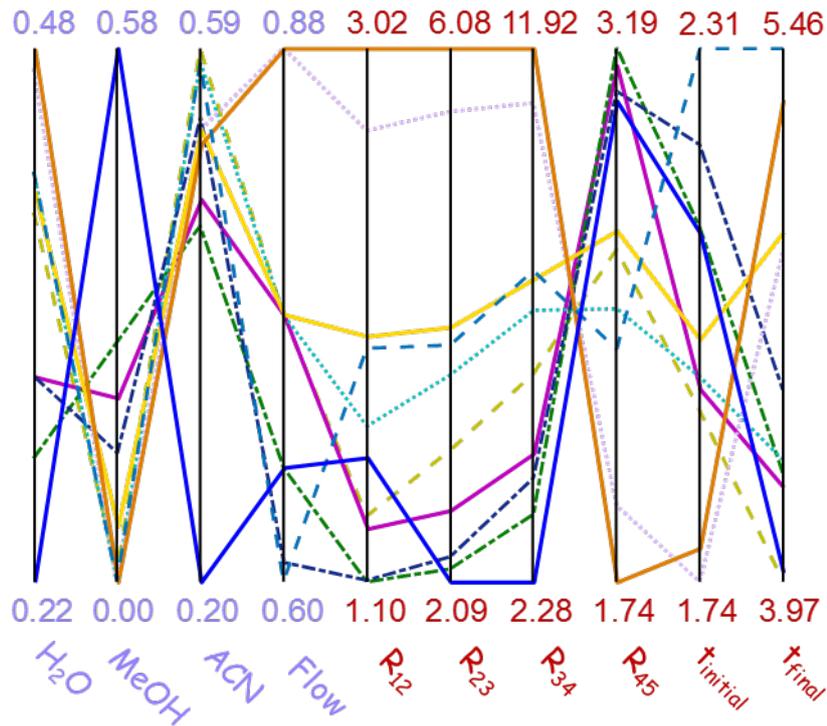


Figura III.2. Diagrama de coordenadas paralelas (tomada del Capítulo VII).

III.2. Análisis de factores paralelos

III.2.1. PARAFAC/PARAFAC2

Parte del contenido de esta sección ha sido tomado de varias monografías consideradas imprescindibles para profundizar en el contenido de esta técnica. Algunas son básicas [11-13] y otras más teóricas [14,15]. También es posible profundizar en el tema en varios capítulos del libro *Comprehensive Chemometrics* [16-18] y especialmente en el libro dedicado a calibrados con datos de tres vías [19,20].

El análisis de factores paralelos (PARAFAC, Parallel Factor Analysis) es una técnica multivariante apropiada para analizar datos de tres vías (señales de orden dos), es decir, datos estructurados en un cubo (o tensor). Puede decirse que PARAFAC es una extensión de las Componentes Principales cuando se tienen datos de orden dos (cubo de datos). La ventaja de esta técnica frente a la técnica de Componentes Principales es que PARAFAC no tiene ambigüedad rotacional.

En general, para poder aplicar esta técnica se tiene que disponer de un cubo de datos $\underline{\mathbf{X}}$ ($I \times J \times K$) compuesto por números reales x_{ijk} , $i = 1, \dots, I$; $j = 1, \dots, J$; $k = 1, \dots, K$. En el caso de estar utilizando una técnica instrumental como la cromatografía de líquidos con distintos detectores que proporcionen señales multivariantes (diodos en serie en HPLC-DAD, o un detector de fluorescencia en HPLC-FLD) cada valor x_{ijk} ,

será la absorbancia (o la intensidad fluorescente) registrada en el i -ésimo tiempo de elución para las j -ésima longitud de onda en la k -ésima muestra.

No obstante, el uso de PARAFAC no está limitado a aplicaciones con datos de técnicas instrumentales acopladas, sino que es posible encontrar aplicaciones en otros campos siempre que se disponga de un cubo de datos estructurado como se indica en el párrafo anterior [21,22].

En general, cada perfil o vía del cubo de datos se puede identificar por su significado, por ejemplo, en el caso de la cromatografía se dispondrá de un perfil cromatográfico, un perfil espectral y un perfil muestral. La Figura III.3 es una representación gráfica de cómo sería un cubo de datos cuando se tiene datos de HPLC-DAD (o HPLC-FLD).

Un modelo PARAFAC de rango F para un cubo de datos $\underline{\mathbf{X}} = (x_{ijk})$ se anota como se muestra en la Ecuación (III.13):

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}, \quad i=1, 2, \dots, I; \quad j=1, 2, \dots, J; \quad k=1, 2, \dots, K; \quad (\text{III.13})$$

donde e_{ijk} son los elementos del tensor $\underline{\mathbf{E}}$, que contiene los residuos del modelo ajustado. PARAFAC se dice que es lineal cuando lo es en sus tres perfiles o vías.

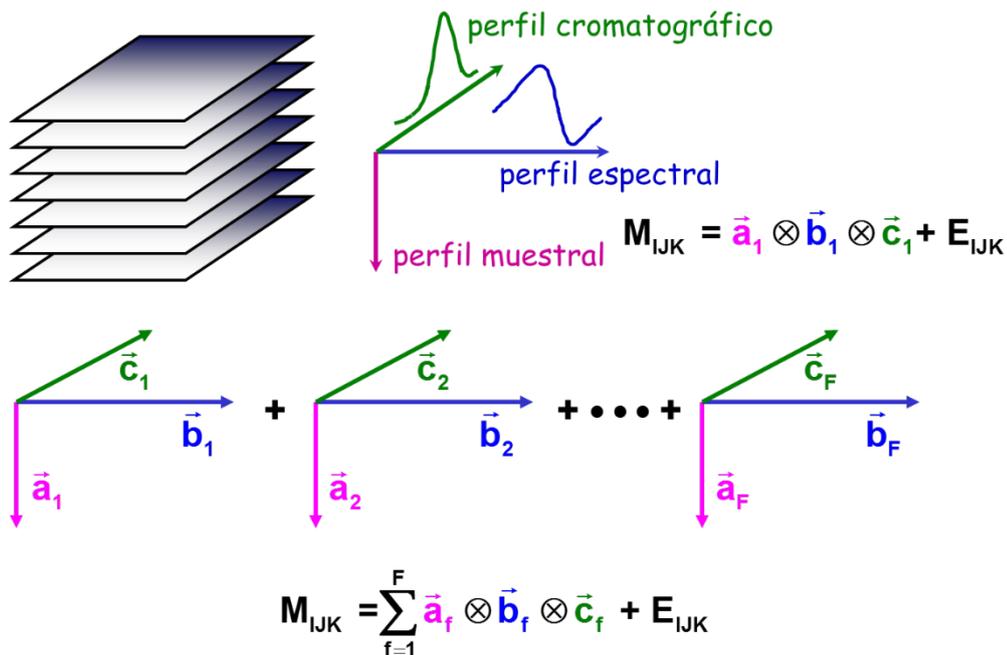


Figura III.3. Datos de tres vías para HPLC-DAD (o HPLC-FLD).

La descomposición realizada por PARAFAC origina triadas o factores, F , estando cada uno de ellos formado por tres vectores de loadings (pesos), \mathbf{a}_f , \mathbf{b}_f y \mathbf{c}_f . De esta forma, el modelo PARAFAC de un cubo de tres vías está formado por tres matrices de loadings, \mathbf{A} , \mathbf{B} y \mathbf{C} , cuyas columnas se corresponden con los vectores de loadings anteriores y las dimensiones de estas matrices son $(I \times F)$, $(J \times F)$ y $(K \times F)$, respectivamente, siendo F el número de factores de la descomposición PARAFAC. Estos loadings, en una técnica PARAFAC, son determinados por mínimos cuadrados. Con estas matrices el modelo de la Ecuación (III.13) puede escribirse como se muestra en la Ecuación (III.14).

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T + \mathbf{E}_k = c_{k1} \mathbf{a}_1 \mathbf{b}_1^T + \dots + c_{kF} \mathbf{a}_F \mathbf{b}_F^T + \mathbf{E}_k, \quad k=1, 2, \dots, K; \quad (\text{III.14})$$

Donde \mathbf{D}_k es la diagonal de una matriz cuadrada $(F \times F)$ cuyos elementos no nulos son los de la fila k -ésima de la matriz \mathbf{C} , y \mathbf{E}_k $(I \times J)$ es la matriz de los residuos. Consecuentemente cada matriz \mathbf{X}_k esta modelada por las mismas matrices de loadings \mathbf{A} y \mathbf{B} pero con diferentes pesos, es decir los que figuran en \mathbf{D}_k . El superíndice T en todas las muestras indica el vector o la matriz transpuestos.

Si los datos son trilineales, la descomposición PARAFAC es única y capaz de dar el perfil específico de cada uno de los factores (analitos) contenidos en la muestra, es decir el perfil cromatográfico, el perfil espectral y el perfil muestral de cada analito que esté contenido en la misma.

En las técnicas empleadas en Química Analítica, PARAFAC y otras pocas técnicas de tres vías, poseen la "propiedad de unicidad" suponiendo que los datos sean trilineales, es decir, si en estos cubos de datos, cada matriz de la muestra difiere una de otra sólo en la cantidad del analito (o analitos), PARAFAC es capaz de obtener un perfil único para cada uno de estos analitos contenidos en la muestra. Esta propiedad también se denomina "ventaja de segundo orden".

Usando adecuadamente datos multivía y una descomposición PARAFAC, es posible identificar inequívocamente a los analitos por sus perfiles cromatográficos y espectrales, siendo este aspecto de suma importancia cuando se están analizando sustancias prohibidas o con un límite de migración específica establecido como es el caso del SML (Specific Migration Limit) en migrantes. La utilización de técnicas multivía en los análisis oficiales es posible debido a la introducción de la noción de método validado como alternativa al método de referencia, como puede leerse en muchas de las normativas para residuos tóxicos [23], pesticidas [24] y migrantes [25].

Como se ha indicado, el no tener ambigüedad rotacional en una descomposición PARAFAC es importante para poder asignar los distintos perfiles de cada factor a un analito concreto. El interés de esta descomposición PARAFAC radica en que la

solución por mínimos cuadrados utilizada para obtener los loadings es única, lo que significa que las matrices **A**, **B** y **C** obtenidas por mínimos cuadrados para los F factores en el modelo de la Ecuación (III.14) es la única que da la menor suma de cuadrados residual, por lo tanto, no hay un conjunto de F factores distintos (excepto por permutación y escala) que descritos por diferentes loadings proporcionen el mismo ajuste. En otras palabras, esto quiere decir que cualquier rotación de estos factores no puede dar la misma suma residual de cuadrados.

Es importante reseñar que PARAFAC, por tener "propiedad de unicidad", permite identificar analitos en presencia de interferentes aunque estos no estén incorporados en el calibrado. La identificación inequívoca de cada analito se realiza comprobando varios aspectos: i) observando que el tiempo de retención de un patrón de referencia coincide con el tiempo de retención observado en el perfil cromatográfico obtenido en PARAFAC, ii) identificando el perfil espectral, calculando el coeficiente de correlación lineal entre el espectro del patrón de referencia y el perfil espectral obtenido en la descomposición (para cada uno de los F analitos de interés que contenga la muestra) y iii) observando la coherencia entre los patrones medidos en el laboratorio y el perfil obtenido en el modo muestral con la descomposición PARAFAC.

Conviene indicar que en las descomposiciones PARAFAC realizadas en los diferentes capítulos de esta memoria, en las que se han utilizado datos procedentes de HPLC-DAD, se han seleccionado ventanas de tiempo independientes para cada pico cromatográfico, excepto cuando aparecía solapamiento de picos en cuyo caso se ha trabajado con una ventana de tiempo cromatográfico que abarca ambas señales.

Mientras que PARAFAC aplica los mismos factores (**A**, **B**) a lo largo de un conjunto de matrices **X**, como se muestra en la Ecuación (III.14), PARAFAC2 aplica el mismo factor a lo largo de un perfil y sin embargo, permite a otro factor en la matriz que varíe. Esto es de suma importancia en cromatografía cuando existen pequeños desplazamientos en los tiempos de retención de los picos cromatográficos.

Un modelo PARAFAC2 con F factores se describe como se muestra en la Ecuación (III.15).

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A}_k \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T + \mathbf{E}_k, \quad k=1, 2, \dots, K; \quad (\text{III.15})$$

Donde \mathbf{A}_k es una matriz ($I_k \times F$), con I_k filas que no son necesariamente iguales para todos los $k = 1, \dots, K$; \mathbf{D}_k es una matriz diagonal de loadings ($F \times F$), que tiene el mismo significado que en la Ecuación (III.14) y **B** es una matriz de loadings ($J \times F$) que no varían con k .

III.2.2. Determinación del número de factores

El reto más importante al hacer estas descomposiciones basadas en PARAFAC o PARAFAC2 es la elección apropiada del número de factores. El número de factores adecuado será aquel que consiga que el modelo sea capaz de describir el comportamiento trilineal de los datos. Es posible utilizar técnicas de validación cruzada [26], en las que se parte el cubo de datos por varios sitios lo que se denomina "split-half" [27]. En concreto consiste en dividir el tensor experimental en dos mitades siguiendo una de las vías que son analizadas independientemente. Debido a la unicidad del modelo PARAFAC, si se elige el número correcto de factores, se tendrá que obtener el mismo resultado para el modelo con el tensor que para los modelos realizados con las particiones. Si el modelo es estable al aplicar el "split-half" indica que el modelo captura la variación esencial, y no la relacionada sólo con determinadas muestras.

Pero si, por otro lado, algunas componentes no son estables con este análisis, podría significar o que el modelo no es válido, o por el contrario que algún factor solo se encuentre presente en una de las particiones y no en la otra. A veces esto sucede cuando el modo muestral se corresponde con patrones de calibrado, donde dependiendo de la magnitud de los interferentes estos factores sólo se hacen patentes en las muestras de concentraciones de los patrones más bajas.

En general, el criterio mayoritariamente utilizado es un índice conocido como diagnóstico de la consistencia del núcleo (CORCONDIA, Core Consistency Diagnostic). El índice de CORCONDIA ha sido desarrollado en la Ref. [28] para PARAFAC y en la Ref. [29] para PARAFAC2. Un índice de CORCONDIA próximo a 100% implica que el modelo es apropiado. Un modelo será completamente trilineal cuando este índice sea del 100%, valores menores se deben a pérdidas de trilinealidad del modelo. Se recomiendan como regla aproximada que valores en torno al 90% deben ser interpretados como trilineales. Cuando existe una falta de trilinealidad, suele afectar a los loadings, apareciendo degeneraciones en los mismos (perfiles casi idénticos duplicados). También es común que el número de iteraciones necesarias para ajustar el modelo aumente. En el caso de que un modelo con mayor número de factores sea aceptable (trilineal) pero no mejore la explicación o la predicción de los datos se aplicará el principio de parsimonia, optando por el modelo de menor número de factores entre aquellos que ofrecen resultados equivalentes. A toda esta explicación hay que añadir, que en Química Analítica disponemos de una ayuda para identificar el perfil muestral, patrones de calibrado de concentración conocida. La pauta encontrada debe ser coherente con los patrones que el investigador ha preparado en el laboratorio.

III.2.3. Calibrado basado en una descomposición PARAFAC

En los Epígrafes II y III del Capítulo VI y en el Capítulo VIII de esta memoria, los modelos de calibrado basados en una descomposición PARAFAC con datos cromatográficos se realizan teniendo en cuentas las siguientes etapas:

- i) Registrar la matriz para cada muestra, de dimensión $I \times J$, siendo I el número de tiempos registrados y J el número de las longitudes de onda del espectro. Con estos datos se construye el tensor $\underline{\mathbf{X}}$, obtenido al unir los K patrones de calibrado.
- ii) Calcular la descomposición PARAFAC del cubo $\underline{\mathbf{X}}$, para obtener los perfiles cromatográfico, espectral y muestral de los analitos (el de interés y los posibles interferentes si hubiera). Inicialmente se pueden poner restricciones de no negatividad y/o unimodalidad a los perfiles con el fin de conseguir que la varianza explicada y el índice de CORCONDIA mejoren. Se debe controlar que todos los patrones de calibrado tengan los estadísticos habituales, T^2 y Q , debajo de un umbral crítico (usualmente 95% confianza).
- iii) Identificar el factor, f_0 , que se corresponde con el analito de interés y cualquier otro factor, f_i , de los interferentes si los hubiera, utilizando para ello la correlación entre el espectro de cada factor obtenido en la descomposición PARAFAC con el de una muestra de referencia en el caso de los perfiles espectrales. En el perfil cromatográfico se controlará que el tiempo de retención relativo de un analito frente a una muestra de referencia no supera el porcentaje establecido.
- iv) Obtener la curva de calibrado haciendo la regresión de los "loadings" del perfil muestral correspondientes al factor identificado en el paso anterior, ($c_{f0} = (c_{1f0}, c_{2f0}, \dots, c_{kf0})$), *versus* la concentración del analito de interés en cada muestra patrón.
- v) Evaluar las figuras de mérito del método (veracidad, precisión, límite de decisión, capacidad de detección) mediante una nueva regresión entre la concentración obtenida con la descomposición PARAFAC (modelo de calibrado del paso iv)) *versus* la concentración añadida del compuesto analizado.
- vi) Cuantificar la concentración del analito de interés en las muestras problema. Para ello, se registra el cromatograma de estas muestras en las mismas condiciones del apartado i), se incorporan los datos obtenidos al tensor $\underline{\mathbf{X}}$ efectuándose la descomposición PARAFAC del nuevo tensor $\underline{\mathbf{X}}_{\text{ampliado}}$. Analizando los estadísticos Q y T^2 se garantiza que las muestras problema sean similares a los patrones del calibrado. Los valores de los "loadings" en los tres perfiles deberán estar por debajo de los valores críticos de Q y T^2 al nivel de confianza elegido (usualmente el 95%). En el procedimiento anterior descrito, concatenar las matrices de los cromatogramas-espectros de los patrones junto con los de las muestras problemas para hacer la descomposición PARAFAC, es

el método más utilizado. Otro procedimiento alternativo, sería proyectar las matrices registradas sobre la descomposición obtenida con los patrones. Cuando se utiliza este segundo procedimiento, en la etapa de predicción es necesario considerar en general más factores que los obtenidos con los patrones de calibrado para evitar un sesgo en la cuantificación del analito en la muestra problema, como consecuencia es necesario llevar a cabo otra descomposición PARAFAC.

III.3. Tecnología Analítica de Procesos y Calidad Diseñada

La Tecnología Analítica de Procesos (PAT por sus siglas en inglés), es el sistema para diseñar, analizar y controlar la fabricación a partir de datos de las materias primas, del proceso y ambientales con la finalidad de garantizar una calidad establecida del producto final mediante los valores de los atributos críticos de calidad.

El análisis de procesos persigue definir estrategias para una producción inteligente. Al contrario de un análisis basado en partes del proceso, se focaliza en la necesidad de una aproximación holística en la que lo multivariante será la clave que soporte la producción de materiales inteligentes en fábricas inteligentes según puede leerse en la Ref. [30].

Este mismo autor incide en la necesidad de que la industria manufacturera tome iniciativas para el desarrollo de tecnologías y productos sostenibles, ya que la disminución de los recursos y el crecimiento de la población suponen un grave riesgo en un futuro inmediato. Detalla que la industria manufacturera es la mayor fuente de riqueza en Europa, proporcionando un 70% de la misma aun cuando sólo un tercio o menos de la población está empleada en este sector. Además, la industria manufacturera financia el 90% del desarrollo de la industria de la tecnología de la información y de la consultoría empresarial.

Por este motivo, la fabricación inteligente ha despertado un gran interés en los últimos años por parte de la Comisión Europea. También ha tomado cartas en el asunto la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), la cual publicó en 2011 una guía técnica sobre la validación de procesos de manufacturación [31]. En ella se describe una validación en tres etapas: i) diseño del proceso, se define el proceso y se marcan los criterios de control; ii) calificación del proceso, se evalúa la viabilidad y reproducibilidad del proceso; iii) verificación continua del proceso, en base a los resultados observados con el control continuo para implementar mejoras tanto en el desarrollo del proceso como de los propios criterios de control.

La idea de la Calidad Diseñada (QbD por sus siglas en inglés) con las herramientas proporcionadas desde la PAT es flexibilizar los procesos de producción adoptando herramientas científicamente fundamentadas, para asegurar la calidad del producto

final desde el diseño inicial del proceso. La implementación de estas propuestas requiere la caracterización cuantitativa del proceso y del producto y herramientas quimiométricas adecuadas de modelado que soporten la toma de decisiones y que, además, deberán ser rápidas, flexibles, "abiertas" y necesariamente multivariantes porque los procesos siempre dependen de múltiples factores, parámetros o propiedades de la materia prima implicada en la producción ("variables de proceso") y también son multirrespuesta (varias variables de calidad del producto final).

La introducción en el ámbito farmacéutico por parte de la FDA (Federal Drug Administration) en 2004 [32-34] de un modo más flexible e innovador de garantizar la calidad mediante su diseño (QbD) junto con las herramientas metodológicas que se agrupan en lo que se conoce como PAT, han supuesto un cambio en la manera de entender el control de procesos, no sólo en el campo farmacéutico. De hecho, el editorial del número de marzo de 2017 de la revista *Journal of Chromatography A* hace referencia explícita, en el ámbito de la espectroscopía, a la necesidad de tecnologías punteras, unidas a métodos avanzados de análisis de datos, que proporcionen la capacidad de monitorizar procesos en tiempo real. En la revisión a la que hace referencia [35] menciona explícitamente "*Besides being encouraged by the Food and Drug Administration's (FDA's) PAT initiative, promises to improve process understanding, reduce overall production costs and help to implement continuous manufacturing. ...In order to exploit the full potential of gathered data, chemometric tools are widely used for the evaluation of complex spectroscopic information*". Kessler [30], en 2013, ya mencionaba el carácter necesariamente transversal de la metodología que permitirá avanzar en este campo.

En la industria farmacéutica está teniendo un impacto creciente, asociar sensores espectroscópicos (UV-Vis, NIR, IR, Raman y fluorescencia de excitación-emisión) y métodos quimiométricos. Los sensores espectroscópicos actualmente son muy asequibles y junto con las técnicas quimiométricas permiten un amplio muestreo y determinación "en línea" de la composición química, estructura, estado de oxidación, autenticidad, etc. La demanda creciente por parte de los consumidores y de las agencias reguladoras para producir productos seguros, asequibles, de alta calidad y de modo sostenible forzarán a muchas industrias a intensificar la implementación de las herramientas de la PAT junto con los diseños de experimentos.

El interés por los métodos multivariantes de análisis de datos y por el diseño de experimentos ha crecido mucho en el contexto de la Tecnología Analítica de Procesos, debido a la necesidad de utilizar metodología para el análisis sistemático de grandes conjuntos de datos que se obtienen con relativa facilidad de los sistemas de medida. En este sentido, los modelos en variables latentes (LVM, Latent Variable Models) muestran un potencial que va más allá de la mera gestión estándar de los datos [36]. Una de las razones de este interés creciente es que, los modelos basados en variables latentes, sirven para relacionar la calidad del producto final con la situación del

proceso al elaborarlo (variables de proceso o de materia prima) y han demostrado ser útiles, tanto por su capacidad predictiva como por la reducción de la dimensionalidad. Además, permiten acoplar la información proporcionada por el modelo a los conocimientos de ingeniería, esto a su vez permite la comprensión del proceso y en consecuencia su mejora permanente [37].

Los modelos en variables latentes, en concreto PLS2, capturan la correlación, tanto entre las características de calidad que definen el producto, como de las variables de proceso, estableciendo además una relación entre ellas. Una última ventaja a mencionar es que el uso de los estadísticos Q y T^2 proporciona un procedimiento para decidir si una nueva operación del proceso está en el espacio latente construido, teniendo eso lugar antes de aplicar el modelo de regresión que estima las características de calidad predichas para la nueva situación del proceso.

La novedad consiste en pasar del modelo de predicción habitual a partir de variables de proceso, a centrar la atención sobre las características deseadas para el producto, es decir, aquel que tiene propiedades específicas definidas "a priori". El problema ahora reside en invertir el modelo PLS2 para encontrar los valores de las variables de proceso que deben ser utilizadas, garantizando el cumplimiento de las especificaciones en el producto. El estudio de la viabilidad de esa inversión, con las restricciones necesarias para garantizar alguna solución, se conoce como la inversión de modelos de variables latentes (LVMI, Latent Variable Model Inversion). En la bibliografía, se describen básicamente dos maneras distintas de abordar el problema de la factibilidad del producto [38,39] mediante la inversión del modelo. Pero en esta memoria se ha optado por un método computacional para realizar la inversión del modelo PLS2 puesto a punto por nuestro grupo de investigación [40], basado en un algoritmo genético que permite encontrar el frente Pareto de las soluciones óptimas, que se verá con más detalle en el Capítulo VII de esta memoria.

III.3.1. Calidad Analítica Diseñada, AQbD

El concepto de la QbD y la estrategia para conseguirla no se limitan al desarrollo de un producto o la mejora de un proceso de producción, también son aplicables directamente a los métodos analíticos. Es una alternativa, científicamente fundamentada, a los métodos tradicionales de validación del método analítico, como por ejemplo se describe en la ICH Q2 (R1) [41]. En la aproximación tradicional, la identificación de los factores que inciden en la calidad del resultado analítico final se optimizan separadamente ("uno cada vez") lo que hace costosa la validación y además, no se adquiere conocimiento global sobre su funcionamiento. Como consecuencia, se reduce la adaptabilidad del método analítico a condiciones de uso variables. Una vez establecido el método no se sabe qué posibilidades de variación en

los factores que le afectan pueden conducir a una suficiente calidad de la medida. Por lo tanto, la necesidad de introducir la QbD es evidente.

AQbD, es el concepto de Calidad Diseñada (QbD) aplicado al desarrollo de un método analítico. La idea central es desarrollar el método de modo que se mantenga la calidad que se desea que tenga el método, el llamado "perfil analítico objetivo" (ATP, Analytical Target Profile), permitiendo variaciones en los parámetros de control del método (CMP, Control Method Parameters). En analogía con la QbD se construirá un modelo tal que sea posible predecir el ATP a partir de los CMP. Invirtiendo el modelo PLS2, en este caso, se podrá obtener el espacio de diseño asociado a un ATP predefinido, este espacio de diseño se conoce con el nombre de "región operable del diseño" (Method Operable Design Región, MODR).

La AQbD ha despertado bastante interés, destacan las revisiones dedicadas específicamente a este concepto [42-45] incluso aparece en las revisiones sistemáticas de cromatografía [46], en esta última, 47 citas de las 158 referenciadas se refieren a este concepto. Las autoridades reguladoras no son ajenas a este nuevo paradigma en el ámbito del análisis químico, un resumen de la posición de la FDA puede verse en la Ref. [47] y en la sección "Application of the concepts defined in ICH Q8 (R2) in the area of analytical methods" [32] desarrollada en el marco de una acción conjunta de la Agencia Europea del Medicamento y la FDA para armonizar procedimientos y aplicaciones de la QbD.

El diseño de experimentos es un elemento clave de la calidad analítica diseñada, para conseguir que la relación entre los CMP y el ATP sea multivariante, multirrespuesta y altamente predictiva. Pero metodológicamente y conceptualmente la AQbD es mucho más amplia. Sin embargo, muchos investigadores piensan erróneamente que optimizar un método analítico mediante diseño de experimentos es AQbD omitiendo la necesidad de obtener la región MODR después de definir el ATP deseado.

El hecho de que QbD haya sido promocionada por la FDA en la industria farmacéutica, y la necesidad de controlar los principios activos y las impurezas en las materias primas y productos acabados, ha provocado que solo haya aplicaciones de AQbD en cromatografía de líquidos [48,49]. Hay que tener en cuenta que la posibilidad de tener acreditados procesos con QbD exige disponer de métodos cromatográficos capaces de determinar principios activos e impurezas en escenarios cambiantes de materia prima, producción e incluso durante el tiempo de vida del producto, esto exige que el método analítico de control tenga bien justificado una MODR.

En la AQbD juega un papel importante la Tecnología Analítica de Procesos, PAT, donde se dispone de datos de las materias primas, del proceso y ambientales (datos recogidos en una matriz de variables predictoras \mathbf{X}) con la finalidad de garantizar la calidad del producto final establecida mediante los valores de los atributos críticos de

calidad (matriz de variables respuestas Y). Actualmente PAT es un estándar en la acreditación de procesos [34,50].

La relación entre X e Y en esta memoria se hará, como se ha expuesto en la sección anterior, mediante un modelo de regresión basado en variables latentes ("projection latent space" o "partial least squares") PLS2. En el Capítulo VII de esta memoria se detalla más en profundidad el procedimiento. Una vez construido el modelo PLS2, como se acaba de decir, es necesaria su inversión para establecer el espacio de diseño, es decir, el dominio en el que pueden modificar las variables predictoras manteniendo la calidad en las respuestas. En el ámbito del laboratorio de análisis, más concretamente cuando se va a llevar a cabo una cromatografía líquida (HPLC-DAD), los parámetros de proceso se convierten en las variables de control del método (composición fase móvil, flujo etc.) y las características de calidad, ATP, serán el perfil cromatográfico deseado (resolución entre picos contiguos, tiempos inicial y final adecuados, etc.) La Figura III.4 muestra esquemáticamente como sería el procedimiento cuando se emplea la cromatografía líquida (HPLC-DAD) como técnica de análisis. La ventaja cuando se trabaja en el laboratorio es que los CPM pueden diseñarse, es decir, es posible decidir qué experimentos se eligen para realizar el modelo PLS2. Para esto último los diseños D-óptimos cobran especial interés ya que permiten reducir en gran medida el esfuerzo experimental.

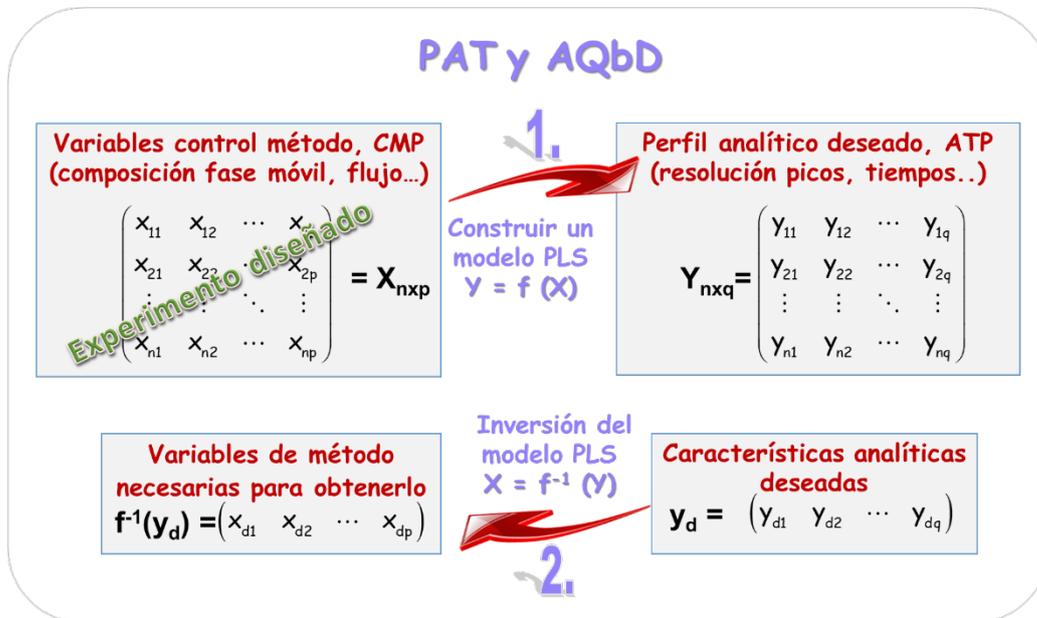


Figura III.4. Esquema del procedimiento para la inversión de un modelo PLS con datos de HPLC-DAD.

III.4. Referencias

- [1] L.S. Riter, O. Vitek, K.M. Gooding, B.D. Hodge, R.K. Julian, Statistical design of experiments as a tool in mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 40 (2005) 565-579. <https://doi.org/10.1002/jms.871>
- [2] G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York, 1998. <https://doi.org/10.1201/9780203508688>
- [3] L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, M.S. Sánchez, Response surface methodology, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* 2nd edition. Chemical and Biochemical Data Analysis, Elsevier, 2020, pp. 287-326. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14756-0>
- [4] V.V. Fedorov, *Theory of optimal experiments*, 1st edition, Academic Press, New York, 1972.
- [5] D. Mathieu doctoral dissertation, *Contribution of experimental design methodology to the study of structure-activity relations*, University of Aix-Marseille, 1981.
- [6] G. Derringer, R. Suich, Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology* 12 (1980) 214-219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- [7] M.E. Rueda, L.A. Sarabia, A. Herrero, M.C. Ortiz, Optimisation of a flow injection system with electrochemical detection using the desirability function: Application to the determination of hydroquinone in cosmetics, *Analytica Chimica Acta* 479 (2003) 173-184. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01542-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01542-8)
- [8] M.C. Ortiz, A. Herrero, S. Sanlloriente, C. Reguera, Methodology of multicriteria optimization in chemical analysis: Some applications in stripping voltammetry, *Talanta* 65 (2005) 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.06.031>
- [9] I. García, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, J.M. Aldama, Optimization of the chromatographic conditions for the determination of hormones by gas chromatography with mass spectrometry detection, *Analytica Chimica Acta* 544 (2005) 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.04.022>
- [10] C. Reguera, M.C. Ortiz, A. Herrero, L.A. Sarabia, Optimization of a FIA system with amperometric detection by means of a desirability function: Determination of sulfadiazine, sulfamethazine and sulfamerazine in milk,

- Talanta 75 (2008) 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.030>
- [11] R. Bro doctoral dissertation, Multi-way analysis in the food industry. Theory, algorithms and applications, University of Amsterdam, 1998, pp. 135-184. Available at <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.24.5344>
- [12] A. Smilde, R. Bro, P. Geladi, Multi-way analysis with applications in the chemical sciences, John Wiley & Sons, Chichester, 2004. <https://doi.org/10.1002/0470012110>
- [13] P.M. Kroonenberg, Applied multiway data analysis, John Wiley & Sons, New Jersey, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470238004>
- [14] P.M. Kroonenberg, Three-mode principal component analysis: Theory and applications, DSWO Press, Leiden, 1983. Available at https://www.researchgate.net/publication/243779184_Three-Mode_Principal_Component_Analysis_Theory_and_Applications (Last access on 10 December 2020).
- [15] W.P. Krijnen, The analysis of three-way arrays by constrained PARAFAC methods, DSWO Press, Groningen, 1993.
- [16] J. Ferré, R. Boqué, N.M. Faber, Multiway data analysis: Eigenvector-based methods, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), Comprehensive Chemometrics 1st edition. Chemical and Biochemical Data Analysis, Elsevier, 2009. pp. 365-409. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00052-1>
- [17] G. Tomasi, R. Bro, Multilinear models: Iterative methods, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), Comprehensive Chemometrics 1st edition. Chemical and Biochemical Data Analysis, Elsevier, 2009. pp. 411-451. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00053-3>
- [18] K.S. Booksh, B. Bronk, J. Czege, Three-way calibration, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), Comprehensive Chemometrics 1st edition. Chemical and Biochemical Data Analysis, Elsevier, 2009. pp. 379-412. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00078-8>
- [19] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, Practical three-way calibration, Elsevier, Amsterdam, 2014. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-07419-4>
- [20] A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri, Data Handling in Science and Technology: Fundamentals and analytical applications of multiway calibration, volume 29, Elsevier, Amsterdam, 2015.
- [21] E. Meléndez, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, Parallel factor analysis for monitoring data from a grape harvest in Qualified Designation of Origin Rioja including

- spatial and temporal variability, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 146 (2015) 347-353. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.06.003>
- [22] M. Hooshyari, L. Rubio, M. Casale, S. Furlanetto, F. Turrini, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, D-optimal design and PARAFAC as useful tools for the optimisation of signals from fluorescence spectroscopy prior to the characterisation of green tea samples, *Food Analytical Methods* 12 (2019) 761-772. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-01408-0>
- [23] Commission Decision (EC) No 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities* L 221/8, 2002.
- [24] SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed, European Commission, 2017.
- [25] EUR 27529 EN, JRC 98028, Practical guidelines on the application of migration modelling for the estimation of specific migration, European Commission, 2015. <http://doi.org/10.2788/04517>
- [26] S. Gourvéneç, G. Tomasi, C. Durville, E. Di Crescenzo, C.A. Saby, D.L. Massart, R. Bro, G. Oppenheim, CuBatch, a MATLAB® interface for n-mode data analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 77 (2005) 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.01.027>
- [27] R.A. Harshman, W.S. de Sarbo, An application of PARAFAC to a small sample problem, demonstrating preprocessing, orthogonality constraints, and split-half diagnostic techniques, in: H.G. Law, C.W. Snyder, J.A. Hattie, R.P. McDonald (Eds.), *Research methods for multi-mode data analysis*, Praeger, New York, 1984, pp. 602-642.
- [28] R. Bro, H.A.L. Kiers, A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models, *Journal of Chemometrics* 17 (2003) 274-286. <https://doi.org/10.1002/cem.801>
- [29] M.H. Kamstrup-Nielsen, L.G. Johnsen, R. Bro, Core consistency diagnostic in PARAFAC2, *Journal of Chemometrics* 27 (2013) 99-105. <https://doi.org/10.1002/cem.2497>
- [30] R.W. Kessler, Perspectives in process analysis, *Journal of Chemometrics* 27 (2013) 369-378. <https://doi.org/10.1002/cem.2553>
- [31] FDA, Guidance for Industry, Process validation: General principles and practices, U.S. Department of Health and Human Services

- Food and Drug Administration, January 2011. Available at <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Process-Validation--General-Principles-and-Practices.pdf>
- [32] EMA/430501/2013, EMA-FDA pilot program for parallel assessment of Quality-by-Design applications: Lessons learnt and Q&A resulting from the first parallel assessment, European Medicines Agency – U.S. Food and Drug Administration, 2013. Available at http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2013/08/WC500148215.pdf (Last access on 10 December 2020).
- [33] FDA, Pharmaceutical CGMPs for the 21st century – A risk based approach, Final report, U.S. Department of Health and Human Services – U.S. Food and Drug Administration, September 2004. <https://www.fda.gov/media/77391/download>
- [34] FDA, Guidance for industry, PAT – A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance, U.S. Department of Health and Human Services – U.S. Food and Drug Administration, Rockville, September 2004. <https://www.fda.gov/media/71012/download>
- [35] M. Rüdts, T. Briskot, J. Hubbuch, Advances in downstream processing of biologics – Spectroscopy: An emerging process analytical technology, *Journal of Chromatography A* 1490 (2017) 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.010>
- [36] E. Tomba, P. Facco, F. Bezzo, M. Barolo, Latent variable modelling to assist the implementation of Quality-by-Design paradigms in pharmaceutical development and manufacturing: A review, *International Journal of Pharmaceutics* 457 (2013) 283-297. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.074>
- [37] M. Ottavian, E. Tomba, M. Barolo, Advanced process decision making using multivariate latent variable methods, in: M. Ierapetritou, R. Ramachandran (Eds.), *Process simulation and data modeling in solid oral drug development and manufacture*, Humana Press, Springer, New York, 2016, pp. 159-189. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2996-2_6
- [38] S. García-Muñoz, T. Kourti, J.F. MacGregor, F. Apruzzese, M. Champagne, Optimization of batch operating policies. Part I. Handling multiple solutions, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45 (2006) 7856-7866. <https://doi.org/10.1021/ie060314g>
- [39] E. Tomba, M. Barolo, S. García-Muñoz, General framework for latent variable model inversion for the design and manufacturing of new products,

- Industrial & Engineering Chemistry Research 51 (2012) 12886-12900.
<https://doi.org/10.1021/ie301214c>
- [40] S. Ruiz, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, A computational approach to partial least squares model inversion in the framework of the process analytical technology and quality by design initiatives, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 182 (2018) 70-78.
<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.08.014>
- [41] ICH Q2 (R1), Validation of analytical procedures: Text and methodology, European Medicines Agency, 1995. Available at
https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
(Last access on 10 December 2020).
- [42] S. Orlandini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Application of quality by design to the development of analytical separation methods, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 443-450. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6302-2>
- [43] R. Peraman, K. Bhadraya, Y.P. Reddy, Analytical Quality by Design: A tool for regulatory flexibility and robust analytics, *International Journal of Analytical Chemistry* 868727 (2015) 1-9.
<https://doi.org/10.1155/2015/868727>
- [44] S. Goswami, R. Chakraverty, A review on application of Quality by Design concept to analytical techniques, *International Journal of Current Research In Health And Biological Sciences* 1 (2016) 100-108.
<https://www.academia.edu/download/50084839/QbD.pdf>
- [45] P. Das, A. Maity, Analytical Quality by Design (AQbD): A new horizon for robust analytics in pharmaceutical process and automation, *International Journal of Pharmaceutics and Drug analysis* 5 (2017) 324-337.
<http://ijpda.com/index.php/journal/article/view/295>
- [46] T. Tome, N. Žigart, Z. Časar, A. Obreza, Development and optimization of liquid chromatography analytical methods by using AQbD principles: Overview and recent advances, *Organic Process Research & Development* 23 (2019) 1784-1802. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00238>
- [47] S. Chatterjee, QbD considerations for analytical methods – FDA perspective, IFPAC Annual Meeting, Baltimore, 2013. Available at
<https://qbdworks.com/wp-content/uploads/2014/06/AnalyticalQbDIFPAC.pdf>

- [48] A. Dispas, H.T. Avohou, P. Lebrun, P. Hubert, C. Hubert, 'Quality by Design' approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 101 (2018) 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.028>
- [49] P.K. Sahu, N.R. Ramiseti, T. Cecchi, S. Swain, C.S. Patro, J. Panda, An overview of experimental designs in HPLC method development and validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147 (2018) 590-611. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>
- [50] EU guidelines for good manufacturing practice for medicinal products for human and veterinary use, Volume 4, Annex 15, European Commission, 2015. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2015-10_annex15.pdf (Last access on 10 December 2020).

CAPÍTULO IV

INSTRUMENTACIÓN

IV.1. Introducción

La técnica analítica utilizada durante el desarrollo de la tesis doctoral ha sido la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) acoplada a diferentes detectores, de fluorescencia (FLD) o de diodos en serie (DAD).

El análisis de una muestra compleja, bien sea porque presenta varios analitos de interés o múltiples interferentes en su matriz, requiere de una etapa de separación para mejorar la selectividad y sensibilidad del método analítico. Hasta mediados del siglo XX las separaciones analíticas se llevaban a cabo mediante precipitación, destilación o extracción. Sin embargo, gracias al ruso Mikhail Tswett se introdujo la cromatografía como técnica de separación analítica, el cual realizó la separación de pigmentos vegetales empleando una columna rellena de carbonato de calcio y haciendo pasar por ella éter de petróleo [1,2].

En la separación cromatográfica, técnica aplicable y muy utilizada en todas las ramas de la ciencia, intervienen dos fases inmiscibles: la fase móvil (FM) en la que se disuelve la muestra, y la fase estacionaria (FE) por la que se hace pasar la fase móvil. Su fundamento se encuentra en la diferencia de velocidad del movimiento del soluto a través de la FE: aquellos componentes que son retenidos se mueven lentamente con el flujo de la FM, sin embargo, los que se unen débilmente se desplazan con rapidez por la FM [1,3].

Atendiendo al tipo de contacto entre FM y FE, existen la cromatografía en columna (la FE está contenida en un tubo estrecho y la FM se desplaza por gravedad o presión) y la cromatografía plana (la FE se fija sobre una placa plana y la FM se mueve por capilaridad o gravedad). Según el estado físico de la FM se pueden distinguir tres tipos de cromatografía: de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos. Por último, en función del tipo de mecanismo de separación se diferencian las cromatografías de adsorción, de reparto, de intercambio iónico, de exclusión y de afinidad [1,3].

La cromatografía líquida en columna es la técnica más antigua dentro de la cromatografía, pero alcanzó su punto álgido en la década de los setenta cuando surge el desarrollo de la cromatografía de líquidos de alta eficacia, comúnmente conocida como HPLC (de las siglas en inglés de High Performance Liquid Chromatography). La técnica HPLC destaca por su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, principalmente, por su gran aplicabilidad a sustancias, como aminoácidos, proteínas, hidrocarburos, fármacos, plaguicidas, antibióticos, etc., que son de primordial interés en la industria, en la ciencia y en la sociedad en general [2,3].

Los equipos empleados en HPLC suelen ser más sofisticados y caros que aquellos utilizados en otras técnicas cromatográficas. Principalmente se debe a que se requieren presiones elevadas para alcanzar un caudal de eluyente razonable para tamaños de partícula de relleno de columna del orden de μm . Un sistema moderno de

cromatografía de líquidos está compuesto por los elementos básicos recogidos en la Figura IV.1 y desarrollados en los siguientes apartados: i) recipientes para la fase móvil y tratamiento de los disolventes, ii) sistema de bombeo, iii) sistema de inyección de la muestra, iv) columna para cromatografía de líquidos con su relleno correspondiente, v) detector y vi) sistema capaz de informar del resultado de la separación (procesador) [2-4].

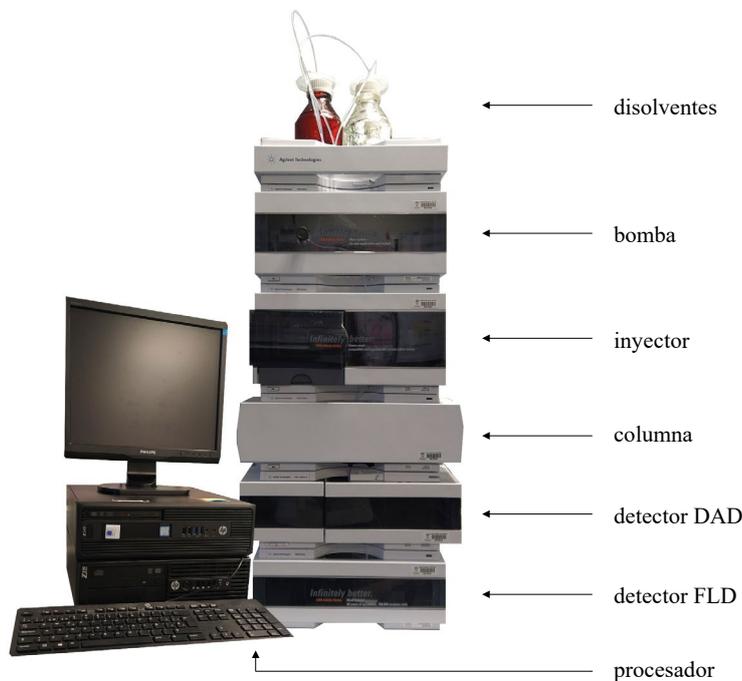
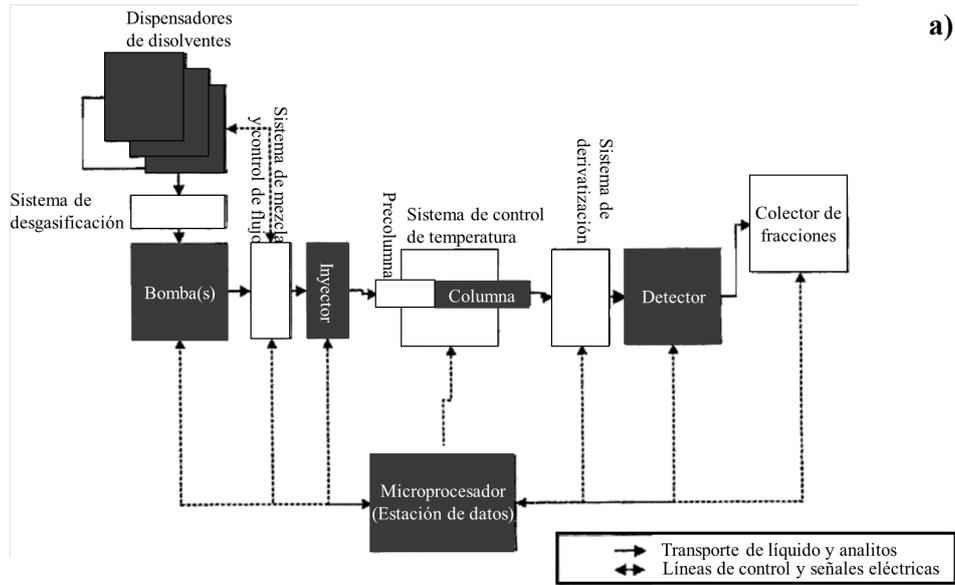


Figura IV.1. a) Diagrama esquemático de la instrumentación necesaria y recomendable en HPLC, mostrado en la Ref. [3]. b) Componentes y distribución del equipo HPLC de la casa comercial Agilent Technologies, disponible en el laboratorio de investigación.

IV.2. Disolventes de la fase móvil

Un sistema de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio, acero inoxidable o politetrafluoroetileno (PTFE), cada uno de los cuales contiene un disolvente. También incluye accesorios para evitar el daño de los componentes del equipo, como desgasificadores y filtros. La entrada al sistema tanto de burbujas como de partículas en suspensión afecta al detector. Además, las burbujas pueden provocar ensanchamiento de pico, y las partículas daños en la bomba, el sistema de inyección y obstrucción de la columna [2,3].

La velocidad y la composición de mezcla a las que los disolventes son introducidos en el sistema para llevar a cabo la separación pueden ser constantes durante todo el análisis, modo de elución isocrático. Sin embargo, para mejorar la eficacia también pueden modificarse a lo largo de la separación, modo de elución gradiente [2-4].

IV.3. Sistema de bombeo

La impulsión de la muestra y fase móvil por el sistema se produce gracias a la presencia de una bomba. Las características de la bomba utilizada en HPLC deben garantizar un flujo constante y reproducible, amortiguar las oscilaciones provocadas por cambios en el caudal que provocan ruido en el detector, ser químicamente inertes y resistentes mecánicamente y permitir cambios rápidos de disolvente [3].

Un alto porcentaje de los cromatógrafos comerciales incorporan en sus sistemas bombas recíprocas, las cuales disponen de una o varias cámaras desde las que se impulsa la fase móvil mediante pistones. La ventaja de este tipo de bombas reside en un volumen interno pequeño, una presión de salida alta, una fácil adaptación a la elución con gradiente y una velocidad de flujo constante. Sin embargo, hay que mencionar que el flujo que producen es pulsado y debe amortiguarse posteriormente [2,3].

IV.4. Sistema de inyección de la muestra

Un sistema de inyección adecuado requiere de reproducibilidad en la introducción de la muestra en la columna, evitar la sobrecarga de la misma (muestras de hasta 500 μL) e introducir la muestra sin modificar la presión del sistema. En HPLC el sistema más utilizado es la válvula de inyección que cuenta con dos circuitos uno conectado al exterior y otro al sistema, cuyas posiciones son fácilmente intercambiables [2,4].

De esta manera, cuando se encuentra en la posición de carga (Figura IV.2a), mientras que la bomba está impulsando fase móvil hacia la columna, por el otro circuito se introduce la muestra desplazándose hasta el bucle (puerto 1). En ese momento, la

válvula cambia a la posición de inyección (Figura IV.2b) permitiendo así que la muestra se dirija hacia la columna. Acto seguido la válvula vuelve a cambiar a la posición de carga para que el flujo de fase móvil desde la bomba hacia la columna continúe y se pueda cargar la siguiente muestra a analizar [3,4].

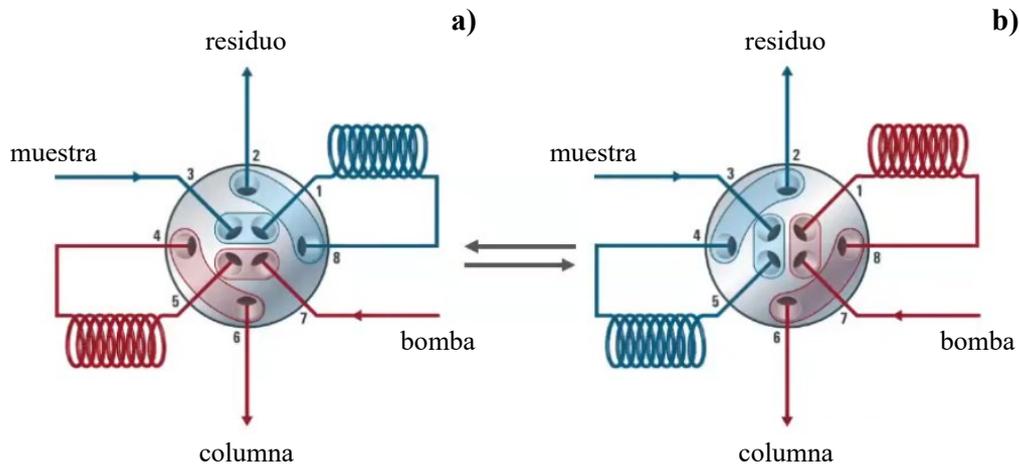


Figura IV.2. Posiciones de a) carga y b) inyección de una válvula de inyección.

IV.5. Columna

Las columnas empleadas en HPLC normalmente son de acero inoxidable, capaz de soportar las altas presiones. Tanto la longitud como el diámetro son de tamaños variables. En ocasiones es recomendable utilizar una precolumna, de menor tamaño pero con la misma fase estacionaria, para proteger la columna y aumentar su vida útil [2,4].

La mayoría de las medidas realizadas mediante HPLC se llevan a cabo a temperatura ambiente. La variación de la temperatura a lo largo del día, incluso dependiendo de la época del año puede ser considerable. Por ello, habitualmente las columnas se sitúan en compartimentos termostatzados para un preciso control de la temperatura [2,3].

La separación se efectúa gracias a las interacciones entre los solutos, la FM y la FE y se rige por la transferencia de analito entre las fases. La constante de equilibrio (K) para este proceso de transferencia se denomina constante de distribución o de reparto, cuyo cálculo se muestra en la Ecuación (IV.1), donde C_E y C_M son las concentraciones de analito en FE y FM respectivamente [1]. De esta manera, los analitos que tienen una constante de distribución mayor, presentan más afinidad con la FE, y por tanto, eluyen más tarde. Esta afinidad suele venir expresada a través del coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$) [5] descrito en la Ecuación (IV.2).

$$K = \frac{C_E}{C_M} \quad (IV.1)$$

$$\log K_{OW} = \frac{[\text{analito}]_{\text{octanol}}}{[\text{analito}]_{\text{agua}}} \quad (IV.2)$$

Un aspecto crucial es la buena elección del material de relleno de columna. El tipo de relleno más utilizado en la cromatografía de reparto es el de partículas porosas unidas químicamente a un soporte. En sus orígenes, los materiales con los que se podían fabricar estas partículas eran sílice (más habitual), alúmina, resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico. A lo largo de los años, las diferentes casas comerciales han desarrollado, y continúan investigando en este campo, materiales modificados a partir de siloxano que permiten mejorar las separaciones y ampliar el campo de aplicabilidad [2-4].

Cuando el mecanismo de separación reside en la polaridad del relleno y de los disolventes empleados, se pueden distinguir la cromatografía de fase normal y de fase reversa (también denominada inversa). En la cromatografía de fase reversa la FE es apolar, habitualmente se utilizan rellenos de siloxanos con cadenas alquilo (C8, C18). La FM está compuesta por disolventes de naturaleza polar como agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. Los analitos apolares son más retenidos y tardan más en salir de la columna, para éstos su tiempo de retención disminuye al añadir a la FM disolventes apolares, como hexano o ciclohexano entre otros [2-4].

IV.6. Detector

Las características más importantes que debe de tener cualquier detector para HPLC son: tener sensibilidad a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal con el aumento de la concentración sin provocar ensanchamientos en los picos del cromatograma, ser insensible a variaciones de temperatura y composición del disolvente y tener un volumen interno mínimo. El sistema de detección puede basarse en una propiedad del efluente que se ve modificada por la presencia de los analitos o basarse en una propiedad del propio analito. Dentro del segundo grupo se encuentran los detectores de absorción molecular en ultravioleta-visible (UV-Vis) y de fluorescencia (FLD) entre otros [2-4].

Los detectores más utilizados en HPLC son los de absorción molecular en UV-Vis debido a que numerosos compuestos absorben la radiación en este rango del espectro electromagnético. Existen diferentes modelos, pero sin lugar a duda el detector de diodos en serie (DAD) es uno de los más funcionales gracias al registro del espectro completo a cada tiempo de elución. Su funcionamiento es el siguiente (Figura IV.3): la lámpara de descarga de arco de deuterio emite la energía en el rango de longitudes de onda impuesto para el análisis, el haz de luz se enfoca con ayuda de un espejo hacia

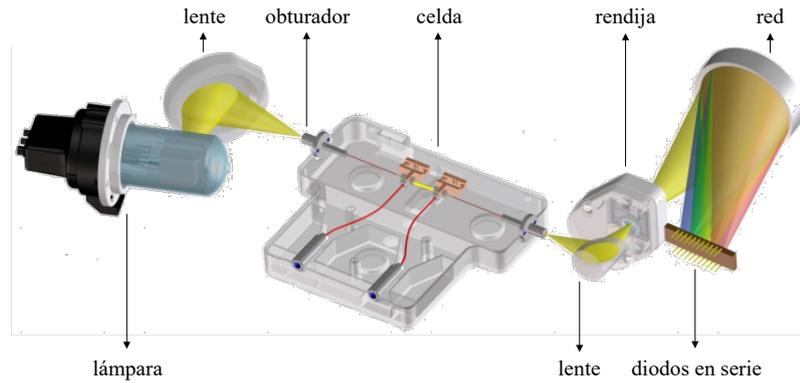


Figura IV.3. Elementos de un detector de diodos: lámpara, lente, obturador, celda, lente, rendija, red y diodos en serie.

la entrada de la celda de flujo, la radiación absorbida por la muestra contenida en la celda sale de ella, este haz se enfoca mediante un segundo espejo y pasa a través de una rendija u obturador que lo dirige hacia la red de difracción que es la encargada de dispersar la luz hacia la matriz de diodos en serie [2,3,6].

Los detectores de fluorescencia son menos empleados en HPLC debido a la limitación de las sustancias detectables (son especies fluorescentes los compuestos aromáticos no sustituidos, las sustancias alifáticas o alicíclicas con grupos carbonilo en su estructura, o compuestos con dobles enlaces conjugados), para las cuales resulta ser muy sensible, de ahí su aplicabilidad en los laboratorios. Este tipo de detectores funcionan con doble haz (Figura IV.4): la lámpara de flash de xenón emite el haz de

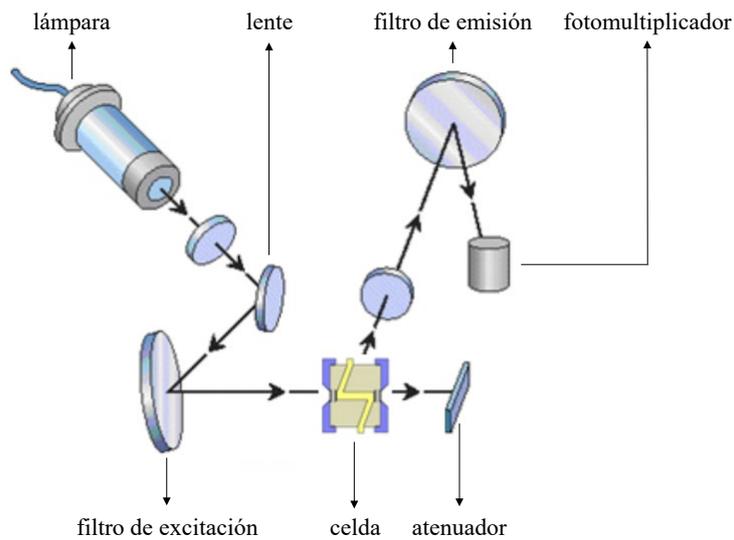


Figura IV.4. Elementos de un detector de fluorescencia: lámpara, lente, filtro de excitación, celda, filtro de emisión, atenuador y fotomultiplicador.

luz, a través de un espejo y de la red de difracción de excitación el haz se enfoca hacia la entrada de la celda de flujo. El papel de doble haz entra en juego a la salida de la celda: la radiación fluorescente es atenuada mediante un difusor, y la radiación emitida a 90° (respecto de la dirección de entrada) es dirigida a través de la red de difracción de emisión hacia el tubo fotomultiplicador [2,3,7].

IV.7. Procesador

El sistema de lectura muestra el resultado de la separación en forma de cromatograma (Figura IV.5), que consiste en una imagen que traduce visualmente la evolución de la señal del detector (que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna) en función del tiempo [2].

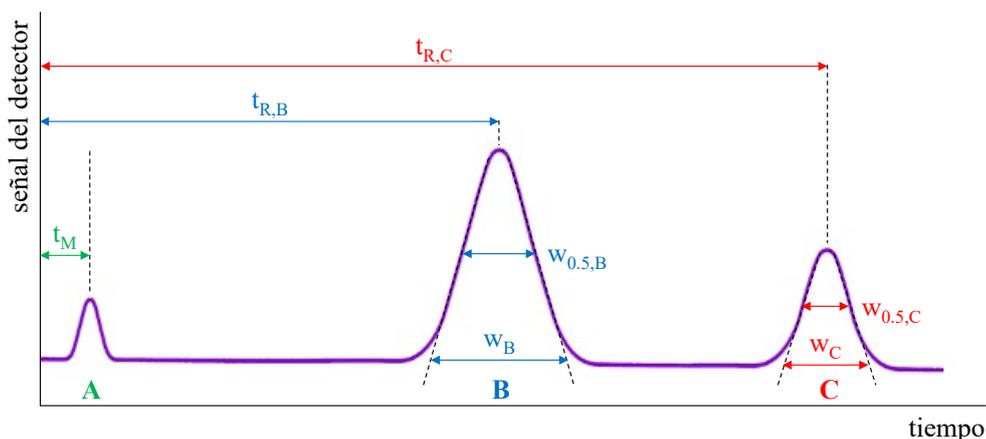


Figura IV.5. Cromatograma característico de una mezcla de tres componentes (A especie no retenida, B y C analitos) en el que se muestra cómo se mide el tiempo de retención de un analito (t_R), el tiempo muerto (t_M), y la anchura total (w) o a media altura ($w_{0.5}$) de un pico.

Los procesadores actuales tienen la capacidad de integrar automáticamente los cromatogramas obtenidos (aunque también el analista puede realizar la integración manualmente) y ofrecer los valores de diversos parámetros: altura, anchura, área, simetría, resolución, tiempo inicial y final, tiempo de retención, etc. [8]. Entre estos valores hay que destacar:

- Tiempo de retención: la posición del máximo del pico sobre el eje tiempo puede usarse para identificar inequívocamente los componentes de la muestra.
- Área de pico: en análisis univariante sirve de medida cuantitativa de la concentración de cada especie, después de relacionarla linealmente con los patrones de calibrado.

- Resolución: se calcula mediante la fórmula de la Ecuación (IV.3) y supone una medida de la capacidad de separación entre dos analitos (B y C). Para una óptima separación se recomiendan valores mayores o iguales a 1, aunque depende mucho del tipo de compuestos analizados, el nivel de concentración (mg L^{-1} o $\mu\text{g L}^{-1}$) y la forma del pico cromatográfico correspondiente (altura, simetría, y obviamente la anchura).

$$R_s = \frac{2.35(t_{R,C} - t_{R,B})}{2(w_{0.5,C} + w_{0.5,B})} \quad (\text{IV.3})$$

Además, el procesador también permite trabajar con los espectros de absorción (en el detector de diodos) y de emisión (en el de fluorescencia) a cada tiempo de retención, generando el procesador una matriz de datos para cada muestra analizada. En la Figura IV.6 se muestra la representación tridimensional de dos ejemplos de matrices de datos, obtenidas mediante un HPLC acoplado a un detector a) de diodos en serie y b) de fluorescencia. Como se puede observar, para el ejemplo a) el procesador registra la absorbancia de la muestra analizada en cada longitud de onda (entre 200 y 500 nm) y para cada tiempo durante los 5 minutos de duración del análisis. Para el caso b) se registra la intensidad fluorescente, habiendo fijado la longitud de onda de excitación, en cada longitud de onda de emisión (entre 275 y 400 nm) y para cada tiempo a lo largo del análisis de 4 minutos.

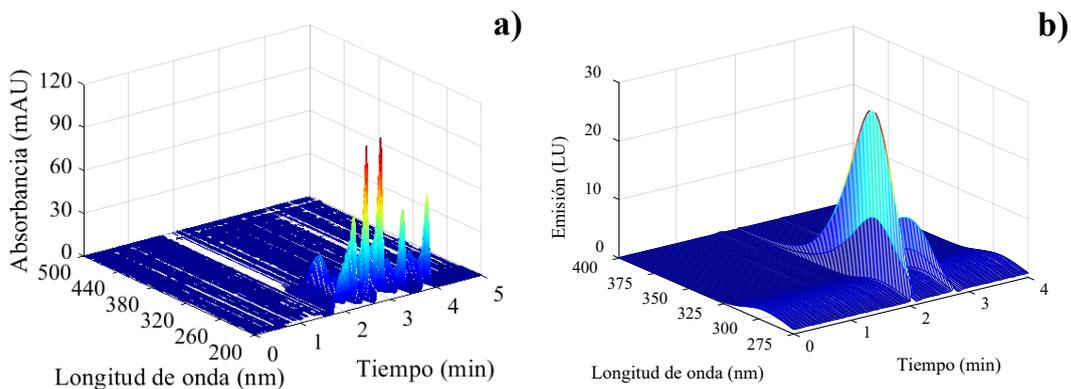


Figura IV.6. Representación tridimensional de dos ejemplos diferentes de matrices de datos registradas a través de un software para HPLC empleando: a) un detector de diodos en serie y b) un detector de fluorescencia.

Cada analito cuenta con un espectro característico, por lo que la comparación del espectro obtenido con HPLC en el tiempo de retención del analito, es decir el espectro en el máximo de pico cromatográfico, frente al espectro de una muestra de referencia permitirá la identificación inequívoca de cada componente de la muestra analizada.

Además, a partir de la concatenación de las matrices de diversas muestras puede construirse un cubo de datos sobre el que puede realizarse un análisis multivariante, empleando técnicas quimiométricas que permitan no sólo la identificación inequívoca de los analitos sino también su cuantificación [9].

Sin duda como se indicaba en la introducción de esta memoria, la estrategia en el ámbito del análisis químico está asociada a la Quimiometría, que siempre sugerirá el uso de señales multivariantes y/o multivía. A pesar de que un procesador también permite trabajar con los espectros de absorción (en el detector de diodos) y de emisión (en el de fluorescencia) a cada tiempo de retención, generando una matriz de datos para cada muestra analizada, el software de estos instrumentos únicamente muestra bellas imágenes pero no indica nada de cómo los datos deben ser tratados. El empleo de información multivariante a través de técnicas quimiométricas permite convertir en información útil la ingente cantidad de datos proporcionada por esta instrumentación moderna.

IV.8. Referencias

- [1] D.A. Skoog, Fundamentos de química analítica, 8th edition, Thomson, Madrid, 2005.
- [2] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Principios de análisis instrumental, 5th edition, McGraw Hill, Madrid, 2001.
- [3] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, Técnicas de separación en química analítica, Editorial Síntesis, Madrid, 2002.
- [4] D.C. Harris, Análisis químico cuantitativo, 3rd edition (6th original edition), Editorial Reverté, Barcelona, 2007.
- [5] PubChem database of the National Institutes of Health (NIH), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Published on 18 June 2019).
- [6] Agilent Technologies, Agilent InfinityLab LC Series: diode array detectors, user manual, Waldbronn, 2016. Available at <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G7117ABCUser.pdf>
- [7] Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity: fluorescence detector, user manual, Waldbronn, 2013. Available at https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1321-90014_FLD-A-B-C_USR_EN.pdf
- [8] OpenLab CDS ChemStation software, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA (Last update on 2017).
- [9] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, A. Herrero, S. Sanllorente, C. Reguera, Usefulness of PARAFAC for the quantification, identification, and description of analytical data, in: A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri (Eds.), Data Handling in Science and Technology: Fundamentals and analytical applications of multiway calibration, volume 29, Elsevier, Amsterdam, 2015, pp. 37-81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63527-3.00002-3>

CAPÍTULO V

**PROCEDIMIENTO SENCILLO PARA OPTIMIZAR UN
MÉTODO CROMATOGRÁFICO. APLICACIÓN EN LA
DETERMINACIÓN DE BISFENOL A Y FENOL EN
JUGUETES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA CON DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA**

V.1. Resumen*

Los límites legales para fenol y bisfenol A (BPA) en juguetes son 15 y 0.1 mg L⁻¹ respectivamente. Los últimos estudios realizados en Europa muestran que el contenido de BPA, el cual llega a nuestros cuerpos a través de diferentes vías de contacto, en ningún caso excede los límites legales. Pero es cierto que los efectos causados por la ingesta continua de este analito durante mucho tiempo y otros posibles procesos que podrían incrementar su migración, todavía están bajo la consideración de las agencias responsables de la salud.

En este trabajo se propone una optimización multirrespuesta utilizando un diseño D-óptimo para optimizar simultáneamente dos factores experimentales (temperatura y flujo de la fase móvil) a tres niveles y uno (composición de fase móvil) a cuatro niveles en una determinación mediante HPLC-FLD. El diseño D-óptimo permitió reducir el esfuerzo experimental de 36 a 11 experimentos garantizando la calidad de las estimaciones. El modelo ajustado se validó y, después de estimar las respuestas en todo el dominio experimental con el modelo ajustado, las condiciones experimentales que maximizan las áreas de pico y minimizan los tiempos de retención para ambos analitos se eligieron por medio de un frente Pareto. De esta manera, la sensibilidad y el tiempo del análisis se mejoraron con esta optimización.

El límite de decisión y la capacidad de detección obtenidos fueron 33.9 y 66.1 µg L⁻¹ para fenol y 25.6 y 50.0 para BPA µg L⁻¹ respectivamente cuando las probabilidades de falso negativo y falso positivo se fijaron en 0.05.

El procedimiento se ha aplicado con éxito para determinar fenol y BPA en diferentes muestras (juguetes, bolsas de suero clínico y lágrimas artificiales). Los simulantes HCl 0.07 M y agua se utilizaron para el análisis de juguetes. La cantidad de fenol encontrada en las bolsas de suero y en las lágrimas artificiales varió entre 15 y 600 µg L⁻¹. No se detectó BPA en los objetos analizados.

Además, este trabajo incorpora programas informáticos implementados en MATLAB del procedimiento utilizado (denominados en inglés como COOrdinates parallel plot y Pareto FROnt, COO-FRO), de manera que se pueden utilizar en cualquier otra optimización cromatográfica.

V.2. Palabras clave

Bisfenol A, fenol, HPLC-FLD, diseño D-óptimo, frente Pareto, coordenadas paralelas

* Este capítulo ha sido publicado en Journal of Chromatography A 1534 (2018) 93-100.

V.3. Introducción

Cuando se propone un método cromatográfico para resolver un problema analítico, es necesario optimizar varios parámetros para conseguir la mejor calidad en los cromatogramas. La calidad de un cromatograma está definida por varias características del mismo que son las respuestas en la etapa de optimización. En estos procedimientos, cuando se tienen varios analitos, es habitual minimizar los tiempos de retención y maximizar las áreas de pico. Además, los parámetros habituales de un procedimiento cromatográfico (temperatura del horno, flujo, composición de la fase móvil en el caso de HPLC), de los que dependen las respuestas, deben establecerse en tres o más niveles para considerar posibles efectos no lineales o para cubrir un rango suficiente de posibilidades experimentales. En ocasiones, la composición de la fase móvil requiere la exploración de diferentes mezclas de disolventes y sus proporciones, de modo que, si se usan mezclas binarias de tres componentes, se necesitarán más de tres niveles. El mismo problema experimental ocurre en el estudio de la robustez cuando el método es multianalito, aunque en este caso se acepta utilizar solo dos niveles por factor y los diseños experimentales óptimos son diseños Plackett-Burman o fraccionados. Experimentar en solo dos niveles puede ser una limitación importante para determinar correctamente la influencia de los factores. Esta limitación aparece cuando el efecto del factor cambia desde del nivel nominal a un nivel inferior o superior y también cuando la respuesta esperada no es lineal. En ambos casos, se necesitan experimentos en más de dos niveles.

Una vez definidos los factores y niveles a estudiar, el método estándar para abordar la optimización consiste en:

- i) Proponer un modelo para relacionar cada respuesta con los niveles de los factores.
- ii) Reducir el número de experimentos del espacio factorial completo utilizando un diseño D-óptimo que garantiza la mejor estimación conjunta de los coeficientes del modelo [1].

Después de realizar los análisis cromatográficos en las condiciones dadas por el diseño D-óptimo, el procedimiento para el análisis e interpretación de los resultados consiste en:

- iii) Evaluar a qué nivel debe fijarse cada factor para optimizar cada respuesta.
- iv) Resolver el conflicto cuando los niveles de factores que optimizan una respuesta son diferentes de los que optimizan otra.

Existen varios procedimientos para la etapa iii), pero todos comparten la idea de analizar el tamaño y el signo de los coeficientes en el modelo ajustado con los datos experimentales. Con diseños no saturados (más experimentos que coeficientes), la significación estadística se usa para decidir si un coeficiente es nulo, en cuyo caso la

conclusión es que el correspondiente nivel de factor no tiene efecto en la respuesta. Cuando el diseño es saturado (el mismo número de experimentos que coeficientes), se utilizan métodos de decisión indirectos: el método de Lenth, el método bayesiano y el método de distribución normal, entre otros. En la Ref. [2] se puede ver una revisión detallada.

El paso iv) a veces se realiza mediante una función de deseabilidad [3] o mediante el análisis de los coeficientes [4,5].

Este trabajo muestra un procedimiento sencillo y proporciona el software para ejecutar los pasos mostrados en los puntos iii) y iv) del esquema anterior, de modo que, además de la reducción en el esfuerzo experimental lograda por el diseño D-óptimo, también beneficia la simplicidad del análisis directo del problema de la optimización multicriterio con factores discretos. El punto de partida son los modelos discontinuos, con variables discretas, ajustados y validados con los resultados experimentales. Utilizando estos modelos, se puede calcular el valor de las respuestas en todo el dominio (alternativamente se podrían obtener todos los resultados experimentales en todos los puntos del dominio factorial completo, lo que en el laboratorio sería inviable). Dado que el problema a estudiar es multiobjetivo y el espacio de diseño es discreto, es imposible utilizar las herramientas analíticas habituales para el análisis de la superficie de respuesta, como el camino óptimo y el análisis canónico. Por esta razón, este trabajo propone para la etapa iii) el uso de un gráfico de coordenadas paralelas [6], que ha sido introducido en aplicaciones analíticas por nuestro grupo de investigación para mejorar la visualización del frente Pareto óptimo para la optimización multirrespuesta [7] y fue de gran utilidad en análisis cromatográficos utilizando la temperatura programada de vaporización en cromatografía de gases-espectrometría de masas en la Ref. [8].

Para obtener los valores óptimos de las respuestas y, si es necesario, resolver conflictos, este trabajo propone determinar el conjunto de experimentos individuales (niveles de cada factor) que conducen a soluciones no dominadas. Es decir, aquellas soluciones que al menos son mejor en una respuesta. Este subconjunto del diseño factorial completo es el llamado frente Pareto de soluciones optimales. Este paso es el equivalente discreto y de respuesta múltiple de la determinación de un máximo o mínimo de una función univariante de varios factores en una región acotada. El procedimiento desarrollado, COO-FRO, se ha aplicado en este trabajo en la optimización de un método para determinar BPA y fenol mediante cromatografía líquida con detección fluorescente (HPLC-FLD) en juguetes y otros objetos de uso cotidiano. Ambos son compuestos orgánicos que tienen un límite máximo establecido en la legislación de la UE [9,10], siendo 0.1 mg L^{-1} para el BPA y 15 mg L^{-1} para el fenol. El límite de migración del fenol como monómero especificado en la guía técnica EN 71-11:2005 era 15 mg L^{-1} , pero desde 2017 la Directiva 2017/774 establece un límite de migración específica del fenol en materiales poliméricos de 5 mg L^{-1} .

El BPA es una de las sustancias químicas de mayor producción a nivel mundial. Este compuesto se usa para fabricar policarbonatos y resinas epoxi, por lo que puede estar presente en muchos productos destinados a entrar en contacto con alimentos, así como en una gran cantidad de objetos de uso diario, particularmente en papeles térmicos, materiales dentales, dispositivos médicos, productos para el cuidado personal y juguetes [11]. Por esta razón, el BPA está presente de manera ubicua en el medio ambiente y sus efectos adversos constituyen uno de los temas de salud pública más candentes en la actualidad. En particular, existe un creciente interés en los posibles efectos de la exposición al BPA en los niños.

Es interesante destacar que las consideraciones básicas que derivan en el límite de migración para BPA en juguetes son diferentes que las de la migración de BPA en materiales en contacto con alimentos [12] y la prohibición de BPA en biberones de policarbonato [13]. Por esta razón, en vista de la necesidad de un alto nivel de protección para los niños contra los riesgos causados por sustancias químicas en los juguetes, la EFSA propone un límite de migración de 0.1 mg L^{-1} para BPA de acuerdo con los métodos establecidos en EN 71-10:2005 y EN 71-11:2005 [14,15]. El 18 de julio de 2016, la Organización Mundial del Comercio (WTO por sus siglas en inglés) distribuyó una notificación [16] anunciando una propuesta de directiva de la UE para endurecer el límite de migración para BPA de 0.1 mg L^{-1} a 0.04 mg L^{-1} . Lo indicado en este borrador [17] finalmente entró en vigor durante el segundo trimestre de 2017 con la Directiva 2017/898.

En la Ref. [18] Caballero-Casero y col. presentaron una revisión exhaustiva de los métodos para analizar BPA. En la Ref. [19] se revisa la liberación de BPA desde biberones de policarbonato hasta simulantes alimentarios. La separación y cuantificación se ha llevado a cabo casi exclusivamente mediante cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS) o mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS). En la Ref. [20] se describe un modelo de cinética de migración de BPA desde vasos de policarbonato. En la Ref. [21] se utilizó fluorescencia molecular para identificar inequívocamente y también cuantificar BPA.

Como ocurre con el BPA, en el caso del fenol, las regulaciones de la UE establecen un límite de migración específica máximo igual a 3 mg kg^{-1} para materiales en contacto con alimentos [22]. Sin embargo, la Directiva 2017/774 [10] indica que el fenol se utiliza como monómero para las resinas fenólicas en la fabricación de resina de madera aglomerada para juguetes y que la degradación de antioxidantes fenólicos podría ser una fuente de fenol en los juguetes. Basado en la preocupación de que el fenol pueda constituir un riesgo para la salud humana a través de la exposición combinada, este compuesto es calificado como sustancia que tiene que ser evaluada [23]. La cromatografía de líquidos y la de gases son las dos técnicas de separación revisadas en la Ref. [24] para analizar fenol en alimentos. Como en el caso

de BPA, la directiva sobre fenol en juguetes propone realizar el análisis de acuerdo con las normas europeas EN 71-10:2005 y EN 71-11:2005.

El método analítico propuesto en EN 71-11:2005 es HPLC con detección UV y FLD (en línea) para fenol y BPA respectivamente. Este trabajo propone utilizar sólo un detector FLD y optimizar dos respuestas para cada analito: maximizar el área de fenol y BPA y minimizar los tiempos de retención de cada uno de ellos.

El contenido de este capítulo está organizado de la siguiente manera: se realiza una descripción del modelo utilizado para el análisis de varios factores a diferentes niveles, después, se obtiene la matriz de respuestas en el dominio factorial completo, y por último, se aplica COO-FRO. Los comandos de MATLAB para COO-FRO, que han sido elaborados para realizar este trabajo, se incluyen en el Anexo A (Sección V.7). Finalmente, en las condiciones elegidas, se realizan medidas de los patrones de calibración de fenol y BPA, se evalúan las figuras de mérito y, por último, se determina el contenido de fenol y BPA migrado desde juguetes utilizando dos simulantes diferentes, y en ampollas de suero fisiológico y bolsas de suero salino para uso médico, en este caso realizando medidas directas.

V.4. Experimental

V.4.1. Reactivos químicos

El bisfenol A se adquirió en Aldrich (Madrid, España); el fenol fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). El acetonitrilo y el metanol (grado isocrático LiChrosolv[®] para cromatografía líquida) fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). Otros reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se obtuvo agua desionizada usando el sistema de purificación de agua Milli-Q Gradient A10 de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

V.4.2. Instrumental

La cuantificación de BPA se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo HPLC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EEUU) compuesto por una bomba cuaternaria (G1311C), un inyector (G1329B), un compartimento termostatzado de columna (G1316A), un detector de fluorescencia (G1321B) y el software HP ChemStation. Para la separación se empleó una columna Kinetex EVO-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m) y se utilizaron metanol (disolvente A), acetonitrilo (disolvente B) y agua desionizada (disolvente C) para la fase móvil. Las condiciones óptimas fueron 0.8 mL min⁻¹ para el flujo y 20°C para la temperatura del compartimento de la columna. A una longitud de onda de excitación fija de 275 nm, se registraron los espectros de emisión entre 275 y 400 nm, cada 1 nm. Mientras que para la integración de las áreas del pico cromatográfico se ha utilizado solo la longitud de onda de emisión

máxima (300 nm y 313 nm para fenol y BPA respectivamente). El tiempo de elución total fue 5 minutos en condiciones no optimizadas, tiempo que se logró reducir en las condiciones elegidas por el diseño D-óptimo (Sección V.5.1.1).

V.4.3. Disoluciones patrón y muestras

Las disoluciones madre de BPA y fenol se prepararon individualmente en metanol a una concentración de 337.1 y 480.5 mg L⁻¹, respectivamente. Las disoluciones de trabajo se prepararon diluyéndolas con agua desionizada. Todas estas disoluciones fueron almacenadas a baja temperatura (4°C) y protegidas de la luz.

Los juguetes infantiles (muñeca, pony, ardilla de juguete y pequeños soldados, Figura V.S1 del material suplementario de la Sección V.8) se adquirieron en una tienda local. El procedimiento de extracción utilizado pretendía simular la ruta de contacto a través de la cual los niños están expuestos a BPA y/o fenol. Se eligieron dos tipos de simulante: i) HCl 0.07 M como simulante de saliva y ii) agua destilada. Las muestras de juguetes se sumergieron en 1000 mL de HCl 0.07 M a 37°C durante 2 horas en el primer caso, y en 1000 mL de agua destilada a 40°C durante 24 horas en el segundo caso [18,21]. Todos los extractos se filtraron empleando filtros de 0.22 µm antes de la inyección en el sistema cromatográfico.

Otros objetos analizados fueron: bolsas de suero de hospital, ampollas de suero y ampollas de lágrimas artificiales (Figura V.S2 del material suplementario de la Sección V.8). En este caso, el suero se inyectó directamente porque tanto el BPA como el fenol podrían migrar desde los envases de plástico.

V.4.4. Software

Los diseños D-óptimos se construyeron y se analizaron con NEMRODW [25]. Las funciones escritas en MATLAB [26] (véase el Anexo A de este capítulo, Sección V.7) se utilizaron para representar en un mismo gráfico las respuestas y los valores de los factores mediante coordenadas paralelas, así como para realizar la optimización multirrespuesta con el frente Pareto. La regresión robusta por mínimos cuadrados recortados (LTS por sus siglas en inglés), función del paquete LIBRA [27,28], se ha utilizado para detectar datos anómalos y después de su eliminación realizar la regresión por mínimos cuadrados (OLS por sus siglas en inglés). El límite de decisión, CC α , y la capacidad de detección, CC β , se determinaron utilizando el programa DETARCHI [29].

V.5. Resultados y discusión

V.5.1. Optimización del procedimiento experimental

V.5.1.1. Diseño de experimentos D-óptimo y modelos ajustados

En este trabajo, el punto de partida para realizar la optimización fue un diseño factorial completo con dos factores a tres niveles (velocidad de flujo de la fase móvil y temperatura del horno) y uno a cuatro niveles (fase móvil). Para el último factor (composición de la fase móvil), se ha elegido acetonitrilo y metanol como modificadores, siendo este último más barato y ecológico.

El dominio experimental discreto constaba de 36 ($3^2 \times 4^1$) experimentos. Los factores y sus niveles se muestran en la Tabla V.1.

Para evaluar el efecto de estos factores sobre las cuatro respuestas (tiempo de retención y área de pico para fenol y BPA), el modelo propuesto para cada una de ellas fue:

$$Y = b_0 + b_{1A}X_{1A} + b_{1B}X_{1B} + b_{2A}X_{2A} + b_{2B}X_{2B} + b_{3A}X_{3A} + b_{3B}X_{3B} + b_{3C}X_{3C} + \varepsilon \quad (V.1)$$

Las variables discretas X_{ij} ($i = 1, 2, 3$ y $j = A, B, C$) codifican el factor y el nivel de acuerdo con los valores discretos que se muestran en la Tabla V.2. En el modelo elegido de la Ecuación (V.1), las variables flujo y temperatura a tres niveles y composición de la fase móvil a cuatro niveles, conducen a verificar el cambio en el comportamiento desde el nivel de referencia hasta los otros dos (o tres) niveles. Por este motivo el modelo es flexible. La Ecuación (V.1) es el modelo reducido de estado-referencia, en el que se omite el nivel de referencia para cada factor (el último nivel para cada factor en la Tabla V.1). Una vez que se han calculado los coeficientes, el modelo se transforma en uno de presencia-ausencia que modela por separado el efecto, desde el nivel de referencia hasta cada nivel, sobre la respuesta. De esta manera, al tener más de dos niveles cada factor en el diseño, si un factor no tiene un efecto lineal sobre la respuesta experimental, la falta de linealidad es detectable.

El modelo de la Ecuación (V.1) tiene 8 coeficientes b_{ij} , por lo que se requieren al menos 8 experimentos para estimar estos coeficientes. Como el espacio de búsqueda de los diseños, que permite estimar estos coeficientes, estaba formado por el diseño factorial completo que consta de 36 experimentos distintos, fue posible reducir el esfuerzo experimental haciendo solo una fracción de estos experimentos garantizando siempre la suficiente precisión en las estimaciones de los coeficientes. Una vez que se ha establecido el número de experimentos reducido, 'n', se trata de elegir mediante un diseño D-óptimo los 8 coeficientes, seleccionando 'n' experimentos de los 36 posibles.

Variar 'n' entre 8 y 36 proporciona sucesivos diseños D-óptimos. Los diseños elegidos mediante el criterio D-óptimo proporcionan la estimación general más precisa. Se puede ver una explicación técnica sobre estos diseños en la Ref. [2].

Tabla V.1. Factores, variables codificadas y dominio experimental de interés para la optimización del tiempo de retención y el área de pico de fenol y BPA.

Factores	Variable codificada	Nivel A	Nivel B	Nivel C	Nivel D
1 Velocidad de flujo (mL min ⁻¹)	X ₁	0.8	0.85	0.9	—
2 Temperatura del horno (°C)	X ₂	20	30	40	—
3 Fase móvil CH ₃ OH:CH ₃ CN:H ₂ O (v/v)	X ₃	65:0:35	70:0:30	0:45:55	0:40:60

Tabla V.2. Valores de las variables discretas en la Ecuación (V.1).

Factor i (i = 1,2)			Factor 3			
Nivel A	X _{iA} = 1	X _{iB} = 0	Nivel A	X _{3A} = 1	X _{3B} = 0	X _{3C} = 0
Nivel B	X _{iA} = 0	X _{iB} = 1	Nivel B	X _{3A} = 0	X _{3B} = 1	X _{3C} = 0
Nivel C	X _{iA} = -1	X _{iB} = -1	Nivel C	X _{3A} = 0	X _{3B} = 0	X _{3C} = 1
			Nivel D	X _{3A} = -1	X _{3B} = -1	X _{3C} = -1

El factor de inflación de varianza, VIF, es una medida de la precisión en la estimación de cada factor y permite decidir si el diseño elegido es válido. En nuestro caso, con el diseño D-óptimo elegido, que constaba de 11 experimentos, fue posible encontrar un VIF entre 1.31 y 1.82 para los coeficientes del modelo. Estos valores son buenos, y con 11 experimentos los grados de libertad fueron suficientes para llevar a cabo el test de fallo de ajuste de este modelo multilineal. Las columnas 2, 3 y 4 en la Tabla V.3 muestran las condiciones cromatográficas en las que se realizaron cada uno de los 11 experimentos obtenidos con el diseño D-óptimo. Las últimas cuatro columnas son las respuestas experimentales obtenidas: las áreas de ambos picos y los tiempos de retención para el fenol y el BPA. El análisis se repitió en las condiciones experimentales correspondientes al experimento número 1, como se muestra en la Tabla V.3, para evaluar el posible fallo de ajuste del modelo propuesto en la Ecuación (V.1).

Con los datos de la Tabla V.3, los coeficientes de cada modelo se estimaron por mínimos cuadrados. Al analizar el ajuste del tiempo de retención del BPA, t_{BPA} , se encontró que el experimento 4 era un dato anómalo (residuo estudentizado igual a 5.49) y el modelo se rehízo sin él. La Tabla V.4 muestra los coeficientes de cada

Tabla V.3. Plan experimental del diseño D-óptimo y las respuestas obtenidas (área de pico y tiempo de retención para fenol y BPA).

Número	Velocidad de flujo (mL min ⁻¹)	Temperatura del horno (°C)	Fase móvil (v/v) CH ₃ OH:CH ₃ CN:H ₂ O	Área de pico		Tiempo de retención	
				Fenol	BPA	Fenol	BPA
1	0.80	20	65:0:35	182.6	35.9	2.149	3.451
1r	0.80	20	65:0:35	172.4	32.9	2.172	3.541
1r	0.80	20	65:0:35	172.8	33.2	2.166	3.509
1r	0.80	20	65:0:35	174.7	32.7	2.172	3.523
2	0.85	30	65:0:35	168.6	32.6	1.967	2.954
3	0.90	40	65:0:35	156.6	29.9	1.806	2.554
4	0.80	20	70:0:30	179.2	38.7	2.033	2.754
5	0.90	30	70:0:30	158.9	35.0	1.763	2.286
6	0.85	40	70:0:30	167.2	35.5	1.831	2.283
7	0.90	20	0:45:55	147.8	25.5	2.154	3.300
8	0.85	30	0:45:55	154.8	25.8	2.202	3.292
9	0.80	40	0:45:55	161.3	26.3	2.263	3.290
10	0.85	20	0:40:60	153.6	22.9	2.551	4.877
11	0.80	30	0:40:60	160.6	23.9	2.582	4.719

Tabla V.4. Modelos ajustados para las respuestas experimentales, áreas de pico de fenol y BPA, tiempos de retención de fenol y BPA. Coeficientes del modelo de acuerdo a la Ecuación (V.1), coeficiente de determinación (R²), p-valores de los test de significación de la regresión y de fallo de ajuste.

Coeficientes	A _{fenol}	A _{BPA}	t _{fenol}	t _{BPA}
b ₀	157.33	28.16	2.1397	3.3538
b _{1A}	8.43	1.20	0.1136	0.2251
b _{1B}	-0.01	0.11	0.0016	0.0085
b _{2A}	1.23	0.79	0.0640	0.2725
b _{2B}	-0.02	-0.11	-0.0071	-0.0331
b _{3A}	5.25	2.33	-0.1506	-0.3415
b _{3B}	7.61	6.84	-0.2590	-0.8149
b _{3C}	-3.06	-2.21	0.0723	-0.0478
Significación de la regresión (p-valor)	< 3 · 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
Test de fallo de ajuste (p-valor)	0.970	0.880	0.141	0.171
R ² (%)	0.975	0.989	0.999	0.999
S _{yx}	2.27	0.71	0.01	0.04

modelo y su validación. Para los cuatro modelos, el p-valor del test de significación es menor que 0.05, por lo tanto, la hipótesis nula debe ser rechazada con un nivel de confianza del 95%, (siendo la hipótesis nula, H_0 : El modelo no explica la variabilidad de la respuesta experimental). Con respecto al test de fallo de ajuste, los p-valores son mayores que 0.05, de modo que no hay evidencia experimental, con un nivel de confianza del 95%, para rechazar H_0 , que en este caso es: "El modelo lineal no tiene fallo de ajuste". Los modelos explican un porcentaje de varianza de las cuatro respuestas, R^2 , que varía entre 97.5% y 99.9% y las desviaciones estándar residuales entre 2.27 y 0.01.

V.5.1.2. Representación y exploración de las funciones de respuesta

Usando los modelos de la Tabla V.4, se calcularon los valores de las áreas y los tiempos de retención en los 36 puntos del dominio experimental completo para ambos analitos, y no solo para los 11 experimentos llevados a cabo en el laboratorio. Las cuatro respuestas junto con los valores de los tres factores implican manejar gráficamente más de tres variables, de modo que la representación conjunta mediante coordenadas cartesianas es imposible. Sin embargo, la representación mediante coordenadas paralelas no tiene esta limitación.

La Figura V.1 se construyó utilizando la "secuencia de comandos CFPF" del Anexo A (Sección V.7). Cada uno de los primeros tres ejes verticales muestra los niveles de los factores y los siguientes cuatro las respuestas en estos niveles (los valores de las áreas de pico y los tiempos de retención). Cada línea quebrada une los niveles de uno de los puntos del dominio experimental con los valores correspondientes de las cuatro respuestas. Para poder comparar en un único gráfico factores y respuestas independientemente de su magnitud, el rango de cada variable se ha transformado de manera que todas se expresen en un intervalo codificado [0, 1]. Sin embargo, se han anotado los valores reales en los extremos de los intervalos de cada variable.

La primera observación que se puede deducir del gráfico es que existe una fuerte correlación negativa entre las áreas de fenol y BPA y los tiempos de retención porque las líneas que unen los valores obtenidos se cruzan, de manera que cuando se cambian las condiciones experimentales cromatográficas, las áreas aumentan, los tiempos disminuyen y viceversa (por ejemplo, para el BPA, el coeficiente de correlación, ρ , entre el área y el tiempo de retención es -0.79). Sin embargo, este efecto no ocurre entre las áreas, cuando aumentan, aumentan tanto para fenol como para BPA al mismo tiempo, aunque en un grado diferente ($\rho = 0.82$). Para los tiempos de retención, las líneas son casi paralelas, lo que indica una fuerte correlación positiva ($\rho = 0.97$). En otras palabras, los dos tiempos de retención aumentan o disminuyen simultáneamente y no hay inversión del pico cuando se modifican las condiciones cromatográficas.

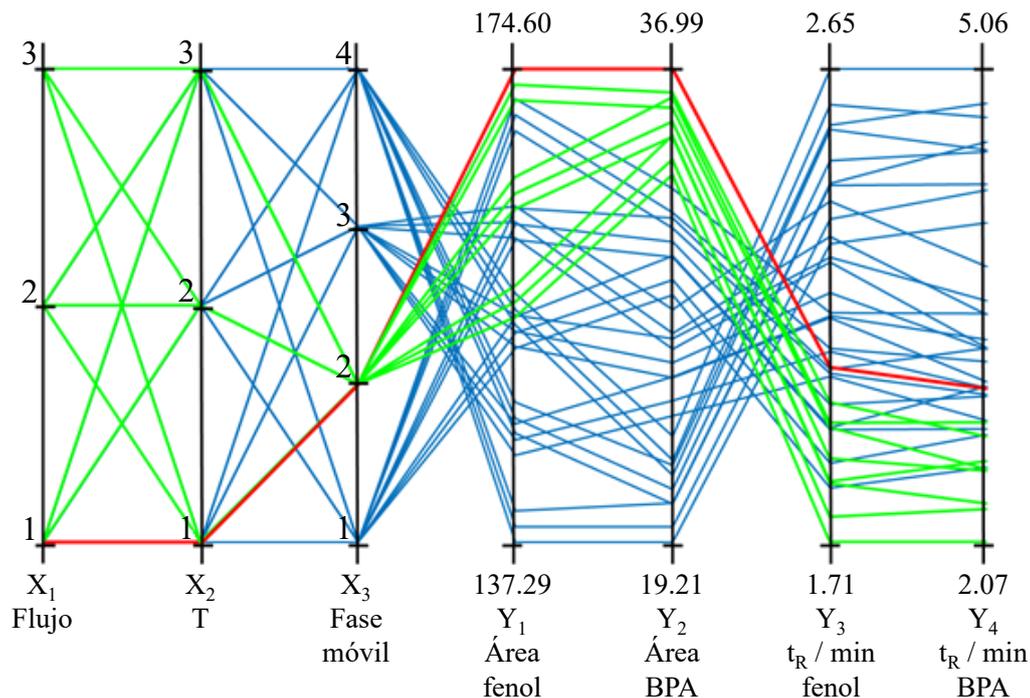


Figura V.1. Gráfico de coordenadas paralelas para el espacio de diseño: flujo, X1, temperatura, X2, y fase móvil, X3, y para las respuestas: área de fenol, Y1, área de BPA, Y2, tiempo de retención de fenol, Y3, tiempo de retención de BPA, Y4. En verde, las respuestas no dominadas encontradas (frente Pareto). En rojo, la solución óptima elegida: nivel 1 para flujo y temperatura, y nivel 2 para fase móvil.

El conflicto es claro, no es posible obtener el tiempo de retención mínimo y el valor máximo del área de pico para cada analito. Esto explica por qué únicamente es necesario estudiar, en base a los criterios prácticos [30,31], las condiciones que forman el frente Pareto, ya que cualquier otra sería peor en al menos una de las respuestas. Al contrario de lo que sucede con los números reales, cuando uno tiene varias respuestas (un vector) no es posible definir un orden que permita comparar un vector con otro y decidir cuál es el mayor. En cambio, se define el concepto de dominación. Dadas las distintas condiciones cromatográficas (i, j), se dice que la respuesta para la condición j domina a la respuesta para la condición i (en resumen, j domina a i) cuando a) y b) son verdaderas:

- a) $A_{\text{fenol}}(i) \leq A_{\text{fenol}}(j)$
 $A_{\text{BPA}}(i) \leq A_{\text{BPA}}(j)$
 $t_{\text{fenol}}(i) \geq t_{\text{fenol}}(j)$
 $t_{\text{BPA}}(i) \geq t_{\text{BPA}}(j)$

- b) Se cumple al menos una de las desigualdades anteriores

El frente Pareto está formado por las condiciones cromatográficas no dominadas. Para calcularlo se usó la función "FParet.m" del Anexo A (Sección V.7). En el caso en

cuestión, el frente se muestra en verde en la Figura V.1. Destaca que todas las condiciones cromatográficas que lo componen comparten el hecho de que la composición de la fase móvil debe estar en el segundo nivel (70:0:30). Sin embargo, el flujo y la temperatura pueden tomar cualquiera de estos tres niveles.

En las nueve soluciones del frente Pareto (en verde en la Figura V.1) se pueden diferenciar tres grupos, los cuales de mayor a menor A_{fenol} se caracterizan por el hecho de que el flujo varía de 0.8 a 0.9 mL min⁻¹. Dado que en todas las condiciones del frente Pareto la reducción en el t_{fenol} y el t_{BPA} es superior al 50%, se decidió considerar aquella que dio mayores valores de sus áreas (A_{fenol} y A_{BPA}). Se seleccionó esta condición experimental, marcada en rojo en la Figura V.1, un flujo de 0.8 mL min⁻¹, una temperatura de 20°C y la composición de la fase móvil de 70:0:30 (CH₃OH:CH₃CN:H₂O), que coincide con una de las condiciones del diseño D-óptimo (condición número 4 de la Tabla V.3).

Bajo esta condición elegida, se realizaron nuevas experiencias en dos días diferentes, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla V.5. Los resultados pueden considerarse similares a los predichos por el modelo para el primer análisis, incluido en el diseño D-óptimo.

Tabla V.5. Resultados experimentales en las condiciones cromatográficas optimizadas. Entre paréntesis, los valores predichos por el modelo.

	A_{fenol}	A_{BPA}	t_{fenol}	t_{BPA}
Día 1	179.2 (174.6)	38.7 (36.99)	2.033 (2.058)	2.754 (3.036)
Día 2	174.3	36.7	2.048	2.788
Día 3	172.7	36.5	2.038	2.761

V.5.1.3. Cómo obtener información del sistema cromatográfico a través del gráfico de coordenadas paralelas

La versatilidad del procedimiento desarrollado en este trabajo permitiría el análisis del efecto de las variables (velocidad de flujo, temperatura y naturaleza y composición de modificadores) sobre las cuatro respuestas. Por ejemplo, la Figura V.2a muestra que cuando la velocidad de flujo y la temperatura se han establecido en su nivel alto (0.9 mL min⁻¹ y 40°C), los tiempos de retención de ambos analitos disminuyen. Este comportamiento se muestra en esta figura (línea magenta para metanol y línea negra para acetonitrilo). Se confirma, como se esperaba, que para cada modificador los tiempos de retención para fenol y BPA son más bajos que los obtenidos con otros niveles de velocidad de flujo y temperatura.

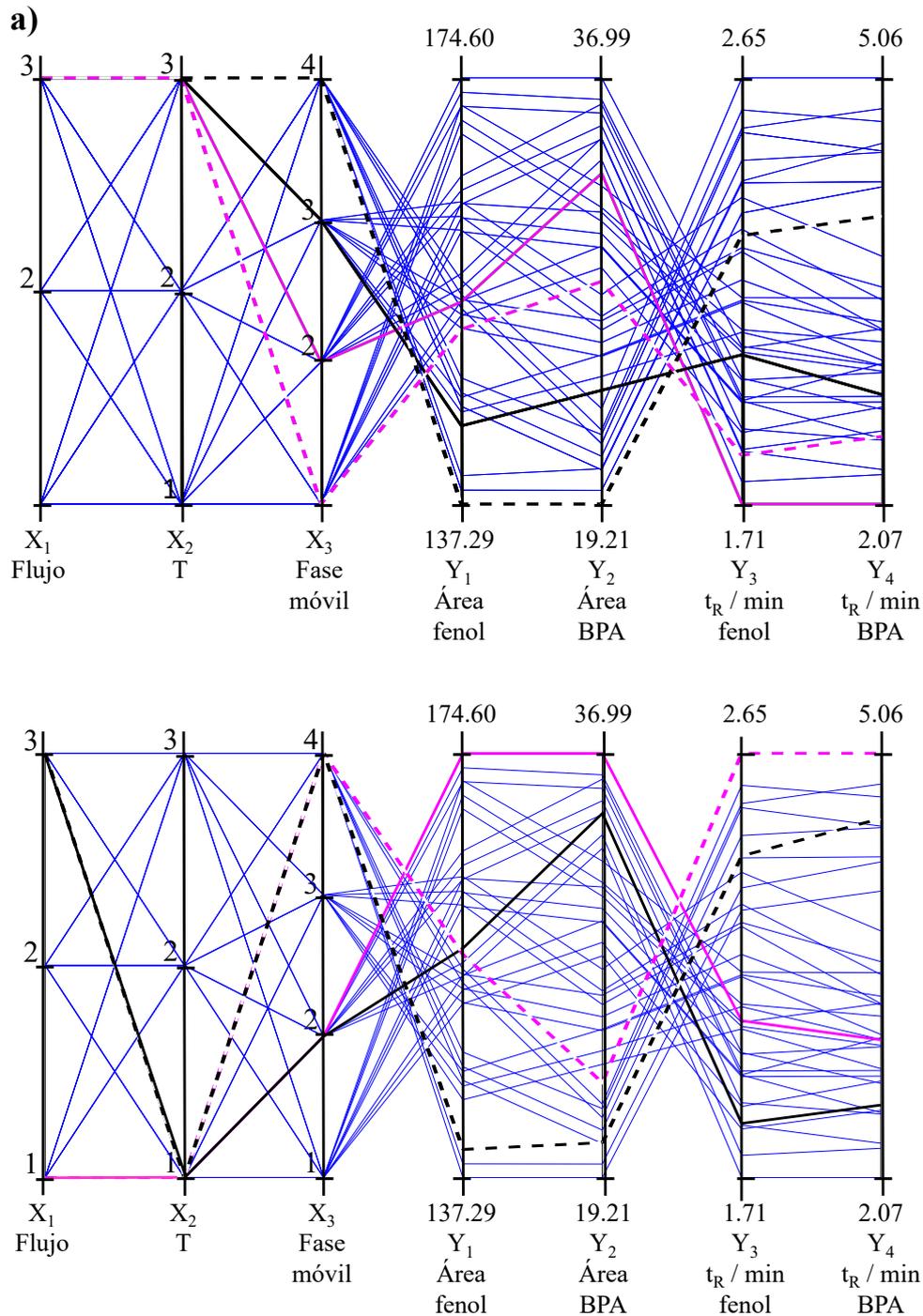


Figura V.2. a) Gráfico de coordenadas paralelas para el espacio de diseño: flujo, X1, temperatura, X2, y fase móvil, X3, y para las respuestas: área de fenol, Y1, área de BPA, Y2, tiempo de retención de fenol, Y3, tiempo de retención de BPA, Y4. Las 36 experiencias del espacio completo están en azul. Las líneas magentas representan metanol y las líneas negras acetonitrilo; las líneas discontinuas indican una fuerza más débil en ambos modificadores (nivel 4 para acetonitrilo y nivel 1 para metanol). Flujo y temperatura fijados en su nivel más alto como en la Tabla V.2. b) Color negro: el nivel de flujo más alto, magenta: el nivel de flujo más bajo (en ambos casos temperatura fijada en el nivel más bajo). Las líneas discontinuas son para acetonitrilo (0:40:60, nivel 4) y las líneas continuas para metanol (70:0:30, nivel 2).

Además, la Figura V.2a muestra que un aumento en la fuerza de elución de ambos modificadores (para la velocidad de flujo y la temperatura fijados en su nivel más alto) reduce el tiempo de retención de fenol y BPA (ambas líneas continuas están por debajo de las líneas discontinuas del mismo color). Indicando las líneas discontinuas una fuerza más débil en ambos modificadores (nivel 4 para acetonitrilo y nivel 1 para metanol).

En la Figura V.2b, el color negro indica flujo alto mientras que el magenta es para el nivel de flujo bajo (temperatura fijada en el nivel más bajo en todos los casos). Se puede observar que cuanto mayor es el flujo (línea negra), menores son las áreas y los tiempos de retención de fenol y BPA. Las líneas negras siempre están por debajo de las líneas magentas en las respuestas.

Además, esta figura también muestra el efecto del modificador utilizado (nivel 4, acetonitrilo 0:40:60 en línea punteada) frente al otro modificador (nivel 2, metanol 70:0:30 en línea continua) siendo el color de estas líneas negro para velocidad de flujo alta y magenta para velocidad de flujo baja.

Se sabe que la fuerza de elución del metanol como modificador es más débil que la del acetonitrilo, por lo que se esperarían tiempos de retención más largos para el metanol. Sin embargo, en el presente trabajo, la cantidad de metanol en la fase móvil es mayor que la del acetonitrilo. Por esta razón, el menor tiempo de retención se obtiene cuando se usa metanol. Es necesario tener en cuenta que el patrón de elución puede cambiar dependiendo de la muestra, por lo que el tiempo de retención puede reducirse aumentando la relación (%) de un disolvente orgánico.

V.5.2. Validación del método

V.5.2.1. Rectas de calibrado y de exactitud

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se realizaron calibrados para fenol y BPA con 9 patrones en un rango de 0 a 403.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ y de 0 a 404.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Se repitieron los dos primeros y los dos últimos niveles de concentración. Para detectar datos anómalos, en ambos casos, se aplicó la regresión robusta LTS que soporta hasta que un 50% de los datos no estén alineados. En la regresión lineal del fenol se encontraron dos valores anómalos con residuo estandarizado LTS por encima de 2.5 en valor absoluto. Estos dos residuos correspondían al mayor nivel de concentración. Después de su eliminación, el rango de calibración estaba comprendido entre 0 y 346 $\mu\text{g L}^{-1}$. En el caso del BPA no se detectaron datos anómalos. Los residuos de la regresión por mínimos cuadrados resultaron compatibles con una distribución normal (p-valores de los test de Chi-cuadrado y Saphiro Wilks mayores que 0.19 y 0.10 para fenol y BPA respectivamente). La Tabla V.6 muestra los resultados obtenidos para ambos calibrados, que son significativos a un nivel de confianza del 95%, porque el p-valor de este test es inferior a $5 \cdot 10^{-5}$.

Tabla V.6. Validación del método analítico optimizado. Parámetros de las rectas de calibrado y de exactitud (s_{yx} es la desviación estándar de la regresión). Límite de decisión y capacidad de detección (para $\alpha = \beta = 0.05$).

		Fenol	BPA
Recta de calibrado	Término independiente	-1.472	0.639
	Pendiente	0.172	0.089
	Coefficiente de correlación	0.986	0.994
	s_{yx}	2.85	1.11
Recta de exactitud	Término independiente	$1.4 \cdot 10^{-5}$	$-5.2 \cdot 10^{-6}$
	Pendiente	1.000	1.000
	s_{yx}	16.59	12.44
$CC\alpha$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		33.9 ^a	25.6 ^a
		26.6 ^b	19.9 ^b
$CC\beta$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		66.1 ^a	50.0 ^a
		51.1 ^b	38.8 ^b

^a n = 1 réplica en la muestra problema.

^b n = 2 réplicas en la muestra problema.

En la Tabla V.6 también se recogen los datos de la pendiente y el término independiente de las rectas de exactitud (concentración calculada *versus* concentración real). Las regiones de confianza conjunta al nivel del 95% se corresponden con las elipses de la Figura V.3. Como ambas contienen el punto (0, 1), se confirma la exactitud de ambas rectas de calibrado.

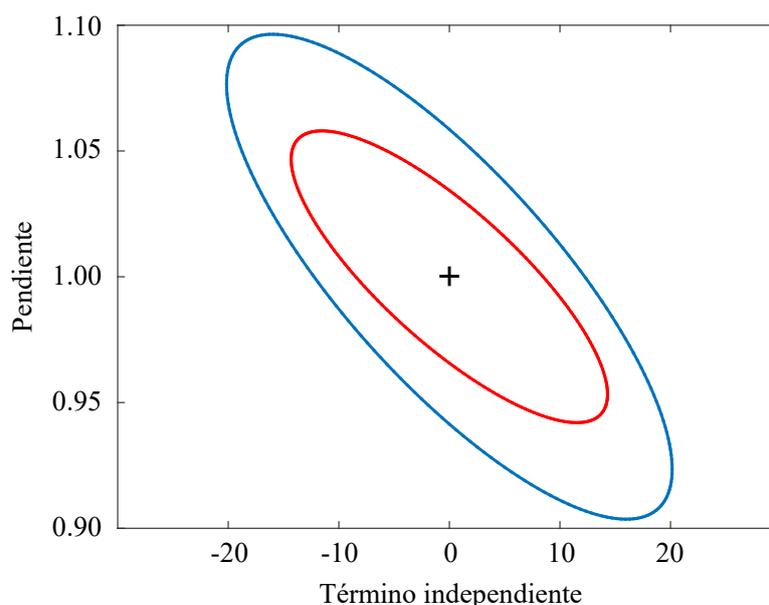


Figura V.3. Región de confianza al 95% para la pendiente y término independiente de las rectas de exactitud. En azul para fenol y rojo para PBA.

La precisión del método optimizado se puede estimar a partir de la desviación estándar residual de la recta de exactitud que se muestra en la Tabla V.6. La precisión más alta corresponde a BPA, ya que, la elipse de confianza en la Figura V.3 tiene menos área.

V.5.2.2. Límite de decisión y capacidad de detección

Para evaluar los límites de detección con el fin de garantizar los riesgos de falso positivo y falso negativo se utilizaron $CC\alpha$ y $CC\beta$. La UE (Decisión de la Comisión 2002/657/CE) y la ISO (ISO 11483-2) definen el límite de decisión ($CC\alpha$) como "el valor de la concentración neta cuyo exceso conduce, para una probabilidad α , a la decisión de que la concentración del analito en el material analizado es mayor que la del blanco". Y la capacidad de detección ($CC\beta$) para una probabilidad dada de falso positivo, α , como "la verdadera concentración neta del analito en el material a analizar, que conducirá, con probabilidad $1-\beta$, a la conclusión correcta de que la concentración en el material analizado es mayor que la del blanco".

Los valores $CC\alpha$ y $CC\beta$ del procedimiento optimizado se calcularon para la validación de una o dos determinaciones en la muestra problema y se muestran en las últimas cuatro filas en la Tabla V.6. El procedimiento permitió determinar con probabilidades de falso positivo (α) y falso negativo (β) igual a 0.05, hasta $51.1 \mu\text{g L}^{-1}$ de fenol mientras que, en el caso de BPA, se alcanzaron $38.8 \mu\text{g L}^{-1}$.

V.5.3. Análisis de juguetes y otras muestras

Una vez realizados los análisis a todas las muestras, no se encontró BPA en ninguna de ellas. Solo se obtuvo un valor para un área integrada en los cromatogramas que provenía de las muestras de migración para uno de los juguetes (ardilla, ver Figura V.S1C del material suplementario en la Sección V.8) cuando se utilizó agua como simulante, pero la concentración calculada estaba por debajo del $CC\alpha$ correspondiente. Por lo tanto, el resultado fue que no se detectaba BPA en ninguno de los juguetes, ni con el simulante de saliva ni con agua, ni tampoco en las otras muestras analizadas. El caso del fenol fue diferente y los resultados se muestran en la Tabla V.7. Para el caso de los juguetes (Figura V.S1 del material suplementario en la Sección V.8), en el proceso de migración solo se detectó fenol cuando el simulante empleado fue agua. En el caso del pony, la cantidad encontrada estaba por encima del $CC\alpha$, mientras que para la muñeca y la ardilla el valor obtenido estaba por debajo, y para los soldados no se obtuvo señal cromatográfica. En el caso de las ampollas de suero, se encontró que la cantidad de fenol varía entre 38.23 y $600.22 \mu\text{g L}^{-1}$, siendo mayor que $CC\beta$ ($66.1 \mu\text{g L}^{-1}$) en cuatro de ellas. Solo las bolsas de suero clínico tienen una cantidad de fenol por debajo del $CC\alpha$ ($33.9 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla V.7. Contenido de fenol en las muestras analizadas. Han sido nombrados de acuerdo con las figuras del material suplementario: S1 para los juguetes y S2 para los otros objetos.

Muestra problema	Fenol ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Pony ^a (A)	62.67
Muñeca ^a (B)	20.20
Ardilla ^a (C)	28.92
Bolsa de suero de hospital (A)	52.19
Bolsa de suero de hospital (B)	14.96
Suero (C)	186.00
Suero (D)	38.23
Suero (E)	44.63
Suero (F)	600.22
Suero (G)	271.52
Suero (H)	268.61
Lágrimas artificiales (I)	35.32

^a Simulante: H₂O.

V.6. Conclusiones

El uso conjunto del gráfico de las coordenadas paralelas y del frente Pareto (COO-FRO), propuesto en este trabajo, permite explorar de manera eficiente múltiples respuestas como función de factores discretos.

En el caso de la optimización del método para la determinación de fenol y BPA mediante HPLC-FLD, el procedimiento COO-FRO utilizado condujo a un aumento en el área del pico de 27.2 y 92.6% y una reducción en el tiempo de retención de 23.4 y 46.0% para fenol y BPA respectivamente. Al emplear el diseño D-óptimo, esta optimización se logró con solo 11 de los 36 experimentos del diseño factorial completo, lo que implica una reducción en el esfuerzo experimental del 69.4%.

Las condiciones óptimas encontradas fueron 0.8 mL min⁻¹ para el flujo, 20°C para la temperatura de la columna y 70:0:30 (metanol:acetonitrilo:agua) para la composición de la fase móvil.

Los modelos de calibrado fueron válidos para el rango lineal entre 0 y 346 $\mu\text{g L}^{-1}$ para fenol y entre 0 y 404.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para BPA. Para las probabilidades de falso positivo (α) y falso negativo (β) igual a 0.05, el límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) fueron 33.9 y 66.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para fenol. Para BPA los valores son 25.6 y 50.0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para los 4 juguetes estudiados, no se encontró contenido migrado de BPA en ninguno de los dos simulantes analizados. El fenol migrado desde los juguetes se detectó en agua pero no en HCl 0.07 M, que es el simulante de saliva; la cantidad encontrada estaba muy por debajo del límite establecido por la EFSA.

Se encontró fenol en las 9 muestras de suero, en un rango desde 38.23 hasta 600.22 $\mu\text{g L}^{-1}$, solo una de ellas estaba por debajo del límite $\text{CC}\alpha$ cuando la probabilidad de falso positivo se estableció en 5%.

V.7. Anexo A

Procedimiento COO-FRO (COOrdinates parallel plot and Pareto FROnt):

```
function FP=FPareto(R,v);

% This function calculates the Pareto front of vectors (rows) in
% matrix R
%
% This code is provided as annex of the manuscript:
% "EASY-TO-USE PROCEDURE TO OPTIMISE A CHROMATOGRAPHIC METHOD.
% APPLICATION IN THE DETERMINATION OF BISPHENOL-A AND PHENOL IN TOYS
% BY MEANS OF LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION"
% Journal of Chromatography A, doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.049
%
% Required input arguments
% R : Data matrix of vectors (rows) to get Pareto front
% v : Vector of positive integers with the variables you want to
% minimize
% For the phenol an BPA data of the paper v=[3 4].
%
% The output is the Pareto front of R that minimizes the variables
% marked in 'v' and maximizes the remaining. FP is a vector with the
% indices of the rows of R that are in the Pareto front
%
% June 2017

Rm=R;
[rf rc]=size(Rm);
Rm(:,v)=-1.*R(:,v);
D=zeros(rf,rf);
for i=1:rf
    xref=Rm(i,:);
    for j=1:rf
        if max(xref-Rm(j,:))>=0;
            D(i,j)=1;
        end
    end
end

S=sum(D');
% The rows with sum equal to 'rf' are the vectors non-dominated
FP=find(S==rf);

% The CFPF script draws the rows of matrix in a parallel coordinates
% plot (blue lines) and superimposed its Pareto front (green lines)
%
% This code is provided as annex of the manuscript:
% "TITLE"
% Journal of Chromatography A, doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.049
%
```

```

% Required input arguments in the workspace
% R1 :Data matrix of vectors (rows) to be plotted. It can be,
%     i) only the matrix of responses, R1=R
%     ii) the matrix of the factorial complete domain together
%         with matrix of responses, R1=[SPACE R]
% flag:If 1, the range of each original variable is maintained
%       if 0, all variables are scaled to range in the [0,1]
%       interval
% FP :Is the vector with the indices of Pareto front, as it is
%     obtained by the function FPareto.m
%
% The output is the Parallel Coordinates plot of R1.
% The variables are drawn in vertical axes with the same order
% as the columns of R1
%
% June 2017

RCP=R1;
[rf rc]=size(RCP);
if flag==1
    x=[min(min(RCP)) max(max(RCP))];
else
    for j=1:rc
        y1=min(RCP(:,j));
        y2=max(RCP(:,j));
        a=y1/(y1-y2);
        b=-1/(y1-y2);
        for i=1:rf;
            RCP(i,j)=a+b*RCP(i,j);
        end
    end
    x=[0 1];
end
figure(2);hold on;
for i=1: rc
    figure(2);plot (i*ones(1,2),x,'k')
end
for i=1:rf
    figure(2);plot(1:rc, RCP(i,:), 'b')
end
set(gca,'xtick',[1:rc])
if flag ==1
    axis([0.9 rc+0.1 x(1)-0.1 x(2)+0.1]);
else
    axis([0.9 rc+0.1 -0.1 1+0.1]);
end

figure(2);plot(1:rc, RCP(FP,:), 'g', 'LineWidth',2)

figure(2); hold off
clearvars RCP rf rc y1 y2 a b x i j;

```

V.8. Apéndice A. Datos del material suplementario



Figura V.S1. Muestras de juguetes para niños analizadas para BPA y fenol en esta aplicación: A) pony, B) muñeca, C) ardilla y D) soldados.

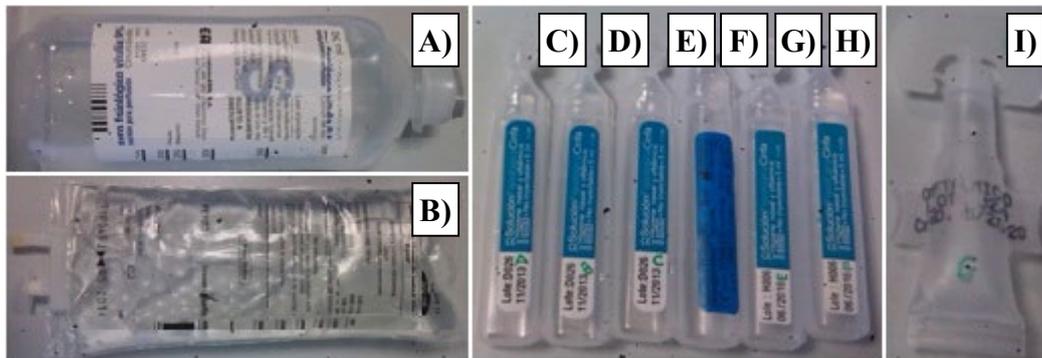


Figura V.S2. Contenedores de suero analizados: (A-B) bolsas de suero de hospital, (C-H) ampollas de suero convencional e (I) lágrimas artificiales.

V.9. Referencias

- [1] P.F. De Aguiar, B. Bourguignon, M.S. Khost, D.L. Massart, R. Phan-Tan-Luu, D-Optimal designs, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 30 (1995) 199-210. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(94\)00076-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(94)00076-X)
- [2] G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York, 1998. <https://doi.org/10.1201/9780203508688>
- [3] L. Rubio, M.L. Oca, L.A. Sarabia, I. García, M.C. Ortiz, Desirability functions as response in a D-optimal design for evaluating the extraction and purification steps of six tranquillizers and an anti-adrenergic by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chemometrics* 30 (2016) 58-69. <https://doi.org/10.1002/cem.2767>
- [4] J.A. Pérez-Serradilla, M.C. Ortiz, L. Sarabia, M.D. Luque de Castro, Focused microwave-assisted Soxhlet extraction of acorn oil for determination of the fatty acid profile by GC-MS. Comparison with conventional and standard methods, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 451-462. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1227-x>
- [5] D. Arroyo, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 4487-4497. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.010>
- [6] A. Inselberg, *Parallel coordinates: Visual multidimensional geometry and its applications*, Springer, Dordrecht, Heidelberg, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68628-8>
- [7] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, D. Arroyo, Improving the visualization of the Pareto-optimal front for the multi-response optimization of chromatographic determinations, *Analytica Chimica Acta* 687 (2011) 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.12.023>
- [8] A. Herrero, C. Reguera, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, Ad-hoc blocked design for the robustness study in the determination of dichlobenil and 2,6-dichlorobenzamide in onions by programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1370 (2014) 187-199. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.016>

- [9] Commission Directive 2014/81/EU of 23 June 2014 amending Appendix C of Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards bisphenol A, Official Journal of the European Union L 183/49, 2014.
- [10] Commission Directive (EU) 2017/774 of 3 May 2017 amending, for the purpose of adopting specific limit values for chemicals used in toys, Appendix C to Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards phenol, Official Journal of the European Union L 115/47, 2017.
- [11] T. Geens, D. Aerts, C. Berthot, J.P. Bourguignon, L. Goeyens, P. Lecomte, G. Maghuin-Rogister, A.M. Pironnet, L. Pussemier, M.L. Scippo, J. Van Loco, A. Covaci, A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A, *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012) 3725-3740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>
- [12] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 12/1, 2011.
- [13] Commission Implementing Regulation (EU) No 321/2011 of 1 April 2011 amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the restriction of use of bisphenol A plastic infant feeding bottles, Official Journal of the European Union L 87/1, 2011.
- [14] EN 71-10, Safety of toys. Part 10: Organic chemical compounds. Sample preparation and extraction, European Committee for Standardization, 2005.
- [15] EN 71-11, Safety of toys. Part 11: Organic chemical compounds. Methods of analysis, European Committee for Standardization, 2005.
- [16] World Trade Organization Committee on Technical Barriers to Trade, Notification 16-3856, 18 July 2016. Available at https://www.google.es/search?q=WTO+16-3856&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe_rd=cr&ei=Y4M0We6kA5qE1gKlkIGABA (Last access on 09 April 2017).
- [17] Ares(2016)3958902, Draft of Commission Directive (EU) amending, for the purpose of adopting specific limit values for chemicals used in toys, Appendix C to Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards bisphenol A. (Last access on 09 April 2017).
- [18] N. Caballero-Casero, L. Lunar, S. Rubio, Analytical methods for the

- determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review, *Analytica Chimica Acta* 908 (2016) 22-53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.034>
- [19] E.J. Hoekstra, C. Simoneau, Release of Bisphenol A from Polycarbonate. A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53 (2013) 386-402. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.536919>
- [20] M.L. Oca, L.A. Sarabia, A. Herrero, M.C. Ortiz, Optimum pH for the determination of bisphenols and their corresponding diglycidyl ethers by gas chromatography–mass spectrometry. Migration kinetics of bisphenol A from polycarbonate glasses, *Journal of Chromatography A* 1360 (2014) 23-38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.063>
- [21] M.L. Spagnuolo, F. Marini, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, Migration test of bisphenol A from polycarbonate cups using excitation-emission fluorescence data with parallel factor analysis, *Talanta* 167 (2017) 367-378. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.033>
- [22] Commission Regulation (EU) 2015/174 of 5 February 2015 amending and correcting Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 30/2, 2015.
- [23] Danish Ministry of the Environment, Environmental Protection Agency, Risk management options analysis, Conclusion document for phenol, Denmark, 2014. Available at <https://echa.europa.eu/documents/10162/07214826-a403-7bcc-6421-c705b08d43f9> (Last access on 18 June 2017).
- [24] R.J. Robbins, Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 2857-2866. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- [25] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu, NEMRODW, Version 2015, L.P.R.A.I., Marsella, Francia, 2015.
- [26] MATLAB version 7.12.0.635 (R2011a), The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA, 2011.
- [27] S. Verboven, M. Hubert, LIBRA: A MATLAB library for robust analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 75 (2005) 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.06.003> Available at <http://wis.kuleuven.be/stat/robust/> LTS regression is also available in the PLS Toolbox at Eigenvector Research. (Last access on 09 October 2017).
- [28] P.J. Rousseeuw, K. Van Driessen, An algorithm for positive-breakdown

- methods based on concentration steps, in: W. Gaul, O. Opitz, M. Schader (Eds.), *Data analysis: Scientific modeling and practical application*, Springer-Verlag, New York, 2000, pp. 335-346. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58250-9_27
- [29] L. Sarabia, M.C. Ortiz, DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85052-6](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85052-6)
- [30] M.S. Sánchez, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, R. Lletí, On Pareto-optimal fronts for deciding about sensitivity and specificity in class-modelling problems, *Analytica Chimica Acta* 544 (2005) 236-245. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.12.084>
- [31] C. Reguera, M.S. Sánchez, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, Pareto-optimal front as a tool to study the behaviour of experimental factors in multi-response analytical procedures, *Analytica Chimica Acta* 624 (2008) 210-222. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.07.006>

CAPÍTULO VI

**ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE MELAMINA Y
FORMALDEHÍDO Y SUS CINÉTICAS DE MIGRACIÓN
EN UTENSILIOS DE COCINA. ANÁLISIS
UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE DE DATOS
OBTENIDOS MEDIANTE HPLC-DAD**

La resina de melamina-formaldehído es un material ampliamente utilizado en la fabricación de utensilios de cocina. Cuando se usan habitualmente estos utensilios puede ocurrir que los monómeros melamina y formaldehído migren al alimento, además de otros componentes que forman el producto final: aditivos añadidos y conocidos por el fabricante. Otras sustancias, no añadidas intencionadamente (denominadas NIAS por sus siglas en inglés) como por ejemplo impurezas de la materia prima o subproductos originados en la fabricación del utensilio, también pueden migrar.

El trabajo de investigación de este capítulo tuvo como primer objetivo poner a punto un método cromatográfico rápido, HPLC-DAD, para la determinación de melamina y formaldehído. Con los datos obtenidos una vez optimizado el método, se realizó un análisis univariante en el modo habitual con los valores que proporciona el software del equipo (área de pico integrada en la longitud de onda seleccionada). El trabajo concluyó realizando las cinéticas de migración para estos dos analitos sometiendo a sucesivas exposiciones varios recipientes de cocina. Este trabajo constituye el Epígrafe VI.I de este capítulo.

Con motivo de la elaboración de un artículo multiautor sobre cromatografía y PARAFAC, participé con el grupo de investigación al que pertenezco aportando los datos obtenidos en mi anterior artículo. Cuando se realizaron las medidas, además de registrar el área de pico a una longitud de onda fija, se obtuvieron datos del rango del espectro entre 200 y 500 nm (cada 2 nm) para así disponer de datos de tres vías (un cubo de datos por analito). Por tanto, se podía considerar la posibilidad de aplicar las ventajas que proporcionaba utilizar PARAFAC como técnica de descomposición. El uso adecuado de esta técnica, cuando los datos son trilineales, permite la identificación inequívoca de las sustancias de interés, aunque existan interferentes (aditivos y/o NIAS) que eluyan junto con estos analitos.

Con los datos obtenidos tanto en los ensayos de migración como en la cinética de migración de uno de los utensilios analizados se aplicó el análisis multivariante mediante la descomposición PARAFAC o PARAFAC2, para la determinación de melamina. Los resultados provenientes de esta descomposición se compararon con los obtenidos con el análisis univariante en términos del error relativo en predicción y de la correlación entre el espectro de una muestra de referencia de melamina y el obtenido en cada tipo de análisis. Esta investigación se corresponde con el Epígrafe VI.II de este capítulo.

En el Epígrafe VI.III de la memoria se realiza un estudio comparativo de la concentración encontrada en las muestras de migración (test y cinéticas) cuando se utilizaba PARAFAC/PARAFAC2 frente a la obtenida con el modo univariante. Todos los datos analizados, tanto en modo univariante como multivariante, provienen de la migración de las mismas muestras (utensilios de cocina analizados).

VI.I. Modelos cinéticos con datos de cromatografía líquida de la migración de melamina y formaldehído desde utensilios de cocina de melamina

VI.I.1. Resumen*

La legislación europea ha establecido un límite de migración específica (SML por sus siglas en inglés) de 15 mg kg^{-1} para formaldehído y 2.5 mg kg^{-1} para melamina. Las resinas de formaldehído se utilizan en la fabricación de utensilios de cocina de melamina. El formaldehído se encuentra en el grupo 1 de la lista de compuestos cancerígenos de la IARC. Para determinar la cantidad de formaldehído y melamina como migrantes potenciales desde diferentes tipos de utensilios de cocina de melamina (vaso, taza, cubiertos, tazón y bol), se ha implementado un método HPLC-DAD. Este método es una alternativa a las propuestas de las guías técnicas para determinar el formaldehído mediante espectrofotometría de UV-Vis y la melamina mediante HPLC. El objetivo final fue construir las curvas cinéticas de migración de estos dos analitos en utensilios de cocina de melamina.

Después de validar el método, se calcularon el límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) para ambos analitos, cuando las probabilidades de falso positivo (α) y falso negativo (β) se fijaron en 0.05; siendo $CC\beta$ 0.269 mg L^{-1} y 0.311 mg L^{-1} para melamina y formaldehído respectivamente. También se calcularon $CC\alpha$ y $CC\beta$ en el SML de ambos analitos, lo que permitió evaluar las probabilidades de dar una falsa no conformidad y una falsa conformidad en el SML.

Los test de migración se realizaron con simulante B (ácido acético al 3% (p/v) en solución acuosa), siendo 70°C durante 2 horas las condiciones de cada exposición. Las cantidades de melamina y formaldehído encontradas en la tercera exposición de todos los utensilios de cocina analizados estaban entre 0.21 y 1.09 mg L^{-1} y entre 0.55 y 3.86 mg L^{-1} , respectivamente.

Se construyeron curvas cinéticas de migración para cada tipo de utensilio de cocina con los datos de dieciséis ciclos de migración consecutivos (70°C cada 30 minutos). El SML para la melamina se sobrepasó en la taza, en el tazón y en el bol después de varios ciclos distintos en cada caso (once, trece y uno respectivamente).

Cuando se realizaron más ciclos en la taza, con el fin de conocer en qué número de ciclos se sobrepasaba el SML, los valores de la cantidad acumulada de formaldehído y melamina fueron 15.30 y 6.79 mg L^{-1} , respectivamente, después de treinta y dos ciclos. Ambas concentraciones excedieron el SML correspondiente.

* Esta primera parte del capítulo ha sido publicada en *Journal of Chromatography A* 1599 (2019) 115-124.

VI.I.2. Palabras clave

Melamina, formaldehído, utensilios de cocina, HPLC-DAD, curva cinética de migración, límite de migración específica

VI.I.3. Introducción

El formaldehído es un compuesto químico muy utilizado. Se emplea en la fabricación de diversos materiales aislantes, como fungicida, germicida y desinfectante industrial y como conservante en la industria sanitaria. También se utiliza en diferentes procesos químicos industriales: la fabricación de barnices, pinturas, pegamentos, aprestos para textiles y como conservante en cosmética [1].

Su uso principal es en la producción de resinas (fenol-formaldehído, urea-formaldehído, melamina-formaldehído y poliacetales o también denominadas polioximetileno) debido a la facilidad con la que se polimeriza. En particular, la resina de melamina-formaldehído se usa habitualmente en utensilios de cocina, y los artículos fabricados con este polímero se conocen comúnmente en inglés como "melaware". Las resinas, antes mencionadas, se utilizan como pegamentos, adhesivos y aglutinantes en las industrias de la madera, la pulpa y el papel, en fibras de vidrio sintéticas, plásticos, recubrimientos y acabados textiles [1].

Hasta hace unos años, el formaldehído estaba clasificado en la categoría 2A de la lista de compuestos carcinogénicos de la IARC [2]. En junio de 2004, en Lyon, un grupo de trabajo internacional de la IARC, expertos en carcinogénesis química y campos relacionados, llevó a cabo los ensayos necesarios y obtuvo evidencia suficiente para concluir en una publicación monográfica [3], que el formaldehído debería clasificarse como carcinógeno para humanos en la categoría 1, en la que se ha incluido desde 2012 [4]. La vía de exposición al formaldehído puede ser diferente: dérmica, oral o por inhalación. Por esta razón, se están haciendo intentos para eliminar o al menos reducir su presencia, así como para aumentar los requisitos y el número de controles de su exposición.

A pesar de ser carcinogénico para los humanos, se puede encontrar como un producto natural en la mayoría de los sistemas vivos y en el medio ambiente. Se produce en frutas y otros alimentos, se origina en mamíferos, incluidos los humanos, a través de procesos metabólicos oxidativos y se produce en las primeras etapas de descomposición de residuos vegetales [1].

Otras fuentes que dan lugar al formaldehído en el medio ambiente son los incendios forestales, el humo del tabaco y los procesos de combustión. Los hidrocarburos emitidos por estos procesos (emisiones de vehículos, incineradoras, refinerías, estufas de leña, etc.) sufren una oxidación fotoquímica que libera formaldehído al medio ambiente. Afortunadamente, el formaldehído tiene una vida media corta en el medio

ambiente, ya que se elimina del aire a través de procesos fotoquímicos y mediante lluvia y biodegradación [1].

La melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) es un compuesto orgánico producido a partir de urea. En 2010, la EFSA [5] informó que no se esperaba que la melamina y sus sales fueran acumulativas. Se utiliza principalmente en la síntesis de resina de melamina-formaldehído, cuyas aplicaciones incluyen la fabricación de utensilios de cocina y como adhesivo para la producción de tableros aglomerados y madera contrachapada en la fabricación de muebles [6-8].

Cuando estos utensilios de cocina entran en contacto con los alimentos, tiene lugar la migración de estas dos sustancias (melamina y formaldehído) a los alimentos [7], exponiendo a las personas a estos agentes, principalmente niños pequeños y bebés, usuarios habituales de este tipo de utensilios de cocina.

La legislación europea establece niveles máximos de migración, conocido como el límite de migración específica (SML), para las dos sustancias. En concreto, para la migración desde materiales plásticos en contacto con alimentos el SML es 15 mg kg^{-1} para formaldehído [9] y 2.5 mg kg^{-1} para melamina [10].

Debido a la preocupación existente sobre la migración de estos compuestos y para verificar el cumplimiento de la legislación, varios autores han publicado estudios en los que cuantifican la migración de formaldehído y melamina desde utensilios de cocina [8,11-16].

Las guías técnicas [17] indican que el proceso analítico para la determinación y cuantificación de la melamina es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector ultravioleta (HPLC-UV) fijando la longitud de onda en 230 nm. El formaldehído requiere una derivatización previa, ya sea con ácido cromotrópico en presencia de ácido sulfúrico, o con 2,4-pentanodiona en presencia de acetato de amonio. Para el formaldehído, la determinación y cuantificación se lleva a cabo mediante espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 574 y 410 nm respectivamente [18].

En la bibliografía revisada se encuentra que la técnica analítica más utilizada para la determinación de formaldehído es la espectrofotometría, con derivatización previa empleando ácido cromotrópico [12-14,16] o 2,4-pentanodiona [11,15]. Otros autores utilizan HPLC acoplado a un detector de diodos en serie (DAD) derivatizando con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) [8].

Para la determinación de la melamina, la técnica utilizada es HPLC-UV [15,16], HPLC-DAD [8,13] y cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un detector de diodos en serie (UHPLC-DAD) [12].

El formaldehído también puede determinarse mediante HPLC-DAD utilizando un agente derivatizante como DNPH en muestras medioambientales [19-22], en

vino [23], en vapor de cigarrillo electrónico [24] o humo de cigarrillo [25], en cosméticos y productos para el cabello [26,27], en sustancias farmacológicas [28], y en quitaesmalte y acetona de grado analítico [29]. El formaldehído también se ha determinado por HPLC-UV con DNPH como agente derivatizante en champú [30]. Burini y Coli [31] usan acetoacetato de etilo como agente derivatizante y HPLC-DAD para la determinación de formaldehído en bebidas alcohólicas. La cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y ampicilina como agente derivatizante se seleccionaron para determinar el formaldehído en el plasma sanguíneo [32].

También se han utilizado técnicas espectrofotométricas para analizar formaldehído en el agua de lluvia, en humo y en las colillas de cigarrillos, utilizando N,N-dietil-p-fenilendiamina [33]; y en materiales de embalaje de alimentos de papel y cartón [34] y muestras de pescado [35], derivatizando con 2,4-pentanodiona. Otros autores han elegido otras técnicas analíticas, como la espectroscopía de fluorescencia con matriz de excitación-emisión (EEM) para el análisis de muestras de alimentos, utilizando como agente derivatizante pironina en presencia de ácido fosfórico y yodato de sodio [36] o con 1,3-ciclohexanodiona [37] o con n-propilamina [38]; y muestras de plasma sanguíneo con pironina en presencia de ácido sulfúrico y bromato de potasio [39].

A pesar de la existencia de una amplia bibliografía sobre las técnicas para determinar formaldehído y melamina, no hay información sobre las curvas cinéticas de migración para estos dos migrantes. Recientemente, en 2015, la Comisión Europea ha realizado un esfuerzo para elaborar informes técnicos como apoyo al Reglamento 10/2011 de material plástico en contacto con alimentos [40]. Este informe reúne guías prácticas sobre la aplicación de modelos de migración para la estimación de una migración específica. Este proyecto de investigación validó un modelo de difusión, las ecuaciones matemáticas a aplicar, el procedimiento de estimación de los coeficientes de transferencia de masa y las condiciones para su adecuada aplicación con un enfoque especial en los plásticos monocapa de poliolefina. La investigación analiza el problema de construir estos modelos basados en fundamentos físicos, pero, a pesar de ser un trabajo extenso y exhaustivo, no puede cubrir cada tipo de comportamiento plástico-alimento. Específicamente, la resina de melamina-formaldehído no se incluye en la investigación mencionada.

En nuestro trabajo se realiza la determinación, cuantificación y cinética de migración de melamina y formaldehído en diferentes utensilios de cocina (vaso, taza, cubiertos, tazón y bol), todos adquiridos en una tienda local. Esos dos analitos fueron elegidos para la determinación porque los utensilios estaban fabricados con resina de melamina-formaldehído de acuerdo con el etiquetado de los mismos.

La determinación y cuantificación de melamina y formaldehído se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de diodos en serie

(HPLC-DAD). La derivatización del formaldehído se realizó con 2,4-pentanodiona en presencia de acetato de amonio y ácido acético. Para ambos analitos, el límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) se determinaron a una concentración igual a cero [41] y en sus respectivos SML [42].

En primer lugar, los test de migración se analizaron de acuerdo con el Reglamento 10/2011 [9] que indica que se requieren tres extracciones y que solo se debe cuantificar el análisis de la tercera migración. Los test deben realizarse bajo condiciones de ensayo estandarizadas (tiempo, temperatura y simulante alimentario) que representen las peores condiciones previsibles de uso de los utensilios de cocina de plástico. Además, la Ref. [18] establece que las condiciones de migración deben ser de 2 horas a 70°C en simulante de alimentos (ácido acético al 3% p/v) para artículos que previsiblemente no se podrían utilizar para cocinar. Sin embargo, en este trabajo se muestran los resultados de las tres exposiciones para poder evaluar el efecto de cambiar el artículo y la exposición a la migración. Para esta tarea, tres artículos (A, B, C) de cada tipo de utensilio de cocina se expusieron a tres ensayos de migración, cuyos extractos fueron analizados por triplicado.

En este estudio, el modelo matemático de la cinética de migración que mejor explica los datos experimentales se ajustó y validó, pudiéndose observar la tendencia mostrada por la concentración migrada desde estos objetos cuando se les usa repetidamente [43]. Teniendo en cuenta que estos utensilios se utilizan de forma continua, conocer el comportamiento de los migrantes con el tiempo y la temperatura es importante desde el punto de vista de la protección de la salud humana. Para los cinco tipos de utensilios de cocina, se realizaron dieciséis migraciones consecutivas a 70°C cada 30 minutos. Para probar si en algún caso la cantidad de formaldehído migrado estaba por encima del SML, se realizaron varios ciclos adicionales en la taza y en el bol. Finalmente, se ajustó una curva cinética de migración completa utilizando los valores experimentales obtenidos después de veintiún ciclos de migración a 70°C durante 1 hora en una nueva taza.

VI.I.4. Material y métodos

VI.I.4.1. Reactivos químicos

Se adquirió formaldehído (mínimo 37% (p/v) estabilizado con aproximadamente 10% de metanol), acetato de amonio y 2,4-pentanodiona en Merck (Darmstadt, Alemania). La melamina fue suministrada por Alfa Aesar (Kandel, Alemania). El acetonitrilo (grado isocrático LiChrosolv[®] para cromatografía líquida) también fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido acético glacial (HiPerSolv Chromanorm para HPLC) se adquirió en VWR Prolabo Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francia). El agua desionizada se obtuvo usando el sistema de purificación de agua Milli-Q Gradient A10 de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

Otros productos químicos empleados fueron: tiosulfato de sodio pentahidratado (pro análisis) suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania), yodo y yodato de potasio obtenidos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). El hidróxido de sodio se adquirió en Ercros (Barcelona, España). El ácido clorhídrico de 37% de pureza (AnalaR Normapur) se obtuvo a través de VWR BDH Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francia) y el yoduro de potasio fue adquirido en Labken (Barcelona, España).

VI.I.4.2. Instrumental

Se empleó un baño de ultrasonidos (VWR International BVBA, Lovaina, Bélgica) para obtener la disolución madre de melamina. Antes de las extracciones se precalentó el simulante B en una estufa 200209 JP Selecta (Barcelona, España).

Las muestras de los test de migración y de las curvas cinéticas de migración se obtuvieron utilizando un baño de agua equipado con un termostato de inmersión Digiterm 200 (JP Selecta S.A., Barcelona, España). El baño termostático también se empleó en el proceso de derivatización.

La cuantificación de melamina y formaldehído se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo HPLC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EEUU) compuesto por una bomba cuaternaria (G1311C), un inyector (G1329B), un compartimento termostaticado de columna (G1316A) y un detector de diodos en serie (G7117C). El software OpenLab CDS ChemStation se utilizó para integrar los picos en modo univariante. La columna cromatográfica empleada fue una Kinetex EVO-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm). La fase móvil estaba compuesta de acetonitrilo (disolvente A) y agua desionizada (disolvente B).

El detector de diodos en serie se programó para calcular el área de pico a la longitud de onda de 230 y 410 nm para melamina y formaldehído, respectivamente, aunque a cada tiempo se registró el espectro de absorción entre 200 y 500 nm, cada 2 nm. Los tiempos de retención fueron de 2.1 y 2.8 minutos, respectivamente. La Figura VI.I.1a muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos en el análisis HPLC-DAD de una muestra. A y B son los picos correspondientes a la melamina y al formaldehído, respectivamente, cuyas áreas integradas se emplearon para el cálculo de la concentración de ambos analitos. La Figura VI.I.1b muestra el cromatograma de un patrón de calibrado que contenía 0.25 mg L⁻¹ de melamina (el nivel de concentración más bajo en calibración).

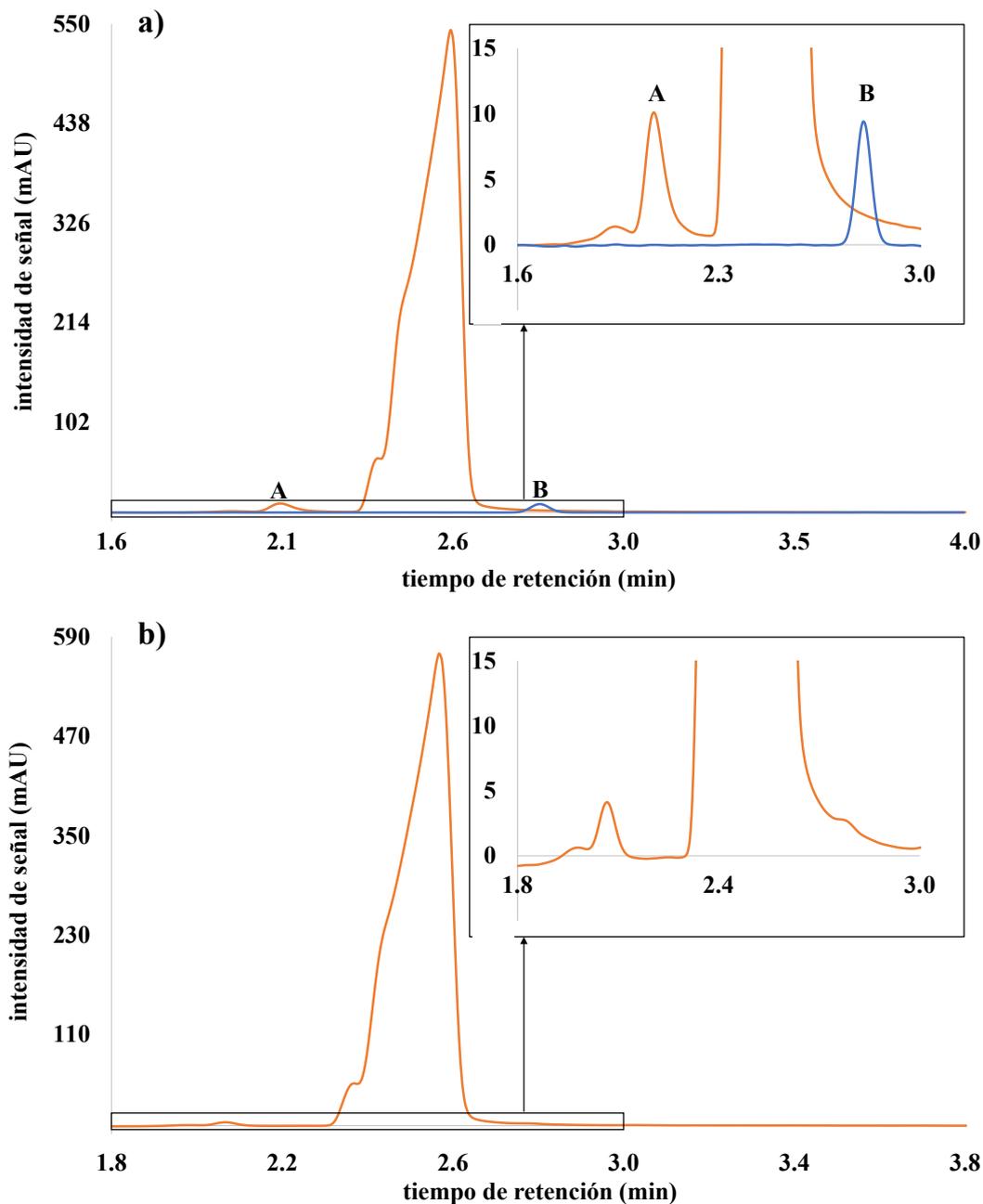


Figura VI.I.1. a) Cromatogramas de una muestra registrada, a 230 y 410 nm, para melamina (A en naranja) y para formaldehído (B en azul) respectivamente. b) Cromatograma de un patrón de calibrado de 0.25 mg L⁻¹ de melamina a 230 nm. En ambas figuras se muestra en un zoom la zona de interés de cada cromatograma.

VII.4.3. Disoluciones patrón y muestras

Previo a la preparación de las muestras, se realizó la valoración de la solución comercial de formaldehído. En la valoración del formaldehído se emplearon disoluciones de tiosulfato de sodio pentahidratado y yodo. La disolución de yodo se

valoró con la disolución de tiosulfato de sodio pentahidratado, y esta, a su vez, se valoró con yodato de potasio y yoduro de potasio.

A continuación, se prepararon disoluciones madre individuales (melamina 500 mg L⁻¹ y formaldehído 1500 mg L⁻¹) disolviendo la cantidad adecuada de cada reactivo en agua y almacenándolas a 4°C. A partir de la disolución madre se preparó diluyendo con agua una disolución intermedia de 150 mg L⁻¹ de formaldehído. A partir de las respectivas disoluciones más concentradas se prepararon las disoluciones individuales de melamina y formaldehído de 50 mg L⁻¹, en este caso mediante dilución con simulante B (ácido acético al 3% (p/v) en solución acuosa). Los patrones de calibración se prepararon a partir de cada disolución de 50 mg L⁻¹ por dilución con simulante B, en el rango de 0 a 10 mg L⁻¹ individualmente para cada analito. Las disoluciones se almacenaron a 4°C y protegidas de la luz. Para construir las rectas de calibrado se utilizaron doce patrones de calibración (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 3, 4, 5, 6, 7.5, 9 y 10 mg L⁻¹).

En todas las muestras analizadas, el simulante B se utilizó como simulante alimentario, siempre precalentado en una estufa a 70°C para tratar de mantener la temperatura de 70°C durante todo el ensayo. Como indican las guías técnicas [18], el simulante B debe llegar hasta aproximadamente 0.5 cm del borde de los artículos sometidos a ensayo por llenado (vaso, taza, tazón y bol). Sin embargo, los cubiertos se sometieron a ensayo por inmersión y se colocaron en un vaso de precipitados. El simulante B cubrió los cubiertos hasta 1 cm desde el extremo del mango, de manera que la parte funcional de los cubiertos que entra en contacto con el alimento quedó completamente cubierta. El simulante se recogió después del proceso de migración en un matraz aforado de 250 mL para las muestras de vaso y cubiertos, mientras que se empleó un matraz aforado de 500 mL para las muestras de taza, tazón y bol, completándose en todos los casos con simulante fresco hasta el enrase del matraz. Por lo tanto, los factores de dilución que se deben aplicar para obtener el resultado final fueron diferentes, dependiendo del tipo de utensilio de cocina analizado.

En primer lugar, se llevaron a cabo los test de migración, para los cuales se utilizaron tres artículos de cada tipo de utensilio de cocina (vaso, taza, cubiertos, tazón y bol, ver Figura VI.I.2). A cada artículo se le sometió a tres exposiciones (70 ± 0.2°C durante 2 horas) como se indica en la Ref. [18], cada una de las cuales se analizó por triplicado. En segundo lugar, se realizaron las correspondientes cinéticas de migración para ambos analitos. Para este análisis, se utilizó un nuevo artículo de cada tipo de utensilio de cocina. Cada artículo fue sometido a migraciones sucesivas (70 ± 0.2°C durante 30 minutos) y sus extractos se almacenaron a 4°C. En todos los casos, el simulante B fue precalentado en una estufa a 70°C. Después, se vertió dentro del utensilio. Tras estar a 70°C (durante el tiempo de exposición) en un baño termostático, se recogió el volumen total de simulante empleado, dejando el artículo vacío. Estas acciones se repitieron en cada procedimiento de migración. Los utensilios no se

lavarón ni enjuagaron entre ciclos. No se observaron trazas sólidas en suspensión en el simulante en ninguno de los ciclos. En la inspección visual, no se observaron daños, roturas, grietas o pérdida de los dibujos (decoración) en los utensilios de cocina después del procedimiento de migración.



Figura VI.I.2. Tipos de utensilios de cocina de melamina analizados: a) vaso, b) taza, c) cubiertos, d) tazón y e) bol.

El análisis cromatográfico se realizó en diferentes condiciones para cada uno de los analitos: melamina y formaldehído. El análisis de formaldehído necesita un procedimiento de derivatización previo. Para el cual es necesario disponer de una "disolución reactiva" que se preparó disolviendo 15 g de acetato de amonio en aproximadamente 80 mL de agua, añadiendo 0.3 y 0.2 mL de ácido acético glacial y 2,4-pentanodiona respectivamente, y completando hasta el enrase en un matraz de 100 mL. Una vez preparada esta disolución, la reacción de derivatización consiste en añadir 16 mL de agua desionizada y 4 mL de la "disolución reactiva", en este orden, a una alícuota de 4 mL de muestra (patrón de calibrado o muestra problema) en un matraz de 25 mL completando hasta la marca con agua desionizada. Las disoluciones preparadas anteriormente se colocaron en un baño a 60°C durante 10 minutos, y a continuación en un baño de hielo durante 10 minutos.

Las condiciones para el análisis cromatográfico de melamina fueron una fase móvil isocrática que consistía en acetonitrilo/agua (15:85, v/v) a una velocidad de flujo de 0.6 mL min⁻¹, mientras que las condiciones para el análisis de formaldehído fueron acetonitrilo/agua (20:80, v/v) a 1.0 mL min⁻¹. En ambos análisis, la temperatura del

compartimento de la columna fue de 20°C, el volumen de inyección 20 µL y el tiempo del análisis completo 4 minutos.

VI.I.4.4. Software

Los modelos de regresión y el análisis de varianza (ANOVA) se llevaron a cabo utilizando STATGRAPHICS Centurion XVII [44]. El límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) se determinaron usando el programa DETARCHI [41] y $CC\alpha$ y $CC\beta$ en el límite de migración específica [42] se estimaron usando NWAYDET (un programa escrito por nuestro grupo de investigación que evalúa las probabilidades de falso no-cumplimiento y falso cumplimiento).

VI.I.5. Resultados y discusión

VI.I.5.1. Validación del método

VI.I.5.1.1. Rectas de calibrado y de exactitud

Se realizaron calibrados para melamina y formaldehído con doce disoluciones patrón en un rango de 0 a 10 mg L⁻¹ para ambos analitos como se indicó en la Sección VI.I.4.3 (se replicaron dos niveles de concentración). En el análisis se detectó que la disolución patrón de 9 mg L⁻¹ de melamina era un dato anómalo (residuo estudentizado igual a -4.83) y se rehízo el modelo para la melamina sin él. Las filas de 1 a 6 de la Tabla VI.I.1 muestran ambos modelos de regresión, los cuales son significativos a un nivel de confianza del 95% porque el p-valor es menor que 10⁻⁴ (la hipótesis nula de este test H₀: El modelo no explica la variabilidad de la respuesta). Además, ambos modelos parecen ser adecuados para los datos experimentales, porque el p-valor para el test de fallo de ajuste es mayor o igual que 0.05 (la hipótesis nula de este test H₀: El modelo no tiene fallo de ajuste).

Además, las filas de 7 a 10 de la Tabla VI.I.1 muestran los resultados de las rectas de exactitud para melamina y formaldehído. El término independiente de estas rectas "concentración estimada *versus* concentración real" no fue diferente de 0 y sus pendientes no fueron diferentes de 1 a un nivel de significación del 5%. Por lo tanto, la veracidad se verificó con un nivel de confianza del 95% para ambos procedimientos. La precisión del método se estimó a partir de la desviación estándar residual, de las rectas de exactitud, mostrada en la fila 11 de la Tabla VI.I.1.

VI.I.5.1.2. Límite de decisión y capacidad de detección

Se utilizaron $CC\alpha$ y $CC\beta$ para evaluar el límite de decisión y la capacidad de detección, con el fin de garantizar las probabilidades de riesgo de falsos positivos y falsos negativos, que en este trabajo se fijaron en 0.05. La ISO 11843 [45] y varios

reglamentos de la UE [46] definen el límite de decisión ($CC\alpha$) como "el valor de la concentración neta cuyo exceso conduce, para una probabilidad α , a la decisión de que la concentración del analito en el material analizado es mayor que la del blanco". Es decir, el límite de decisión ($CC\alpha$) significa el límite en y por encima del cual se puede concluir con una probabilidad de error de α que una muestra es no-conforme. Y la capacidad de detección ($CC\beta$) para una probabilidad dada de falso positivo, α , se define como "la verdadera concentración neta del analito en el material a analizar, que conducirá, con probabilidad $1-\beta$, a la conclusión correcta de que la concentración en el material analizado es mayor que la del blanco".

Los valores $CC\alpha$ y $CC\beta$ del procedimiento a una concentración igual a cero se calcularon a través de las rectas de calibrado y se muestran en las filas 12 y 13 de la Tabla VI.I.1 [41]. El procedimiento permite la determinación de $CC\beta$ con probabilidades de falso positivo (α) y falso negativo (β) igual a 0.05, siendo 0.269 y 0.311 mg L⁻¹ para melamina y formaldehído, respectivamente.

Tabla VI.I.1. Validación del método analítico. Parámetros de las rectas de calibrado y exactitud (s_{yx} es la desviación estándar de la regresión). Límite de decisión y capacidad de detección (para $\alpha = \beta = 0.05$).

		Melamina	Formaldehído
Recta de calibrado	Término independiente	2.126	-0.032
	Pendiente	65.311	22.773
	Coefficiente de correlación	0.999	0.999
	s_{yx}	4.606	1.870
	P-valor (significación de la regresión)	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	P-valor (test de fallo de ajuste)	0.537	0.527
Recta de exactitud	Término independiente	-2.41 · 10 ⁻⁶	-0.007
	P-valor	0.999	0.835
	Pendiente	1.000	1.004
	P-valor	0.999	0.574
	s_{yx}	0.071	0.079
$CC\alpha$ ($x_0 = 0$) mg L ⁻¹		0.134	0.159
$CC\beta$ ($x_0 = 0$) mg L ⁻¹		0.269	0.311
$CC\alpha$ ($x = SML^a$) mg L ⁻¹		2.597	16.15
$CC\beta$ ($x = SML^a$) mg L ⁻¹		2.690	17.25

^a SML para melamina igual a 2.5 mg kg⁻¹ y para formaldehído igual a 15 mg kg⁻¹.

En el caso de sustancias con un SML, $CC\beta$ significa el contenido más pequeño de sustancia que puede detectarse, identificarse o cuantificarse en una muestra con una probabilidad de error de β (falso cumplimiento), que es la concentración a la que el método puede detectar las concentraciones en el límite de migración específica con una certeza estadística de $1-\beta$ [46]. Los valores de $CC\beta$ cuando las probabilidades de falso no-cumplimiento (α) y falso cumplimiento (β) se fijaron en 0.05, fueron 2.690 y 17.25 mg L^{-1} para melamina y formaldehído, respectivamente.

VI.I.5.1.3. Identificación inequívoca de analitos

Para garantizar la identificación inequívoca de cada analito en este trabajo, se tuvieron en cuenta los criterios de confirmación establecidos en la Ref. [46] para HPLC-DAD. Estos criterios son: i) El tiempo de retención del analito, deberá ser el mismo que el de un patrón de calibrado en la matriz apropiada, dentro de un margen de $\pm 2.5\%$. ii) Verificar que el espectro coincida con el de una muestra de referencia, uno de los requisitos principales es que el máximo de absorción en el espectro de cada analito deberá estar en la misma longitud de onda que los del patrón de calibración dentro de un margen determinado por la resolución del sistema de detección. Para la detección de diodos en serie (DAD) este margen es de ± 2 nm.

Los tiempos de retención de ambos analitos en los patrones de calibrado coinciden con los de las muestras problema, siendo 2.080 y 2.078 min para melamina y 2.826 y 2.805 min para formaldehído, respectivamente.

Para verificar el segundo criterio, se registraron los espectros de absorción entre 200 y 248 nm para melamina y entre 320 y 500 nm para formaldehído, cada 2 nm. La Figura VI.I.3 muestra los espectros de absorción de una muestra de un blanco, un patrón de calibrado y una muestra problema. Como se puede observar, dicho requisito se cumplió para ambos analitos. Además, se calcularon los coeficientes de correlación entre el espectro del patrón de calibración y el de la muestra problema, que fueron 0.993 y 1.000 para melamina y formaldehído, respectivamente.

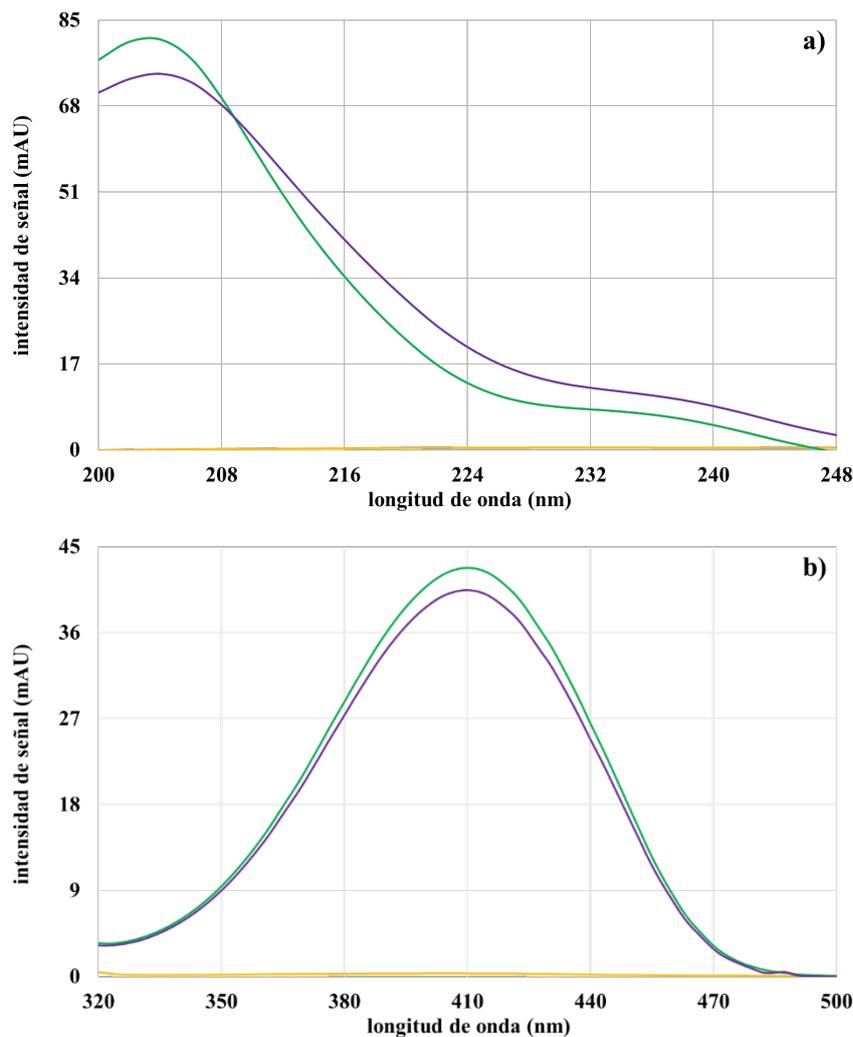


Figura VI.1.3. Espectros de absorción registrados en el análisis mediante HPLC-DAD para a) melamina y b) formaldehído. El espectro de la muestra del blanco se representa en amarillo, el del patrón de calibración en verde y el de la muestra problema en morado.

VI.1.5.2. Test de migración

En los test de migración, se analizaron tres artículos (A, B, C) de cada uno de los cinco tipos de utensilios de cocina seleccionados, descritos en la Sección VI.1.4.3 (vaso, taza, cubiertos, tazón y bol). Cada artículo se expuso a tres test de migración, y cada uno de los extractos de migración se analizó por triplicado.

La cantidad de melamina y formaldehído que migra desde los utensilios de cocina, obtenida después de realizar el análisis cromatográfico, se muestra en las Tablas VI.1.2 y VI.1.3.

Tabla VI.I.2. Resultados de los test de migración de melamina desde utensilios de cocina, expresados en miligramos de analito por litro de simulante (mg L⁻¹). Se analizaron tres artículos (A, B, C) de cada tipo de utensilio de cocina. Cada una de las exposiciones de cada artículo se analizó por triplicado.

Melamina	Exposición 1			Exposición 2			Exposición 3			
	Muestra problema	n = 3		n = 3			n = 3			
Vaso	A	0.271	0.284	0.289	0.421	0.445	0.459	0.618	0.640	0.675
	B	0.157	0.160	0.165	0.293	0.314	0.333	0.410	0.425	0.450
	C	0.156	0.153	0.150	0.162	0.176	0.192	0.218	0.223	0.210
Taza	A	0.419	0.429	0.425	0.549	0.524	0.533	0.608	0.623	0.628
	B	0.866	0.898	0.944	0.802	0.797	0.802	0.884	0.855	0.885
	C	0.476	0.500	0.498	0.546	0.537	0.543	0.820	0.829	0.840
Cubiertos	A	0.441	0.440	0.449	0.249	0.250	0.250	0.315	0.316	0.323
	B	0.539	0.531	0.540	0.283	0.283	0.284	0.364	0.364	0.373
	C	0.368	0.358	0.337	0.309	0.310	0.288	0.361	0.361	0.361
Tazón	A	0.542	0.541	0.564	0.846	0.875	0.910	0.921	0.881	1.048
	B	0.473	0.474	0.481	0.861	0.847	0.884	1.033	1.068	1.087
	C	0.593	0.551	0.532	0.803	0.812	0.821	0.768	0.780	0.787
Bol	A	1.262	1.227	1.190	0.552	0.537	0.534	0.624	0.632	0.638
	B	1.279	1.225	1.229	0.289	0.288	0.297	0.359	0.369	0.368
	C	0.692	0.672	0.685	0.589	0.594	0.601	0.516	0.514	0.516

Tabla VI.I.3. Resultados de los test de migración de formaldehído desde utensilios de cocina, expresados en miligramos de analito por litro de simulante (mg L⁻¹). Se analizaron tres artículos (A, B, C) de cada tipo de utensilio de cocina. Cada una de las exposiciones de cada artículo se analizó por triplicado.

Formaldehído	Exposición 1			Exposición 2			Exposición 3			
	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	
Vaso	A	1.065	1.124	1.132	1.441	1.477	1.483	1.606	1.636	1.644
	B	1.079	1.129	1.143	1.380	1.398	1.384	1.636	1.674	1.695
	C	0.561	0.591	0.606	0.779	0.808	0.819	0.862	0.861	0.854
Taza	A	1.191	1.277	1.333	1.695	1.796	1.869	1.581	1.643	1.693
	B	1.542	1.637	1.699	1.841	1.925	1.986	1.652	1.717	1.764
	C	1.402	1.493	1.564	1.562	1.622	1.678	2.111	2.186	2.240
Cubiertos	A	0.727	0.756	0.769	0.624	0.643	0.652	0.557	0.567	0.563
	B	0.772	0.804	0.823	0.590	0.605	0.610	0.551	0.568	0.576
	C	0.734	0.761	0.781	0.646	0.670	0.682	0.592	0.598	0.590
Tazón	A	1.591	1.689	1.722	2.005	2.082	2.156	1.916	1.969	1.998
	B	1.469	1.545	1.591	2.120	2.198	2.283	2.169	2.245	2.276
	C	1.409	1.482	1.565	1.718	1.771	1.807	1.393	1.438	1.467
Bol	A	4.232	4.381	4.456	3.201	3.289	3.332	3.756	3.852	3.861
	B	1.240	1.300	1.324	1.060	1.100	1.127	1.405	1.420	1.416
	C	2.656	2.780	2.800	3.718	3.821	3.872	2.409	2.460	2.480

Como se puede ver, en ningún caso se superó el SML [9,10]. Para la mayoría de los utensilios de cocina, la concentración encontrada en la tercera exposición fue mayor que en las exposiciones anteriores. En este trabajo, las cantidades de melamina y formaldehído migradas en la tercera exposición [18] siempre estuvieron por debajo de 1.09 mg L^{-1} (tazón) para la melamina y de 3.86 mg L^{-1} (bol) para el formaldehído.

A la vista de los datos recogidos en las Tablas VI.I.2 y VI.I.3, se puede concluir que la máxima cantidad encontrada tanto de melamina como de formaldehído de entre todos los test de migración fue 1.28 y 4.46 mg L^{-1} , respectivamente, en la primera exposición en el bol. Además, se puede observar un cierto grado de variabilidad en la concentración encontrada para los tres artículos del mismo tipo de utensilio de cocina y de la misma exposición. Esto llevó a concluir que el proceso de migración de los analitos desde el material al simulante se ve afectado por la calidad del producto terminado, es decir, que las condiciones del proceso de fabricación hacen que la migración varíe.

Desde un punto de vista inferencial, se analizaron los datos de estas migraciones (expresados en mg L^{-1}) mediante un análisis de la varianza (un ANOVA de 2 factores con interacción) con los datos de las Tablas VI.I.2 y VI.I.3 y con el modelo para dos factores fijos descrito en la Ecuación (VI.I.1).

$$X_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \tau\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{VI.I.1})$$

El primer factor considerado fue "el artículo" (a 3 niveles: A, B, C) y el segundo "la exposición de migración" (a 3 niveles: 1, 2, 3). Los resultados del ANOVA de 2 vías con niveles fijos se detallan en la Tabla VI.I.4 para melamina y en la Tabla VI.I.5 para formaldehído. Las primeras 4 columnas de estas tablas muestran la Media de Cuadrados (MS por sus siglas en inglés), las columnas de 5 a 7 la F calculada en el ANOVA, y las siguientes columnas de 8 a 11 muestran la varianza expresada como porcentaje. Estos resultados muestran que ambos factores y su interacción tienen un efecto estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95% porque el p-valor es menor que 10^{-4} (la hipótesis nula de este test H_0 : No hay efecto de los factores (o de la interacción)).

Se puede ver que el desglose de la varianza total en este ANOVA, expresada como porcentaje, se distribuye de la siguiente manera: el porcentaje más bajo se debe al error residual ($\sigma^2(\varepsilon)$) siendo inferior a 2.2 y 4.6% para la melamina y el formaldehído respectivamente; el segundo, en general, se debe a la interacción ($\sigma^2(\tau\beta)$). Siendo en la mayoría de los casos los porcentajes más elevados los debidos a los factores individuales observándose, para los utensilios de cocina analizados, una gran diferencia en los valores de los porcentajes encontrados para ambos factores ($\sigma^2(\tau)$, $\sigma^2(\beta)$).

Tabla VI.I.4. Para melamina, ANOVA de dos factores (τ : artículo, β : exposición) y su interacción ($\tau\beta$) involucrados en los test de migración (Ecuación (VI.I.1)).

Melamina	MS calculada				F calculada				Varianza estimada (%)			
	MS (τ)	MS (β)	MS ($\tau\beta$)	MS (ε)	F (τ)	F (β)	F ($\tau\beta$)	F ($\tau\beta$)	σ^2 (τ)	σ^2 (β)	σ^2 ($\tau\beta$)	σ^2 (ε)
Vaso	$1.69 \cdot 10^{-1}$	$1.21 \cdot 10^{-1}$	$1.79 \cdot 10^{-2}$	$2.65 \cdot 10^{-4}$	639.31	455.52	67.62	67.62	49.0	34.9	15.4	0.7
Taza	$2.65 \cdot 10^{-1}$	$7.64 \cdot 10^{-2}$	$3.03 \cdot 10^{-2}$	$2.70 \cdot 10^{-4}$	980.71	283.14	112.42	112.42	61.0	17.6	20.8	0.6
Cubiertos	$9.95 \cdot 10^{-3}$	$6.28 \cdot 10^{-2}$	$9.63 \cdot 10^{-3}$	$5.56 \cdot 10^{-5}$	179.08	1129.55	173.40	173.40	9.7	61.6	28.2	0.5
Tazón	$1.94 \cdot 10^{-2}$	$4.09 \cdot 10^{-1}$	$2.59 \cdot 10^{-2}$	$1.23 \cdot 10^{-3}$	15.80	332.66	21.05	21.05	3.6	79.8	14.5	2.2
Bol	$1.04 \cdot 10^{-1}$	$9.47 \cdot 10^{-1}$	$1.66 \cdot 10^{-1}$	$2.82 \cdot 10^{-4}$	369.88	3357.38	589.98	589.98	6.7	61.0	32.1	0.2

Distribución F: $F(\tau) = F(\beta) = F_{0.05,2,18} = 3.55$; $F(\tau\beta) = F_{0.05,4,18} = 2.93$.

Tabla VI.I.5. Para formaldehído, ANOVA de dos factores (τ : artículo, β : exposición) y su interacción ($\tau\beta$) involucrados en los test de migración (Ecuación (VI.I.1)).

Formaldehído	MS calculada				F calculada				Varianza estimada (%)			
	MS (τ)	MS (β)	MS ($\tau\beta$)	MS (ε)	F (τ)	F (β)	F ($\tau\beta$)	F ($\tau\beta$)	σ^2 (τ)	σ^2 (β)	σ^2 ($\tau\beta$)	σ^2 (ε)
Vaso	1.26	$4.63 \cdot 10^{-1}$	$2.06 \cdot 10^{-2}$	$5.94 \cdot 10^{-4}$	2115.03	779.80	34.71	34.71	70.4	25.9	3.4	0.3
Taza	$1.11 \cdot 10^{-1}$	$3.76 \cdot 10^{-1}$	$1.56 \cdot 10^{-1}$	$4.97 \cdot 10^{-3}$	22.40	75.62	31.26	31.26	10.9	38.1	46.4	4.6
Cubiertos	$1.19 \cdot 10^{-3}$	$9.04 \cdot 10^{-2}$	$2.45 \cdot 10^{-3}$	$2.82 \cdot 10^{-4}$	4.21	320.60	8.71	8.71	0.9	90.0	6.5	2.5
Tazón	$4.60 \cdot 10^{-1}$	$4.84 \cdot 10^{-1}$	$1.06 \cdot 10^{-1}$	$3.89 \cdot 10^{-3}$	118.25	124.25	27.16	27.16	35.7	37.6	23.9	2.7
Bol	$1.53 \cdot 10^1$	$1.30 \cdot 10^{-1}$	1.17	$4.17 \cdot 10^{-3}$	3668.23	31.15	281.58	281.58	80.6	0.7	18.5	0.2

Distribución F: $F(\tau) = F(\beta) = F_{0.05,2,18} = 3.55$; $F(\tau\beta) = F_{0.05,4,18} = 2.93$.

Del análisis de varianza se puede deducir que el procedimiento de migración de ambos analitos depende en gran medida de los artículos y de las exposiciones, es decir, que depende del proceso de producción industrial de cada artículo analizado.

VI.I.5.3. Curvas cinéticas de migración

Para construir las curvas cinéticas de migración, se determinó la cantidad de melamina y formaldehído en cada uno de los extractos obtenidos en cada ciclo como se describe en la Sección VI.I.4.3. Los modelos cinéticos de migración se construyeron utilizando la cantidad acumulada de melamina y formaldehído, es decir, sumando la cantidad encontrada en cada una de las migraciones a la de las anteriores (dieciséis ciclos a 70°C durante 30 minutos). Los modelos matemáticos que mejor explican los datos experimentales se ajustaron y se validaron estadísticamente para las curvas cinéticas de migración de cada tipo de utensilio de cocina.

Todos los modelos, incluidos en la Tabla VI.I.6, explican al menos el 99.31% de la variabilidad de la respuesta (miligramo de analito migrado por litro de simulante). El SML para la melamina se superó en la taza, en el tazón y en el bol, siendo 2.68, 2.54 y 3.38 mg L⁻¹ la cantidad acumulada de melamina encontrada en los ciclos once, trece y uno respectivamente. Los valores para el formaldehído estuvieron por debajo del SML en todos los ciclos. Después de dieciséis ciclos, la cantidad máxima encontrada fue 4.67 mg L⁻¹ de melamina (en el caso del bol) y 8.22 mg L⁻¹ de formaldehído (en la taza). La Tabla VI.I.6 muestra los modelos específicos ajustados para cada utensilio y la varianza explicada por ellos. La Figura VI.I.4 (a y b) muestra las curvas cinéticas de migración ajustadas para todos los utensilios analizados, en la Figura VI.I.4a para melamina y en la Figura VI.I.4b para formaldehído. En estas figuras, el vaso está representado en morado, la taza en naranja, los cubiertos en verde, el tazón en amarillo y el bol en azul. En ambos gráficos se puede ver claramente el comportamiento diferente que muestra la migración de melamina para el bol en comparación con el resto de los modelos ajustados.

Además, se realizó una estimación del número de ciclos de migración consecutivos teóricos a los que cada tipo de utensilio de cocina tendría que exponerse para superar el SML (2.5 y 15 mg L⁻¹ para melamina y formaldehído, respectivamente). En la Tabla VI.I.7 se muestran los valores calculados a partir de la predicción de los modelos de la Tabla VI.I.6.

A partir de las predicciones obtenidas de los modelos ajustados, se decidió realizar trece ciclos más, a 70°C durante 30 minutos en la taza y en el bol. El objetivo era verificar si realmente se alcanzaría el límite para el formaldehído en la taza y si los nuevos puntos experimentales se ajustaban a los modelos propuestos en el primer estudio de cinéticas de migración. La cantidad acumulada encontrada después de veintinueve ciclos fue 6.07 y 13.62 mg L⁻¹ de melamina y formaldehído

respectivamente en la taza y 6.07 y 6.83 mg L⁻¹ en el bol. En ambos utensilios, la cantidad acumulada de melamina migrada fue más del doble del SML. Por el contrario, no se alcanzó el SML para el formaldehído.

Por tercera vez, se realizaron varios ciclos más en la taza. Se demostró experimentalmente que con treinta y dos ciclos, se alcanzó una cantidad acumulada de formaldehído migrado desde la taza que superó el SML, 15.30 mg L⁻¹. Además, la cantidad acumulada de melamina encontrada después de cuarenta y tres ciclos fue de 10.39 mg L⁻¹, lo que cuadruplica el SML.

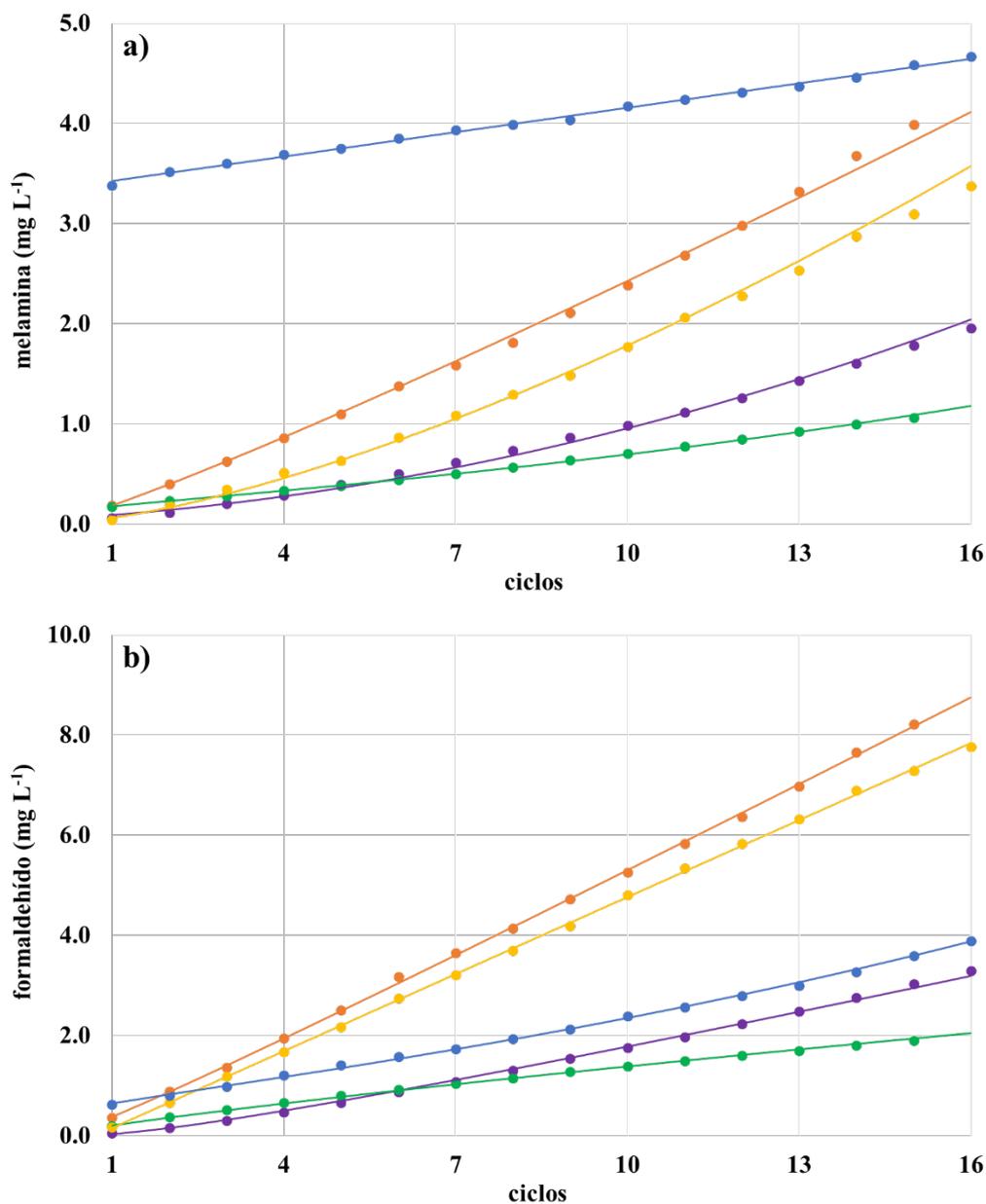


Figura VI.1.4. Curvas cinéticas de migración ajustadas: a) para melamina y b) para formaldehído. El vaso está representado en morado, la taza en naranja, los cubiertos en verde, el tazón en amarillo y el bol en azul.

Tabla VI.I.6. Curvas cinéticas de migración para cada utensilio de cocina utilizado: modelos de regresión y varianza explicada (R²).

	Melamina		Formaldehído	
	Modelo	R ² (%)	Modelo	R ² (%)
Vaso	$Y = (0.225 + 0.075x)^2$	99.42	$Y = (-0.374 + 0.540x^{0.5})^2$	99.79
Taza	$Y = \exp(-1.700 + 1.123 \ln x)$	99.93	$Y = (-0.173 + 0.783x^{0.5})^2$	99.96
Cubiertos	$Y = \exp(-2.359 + 0.631x^{0.5})$	99.96	$Y = \exp(-1.602 + 0.836 \ln x)$	99.88
Tazón	$Y = \exp(-2.831 + 1.481 \ln x)$	99.31	$Y = -0.362 + 0.512x$	99.97
Bol	$Y = 3.343 + 0.081x$	99.64	$Y = \exp(-1.041 + 0.599x^{0.5})$	99.85

Tabla VI.I.7. Número de migraciones o ciclos consecutivos (70°C durante 30 minutos), predichos a partir de modelos de ajuste de las curvas cinéticas de migración (de la Tabla VI.I.6), tras los que se habría alcanzado SML.

	Melamina (2.5 mg L ⁻¹)		Formaldehído (15 mg L ⁻¹)	
	valor de x	ciclos	valor de x	ciclos
Vaso	18.02	19	61.87	62
Taza	10.27	11	26.72	27
Cubiertos	26.94	27	173.26	174
Tazón	12.57	13	29.98	30
Bol	*	1	39.16	40

* El SML para la melamina migrada desde el bol se alcanzó en el primer ciclo.

Para realizar los análisis cromatográficos en una sola sesión y evitar cambios inherentes al sistema cromatográfico, se construyó además una curva cinética de migración completa utilizando los valores experimentales obtenidos en una taza nueva después de veintiún ciclos a 70°C cada 1 hora. Los nuevos modelos matemáticos para la melamina ($Y = (0.595 + 0.116x)^2$ con $R^2 = 99.82\%$) y para el formaldehído ($Y = (-0.257 + 0.856x^{0.5})^2$ con $R^2 = 99.98\%$) fueron ajustados y validados estadísticamente. La representación de estas curvas se muestra en la Figura VI.I.5.

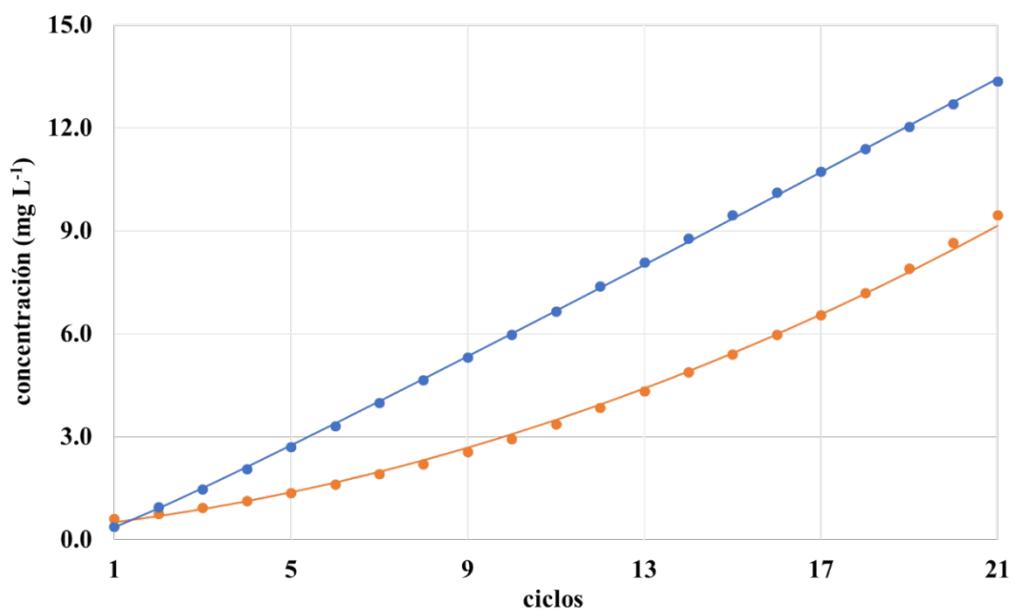


Figura VI.I.5. Curvas cinéticas de migración ajustadas para 21 migraciones consecutivas a 70°C durante 1 hora. La melamina está representada en naranja y el formaldehído en azul.

Aunque los ciclos de migración realizados sobre la nueva taza fueron de 1 hora, en lugar de 30 minutos como en el estudio anterior, la cantidad acumulada de formaldehído después de veintiún ciclos alcanzó 13.36 mg L⁻¹, por debajo del SML. Este resultado resalta nuevamente lo que se observó en la Sección VII.5.2, que los objetos del mismo tipo de utensilio de cocina elaborados por el mismo fabricante muestran diferentes comportamientos o tendencias de migración, casi seguramente debido al proceso de fabricación de cada artículo.

La cantidad acumulada de melamina migrada desde la taza es casi cuatro veces el SML, 9.46 mg L⁻¹. Esta cantidad se encontró después de veintiún ciclos (70°C durante 1 hora) y este resultado es comparable con el obtenido en el estudio anterior (se encontraron 10.39 mg L⁻¹ de melamina después de cuarenta y tres ciclos a 70°C cada 30 minutos). Por lo tanto, cantidades similares de melamina migraron cuando el número de ciclos consecutivos fue la mitad, pero el tiempo de exposición fue el doble.

VI.I.6. Conclusiones

Se ha desarrollado un método rápido para la determinación de melamina y formaldehído mediante HPLC-DAD y se ha llevado a cabo la identificación inequívoca de ambos analitos a través de sus espectros de absorción.

La cantidad de melamina y formaldehído, cuando se usa cualquiera de los utensilios de cocina analizados, no ha excedido el límite de migración específica (SML) para ambos analitos después de tres exposiciones a 70°C durante 2 horas.

Sin embargo, las curvas cinéticas de migración construidas para los diferentes utensilios de cocina y para ambos analitos muestran que la cantidad acumulada de melamina y formaldehído alcanzó los límites de migración específica, incluso cuando el número de ciclos realizados no era alto. Por esta razón, parece razonable aconsejar que los utensilios de melamina-formaldehído, más comúnmente utilizados por niños, deben usarse con precaución teniendo en cuenta las propiedades carcinogénicas del formaldehído. La cantidad de melamina encontrada en este trabajo no fue relevante ya que, según estudios de la EFSA, no se espera que la melamina y sus sales sean acumulativas.

Además, el análisis de varianza ha demostrado que el proceso de migración de los analitos desde el material al simulante está relacionado con los artículos y las exposiciones, y por lo tanto con el proceso de fabricación de cada artículo, que obviamente depende en gran medida del lote de producción.

Los resultados obtenidos en este trabajo están restringidos al análisis realizado en cinco tipos de utensilios elaborados con melamina que han sido producidos por el mismo fabricante. Por lo tanto, las conclusiones obtenidas a partir de este trabajo, no pueden generalizarse a todos los utensilios de resina de melamina-formaldehído disponibles en el mercado.

VI.1.7. Referencias

- [1] M. Qu, J. Lu, R. He, Formaldehyde from environment, in: R. He (Ed.), *Formaldehyde and cognition*, Springer, Dordrecht, 2017, pp. 1-19. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1177-5_1
- [2] International Agency for Research on Cancer (IARC), Formaldehyde. Summary of data reported and evaluation, in: IARC (Ed.), *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Wood dust and formaldehyde*, volume 62, IARC, Lyon, 1995, pp. 332-336. Available at <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Wood-Dust-And-Formaldehyde-1995>
- [3] International Agency for Research on Cancer (IARC), Formaldehyde. Summary of data reported and evaluation, in: IARC (Ed.), *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol*, volume 88, IARC, Lyon, 2006, pp. 273-280. Available at <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Formaldehyde-2-Butoxyethanol-And-1--Em-Tert-Em--Butoxypropan-2-ol-2006>
- [4] International Agency for Research on Cancer (IARC), Formaldehyde. Evaluation, in: IARC (Ed.), *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens*, volume 100 F, IARC, Lyon, 2012, pp. 430. Available at <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Chemical-Agents-And-Related-Occupations-2012>
- [5] European Food Safety Authority (EFSA), Scientific opinion on melamine in food and feed, *EFSA Journal* 8 (2010) 1573. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1573>
- [6] Y.C. Tyan, M.H. Yang, S.B. Jong, C.K. Wang, J. Shiea, Melamine contamination, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (2009) 729-735. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3009-0>
- [7] Y.F. Hsu, K.T. Chen, Y.W. Liu, S.H. Hsieh, H.Y. Huang, Determination of melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid by micellar electrokinetic chromatography, *Analytica Chimica Acta* 673 (2010) 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.032>
- [8] V. García Ibarra, A. Rodríguez Bernaldo de Quirós, R. Sendón, Study of

- melamine and formaldehyde migration from melamine tableware, *European Food Research and Technology* 242 (2016) 1187-1199. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2623-7>
- [9] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 12/1, 2011.
- [10] Commission Regulation (EU) No 1282/2011 of 28 November 2011 amending and correcting Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 328/22, 2011.
- [11] N. Poovarodom, K. Junsrisuriyawong, R. Sangmahamad, P. Tangmongkollert, Effects of microwave heating on the migration of substances from melamine formaldehyde tableware, *Food Additives and Contaminants* 31 (2014) 1616-1624. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.947638>
- [12] V. Mannoni, G. Padula, O. Panico, A. Maggio, C. Arena, M.R. Milana, Migration of formaldehyde and melamine from melaware and other amino resin tableware in real life service, *Food Additives and Contaminants* 34 (2017) 113-125. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1252467>
- [13] K.H. Lund, J.H. Petersen, Migration of formaldehyde and melamine monomers from kitchen- and tableware made of melamine plastic, *Food Additives and Contaminants* 23 (2006) 948-955. <https://doi.org/10.1080/02652030500415660>
- [14] E.L.J. Potter, E.L. Bradley, C.R. Davies, K.A. Barnes, L. Castle, Migration of formaldehyde from melamine-ware: UK 2008 survey results, *Food Additives and Contaminants* 27 (2010) 879-883. <https://doi.org/10.1080/19440041003636638>
- [15] R.E. Martin, C.B. Hizo, A.M. Ong, O.M. Alba, H. Ishiwata, Release of formaldehyde and melamine from melamine tableware manufactured in the Philippines, *Journal of Food Protection* 55 (1992) 632-635. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.8.632>
- [16] E.L. Bradley, V. Boughtflower, T.L. Smith, D.R. Speck, L. Castle, Survey of the migration of melamine and formaldehyde from melamine food contact articles available on the UK market, *Food Additives and Contaminants* 22 (2005) 597-606. <https://doi.org/10.1080/02652030500135243>
- [17] CEN/TS 13130-27, Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics substances subject to limitation. Part 27: Determination of 2,4,6-triamino-

- 1,3,5-triazine in food simulants, European Committee for Standardization, 2005.
- [18] EUR 24815 EN, JRC 64903, Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware, European Commission, 2011. <https://doi.org/10.2788/19565>
- [19] F. Villanueva, A. Tapia, A. Notario, J. Albaladejo, E. Martínez, Ambient levels and temporal trends of VOCs, including carbonyl compounds, and ozone at Cabañeros National Park border, Spain, *Atmospheric Environment* 85 (2014) 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.12.015>
- [20] A. Levart, M. Veber, Determination of aldehydes and ketones in air samples using cryotrapping sampling, *Chemosphere* 44 (2001) 701-708. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00369-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00369-6)
- [21] D. Custódio, C.S. Guimarães, L. Varandas, G. Arbilla, Pattern of volatile aldehydes and aromatic hydrocarbons in the largest urban rainforest in the Americas, *Chemosphere* 79 (2010) 1064-1069. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.028>
- [22] M.C. Prieto-Blanco, M.P. Iglesias, P. López-Mahía, S.M. Lorenzo, D.P. Rodríguez, Simultaneous determination of carbonyl compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter by liquid chromatography–diode array detection–fluorescence detection, *Talanta* 80 (2010) 2083-2092. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.009>
- [23] R.J. Elias, V.F. Laurie, S.E. Ebeler, J.W. Wong, A.L. Waterhouse, Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection, *Analytica Chimica Acta* 626 (2008) 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.07.048>
- [24] L. Kosmider, A. Sobczak, M. Fik, J. Knysak, M. Zaciera, J. Kurek, M.L. Goniewicz, Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: Effects of nicotine solvent and battery output voltage, *Nicotine & Tobacco Research* 16 (2014) 1319-1326. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntu078>
- [25] T.L. Wang, H.W. Tong, X.Y. Yan, L.Q. Sheng, J. Yang, S.M. Liu, Determination of volatile carbonyl compounds in cigarette smoke by LC-DAD, *Chromatographia* 62 (2005) 631-636. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0675-8>
- [26] E.N. Oiyee, M.F.M. Ribeiro, L.L. Okumura, A.A. Saczk, P. Ciancaglini, M.F. de Oliveira, Forensic investigation of formaldehyde in illicit products for hair

- treatment by DAD-HPLC: A case study, *Journal of Forensic Sciences* 61 (2016) 1122-1125. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13068>
- [27] P.W. Wu, C.C. Chang, S.S. Chou, Determination of formaldehyde in cosmetics by HPLC method and acetylacetone method, *Journal of Food and Drug Analysis* 11 (2003) 8-15. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2728>
- [28] A. Soman, Y. Qiu, L.Q. Chan, HPLC-UV method development and validation for the determination of low level formaldehyde in a drug substance, *Journal of Chromatographic Science* 46 (2008) 461-465. <https://doi.org/10.1093/chromsci/46.6.461>
- [29] X.H.H. Huang, H.S.S. Ip, J.Z. Yu, Determination of trace amounts of formaldehyde in acetone, *Analytica Chimica Acta* 604 (2007) 134-138. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.011>
- [30] A.N.M. Nguyet, L. Tallieu, J. Plaizier-Vercammen, D.L. Massart, Y.V. Heyden, Validation of an HPLC method on short columns to assay ketoconazole and formaldehyde in shampoo, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32 (2003) 1-19. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00640-4](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00640-4)
- [31] G. Burini, R. Coli, Determination of formaldehyde in spirits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection after derivatization, *Analytica Chimica Acta* 511 (2004) 155-158. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.025>
- [32] W. Luo, H. Li, Y. Zhang, C.Y.W. Ang, Determination of formaldehyde in blood plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B* 753 (2001) 253-257. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00552-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00552-1)
- [33] A.A. Mohamed, A.T. Mubarak, Z.M.H. Marestani, K.F. Fawy, Highly sensitive and selective catalytic determination of formaldehyde and acetaldehyde, *Talanta* 74 (2008) 578-585. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.06.020>
- [34] C. Ekinçi Dogan, R. Sancı, Formaldehyde migration in aqueous extracts from paper and cardboard food packaging materials in Turkey, *Food Additives and Contaminants* 8 (2015) 221-226. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1057872>
- [35] Y. Shen, W.F. Wang, Y.Y. Wu, A method for identification of exogenous formaldehyde in Bombay duck (*Harpodon nehereus*), *Food Analytical Methods* 8 (2015) 2474-2481. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0138-2>

- [36] G. Li, L. Han, Determination of formaldehyde in aquatic products by a sensitive catalytic fluorescence method, *Analytical Methods* 6 (2014) 426-432. <https://doi.org/10.1039/C3AY41478G>
- [37] X.Q. Zhao, Z.Q. Zhang, Microwave-assisted on-line derivatization for sensitive flow injection fluorometric determination of formaldehyde in some foods, *Talanta* 80 (2009) 242-245. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.066>
- [38] S.P. Aubourg, Detección de fluorescencia en sistemas modelo conteniendo aldehidos: Relación con la alteración de pescado, *Grasas y Aceites* 49 (1998) 419-424. <https://doi.org/10.3989/gya.1998.v49.i5-6.752>
- [39] Y.S. Wang, X. Tan, J.H. Xue, G.R. Li, L.F. Shi, H.M. Yang, L. Liu, B. Zhou, X.L. Xiao, Determination of trace formaldehyde in blood plasma by resonance fluorescence technology, *Analytica Chimica Acta* 690 (2011) 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.030>
- [40] EUR 27529 EN, JRC 98028, Practical guidelines on the application of migration modelling for the estimation of specific migration, European Commission, 2015. <https://doi.org/10.2788/04517>
- [41] L. Sarabia, M.C. Ortiz, DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85052-6](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85052-6)
- [42] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, I. García, D. Giménez, E. Meléndez, Capability of detection and three-way data, *Analytica Chimica Acta* 559 (2006) 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.069>
- [43] S. Sanllorente, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, Migration kinetics of primary aromatic amines from polyamide kitchenware: Easy and fast screening procedure using fluorescence, *Talanta* 160 (2016) 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.060>
- [44] STATGRAPHICS Centurion XVII Version 17.2.02 (64 bit), Statpoint Technologies, Inc., VA, USA, 2016.
- [45] ISO 11843, Capability of detection, Part 1: Terms and definitions and Part 2: methodology in the linear calibration case, International Organization for Standardization, 2000.
- [46] Commission Decision (EC) No 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities* L 221/8, 2002.

VI.II. Descomposición PARAFAC, con datos de tres vías cromatográficas, para la identificación inequívoca y cuantificación de compuestos en un marco regulado

VI.II.1. Resumen*

Es incuestionable que cada día la sociedad demanda un mayor control en el análisis de alimentos, productos de cuidado personal, medicamentos, muestras medioambientales, etc., así como información clara y comprensible sobre la toxicidad de los compuestos químicos. Esto provoca una necesidad creciente de proponer métodos de análisis que permitan la cuantificación e identificación inequívoca de analitos en muestras complejas.

Varias organizaciones oficiales que regulan estos aspectos en compuestos como pesticidas, migrantes o aditivos, han aumentado los requisitos sobre las figuras de mérito, entre otros, el relativo a la identificación inequívoca de los analitos de interés. La recomendación general es el uso de la información proporcionada por técnicas cromatográficas sobre la muestra objeto de análisis, por ejemplo, el uso de datos de HPLC-DAD o GC-MS. En este caso, para cada muestra, se dispone de una matriz de datos formada por el vector respuesta (absorbancias o abundancias) registrado en cada tiempo de retención. Cuando las matrices correspondientes a los patrones de calibración y a las muestras problema se concatenan se obtiene un tensor de datos.

Existen varias técnicas quimiométricas con la "ventaja de segundo orden" como es el caso de PARAFAC, que pueden manejar tensores de datos. Utilizando estas técnicas pueden ser identificados y cuantificados los analitos de interés incluso en presencia de interferentes. Si el tensor de datos es trilineal, el análisis de los datos utilizando PARAFAC/PARAFAC2 permite la identificación inequívoca y la cuantificación del analito de interés de manera que el resultado es válido de acuerdo con los criterios impuestos por las autoridades competentes.

En el artículo publicado, antes mencionado, la metodología quimiométrica se explica a través de cuatro casos de estudio diferentes relacionados todos ellos con la determinación de analitos en matrices complejas (bisfenol A migrado desde policarbonato, diclobenil en cebolla, oxibenzona en cremas cosméticas de protección solar y melamina migrada desde utensilios de cocina "melaware"). Esta metodología multivía resuelve problemas de coelución de interferentes que tienen un espectro de absorción similar en HPLC-DAD (o comparten relaciones m/z en GC-MS) con el

* Este epígrafe ha sido publicado en: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 200 (2020) 104003.

analito de interés o con el estándar interno, proporcionando resultados que llevan a dar falsos negativos con métodos de identificación convencionales. Además, la descomposición PARAFAC de los tensores trilineales permite optimizar de forma conjunta varios parámetros analíticos (extracción, limpieza, etc.) que controlan diferentes pretratamientos realizados a las muestras antes de la determinación cromatográfica de muestras complejas sin necesidad de hacer un calibrado experimental en cada condición del diseño para obtener el valor de la respuesta.

VI.II.2. Introducción

El objetivo del trabajo fue mostrar la utilidad de las técnicas de n-vías cuando existen requisitos legales que deben cumplirse en las características de rendimiento de los métodos analíticos, como en el caso de los métodos para determinar residuos de sustancias veterinarias, pesticidas o algunos monómeros y aditivos que migran a los alimentos. Estas características están definidas en diferentes reglamentos: Documentos guía sobre control de la calidad analítica y procedimientos de validación de métodos para residuos de plaguicidas y análisis en alimentos y piensos SANTE/11813/2017 [1] (que actualiza el contenido de SANCO/12495/2011 [2] para plaguicidas), Decisión 2002/657/CE para residuos de medicamentos veterinarios [3] y EUR 27529 para test de migración [4], entre otros.

Existen varias técnicas quimiométricas con la "ventaja de segundo orden" que pueden manejar tensores de datos, esto permite que los analitos de interés puedan ser identificados y cuantificados incluso en presencia de interferentes que no están incluidos en los patrones de calibración [5], por ello, en este trabajo se ha considerado PARAFAC como una buena opción. Se pueden encontrar aplicaciones de PARAFAC y PARAFAC2 en análisis cromatográfico (en particular, GC-MS y HPLC-DAD) en contextos regulados en las Ref. [6-8] para pesticidas y en la determinación de monómeros y aditivos que migran a los alimentos en las Ref. [9,10]. En todos estos casos, las características de los análisis están reguladas.

La utilidad de las técnicas de tres vías también se muestra con otras técnicas cromatográficas, por ejemplo, en la determinación de residuos veterinarios con HPLC-DAD [11] o fungicidas con LC-MS/MS [12]. Además, la Ref. [13] muestra el uso de estas técnicas para el análisis "no dirigido" (no target), es decir, de sustancias que no se sabe si estarán presentes en la muestra.

El trabajo desarrolla cuatro casos de estudio [14] con aspectos relevantes que requieren cumplir con la legislación vigente, debido a la naturaleza de las sustancias analizadas (pesticidas y migrantes en alimentos, aditivos cosméticos, etc.). En estos casos, la utilidad de las técnicas de n-vías (PARAFAC o PARAFAC2) se hace evidente. En el trabajo también se ha incluido una comparativa entre los resultados obtenidos con métodos convencionales frente a los de PARAFAC o PARAFAC2.

Aunque los procedimientos analíticos se centran en dos técnicas cromatográficas (GC-MS y HPLC-DAD), el modo de operación que se muestra es mucho más amplio y se puede utilizar con datos obtenidos mediante cualquier detector multivariante en tándem con la cromatografía. La novedad más importante es el uso de la "propiedad de unicidad" para identificar inequívocamente y cuantificar los analitos al mismo tiempo, utilizando para ello los factores obtenidos de las descomposiciones PARAFAC.

La "propiedad de unicidad" se conoce como "ventaja de segundo orden" [15] en análisis químico. Para poder aplicarla es necesario disponer de un tensor (o cubo) de datos. Se construye el tensor de datos trilineales con las 'K' matrices correspondientes a las 'K - h' muestras de concentración conocida del analito de interés (patrones de calibración) junto con las 'h' matrices de las muestras problema. La "propiedad de unicidad" significa que, si uno de los factores corresponde al analito, entonces la concentración e identificación inequívoca de este analito se puede calcular en la muestra problema incluso en presencia de interferentes que no estaban en las muestras de calibrado. Esta propiedad garantiza que solo hay un perfil de muestra vinculado al analito de interés, independientemente de los factores restantes.

VI.II.3. Software y experimental

VI.II.3.1. Software

Para las medidas registradas con un cromatógrafo HPLC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EEUU) se utilizó el software OpenLab CDS ChemStation.

Las descomposiciones PARAFAC y PARAFAC2 se realizaron con PLS_Toolbox [16] y MATLAB [17]. Los modelos de regresión, las rectas de exactitud y los modelos cinéticos se ajustaron y validaron utilizando STATGRAPHICS Centurion XVII [18]. El límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) se calcularon utilizando el programa DETARCHI [19,20].

VI.II.3.2. Instrumental y detalles experimentales

En lo que sigue en este epígrafe de la memoria sólo se reporta la parte correspondiente al Caso IV (HPLC-DAD) del artículo completo referenciado al comienzo.

VI.II.3.2.1. Caso IV (HPLC-DAD)

Para cuantificar la melamina, se empleó un cromatógrafo HPLC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EEUU). Este HPLC estaba compuesto por una bomba cuaternaria (G1311C), un inyector (G1329B), un compartimento termostatzado de columna (G1316A) y un detector de diodos en serie (G7117C). La columna elegida para la

separación fue una columna Kinetex EVO-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). Se utilizaron acetonitrilo y agua desionizada como disolventes para la fase móvil. Las condiciones para el análisis cromatográfico de melamina fueron un volumen de inyección de 20 μL, la temperatura del compartimento de la columna se fijó a 20°C y la fase móvil se programó en modo isocrático (acetonitrilo:agua, 15:85, v/v) con una velocidad de flujo de 0.6 mL min⁻¹. Los espectros de absorción se registraron entre 200 y 500 nm, cada 2 nm.

Otros detalles sobre los analitos, el procedimiento experimental para obtener los extractos de los utensilios de cocina de melamina, los test de migración y el procedimiento para construir el modelo cinético de migración pueden verse en el Epígrafe VI.I de esta memoria, y en su publicación [21], aunque no se utilizaron técnicas de tres vías en esta última referencia.

VI.II.4. Teoría

VI.II.4.1. Modelos PARAFAC/PARAFAC2

Un modelo PARAFAC de rango F para el tensor $\underline{\mathbf{X}} = (x_{ijk})$ se escribe como [22,23]:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}, \quad i=1, 2, \dots, I; \quad j=1, 2, \dots, J; \quad k=1, 2, \dots, K; \quad (\text{VI.II.1})$$

dónde e_{ijk} son los residuos del modelo ajustado. PARAFAC es un modelo trilineal, como se puede ver en la Ecuación (VI.II.1), ya que es lineal en cada uno de los tres perfiles.

En general, un tensor de datos de tres vías $\underline{\mathbf{X}} (I \times J \times K)$ está compuesto de números reales, x_{ijk} , $i = 1, \dots, I$; $j = 1, \dots, J$; $k = 1, \dots, K$. En el caso de los datos de HPLC-DAD, cada valor x_{ijk} sería la absorbancia registrada en el k-ésimo tiempo de elución, para la j-ésima longitud de onda de la i-ésima muestra. En la práctica, cada perfil (vía o modo) del tensor se identifica por su significado, por ejemplo, perfiles cromatográficos, espectrales o muestrales para datos de HPLC-DAD. El orden de los perfiles no está predeterminado, y el investigador puede decidir cambiarlo.

Los datos cromatográficos son trilineales si el tensor de datos experimentales es compatible con la estructura de la Ecuación (VI.II.1). El diagnóstico de consistencia del núcleo (CORCONDIA) [24] mide el grado de trilinealidad del tensor experimental de tres vías cuando $F \geq 2$. Si el tensor de tres vías es trilineal, entonces se alcanza el valor máximo para este índice, CORCONDIA igual a 100. La solución de mínimos cuadrados de PARAFAC es única cuando el tensor de tres vías es trilineal y se ha elegido el número apropiado de factores para ajustar el modelo PARAFAC [25].

La "propiedad de unicidad" puede ser utilizada para identificar compuestos inequívocamente mediante sus perfiles cromatográficos y espectrales según lo establecido en algunos reglamentos y directrices oficiales, incluso en presencia de un coeluyente que absorba en el mismo rango espectral que el analito de interés.

PARAFAC2 se utiliza para corregir las desviaciones de la trilinealidad cuando aparecen pequeños desplazamientos en el tiempo de retención en el cromatograma entre muestra y muestra [26,27]. En este caso, PARAFAC2 aplica los mismos perfiles (\mathbf{b}_f , $f = 1, \dots, F$) a lo largo del modo espectral y permite que el modo cromatográfico varíe de una matriz a otra. Entonces, la Ecuación (VI.II.1) debe modificarse como se muestra en la Ecuación (VI.II.2) para describir un modelo PARAFAC2:

$$\underline{\mathbf{X}} = (\mathbf{x}_{ijk}) = \left(\sum_{f=1}^F a_{if}^k \mathbf{b}_{jf} \mathbf{c}_{kf} + e_{ijk} \right), \quad (\text{VII.II.2})$$

$i=1, 2, \dots, I; \quad j=1, 2, \dots, J; \quad k=1, 2, \dots, K;$

dónde se añade el superíndice k para tener en cuenta la dependencia del perfil cromatográfico de la k -ésima muestra. Por lo tanto, para los modelos PARAFAC2, el perfil muestral, en esta ecuación, es el tercer modo, mientras que el perfil cromatográfico pasa a ser el primero.

Los cromatogramas no se pueden alinear con técnicas como las empleadas en los estudios de las Ref. [28,29], ya que los cambios en el tiempo de retención de los analitos deben evaluarse obligatoriamente para garantizar que los tiempos de retención se encuentren dentro de los intervalos de tolerancia establecidos en las reglamentaciones. Si el cromatograma no cumple con ese requisito, entonces la identificación inequívoca del analito no es posible.

VI.II.4.2. Varias regulaciones obligatorias relacionadas con la identificación inequívoca

A pesar de que en esta memoria solo se ha trabajado con cromatografía de líquidos, en este apartado se mencionan varias regulaciones internacionales que generalmente hacen referencia a técnicas cromatográficas acopladas con espectrometría de masas, pero siempre insistiendo en la identificación inequívoca de los analitos. Además, este Epígrafe VI.II, como se ha mencionado al comienzo, es parte del artículo multiautor en el que tres de los cuatro casos desarrollados empleaban GC-MS como técnica de análisis.

La Agencia Mundial Antidopaje (WADA) en la Ref. [30] estableció los criterios mínimos para la confirmación con cromatografía-espectrometría de masas de la identidad de los analitos con fines de control de dopaje. Se afirma que: "La capacidad de un método para identificar un analito es función del procedimiento completo (preparación de muestra, separación cromatográfica, análisis de masas y evaluación de datos). Cualquier descripción del método para fines de documentación debe incluir todas las partes del método. Las características analíticas apropiadas deben documentarse para todo el método de identificación y debe demostrarse que son suficientemente adecuadas para el propósito mediante la validación adecuada del método". Esto guía al cromatografista en el establecimiento de algunos criterios mínimos para la confirmación de la identidad de los analitos con fines del control de dopaje cuando se usa GC-MS antes de informar sobre un resultado positivo/negativo del análisis.

Sin embargo, este no es el único documento que guía al analista sobre cómo los analitos de interés (residuos tóxicos de medicamentos veterinarios, pesticidas o migrantes) deben ser identificados de manera inequívoca. En general, todas estas guías consideran dos técnicas distintas independientes para la identificación inequívoca.

En 2002, se publicó la Decisión 2002/657/CE [3] sobre el funcionamiento de métodos analíticos y la interpretación de los resultados para residuos veterinarios en alimentos y piensos. Este es uno de los primeros documentos que especifica las tolerancias para el tiempo de retención y para los iones diagnóstico, m/z , que deben cumplirse para considerar que el análisis es válido desde el punto de vista de la identificación del analito cuando se utiliza GC-MS.

Además, el documento SANTE/11813/2017 [1] (implementado en 2018), que reemplaza a SANTE/11945/2015 y a documentos anteriores llamados SANCO [2], muestra cómo realizar la validación del método y los procedimientos de control de calidad para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos y piensos.

Las guías mencionadas sugieren el uso de técnicas cromatográficas (GC o LC) acopladas a detectores multivariantes (generalmente: MS^1 , MS^n) para la identificación inequívoca. El número de iones diagnóstico (m/z) considerados para la identificación depende de la técnica de MS utilizada y del tipo de analito (prohibido o con un límite permitido). En el caso de MS^1 , se necesita 1 punto de identificación (IP) por cada m/z de ion diagnóstico, mientras que si la detección es MS^n se necesita 1 IP por cada ion precursor y 1.5 IP por cada ion producto. Además, el tiempo de retención relativo (RRT) del analito en la muestra en comparación con el de una muestra de referencia no debe diferir más de $\pm 0.5\%$ en GC (o $\pm 2.5\%$ en LC). Adicionalmente, cuando se usa MS^1 de una sola etapa, se deben adquirir cuatro o tres iones diagnóstico dependiendo de si el analito está prohibido o tiene un límite permitido, respectivamente.

Si se usa GC-MS (fragmentación en modo SIM), se recomienda que los iones seleccionados sean los iones moleculares y aductos característicos, iones fragmentados característicos y todos sus iones isotópicos. Estos iones no deberían provenir exclusivamente de la misma parte de la molécula. Además, se deben controlar las tolerancias máximas permitidas para la abundancia relativa de ion de los iones diagnóstico (m/z). Las tolerancias permitidas se basan en la abundancia relativa de los iones diagnóstico escritos como porcentaje del pico base [1,3]. Hay tablas para controlar esta tolerancia basada en el porcentaje de esta relación, que pueden ser ligeramente diferentes de una regulación a otra.

La Figura VI.II.1 muestra un esquema de las etapas a realizar para la identificación inequívoca de los analitos presentes en una muestra problema; contiene la tabla de tolerancias de la Ref. [2] y un diagrama de cómo proceder en el hipotético caso de un pesticida en el que se han seleccionado 3 iones diagnóstico, denominados $m/z = 201$ (pico base o el que tiene la mayor abundancia), $m/z = 68$ y $m/z = 158$. Los pasos a seguir para controlar las tolerancias serán: i) registrar el espectro de una muestra de referencia en los m/z iones elegidos; ii) construir los intervalos de tolerancia de acuerdo con la tabla allí referenciada para las abundancias relativas de cada m/z ion con respecto al pico base, utilizando las muestras de referencia; iii) adquirir las abundancias para los mismos m/z iones para la muestra problema y calcular las intensidades relativas (I_R , en %); iv) verificar si la I_R de cada relación m/z está dentro del intervalo de tolerancia construido con la muestra de referencia en el paso anterior.

Como se puede ver en la Figura VI.II.1, $m/z = 201$ es el pico base, por lo que la intensidad del resto de los iones ($m/z = 68$ y $m/z = 158$) se divide por la intensidad del pico base. Los valores de I_R obtenidos fueron 30.13% y 22.08%, respectivamente. La tabla muestra que la tolerancia permitida para esos I_R es ± 15 . Los intervalos de tolerancia también se representan en la Figura VI.II.1 y solo el $m/z 68$ está dentro del intervalo de tolerancia en el caso de la muestra problema. Por lo tanto, no se puede concluir que la muestra problema contenga el pesticida ya que la I_R de $m/z 158$ no está dentro del intervalo de tolerancia correspondiente. Cuando la muestra problema es una matriz compleja o un extracto, entonces uno o más interferentes pueden coeluir con el analito de interés e incluso compartir alguna relación m/z con los iones diagnóstico elegidos. Esto conducirá a un resultado de falso negativo. Sin embargo, el resultado de falso negativo se habría evitado aplicando una técnica quimiométrica con la "ventaja de segundo orden" como PARAFAC o PARAFAC2 a los mismos datos experimentales, ya que nos hubiera permitido distinguir que un determinado m/z puede también proceder de otro analito.

Es importante reseñar que la identificación inequívoca y la "ventaja de segundo orden" también son útiles en el análisis químico. Los métodos cromatográficos actuales previo a la propia medida instrumental presentan muchas etapas: la preparación de muestra (extracción, limpieza, derivatización), el tipo de inyección (PTV, etc.) y otras

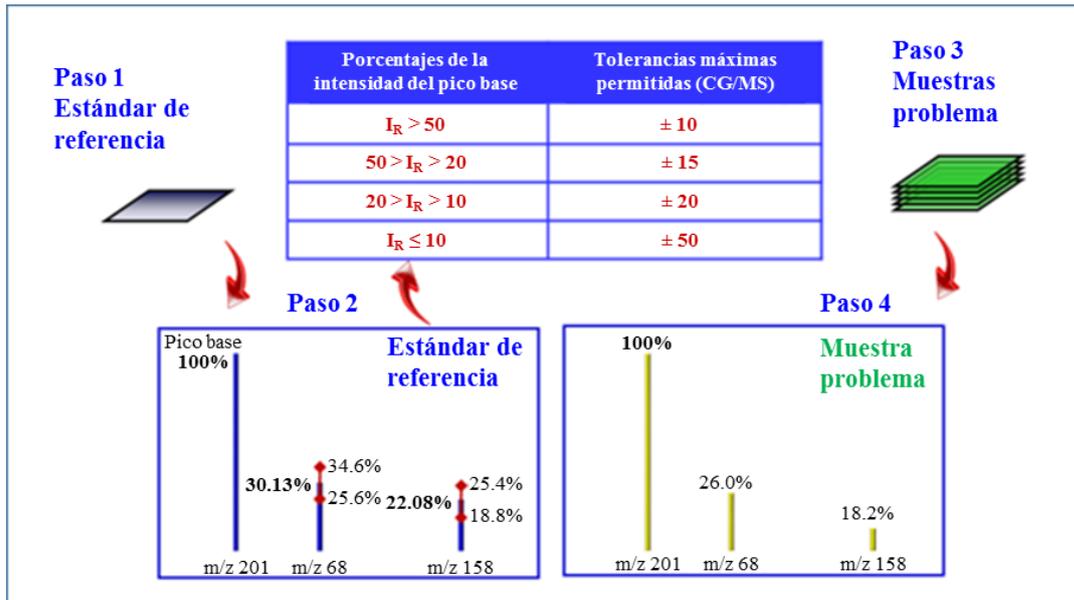


Figura VI.II.1. Esquema de la identificación inequívoca de un analito en una muestra problema.

propias de la técnica cromatográfica (temperatura de inyección, rampas de calentamiento, flujo, composición de la fase móvil en HPLC, etc.). Cuando se optimiza un nuevo método cromatográfico, la consideración conjunta de todos estos parámetros experimentales es prácticamente imposible. Además, su efecto no se puede observar individualmente ya que puede haber interacciones entre sí. En consecuencia, se necesitan modelos de calibración en cada combinación de factores (diferentes condiciones del análisis en un diseño de experimentos, por ejemplo) para evaluar el efecto de estos factores porque también se debe cuantificar la cantidad de analito en cada combinación de ellos. Por lo tanto, si se van a analizar 'K' diferentes combinaciones de los factores, se deben realizar 'K' calibraciones. Suponiendo que cada calibración consiste en 'c' inyecciones cromatográficas, entonces se deben hacer 'K × c' inyecciones, por lo que el esfuerzo experimental se multiplica por el número de patrones. Sin embargo, si se construye un tensor de tres vías con los mismos datos experimentales ('K' matrices), solo se necesitan 'c' matrices adicionales ('K + c' en total) para identificar y cuantificar el analito de interés y el efecto de los factores experimentales sobre el resultado del análisis. Este problema se resuelve utilizando una técnica quimiométrica como PARAFAC o PARAFAC2 [8].

VI.II.4.3. Identificación inequívoca y cuantificación a través de PARAFAC/PARAFAC2

En la Ref. [25], se muestra la similitud entre el modelo PARAFAC y el modelo físico subyacente a los datos adquiridos mediante GC-MS (o HPLC-DAD). En ambos casos,

los datos experimentales se organizan en un tensor de tres vías, $\underline{\mathbf{X}}$, de dimensión $I \times J \times K$. En este trabajo, se utiliza una matriz de datos que considera los tiempos de elución alrededor del tiempo de retención de cada analito de interés. En GC-MS, para cada una de las K muestras analizadas, la abundancia de J iones característicos se registra a I tiempos de elución alrededor del tiempo de retención de cada analito, por lo que se obtiene un espectro de masas en cada tiempo de elución. Si la adquisición de datos se realiza mediante HPLC-DAD, solo cambia el significado del índice J , siendo la absorbancia registrada a cada J longitud de onda. El resto de los índices tienen el mismo significado que en el caso anterior.

Sin embargo, el diagnóstico de la trilinealidad de los datos experimentales no es una consecuencia de la similitud entre modelos, mencionada anteriormente, por lo que debe verificarse en cada caso individual. Es posible que un tensor de datos experimentales no sea trilineal, incluso si los datos se han obtenido utilizando una técnica que, en teoría, debería ser trilineal. Por otro lado, también es posible que las desviaciones experimentales, que podrían conducir a datos no trilineales, en realidad no invaliden la "ventaja de segundo orden".

Debe tenerse en cuenta que para los F factores de PARAFAC de un tensor de datos de dimensión $I \times J \times K$, solo deben estimarse los valores $(I + J + K) \times F$, así que el efecto estadístico de este "suavizado" es muy importante. En el caso del análisis químico, la evaluación de la trilinealidad de los datos, junto con la ventaja de que los perfiles cromatográfico y espectral del analito de interés se conocen experimentalmente a partir de las muestras de referencia, son muy útiles para esta tarea. Por lo tanto, se puede verificar que los perfiles estimados con PARAFAC o PARAFAC2 corresponden a ellos. Este diagnóstico a veces se resume como un análisis de la coherencia del modelo ajustado.

En esta sección se describen los pasos seguidos para la identificación inequívoca y cuantificación usando una descomposición PARAFAC o PARAFAC2. El orden de los índices de las matrices se puede intercambiar en cada caso debido a diferentes razones técnicas (mencionadas en las secciones anteriores). Los pasos seguidos en los cuatro casos (del artículo multiautor mencionado) han sido:

- i) Registrar, para cada muestra, la matriz de abundancias de las J relaciones m/z adquiridas en los I tiempos de elución para cada pico cromatográfico en el caso de GC-MS (o registrar la matriz de absorbancias en las J longitudes de onda y los I tiempos de elución para cada pico en el caso de HPLC-DAD).
- ii) Estimar los intervalos de tolerancia correspondientes para el tiempo de retención relativo y para la abundancia relativa de ion (m/z) con los loadings de los perfiles cromatográfico y espectral obtenidos con la descomposición PARAFAC (o PARAFAC2) de un tensor, $\underline{\mathbf{X}}_i$, que contenía K_i muestras de referencia. En el caso de HPLC-DAD, la identificación inequívoca en el perfil espectral se realiza

mediante el coeficiente de correlación lineal entre el espectro de una muestra de referencia y el obtenido con la descomposición PARAFAC (o PARAFAC2).

- iii) Construir el tensor de tres vías, $\underline{\mathbf{X}}_1$, compuesto por las K_1 muestras del conjunto de calibración (patrones de calibración).
- iv) Realizar la descomposición PARAFAC (o PARAFAC2) de ese tensor para obtener los perfiles cromatográfico y espectral de los diferentes compuestos presentes en esas muestras, para cada ventana cromatográfica entorno a un pico.
- v) Para cada descomposición PARAFAC (o PARAFAC2), usar los residuos Q y los estadísticos T^2 de Hotelling para verificar si hay valores anómalos.
- vi) Identificar el factor del modelo que corresponde inequívocamente al analito de interés utilizando los intervalos de tolerancia. En el caso de HPLC-DAD, la identificación del perfil espectral se lleva a cabo utilizando el coeficiente de correlación.
- vii) En el caso de los datos de GC-MS, los loadings muestrales de cada analito deben estandarizarse dividiendo cada uno de ellos por el loading muestral correspondiente a su estándar interno.
- viii) Ajustar y validar un modelo de calibración "loading muestral *versus* concentración real" utilizando los patrones de calibración. En el caso de los datos de GC-MS, se utilizan los loadings muestrales estandarizados (con los loadings del estándar interno).
- ix) Construir otro tensor de tres vías, $\underline{\mathbf{X}}_2$, compuesto por las K_2 muestras del nuevo conjunto de muestras. Estas muestras pueden provenir de diferentes orígenes (extractos de una matriz compleja, diseño de experimentos o cinética de migración).
- x) Determinar la concentración del analito en estas nuevas muestras a través de los loadings muestrales (o los estandarizados en el caso de datos de GC-MS) con el modelo de calibración del paso anterior viii). Todos los analitos de interés deben identificarse de manera inequívoca previamente.

VI.II.5. Resultados y discusión

VI.II.5.1. Caso IV: Test de migración y cinética de migración para melamina con HPLC-DAD

En este caso, se analizó la migración de melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) desde utensilios de cocina de melamina (melaware) al simulante alimentario B (ácido acético al 3% (p/v) en solución acuosa) de acuerdo a la normativa vigente [31,32]. La legislación europea [33] establece el límite de migración específica (SML) para la melamina en materiales de plástico en 2.5 mg kg^{-1} . Para este estudio, tres boles

(A, B, C) fueron expuestos a tres test de migración consecutivos (exposiciones 1, 2, 3) y analizados por triplicado. La cuantificación e identificación se llevaron a cabo utilizando la descomposición PARAFAC2 con las señales obtenidas mediante HPLC-DAD. El procedimiento experimental para obtener el extracto del test de migración a partir de los utensilios de cocina y realizar la cinética de migración se ha descrito en el Epígrafe VI.I de esta memoria y en la Ref. [21].

Para los test de migración sobre los recipientes (boles), se necesitaba un tensor de datos \underline{X}_1 ($76 \times 151 \times 41$) para construir un modelo PARAFAC2. En ese tensor, 76 eran los barridos (registrados entre 1.7 y 2.2 min), 151 correspondía al número de longitudes de onda (entre 200 y 500 nm) y 41 eran las muestras analizadas. De estas muestras, 14 fueron patrones de calibrado y 27 las muestras obtenidas en los ensayos de migración (tres exposiciones de tres boles, donde el extracto de cada exposición se midió tres veces). El uso de la descomposición PARAFAC2 fue necesario debido al ligero desplazamiento en el tiempo de retención de melamina. El índice CORCONDIA del modelo de dos factores obtenido fue igual a 100% y explicó un 97.46% de la varianza. La Figura VI.II.2 muestra los perfiles cromatográfico, espectral y muestral de los dos factores. En la Figura VI.II.2A se observa la presencia de un interferente (en naranja) que muestra el mismo tiempo de retención que la melamina (en azul). Los espectros de absorción de la melamina y el interferente se muestran en la Figura VI.II.2B representados con los mismos colores que en el perfil cromatográfico. El coeficiente de correlación entre el espectro de una muestra de referencia y el espectro de melamina obtenido con la descomposición PARAFAC2 fue de 0.999. Cuando se realizó el calibrado de forma univariante, el coeficiente de correlación se obtuvo comparando el espectro de referencia con el espectro de una muestra problema registrado en el tiempo de retención, siendo su valor 0.993. Este cálculo se realizó solo con las primeras 25 longitudes de onda ya que la absorbancia de la melamina era prácticamente cero en el resto del rango espectral registrado.

En la Figura VI.II.2C se muestra el perfil muestral obtenido de la descomposición PARAFAC2. Las muestras de 1 a 14 se corresponden con los patrones de calibrado, las muestras cuarta y novena se midieron por duplicado. El valor para los loadings muestrales relacionados con el interferente (en naranja en esa figura) en los patrones de calibración es prácticamente cero. El resto de las muestras corresponden a los test de migración. La cantidad de melamina migrada en la primera exposición es mayor que en las otras dos exposiciones independientemente del bol analizado.

La regulación europea establece que los valores obtenidos deben expresarse después de la tercera migración [32]. Una vez realizada la validación del modelo de calibración (loading muestral *versus* concentración real), se calculó la cantidad de melamina migrada desde el bol en la tercera exposición, que fue de 0.34 mg L^{-1} ($n = 9$), valor por debajo del SML [33].

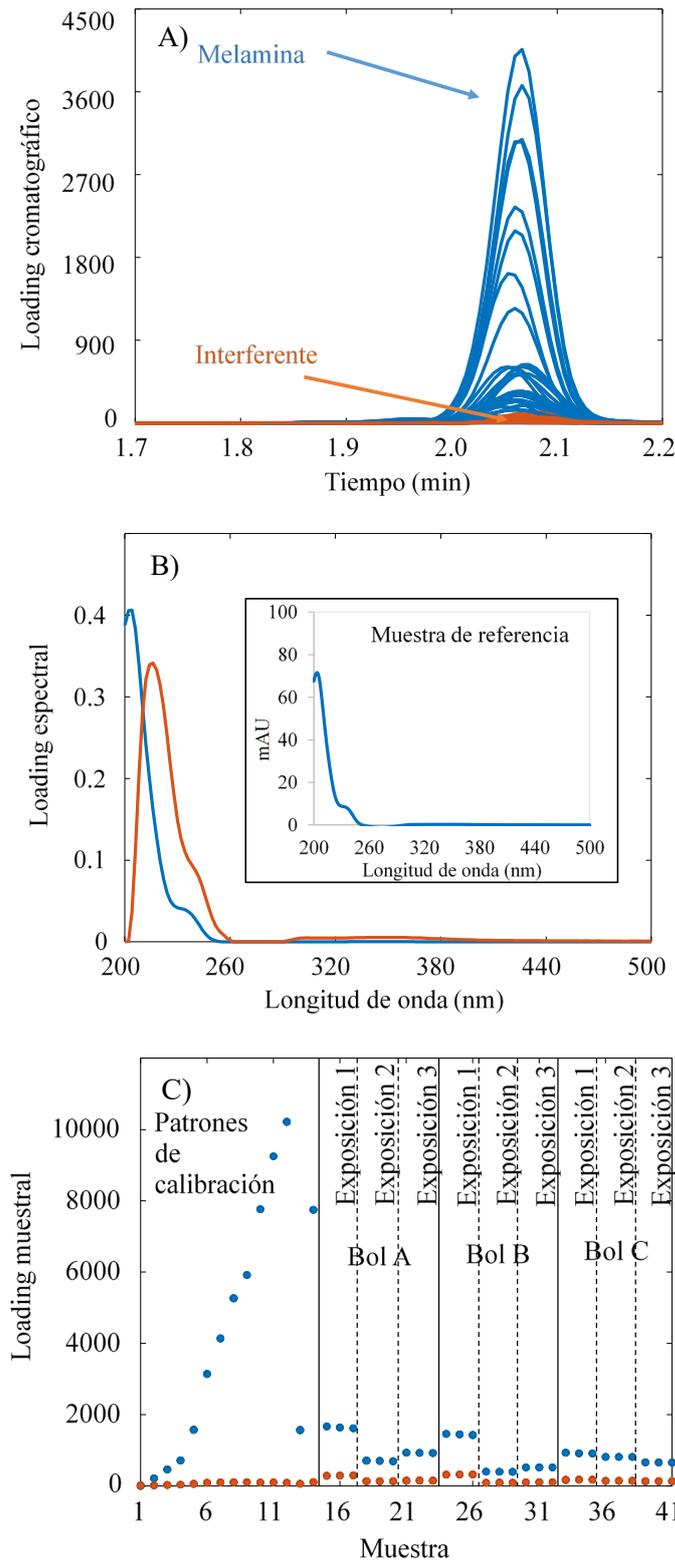


Figura VI.II.2. Loadings del modelo PARAFAC2 obtenidos para los test de migración de tres boles: A) perfil cromatográfico, B) perfil espectral y C) perfil muestral.

Teniendo en cuenta que los utensilios de cocina de melamina están fabricados para un uso continuado, se ajustó y validó un nuevo modelo PARAFAC para estudiar la tendencia de la concentración acumulada de melamina migrada desde un bol después de varios ciclos de migración consecutivos. Los datos se organizaron en un nuevo tensor, $\underline{\mathbf{X}}_2$, de dimensión $76 \times 151 \times 30$. En este caso, las 30 muestras corresponden a 14 patrones de calibrado junto con 16 muestras provenientes de ciclos de migración consecutivos (cada uno de 30 minutos) de un mismo bol. Las matrices utilizadas en la construcción del tensor se calcularon como la suma de los datos de la matriz de HPLC de cada ciclo y las matrices de HPLC de los ciclos anteriores. A modo de ejemplo, la matriz del ciclo número 10 contenida en el tensor consiste en la matriz de HPLC del ciclo número 10 junto con las matrices de HPLC de los 9 ciclos anteriores. Este procedimiento está justificado por la Ecuación (VI.II.3). Los perfiles cromatográficos y espectrales de los F factores son los mismos de un ciclo a otro, ya que el modelo es trilineal y los test de migración se realizaron en el mismo bol. Por lo tanto, si se suman las 'c' primeras matrices, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\sum_{k=1}^c \left(\sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \right) = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} \left(\sum_{k=1}^c c_{kf} \right) + e'_{ijk}, \quad (\text{VI.II.3})$$

$i=1, 2, \dots, I; \quad j=1, 2, \dots, J; \quad c=1, 2, \dots, K;$

Por lo tanto, el perfil muestral se compone de la suma acumulativa, hasta 'c', de los perfiles muestrales de los 'c' ciclos de migración.

Para el modelo PARAFAC se obtuvo un índice CORCONDIA de 97% y una varianza explicada de 84.27%. La Figura VI.II.3A muestra el perfil cromatográfico de los tres factores obtenidos, en este caso, en la descomposición PARAFAC. Se observa un gran solapamiento de señales para los perfiles correspondientes al interferente y a la melamina, factores en naranja y azul respectivamente en esa figura.

Los perfiles espectrales correspondientes a los tres factores de PARAFAC se recogen en la Figura VI.II.3B. El coeficiente de correlación entre el espectro de referencia de melamina y el obtenido en la descomposición PARAFAC fue igual a 0.9999 (mayor que 0.9733, que es el obtenido a partir de la correlación con el espectro registrado en el máximo de pico), cuando se utilizan las primeras 25 longitudes de onda, por lo que el factor en azul en esa figura se relacionó con la presencia de melamina en las muestras analizadas. Además, el espectro obtenido para uno de los interferentes (en amarillo en la Figura VI.II.3B) tenía un coeficiente de correlación de 0.9879 ($n = 25$) con el espectro de una mezcla de simulante alimentario y fase móvil. El otro interferente (en naranja) no pudo ser identificado.

Los loadings de los patrones de calibración y las muestras del bol se muestran en la Figura VI.II.3C. Ambos interferentes (en naranja y amarillo) aparecieron en algunos

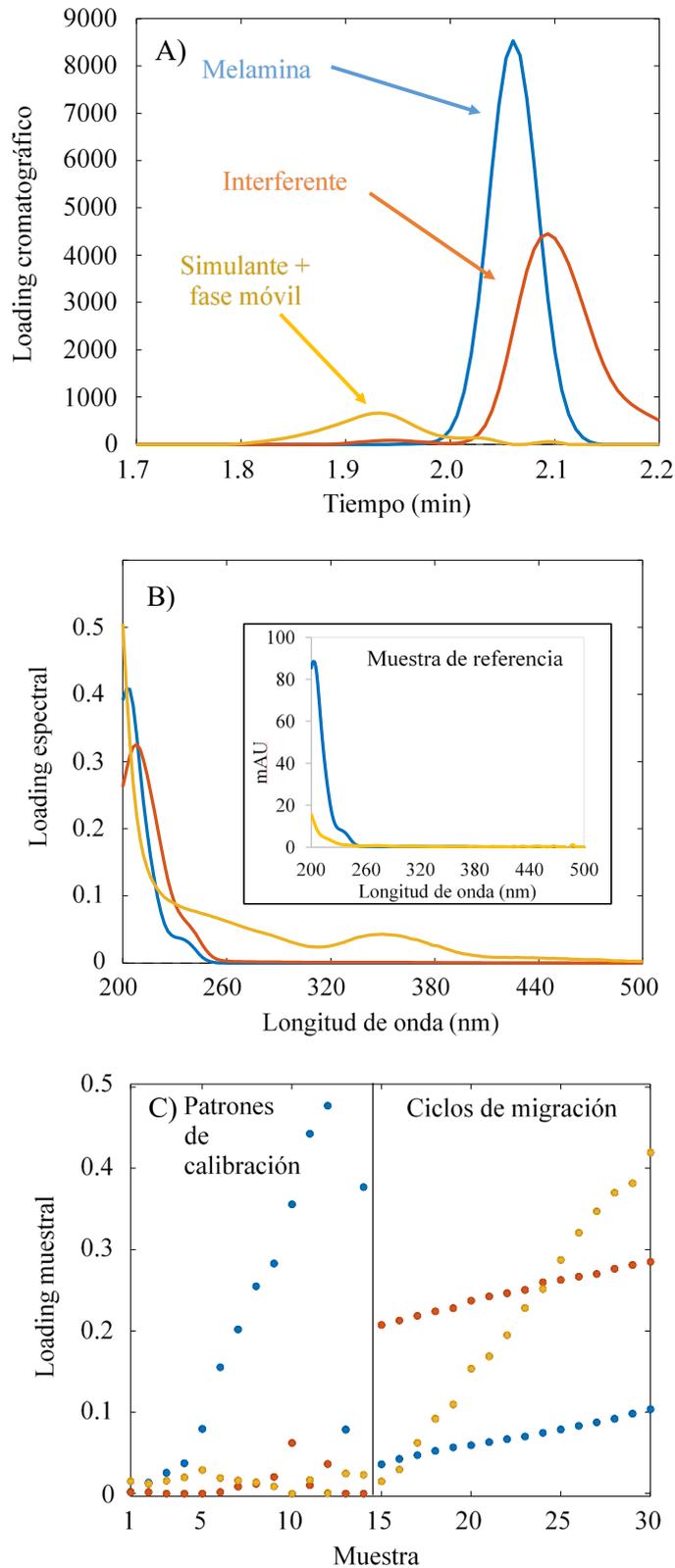


Figura VI.II.3. Loadings del modelo PARAFAC obtenidos para la cinética de migración. Loadings de: A) perfil cromatográfico, B) perfil espectral y C) perfil muestral.

patrones de calibrado y en todas las muestras del recipiente. Los loadings de los tres factores en las muestras del bol muestran una pauta creciente. El tensor se construyó con las matrices acumuladas, por lo que la linealidad observada en la parte derecha de esta figura indica que la cantidad de melamina migrada desde el bol en cada ciclo fue aproximadamente la misma, excepto en el primer ciclo de migración (muestra número 15 en la Figura VI.II.3C).

Se construyó un modelo de calibración para melamina utilizando los loadings muestrales de los 14 patrones de calibración. La recta de exactitud (concentración predicha *versus* concentración real) indicó que el procedimiento no tenía sesgo a un nivel de significancia del 5%. Los valores del límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) fueron 0.29 y 0.58 mg L⁻¹, respectivamente, cuando las probabilidades α y β se fijaron en 0.05.

La ecuación de la curva cinética de migración (cantidad acumulada de melamina) del bol fue $y = 0.301 + 0.044 x$, donde x es el número de ciclos de 30 min (hasta 16). El porcentaje de varianza explicada de este modelo cinético fue $R^2 = 99.5\%$. Después de dieciséis ciclos, la cantidad acumulada encontrada fue de 1.03 mg L⁻¹ de melamina, nuevamente por debajo del SML [33].

Por lo tanto, este estudio condujo a la conclusión de que el uso de PARAFAC o PARAFAC2 era necesario en los test de migración y en la cinética de migración para evitar la sobreestimación de la cantidad de melamina, ya que se ha detectado un interferente que coeluye y otro que se solapa con este analito. Además, en ambos análisis de migración, los errores relativos de los patrones de calibración (entre 0.25 y 10.00 mg L⁻¹) calculados de la manera habitual con las áreas de pico cromatográfico fueron mayores que los valores obtenidos con los loadings de PARAFAC, especialmente en los niveles más bajos de concentración como puede observarse en la Tabla VI.II.1.

Tabla VI.II.1. Error relativo (%) en los patrones de calibración para la melamina, obtenido con los loadings de la descomposición PARAFAC/PARAFAC2 y con el área del pico.

Concentración (mg L ⁻¹)		0.25	0.50	0.75	1.50	3.00	4.00	5.00	6.00	7.50	9.00	10.00
Test de migración	Descomposición PARAFAC2	17.2	10.8	7.9	-1.6	-1.6	-0.3	-2.1	4.3	-0.3	0.3	0.8
	Área de pico	32.2	16.7	5.0	-6.4	-1.7	-1.5	-3.9	1.9	-0.9	0.3	1.6
Cinética de migración	Descomposición PARAFAC	28.0	14.1	10.0	-3.0	-4.4	-2.5	-4.0	3.6	-0.3	-1.2	1.8
	Área de pico	65.9	32.1	2.1	-14.4	2.0	1.5	-6.1	0.7	-0.3	-1.4	2.8

VI.II.6. Conclusiones

La aplicación de la descomposición PARAFAC/PARAFAC2 permite la identificación inequívoca de los compuestos de interés de acuerdo con la normativa vigente.

El uso de modelos PARAFAC/PARAFAC2 en los test de migración y la cinética de migración evitó la sobreestimación de la cantidad de melamina migrada a pesar del hecho de que una interferente coeluyó con este analito.

La descomposición PARAFAC/PARAFAC2 también puede emplearse como una herramienta de control de calidad debido a su capacidad para detectar y manejar el efecto de cualquier interferente presente en muestras de matriz complejas.

VI.II.7. Referencias

- [1] SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed, European Commission, 2017.
- [2] SANCO/12495/2011, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, European Commission, 2011.
- [3] Commission Decision (EC) No 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities L 221/8, 2002.
- [4] EUR 27529 EN, JRC 98028, Practical guidelines on the application of migration modelling for the estimation of specific migration, European Commission, 2015. <http://doi.org/10.2788/04517>
- [5] M.C. Ortiz, L. Sarabia, Quantitative determination in chromatographic analysis based on n-way calibration strategies, *Journal of Chromatography A* 1158 (2007) 94-110. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.047>
- [6] B.D. Real, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, Develop of a multiway chemometric-based analytical method fulfilling regulatory identification criteria: Application to GC-MS pesticide residue analysis, *Journal of Chromatography B* 910 (2012) 122-137. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.017>
- [7] R. Morales, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, Usefulness of a PARAFAC decomposition in the fiber selection procedure to determine chlorophenols by means SPME-GC-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 1095-1107. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5545-7>.
- [8] A. Herrero, C. Reguera, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, Determination of dichlobenil and its major metabolite (BAM) in onions by PTV-GC-MS using PARAFAC2 and experimental design methodology, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 133 (2014) 92-108. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.12.001>
- [9] M.L. Oca, M.C. Ortiz, A. Herrero, L.A. Sarabia, Optimization of a GC/MS procedure that uses parallel factor analysis for the determination of bisphenols and their diglycidyl ethers after migration from polycarbonate tableware, *Talanta* 106 (2013) 266-280. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.086>
- [10] L. Rubio, S. Sanllorente, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, Optimization of a headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry procedure for the determination of aromatic amines in water and

- in polyamide spoons, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 133 (2014) 121-135. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.01.013>
- [11] I. García, L. Sarabia, M.C. Ortiz, J.M. Aldama, Robustness of the extraction step when parallel factor analysis (PARAFAC) is used to quantify sulfonamides in kidney by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD), *Analyst* 129 (2004) 766-771. <https://doi.org/10.1039/B404320K>
- [12] D. Arroyo, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, F. Palacios, Determination and identification, according to European Union Decision 2002/657/EC, of malachite green and its metabolite in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an optimized extraction procedure and three-way calibration, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 5472-5482. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.076>
- [13] L. Rubio, L.A. Sarabia, A. Herrero, M.C. Ortiz, Advantages of a programmed temperature vaporizer inlet and parallel factor analysis in the determination of triazines in the presence of non-intentionally added substances by gas chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 1131-1143. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5428-y>
- [14] M.C. Ortiz, S. Sanllorente, A. Herrero, C. Reguera, L. Rubio, M.L. Oca, L. Valverde-Som, M.M. Arce, M.S. Sánchez, L.A. Sarabia, Three-way PARAFAC decomposition of chromatographic data for the unequivocal identification and quantification of compounds in a regulatory framework, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 200 (2020) 104003. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104003>
- [15] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, Theory of analytical chemistry, *Analytical Chemistry* 66 (1994) 782A-791A. <https://doi.org/10.1021/ac00087a718>
- [16] B.M. Wise, N.B. Gallagher, R. Bro, J.M. Shaver, W. Winding, R.S. Koch, *PLS Toolbox 8.7*, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA, 2019.
- [17] *MATLAB version 9.4.0.813654 (R2018a)*, The Mathworks Inc., Natick, MA, USA, 2018.
- [18] *STATGRAPHICS Centurion 18 version 18.1.11 (64 bit)*. Statgraphics Technologies Inc., Herndon, VA, USA, 2018.
- [19] L. Sarabia, M.C. Ortiz, DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85052-6](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85052-6)

- [20] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, I. García, D. Giménez, E. Meléndez, Capability of detection and three-way data, *Analytica Chimica Acta* 559 (2006) 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.069>
- [21] M.M. Arce, S. Sanllorente, M.C. Ortiz, Kinetic models of migration of melamine and formaldehyde from melamine kitchenware with data of liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1599 (2019) 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.006>
- [22] C.A. Andersson, R. Bro, The N-way toolbox for MATLAB, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 52 (2000) 1-4. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(00\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(00)00071-X)
- [23] R. Bro, Exploratory study of sugar production using fluorescence spectroscopy and multi-way analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 46 (1999) 133-147. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00181-6](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00181-6)
- [24] R. Bro, H.A.L. Kiers, A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models, *Journal of Chemometrics* 17 (2003) 274-286. <https://doi.org/10.1002/cem.801>
- [25] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, A. Herrero, S. Sanllorente, C. Reguera, Usefulness of PARAFAC for the quantification, identification, and description of analytical data, in: A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri (Eds.), *Data Handling in Science and Technology: Fundamentals and analytical applications of multiway calibration*, volume 29, Elsevier, Amsterdam, 2015, pp. 37-81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63527-3.00002-3>
- [26] H.A.L. Kiers, J.M.F. ten Berge, R. Bro, PARAFAC2 – Part I. A direct fitting algorithm for the PARAFAC2 model, *Journal of Chemometrics* 13 (1999) 275-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-128X\(199905/08\)13:3/4<275::AID-CEM543>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-128X(199905/08)13:3/4<275::AID-CEM543>3.0.CO;2-B)
- [27] R. Bro, C.A. Andersson, H.A.L. Kiers, PARAFAC2 – Part II. Modelling chromatographic data with retention time shifts, *Journal of Chemometrics* 13 (1999) 295-309. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-128X\(199905/08\)13:3/4<295::AID-CEM547>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-128X(199905/08)13:3/4<295::AID-CEM547>3.0.CO;2-Y)
- [28] M. Ottensmann, M.A. Stoffel, H.J. Nichols, J.I. Hoffman, GCalignR: An R package for aligning gas-chromatography data for ecological and evolutionary studies, *PLoS ONE* 13:6 (2018) e0198311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198311>

- [29] M. Li, X.R. Wang, Peak alignment of gas chromatography–mass spectrometry data with deep learning, *Journal of Chromatography A* 1604 (2019) 460476. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460476>
- [30] WADA Technical Document – TD2015IDCR, Minimum criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes, WADA, 2015. Available at https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf (Last access on 12 December 2019).
- [31] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 12/1, 2011.
- [32] EUR 24815 EN, JRC 64903, Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware, European Commission, 2011. <https://doi.org/10.2788/19565>
- [33] Commission Regulation (EU) No 1282/2011 of 28 November 2011 amending and correcting Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 328/22, 2011.

VI.III. Análisis univariante *versus* multivariante en cromatografía líquida. Aplicación en la migración desde materiales en contacto con alimentos

VI.III.1. Introducción*

Cada vez son más numerosos los materiales que de forma directa o indirecta están en contacto con los alimentos que se consumen a diario. Esto ha llevado a que en la actualidad unos de los focos de atención de los organismos responsables de velar por la salud de los ciudadanos, esté puesto en estos materiales. Los materiales en contacto con alimentos (FCM por sus siglas en inglés) suponen, por tanto, una gran preocupación sobre todo debido a la posibilidad existente de que ciertos compuestos de estos materiales puedan migrar a los alimentos.

Sin embargo, estos materiales también se emplean para evitar la contaminación de los alimentos y prolongar su vida útil. Otra de las aplicaciones de estos materiales que está aumentando de forma exponencial es la demanda, por parte de la población, de comida para llevar lo que inevitablemente implica mayor contacto de los alimentos con su envasado.

Por otro lado, los fabricantes tratan de proporcionar mayor durabilidad y resistencia a los envases, así como comodidad y ligereza en el transporte de los mismos. Todo esto lleva a las empresas productoras a desarrollar nuevos materiales o a incorporar nuevas sustancias (aditivos) para conseguir los objetivos enunciados [1].

Los materiales que entran en contacto con los alimentos pueden tener multitud de fórmulas tanto por el tipo de componentes que se usan como por la proporción en que intervienen. Estos materiales pueden agruparse en 17 categorías diferentes [2]: materiales inteligentes, adhesivos, cerámica, corcho, caucho, vidrio, resinas de intercambio iónico, metales y aleaciones, papel y cartón, plásticos, tintas de impresión, celulosa regenerada, siliconas, productos textiles, barnices y recubrimientos, ceras, y madera.

Sin duda, uno de los grupos más importantes en cuanto a producción y consumo mundial es el de los plásticos. Además de los propiamente considerados FCM de plástico, muchos envases de papel y cartón presentan laminados de plástico en su interior, y también la mayoría de envases metálicos están recubiertos de materiales poliméricos [3].

* Este epígrafe corresponde al manuscrito que se encuentra en proceso de elaboración para su envío a Talanta.

Estos plásticos están formados por una base polimérica (macromolécula compuesta por unidades repetidas de monómeros), un homopolímero si estas unidades son de un solo tipo o un copolímero cuando son dos o más unidades diferentes [4]. Para su fabricación se emplean aditivos para obtener unas determinadas propiedades finales del producto y también para simplificar y abaratar el proceso de producción. Algunos de estos aditivos son: plastificantes, lubricantes, colorantes, estabilizantes, cargas o rellenos, retardantes de llama, agentes espumantes, modificadores de impacto, agentes antiestáticos y antimicrobianos [5].

En el producto final también están presentes, además de monómeros y aditivos, tintas o adhesivos empleados para su presentación al mercado y/o consumidor. Asimismo, otras sustancias desconocidas que tienen su origen en impurezas de la materia prima o subproductos formados durante el proceso de fabricación, pueden estar incluidas en el producto final. A este grupo se le conoce como NIAS (Sustancias No Añadidas Intencionadamente) [3].

Cualquier compuesto que forme parte de un FCM puede migrar al alimento. La migración específica de ciertas sustancias desde materiales plásticos hasta el alimento/simulante alimenticio se encuentra regulada por el Reglamento 10/2011 [6]. Por tanto, la verificación del cumplimiento de los SML en los materiales para los que se conocen sus componentes no supone un problema y se realiza de la siguiente manera: i) se pone a punto un método para el/los analitos de interés, ii) se toman muestras de la migración, iii) con un análisis univariante convencional se valida el método y a su vez se cuantifican los analitos migrados, y iv) se comparan los resultados de la concentración encontrada frente al SML.

El problema surge cuando alguna de las NIAS interfiere en el análisis univariante, por ejemplo, en cromatografía de líquidos esta interferencia puede darse cuando coeluye con el analito o cuando sus tiempos de retención se encuentran muy próximos. Ante esta situación la cuantificación del analito en las muestras de migración es errónea.

Una solución, propuesta en esta memoria, cuando se trabaja con muestras de migración (matriz compleja por el desconocimiento de todos los componentes que pueden encontrarse en el medio) es el uso de las técnicas de n-vías. Estas técnicas presentan la "ventaja de segundo orden"; lo que significa que, a partir de conjuntos de datos de tres vías (tensores), sobre los que se aplica una descomposición adecuada empleando herramientas quimiométricas, se consigue identificar separadamente el analito y los posibles interferentes presentes en la muestra siempre que los datos sean trilineales [7].

Como se ha puesto de manifiesto en el Epígrafe VI.II [8] y en la Ref. [9], la descomposición PARAFAC/PARAFAC2 resulta una excelente herramienta quimiométrica para la aplicación sobre datos analíticos obtenidos a partir de técnicas de tres vías. Más concretamente, se ha detallado un caso práctico (Caso IV de la Ref. [8]) en el que se empleó como técnica de análisis la cromatografía de líquidos

acoplada a un detector de diodos en serie (HPLC-DAD) para la determinación de melamina en muestras obtenidas tras el proceso de migración (test y cinética de migración) desde un bol fabricado con resina de melamina-formaldehído.

En el Epígrafe VI.II se realizó una comparativa de los valores obtenidos mediante un análisis univariante convencional (utilizando las áreas de pico como respuesta) y los procedentes de la descomposición PARAFAC/PARAFAC2. Este estudio comparativo se efectuó para: i) los errores relativos en predicción de los patrones de calibrado, y ii) la correlación del espectro obtenido frente al de una muestra de referencia.

Debido a las diferencias observadas, en este epígrafe se amplía la comparativa incluyendo las cantidades de melamina obtenidas tanto en los test de migración como en las cinéticas de migración. El estudio se aplicó sobre los tensores de datos obtenidos para 5 tipos de utensilios de cocina distintos (mostrados en Epígrafe VI.I), para la identificación y cuantificación de melamina.

VI.III.2. Búsqueda de modelos

Los tensores de datos empleados contienen las absorbancias registradas (x_{ijk}) en cada i -ésimo tiempo de retención y j -ésima longitud de onda para la k -ésima muestra. La descomposición PARAFAC de estos tensores, $\underline{\mathbf{X}}$ (de dimensiones $I \times J \times K$), se explica de forma generalizada a través del modelo trilineal de la Ecuación (VI.III.1) [10]:

$$\underline{\mathbf{X}}=x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if}b_{jf}c_{kf} + e_{ijk}, \quad (\text{VI.III.1})$$

$i=1, 2, \dots, I; \quad j=1, 2, \dots, J; \quad k=1, 2, \dots, K;$

dónde e_{ijk} son los residuos y F el número de factores del modelo ajustado.

Para la construcción de estos modelos es necesario definir previamente en cada uno de los perfiles si se quiere imponer alguna restricción. Generalmente aplicar alguna de estas restricciones (unimodalidad, no-negatividad, etc.) conduce a modelos que explican más varianza y tienen un índice de CORCONDIA mejor [11].

La aplicación de cualquier restricción debe estar siempre justificada. Teniendo en cuenta la positividad de los espectros, así como de las concentraciones, resulta coherente la aplicación de la restricción de no-negatividad sobre los perfiles espectral y muestral del tensor (para este trabajo dimensiones J y K respectivamente). A su vez, para el perfil cromatográfico (dimensión I) la restricción de unimodalidad cobra sentido al forzar la presencia de un solo máximo para cada factor (F), es decir, un pico cromatográfico por cada compuesto (identificado por el modelo) presente en la matriz

de la muestra [12]. Debe recordarse a este respecto que en el desarrollo de esta memoria la descomposición PARAFAC/PARAFAC2 se hace individualmente para cada pico cromatográfico, excepto en el caso de que los picos estén muy solapados.

Como se ha descrito en el Capítulo III, dos características que definen la bondad de un modelo PARAFAC son el índice de CORCONDIA [13] y el número de factores (F) [9], ambos relacionados entre sí. El índice de CORCONDIA se define como el diagnóstico de consistencia del núcleo y mide el grado de trilinealidad del tensor experimental cuando $F \geq 2$, siendo 100 su máximo valor posible. Cuando el tensor es trilineal y se eligen el número apropiado de factores se obtiene el modelo PARAFAC único que se buscaba.

En ocasiones un valor bajo de este índice puede ser debido a las desviaciones de la trilinealidad originadas cuando aparecen pequeños desplazamientos en el tiempo de retención en el cromatograma entre muestra y muestra [14,15]. Ante esta situación se emplean modelos PARAFAC2, los cuales corrigen este problema permitiendo que el modo cromatográfico varíe de una matriz a otra, explicando el modelo construido mediante la Ecuación (VI.III.2):

$$\underline{\mathbf{X}} = (\mathbf{x}_{ijk}) = \left(\sum_{f=1}^F \mathbf{a}_{if}^k \mathbf{b}_{jf} \mathbf{c}_{kf} + \mathbf{e}_{ijk} \right), \quad (\text{VI.III.2})$$

$i=1, 2, \dots, I; \quad j=1, 2, \dots, J; \quad k=1, 2, \dots, K;$

Los modelos de descomposición PARAFAC/PARAFAC2 para la determinación de melamina se construyeron para cada utensilio de cocina y tipo de migración (test o cinética, ver detalles en Epígrafe VI.I). En la Tabla VI.III.1 se recogen las características de dichos modelos.

Como se puede observar, en la columna 3 de la Tabla VI.III.1 se muestran las dimensiones ($I \times J \times K$) del tensor de datos experimentales empleado. Para los test de migración (apartado a) en la Tabla VI.III.1), en todos los casos a excepción de la taza, se han tomado cubos de dimensión $76 \times 151 \times 41$ que corresponden a barridos registrados entre 1.7 y 2.2 min ($I = 76$), en las 151 longitudes de onda entre 200 y 500 nm, para 41 muestras repartidas en 14 patrones de calibración (2 de ellos replicados) y 27 muestras procedentes de los test de migración (3 artículos sobre los que se realizaron 3 exposiciones y analizados por triplicado). En la descomposición del tensor de la taza se observó un comportamiento anómalo de dos muestras, concretamente dos réplicas de la tercera exposición de la taza B. Se decidió eliminar dichas muestras y rehacer el modelo, de ahí que la dimensión K del tensor final sea 39. Como curiosidad es interesante mencionar que el número de datos proporcionados por el cromatógrafo para el caso del tensor construido ($76 \times 151 \times 41$)

es de 470516 y mediante la técnica PARAFAC(PARAFAC2) es posible obtener la información útil para identificar y cuantificar la melamina.

Para las cinéticas de migración (apartado b) en la Tabla VI.III.1), la dimensión I cambia en el vaso y los cubiertos, ya que se redujo la ventana de tiempos entre 2.0 y 2.2 min (31 barridos). Además, el tamaño muestral es diferente para cada tipo de utensilio, los 14 patrones de calibración junto con: 15 muestras de migración para los cubiertos ($n = 29$); 16 para el vaso, el tazón y el bol ($n = 30$); 21 para la taza expuesta a ciclos de 1 hora ($n = 35$). La mayor diferencia reside en el tamaño muestral utilizado en el caso de la taza ($n = 86$), ya que el tensor de datos estaba formado por tres conjuntos de calibrado (3×14) y 44 muestras de migración.

Las columnas de 4 a 7 de la Tabla VI.III.1 detallan si ha sido necesaria o no la corrección del desplazamiento cromatográfico entre muestras utilizando PARAFAC2, así como las restricciones impuestas a los perfiles del tensor (P1, P2, P3). Los factores necesarios para la construcción del modelo (F), el índice de CORCONDIA y la varianza del tensor explicada por el modelo se recogen en las columnas de 8 a 10 de la misma tabla.

A modo de ejemplo, en la Figura VI.III.1 se muestran los perfiles cromatográfico, espectral y muestral obtenidos a partir de la descomposición PARAFAC2 del tensor de datos de la cinética de migración para el tazón (ver fila 9 de la Tabla VI.III.1). Como se puede observar en la Figura VI.III.1a, para la ventana de tiempos elegida se han identificado tres factores (sustancias presentes en la matriz de la muestra) diferentes, representadas en los colores azul, naranja y amarillo. El factor azul coeluye con el amarillo, cuyos picos cromatográficos se encuentran solapados con el pico del factor naranja.

El perfil espectral representado en la Figura VI.III.1b muestra tres espectros diferentes, es decir, que cada factor se corresponde a una sustancia distinta. Los loadings espectrales permiten identificar inequívocamente el analito de interés. Para ello, se ha calculado el coeficiente de correlación lineal entre el espectro del factor correspondiente a la melamina (asociada para este modelo al factor azul) y el espectro de una muestra de referencia entre las longitudes de onda 200 y 248 nm, obteniéndose los valores de los coeficientes de correlación recogidos en la columna 11 de la Tabla VI.III.1 para cada una de las descomposiciones realizadas.

La Figura VI.III.1c representa el perfil muestral, cuyos loadings permiten validar un modelo de regresión para aquellas muestras de concentración conocida (Sección VI.III.3). Posteriormente, utilizando este modelo y los loadings de las muestras de migración es posible determinar la concentración de melamina migrada desde el utensilio (Sección VI.III.4).

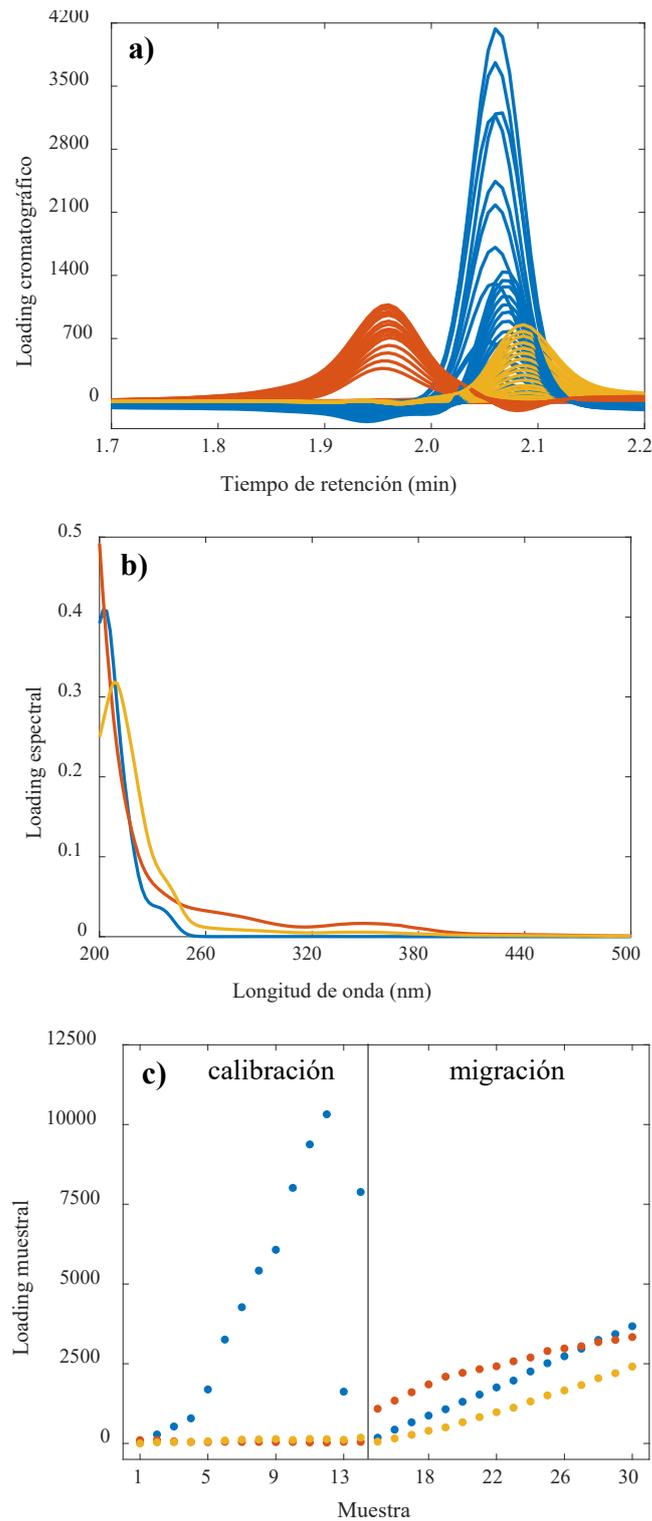


Figura VI.III.1. Loadings del modelo PARAFAC2 obtenidos a partir del tensor de datos correspondiente a la cinética de migración del tazón: a) perfil cromatográfico, b) perfil espectral y c) perfil muestral.

Tabla VI.III.1. Características de los modelos obtenidos mediante descomposición PARAFAC/PARAFAC2 para la determinación de melamina en muestras de migración: a) test y b) cinética.

Migración	Utensilio	I × J × K	Modelo	Restricciones ^a			CORCONDIA	Varianza X (%)	Coeficiente de correlación (n = 25)	
				P1	P2	P3				
a) Test	Vaso	76 × 151 × 41	PARAFAC	U	N	N	2	99	96.95	0.9997
	Taza	76 × 151 × 39	PARAFAC	U	N	N	2	98	97.26	0.9995
	Cubiertos	76 × 151 × 41	PARAFAC2	N	N	N	2	100	97.76	0.9991
	Tazón	76 × 151 × 41	PARAFAC	UN	N	N	2	97	97.02	0.9997
	Bol ^b	76 × 151 × 41	PARAFAC2	N	N	N	2	100	97.46	0.9991
	b) Cinética	Vaso	31 × 151 × 30	PARAFAC	U	N	N	2	96	91.75
Taza		76 × 151 × 86	PARAFAC	U	N	N	2	99	83.29	0.9966
Cubiertos		31 × 151 × 29	PARAFAC2	UN	N	N	2	100	99.06	0.9997
Tazón		76 × 151 × 30	PARAFAC2	U	N	N	3	100	93.93	0.9999
Bol ^b		76 × 151 × 30	PARAFAC	N	N	N	3	97	84.27	0.9999
Taza 1 hora		76 × 151 × 35	PARAFAC2	U	N	N	3	100	77.84	0.9999

^a Las restricciones de los perfiles cromatográfico (P1), espectral (P2) y muestral (P3) están codificadas como: (N) no-negatividad, (U) unimodalidad, (UN) unimodalidad y no-negatividad.

^b Las características recogidas en esta tabla para el utensilio bol hacen referencia a los modelos mostrados en el Epígrafe VI.II.

VI.III.3. Validación de modelos

A partir de los loadings muestrales que proporcionan cada una de las descomposiciones PARAFAC/PARAFAC2 (cuyas características se han recogido en la Tabla VI.III.1 de la Sección VI.III.2), se han construido modelos de regresión para cada utensilio y tipo de migración. El ajuste de los modelos de regresión, loading muestral *versus* concentración, se ha realizado para 14 patrones que corresponden a 12 niveles de concentración diferentes, 2 de los cuales se analizaron por duplicado. Excepcionalmente, en la construcción de la recta de calibrado de la cinética de la taza se emplearon tres conjuntos de calibración ($n = 42$). En el caso del test de migración del bol se encontró un dato anómalo cuyo residuo estudentizado era -4.43, por lo que la recta de calibrado se ajustó con 13 datos. Las filas de 2 a 6 y de 12 a 16 de la Tabla VI.III.2 recogen los parámetros de todas las rectas de calibrado para la melamina.

La validación de las rectas de calibrado se realizó en términos de veracidad y precisión. La precisión se evaluó a través de la desviación estándar (s_{yx}) mostrada en las filas 5 y 15 de la Tabla VI.III.2. Mientras que la veracidad se comprobó a través del término independiente y la pendiente de la recta de exactitud (concentración predicha *versus* concentración real), cuyas hipótesis nulas a contrastar son H_0 : Término independiente igual a 0 y H_0 : Pendiente igual a 1. En todos los casos analizados sus p-valores fueron superiores a 0.05, por lo que se puede concluir que con los datos que se dispone no se tienen evidencias para rechazar las hipótesis nulas. Los parámetros de las rectas de exactitud para la melamina se recogen en las filas de 7 a 10 y de 17 a 20 de la Tabla VI.III.2. Se puede concluir que el método es insesgado y no tiene error constante ni proporcional.

VI.III.4. Estudio comparativo de la melamina migrada

Mediante las rectas de calibrado ya validadas y los loadings muestrales correspondientes a la migración, tanto en el caso de las muestras procedentes de los test de migración como los obtenidos en las cinéticas, se calculó la concentración de melamina migrada desde los utensilios al simulante.

Los valores obtenidos se representan en color verde en los diagramas de barras de las Figuras VI.III.2 y VI.III.3. En estas mismas figuras se muestran en morado los resultados de melamina migrada (en mg L^{-1}) obtenidos al emplear un análisis univariante convencional con el área de pico cromatográfico como técnica de tratamiento de datos, es decir, se ha integrado el área de pico cromatográfico fijando una única longitud de onda en el detector (ver detalles en el Epígrafe VI.I).

Tabla VI.III.2. Parámetros de las rectas de calibrado y de exactitud, construidas a partir de los loadings muestrales de los modelos PARAFAC/PARAFAC2 para la determinación de melamina en muestras de migración: a) test y b) cinética.

a) Test	Vaso	Taza	Cubiertos	Tazón	Bol	
Recta de calibrado	Término independiente	-0.0085	-118.8	-0.0020	4.3	
	Pendiente	0.0510	1036.1	0.0489	1030.2	
	Coefficiente de correlación	0.9983	0.9982	0.9997	0.9999	
	s_{yx}	0.0109	224.7	0.0047	56.5	
	p-valor significación	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	
Recta de exactitud	Término independiente	$5.18 \cdot 10^{-4}$	$-2.27 \cdot 10^{-3}$	$4.82 \cdot 10^{-4}$	$4.60 \cdot 10^{-9}$	
	p-valor	0.9955	0.9805	0.9907	1.0000	
	Pendiente	0.9998	1.0014	1.0005	1.0000	
	p-valor	0.9893	0.9373	0.9546	0.9992	
b) Cinética	Vaso	Taza	Cubiertos	Tazón	Bol	Taza 1 hora
Recta de calibrado	Término independiente	0.0013	-74.1	68.5	0.0048	79.0
	Pendiente	0.0174	1050.7	1036.7	0.0481	1049.7
	Coefficiente de correlación	0.9980	0.9985	0.9996	0.9991	0.9995
	s_{yx}	0.0100	206.1	111.0	0.0073	116.1
	p-valor significación	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
Recta de exactitud	Término independiente	$-2.32 \cdot 10^{-3}$	$-8.35 \cdot 10^{-4}$	$-9.93 \cdot 10^{-4}$	$1.68 \cdot 10^{-7}$	$-2.64 \cdot 10^{-3}$
	p-valor	0.9780	0.9920	0.9824	1.0000	0.9549
	Pendiente	1.0007	1.0007	1.0008	1.0000	1.0013
	p-valor	0.9644	0.9641	0.9262	0.9999	0.8799

En la Figura VI.III.2 el eje de abscisas describe las tres réplicas de cada exposición (1, 2, 3) realizadas a los tres artículos (A, B, C); mientras que en la Figura VI.III.3 representa el número de ciclos de migración a los que se ha expuesto el utensilio.

A través de los gráficos de la Figura VI.III.2 se observa fácilmente que la concentración de melamina presente en la muestra es mayor cuando no se aplican técnicas con la "ventaja de segundo orden" como es la descomposición PARAFAC o PARAFAC2, lo que supone una sobreestimación de la misma. Este efecto se debe a que en la integración del pico de la melamina intervienen inevitablemente el/los interferentes que coeluyen, lo que provoca la sobreestimación y puede derivar en falsas no-conformidades cuando la concentración calculada supere el límite de migración específica (SML de 2.5 mg kg⁻¹ para la melamina [16]).

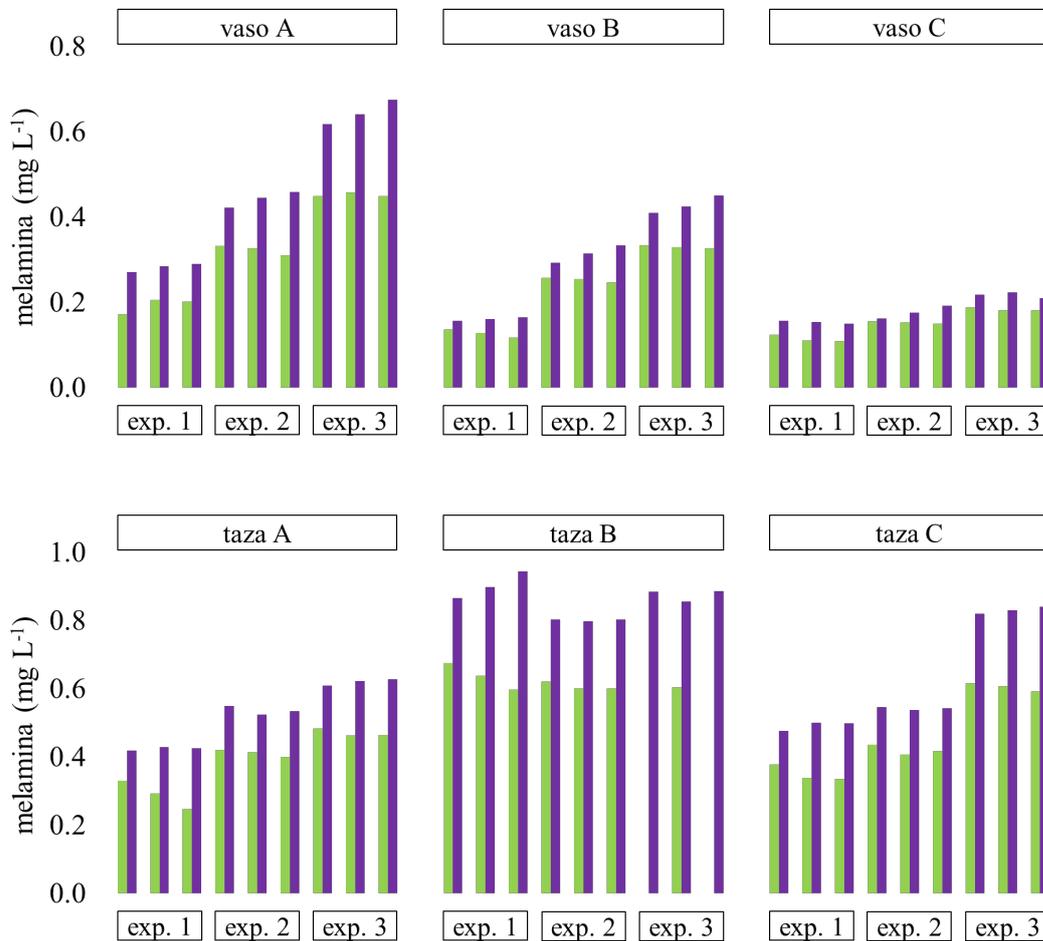


Figura VI.III.2. Comparación de las concentraciones de melamina obtenidas para los test de migración en los diferentes tipos de utensilios. Valores calculados mediante un análisis univariante convencional (en morado) y mediante la descomposición PARAFAC o PARAFAC2 (en verde). El eje de ordenadas describe la melamina migrada en mg L⁻¹.

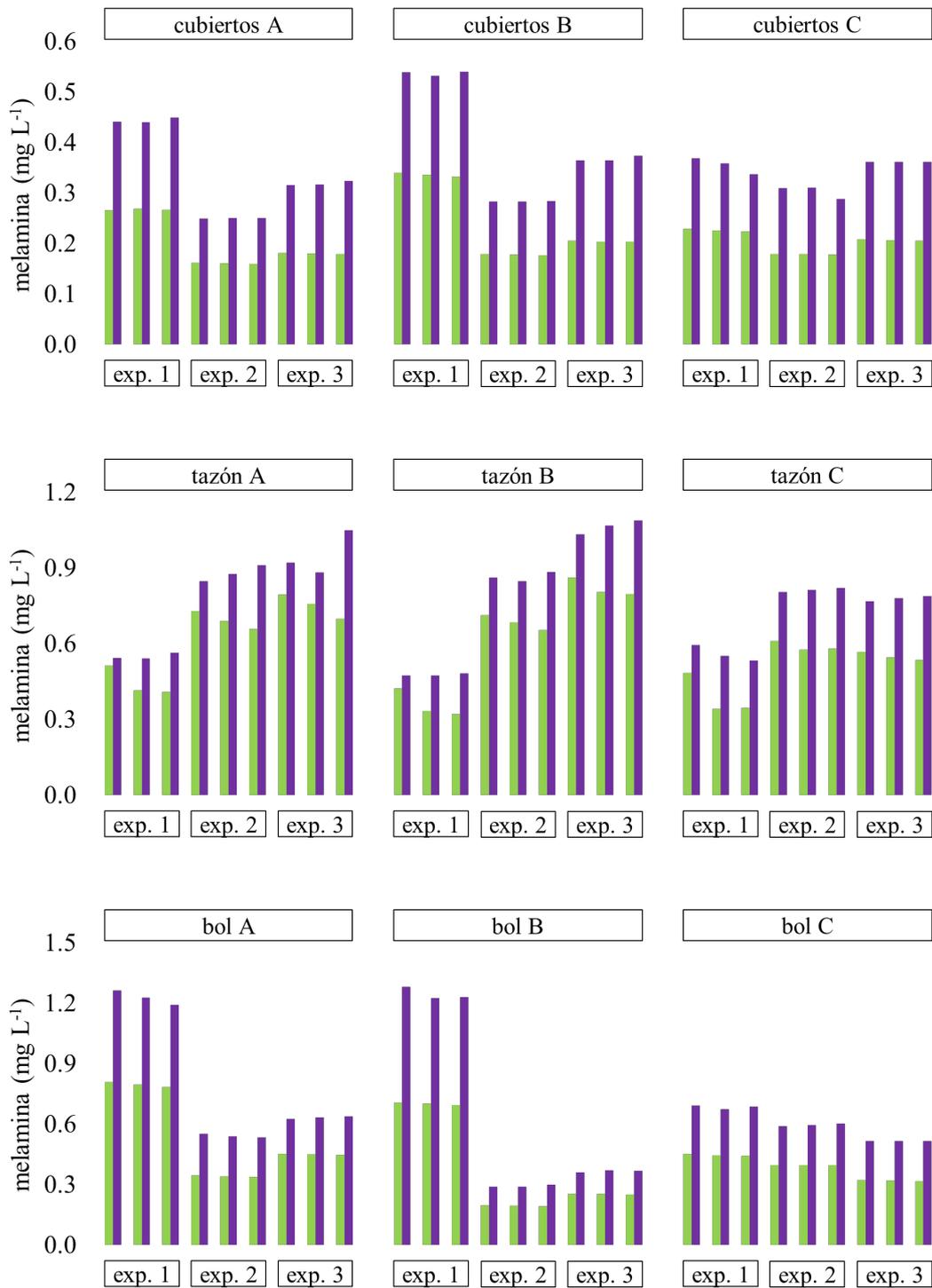


Figura VI.III.2. Continuación.

En las muestras provenientes del test de migración para cada tipo de utensilio, el análisis univariante supone un aumento de más del 30% en la cantidad de melamina encontrada respecto a la obtenida mediante la descomposición PARAFAC o PARAFAC2. Concretamente los porcentajes fueron de 31, 37, 67, 33 y 55% para vaso, taza, cubiertos, tazón y bol respectivamente. Observando estos resultados resulta digno de destacar que los porcentajes más altos (cubiertos y bol) corresponden a utensilios que tenían elementos decorativos en la superficie que entra en contacto con el simulante.

Las cinéticas de migración están construidas de manera que se muestra la concentración acumulada de melamina encontrada tras someter al utensilio a sucesivos ciclos de migración, de ahí la tendencia creciente de todos los gráficos de barras de la Figura VI.III.3. En algunas de las figuras se ha indicado con una línea negra horizontal discontinua dónde está el SML para la sustancia, sobre todo para indicar la diferencia de haber dado o no una falsa no-conformidad en los resultados dependiendo del modo de tratar los datos experimentales.

Mediante el análisis univariante se había llegado a la conclusión de que en la taza, el tazón y el bol la cantidad de melamina acumulada superaba el SML tras 11, 13 y 1 ciclos respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos con el análisis multivariante revelan que en realidad hacen falta 23 ciclos para alcanzar el SML en la cinética acumulada de la taza, mientras que después de 16 ciclos ni en el tazón ni en el bol se ha superado dicho límite.

Precisamente la gran diferencia en los resultados obtenidos para el bol es uno de los aspectos más destacables del trabajo. Una o las dos sustancias no identificadas (recuérdese que el modelo PARAFAC era de 3 factores, ver fila 10 de la Tabla VI.III.1) que presentaban tiempos de retención próximos al de la melamina están presentes en la matriz de la muestra en una concentración de tal magnitud que hacen que en el primer ciclo la estimación mediante el análisis univariante sea 10 veces superior. Es decir, la cantidad de melamina encontrada en el ciclo 1 para el bol fue 3.379 mg L^{-1} utilizando el análisis univariante y 0.324 mg L^{-1} mediante la descomposición PARAFAC.

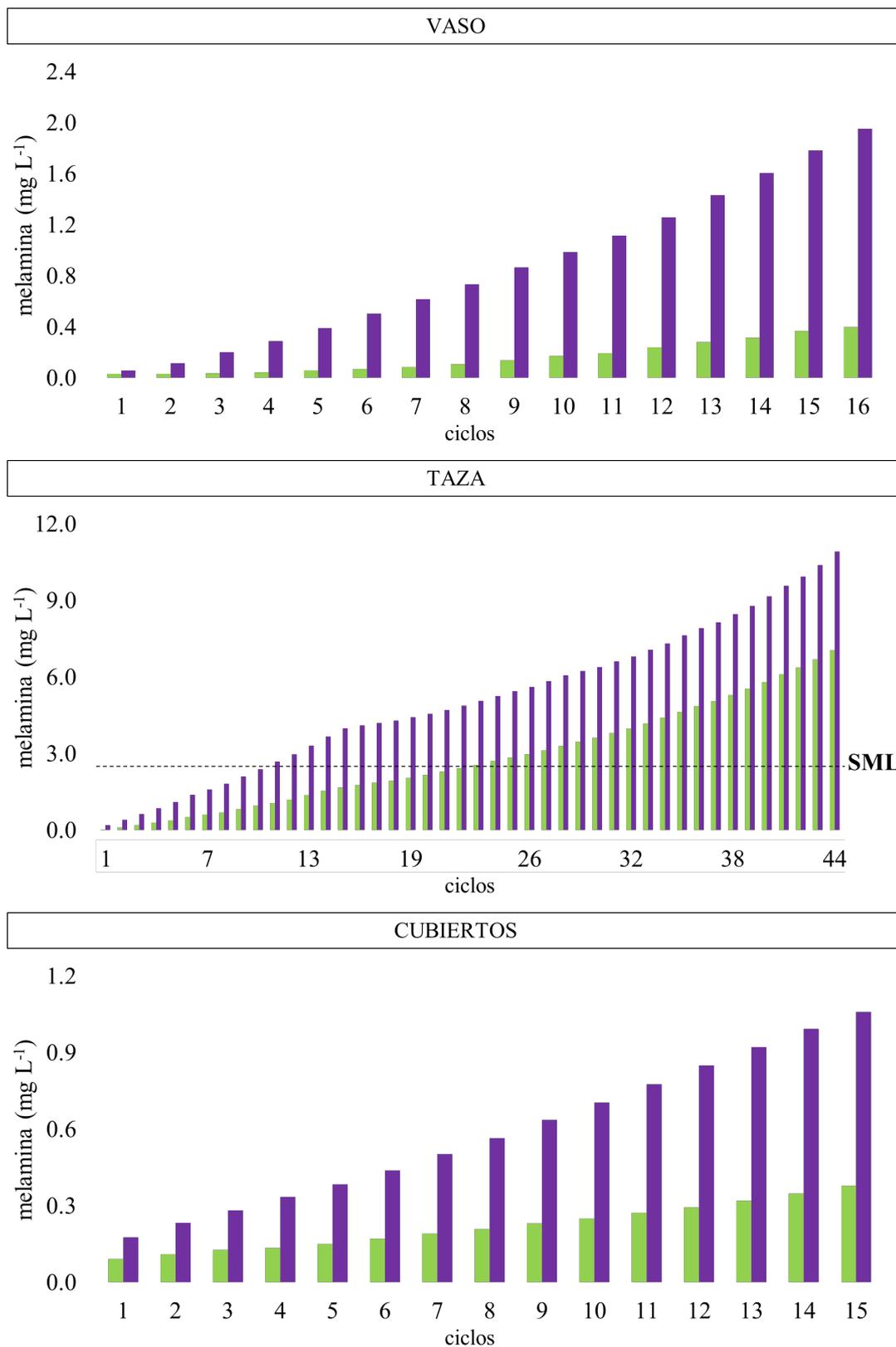


Figura VI.III.3. Comparación de las concentraciones de melamina obtenidas para las cinéticas de migración en los diferentes tipos de utensilios. Valores calculados mediante un análisis univariante convencional (en morado) y mediante la descomposición PARAFAC o PARAFAC2 (en verde). La línea horizontal discontinua representada en negro indica el SML.

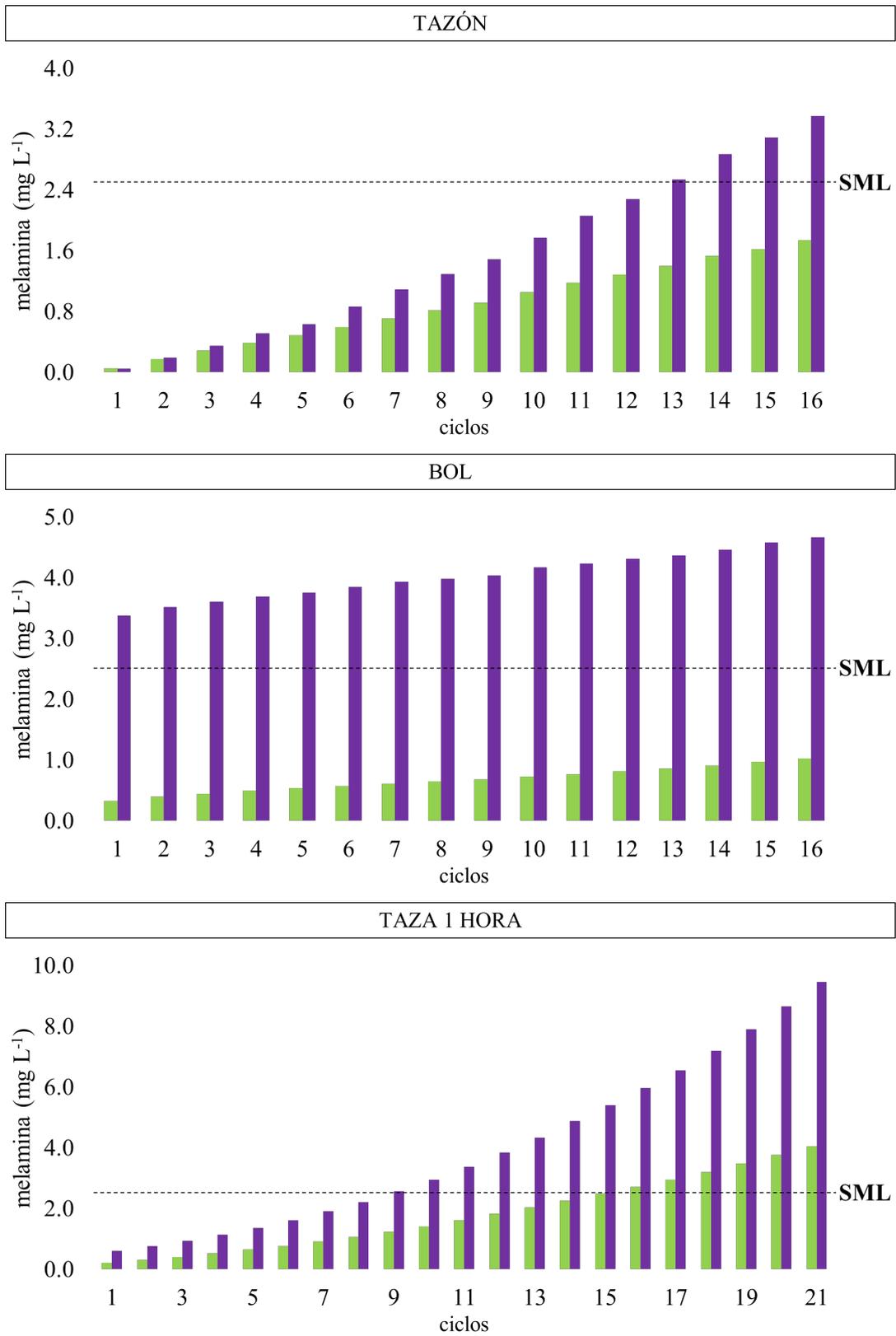


Figura VI.III.3. Continuación.

VI.III.5. Conclusiones

La determinación mediante cromatografía de líquidos de uno o varios compuestos en muestras de migración supone un reto debido a la complejidad de la matriz de este tipo de muestras. Generalmente en las muestras de migración suelen estar presentes, además de los analitos de interés, otras sustancias no identificadas (NIAS) que pueden tener un tiempo de retención cercano al del analito. En ese caso, la cuantificación del mismo a través de un análisis univariante convencional da lugar a resultados que sobreestiman la cantidad de melamina encontrada.

Como se ha podido comprobar en este trabajo, dónde se ha realizado la comparación de resultados obtenidos con análisis univariante y multivariante partiendo de los mismos datos analíticos, cuando se trabaja con muestras de migración es recomendable el empleo de técnicas de n-vías que presentan la "ventaja de segundo orden" (como por ejemplo la descomposición PARAFAC/PARAFAC2).

Eligiendo adecuadamente el tipo de restricción de cada dimensión del tensor de datos y el número de factores del modelo a construir, la descomposición trilineal PARAFAC/PARAFAC2 proporciona perfiles únicos para cada factor, permitiendo así la identificación inequívoca del analito de interés (para este trabajo la melamina identificada a través del perfil espectral) y evitando la sobreestimación asociada a falsas no-conformidades.

Puede ocurrir que al realizar el análisis multivariante no se encuentren interferentes y hubiese bastado con el análisis univariante convencional, pero a priori el analista no puede conocer si en las muestras de migración van a aparecer otras sustancias que componen los artículos analizados y de igual manera han podido migrar hasta el simulante.

VI.III.6. Referencias

- [1] S. Qian, H. Ji, X. Wu, N. Li, Y. Yang, J. Bu, X. Zhang, L. Qiao, H. Yu, N. Xu, C. Zhang, Detection and quantification analysis of chemical migrants in plastic food contact products, *PLoS ONE* 13:12 (2018) e0208467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208467>
- [2] Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC, *Official Journal of the European Union* L 338/4, 2004.
- [3] K.A. Barnes, C.R. Sinclair, D.H. Watson, *Chemical migration and food contact materials*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2007. <https://doi.org/10.1533/9781845692094>
- [4] A. Rudin, *The elements of polymer science and engineering. An introductory text and reference for engineers and chemists*, 2nd edition, Academic Press (Elsevier), San Diego, 1999. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-601685-7.X5000-9>
- [5] M. Beltrán, A. Marcilla, *Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades*, 1st edition, Publicaciones de la Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, 2012.
- [6] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 12/1, 2011.
- [7] M.C. Ortiz, L. Sarabia, Quantitative determination in chromatographic analysis based on n-way calibration strategies, *Journal of Chromatography A* 1158 (2007) 94-110. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.047>
- [8] M.C. Ortiz, S. Sanllorrente, A. Herrero, C. Reguera, L. Rubio, M.L. Oca, L. Valverde-Som, M.M. Arce, M.S. Sánchez, L.A. Sarabia, Three-way PARAFAC decomposition of chromatographic data for the unequivocal identification and quantification of compounds in a regulatory framework, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 200 (2020) 104003. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104003>
- [9] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, A. Herrero, S. Sanllorrente, C. Reguera, Usefulness of PARAFAC for the quantification, identification, and description of analytical data, in: A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri (Eds.), *Data Handling in Science and Technology: Fundamentals and analytical applications of multiway*

- calibration, volume 29, Elsevier, Amsterdam, 2015, pp. 37-81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63527-3.00002-3>
- [10] C.A. Andersson, R. Bro, The N-way toolbox for MATLAB, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 52 (2000) 1-4. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(00\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(00)00071-X)
- [11] R. Bro, Exploratory study of sugar production using fluorescence spectroscopy and multi-way analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 46 (1999) 133-147. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00181-6](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00181-6)
- [12] R. Bro, Constraints, in: R. Bro doctoral dissertation (Ed.), *Multi-way analysis in the food industry. Theory, algorithms and applications*, University of Amsterdam, 1998, pp. 135-184. Available at <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.24.5344>
- [13] R. Bro, H.A.L. Kiers, A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models, *Journal of Chemometrics* 17 (2003) 274-286. <https://doi.org/10.1002/cem.801>
- [14] H.A.L. Kiers, J.M.F. ten Berge, R. Bro, PARAFAC2 – Part I. A direct fitting algorithm for the PARAFAC2 model, *Journal of Chemometrics* 13 (1999) 275-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-128X\(199905/08\)13:3/4<275::AID-CEM543>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-128X(199905/08)13:3/4<275::AID-CEM543>3.0.CO;2-B)
- [15] R. Bro, C.A. Andersson, H.A.L. Kiers, PARAFAC2 – Part II. Modelling chromatographic data with retention time shifts, *Journal of Chemometrics* 13 (1999) 295-309. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-128X\(199905/08\)13:3/4<295::AID-CEM547>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-128X(199905/08)13:3/4<295::AID-CEM547>3.0.CO;2-Y)
- [16] Commission Regulation (EU) No 1282/2011 of 28 November 2011 amending and correcting Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* L 328/22, 2011.

CAPÍTULO VII

**UN NUEVO ENFOQUE BASADO EN LA INVERSIÓN
DE UN MODELO PLS PARA BUSCAR UN PERFIL
ANALÍTICO PREDETERMINADO. APLICACIÓN
EN LA DETERMINACIÓN DE CINCO
BISFENOLES MEDIANTE HPLC-DAD**

VII.1. Resumen*

El capítulo muestra un procedimiento para seleccionar los parámetros de control del método (factores) para obtener un "perfil analítico preestablecido" cuando se va a emplear una técnica de cromatografía líquida para la determinación simultánea de cinco bisfenoles (bisfenol A, bisfenol S, bisfenol F, bisfenol Z y bisfenol AF). Algunos de estos bisfenoles están prohibidos, o tienen establecido un límite de migración específica en distintas regulaciones de la UE tanto para materiales en contacto con alimentos, como para juguetes, cosméticos o papel térmico. Concretamente, el bisfenol A se considera que es un disruptor endocrino que puede migrar del envase o de los utensilios de cocina a los alimentos, siendo el bisfenol más regulado.

El procedimiento propuesto en el trabajo consta de tres etapas. La primera consiste en construir un diseño D-óptimo desde un diseño compuesto (diseño mezcla-proceso) para los parámetros de control del método, que son la composición de una fase móvil ternaria y su flujo. La segunda etapa consiste en ajustar un modelo PLS2 para predecir seis respuestas analíticas (cuatro resoluciones entre picos consecutivos y el tiempo inicial y final del cromatograma) en función de los parámetros de control del método. La tercera etapa se corresponde con la inversión del modelo PLS2 construido para así obtener las condiciones necesarias para conseguir un "perfil analítico preestablecido". Este perfil analítico objetivo se fijó para que la resolución entre picos cromatográficos contiguos fuera superior a 1.1; el tiempo inicial fuera de al menos 2 min, para obviar el tiempo muerto de la columna; y un tiempo final corto, no más de 4 min.

La inversión computacional del modelo de predicción PLS2 que busca el frente Pareto de estas seis respuestas proporciona un conjunto de condiciones experimentales para realizar la determinación cromatográfica. Los parámetros de control del método seleccionados en el frente Pareto fueron: una composición de fase móvil ternaria con 22% de agua, 58% de metanol y 20% de acetonitrilo, manteniendo el flujo en 0.66 mL min^{-1} . Estas condiciones proporcionan un cromatograma con tiempos de retención de 2.180, 2.452, 2.764, 3.249 y 3.775 minutos para BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ, respectivamente.

Finalmente, se validó el método analítico en las condiciones experimentales seleccionadas. Para los cinco bisfenoles, la elipse de confianza conjunta mostró que la pendiente y el término independiente de cada recta de exactitud (concentración predicha *versus* concentración real) son iguales a 1 y 0, respectivamente. Por tanto, se puede concluir que el procedimiento puesto a punto es veraz y preciso. Además, la capacidad de detección obtenida para los cinco bisfenoles fue: 596, 334, 424, 458 y $1156 \mu\text{g L}^{-1}$, cuando las probabilidades de falso positivo y falso negativo se fijaron en 0.05.

* Este capítulo ha sido enviado el 28 de octubre de 2020 para su publicación en *Analytica Chimica Acta*.

VII.2. Palabras clave

Tecnología Analítica de Procesos; Mínimos Cuadrados Parciales; optimización Pareto; bisfenol A; HPLC-DAD, Inversión computacional de un Modelo de Variables Latentes.

VII.3. Introducción

La Tecnología Analítica de Procesos (PAT, por sus siglas en inglés) es una metodología para diseñar, analizar y controlar la fabricación a partir de datos medidos sobre las materias primas, sobre las variables críticas del proceso, sobre propiedades ambientales, etc. (que constituyen la matriz \mathbf{X}), con el objetivo de asegurar la calidad del producto final. Esta calidad se establece mediante unos valores de los Atributos Críticos de Calidad (CQA, por sus siglas en inglés) en la matriz \mathbf{Y} . Actualmente, la Tecnología Analítica de Procesos es un estándar para la acreditación de procesos farmacéuticos [1,2].

En el presente trabajo, la relación entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} se establece mediante un modelo de regresión de variables latentes, en concreto, un modelo PLS2 ("espacio latente de proyección" o "mínimos cuadrados parciales" con más de una respuesta) que se obtiene calculando 'a' nuevas variables ortogonales tales que,

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_a \mathbf{P}_a^T + \mathbf{R}_X = \widehat{\mathbf{X}} + \mathbf{R}_X \quad (\text{VII.1})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}_a \mathbf{Q}_a^T + \mathbf{R}_Y = \mathbf{X}\mathbf{M} + \mathbf{R}_Y \quad (\text{VII.2})$$

En lo que sigue, se asume que \mathbf{X} variables de entrada son representativas del "espacio del proceso", e \mathbf{Y} (respuestas) del "espacio de calidad" de las características del producto.

Como en muchas otras situaciones basadas en datos, los atributos de calidad prefijados son conocidos y se pueden definir como un vector \mathbf{y}_{des} , que no necesariamente tiene que estar en el conjunto de entrenamiento. Que se pueda alcanzar este \mathbf{y}_{des} (producto factible con unas características prefijadas) depende de la existencia de valores de las variables de proceso que darían este producto objetivo. Por tanto, una vez construido el modelo PLS2, es necesaria su inversión para tener los valores de las variables de entrada, \mathbf{x}_{des} , con las que se obtendrá una calidad preestablecida \mathbf{y}_{des} [1]. El estudio de la viabilidad de esta inversión, con las restricciones necesarias, para garantizar la existencia de una solución se conoce como Inversión de Modelos de Variables Latentes (LVMI por sus siglas en inglés).

En la literatura existen dos alternativas para abordar esta inversión. Una de ellas está relacionada con la inversión de las matrices de la descomposición (las de las

Ecuaciones (VII.1) y (VII.2)). Un resumen de este enfoque se encuentra en las Ref. [3,4]. La Ref. [5] contiene las condiciones y restricciones necesarias, en función de la dimensión de los espacios que generan las variables latentes, las de proceso y las de calidad, pero en este escenario, no se pueden imponer restricciones directamente a las características de calidad.

Por eso la segunda alternativa es redefinir la inversión y, por ejemplo, buscar los "scores" que minimizan la diferencia ponderada al cuadrado entre las características predichas y las deseadas, poniendo un límite al valor máximo permitido para el estadístico T^2 de Hotelling [6]. De esta forma, esta cuestión se plantea como un problema de mínimos cuadrados ponderados, y posiblemente restringidos, que también es aplicable si se cambiara el tipo de modelo, por un PLS no lineal como se hace en la Ref. [3], o con programación genética como en la Ref. [7].

En ambas alternativas, la inversión "va" desde el espacio \mathbf{Y} hasta el subespacio $\hat{\mathbf{X}}$ en \mathbf{X} , Ecuación (VII.1), reconstruido a partir del espacio generado por las variables latentes. En consecuencia, se asume implícitamente que el subespacio $\hat{\mathbf{X}}$ de alguna manera recoge toda la correlación entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} , y también que los subespacios residuales \mathbf{R}_x y \mathbf{R}_y no están correlacionados con \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente, lo que en general no es cierto. Se han hecho algunos intentos de abordar este problema que incluyen el pretratamiento de las predictoras, dando lugar a la familia de procedimientos de Corrección de Señal Ortogonal (OSC en inglés) que se explica en la Ref. [8], o modificaciones del método PLS [9] sin disponer todavía de una solución aceptable para obtener un subespacio de \mathbf{X} cuyo complemento ortogonal sea independiente de \mathbf{Y} .

El presente trabajo utiliza una tercera alternativa con un enfoque computacional para la inversión del modelo, publicado recientemente por nuestro grupo [10]. La metodología se basa en las propiedades que tiene el frente Pareto óptimo calculado al minimizar simultáneamente las diferencias esperadas entre las características de calidad predichas (predicciones del modelo) y las propuestas como objetivo en \mathbf{y}_{des} . La ventaja de este nuevo enfoque es que permite abordar el problema de la viabilidad de un producto con determinadas características desde el punto de vista multidimensional, considerando cada característica de calidad pero estudiando su comportamiento conjunto para no perder la estructura de correlación que inevitablemente existe entre las respuestas. Una ventaja adicional con el procedimiento que se propone en este trabajo es que la solución \mathbf{x}_{des} , para una calidad prefijada \mathbf{y}_{des} , se obtiene en el espacio de las variables originales y no en el espacio latente, aunque la relación entre predictoras y respuestas (espacio de proceso y de calidad) se ha construido utilizando modelos de variables latentes como PLS2.

El modelo PLS2 que se invierte puede incluir no solo las variables de entrada (medidas) relacionadas con el proceso, sino también sus productos cruzados (interacciones entre variables) o cualquier otra posible transformación necesaria para

modelar las no linealidades. En este caso, la matriz con las variables predictoras para ajustar el modelo PLS2 contendrá las columnas adicionales correspondientes a estas nuevas "variables" obtenidas a partir de las originales. En consecuencia, la inversión directa de las matrices no es posible, como se muestra en la Ref. [11], pero la solución obtenida con el enfoque computacional, x_{des} , es viable y siempre se obtiene en términos de las variables originales.

Las propiedades que se acaban de resumir pueden trasladarse directamente al laboratorio analítico, donde las "variables de proceso o de entrada" son las que afectan a la preparación de la muestra o a los factores instrumentales, mientras que las características de calidad están relacionadas con señales analíticas o figuras de mérito del procedimiento analítico en relación con su finalidad. En este contexto, se ha definido el término Calidad Analítica Diseñada (AQbD por sus siglas en inglés) haciendo referencia a la versión del concepto Calidad Diseñada (QbD en inglés) aplicada al desarrollo de un método analítico. La AQbD ha despertado un interés considerable, las Ref. [12,13] son revisiones destacables sobre estos temas. Este interés también aparece en revisiones sistemáticas de cromatografía, por ejemplo, 47 citas de las 158 referencias de la Ref. [14] están relacionadas con AQbD.

La idea principal en AQbD es desarrollar el método analítico de manera que se logre una calidad deseada. Esta calidad prevista se define como un "Perfil Analítico Objetivo" (ATP por sus siglas en inglés), en función de los denominados Parámetros de Control del Método (CMP por sus siglas en inglés). En analogía con QbD, se construye un modelo para predecir el ATP a partir de los CMP. La novedad en el presente trabajo es que, la inversión del modelo PLS2 ajustado dará los valores particulares de los CMP, x_{des} con la notación de los párrafos anteriores, para obtener un ATP preestablecido, es decir, un y_{des} predefinido.

Una revisión bibliográfica sobre el tema muestra algunos artículos [15,16] donde este enfoque de la AQbD se utiliza para optimizar figuras de mérito de los procedimientos analíticos, sin embargo, no se han encontrado referencias sobre la inversión de modelos PLS para esta tarea.

El procedimiento propuesto, en el presente trabajo, para garantizar un ATP mediante la inversión de un modelo PLS2 es un enfoque metodológico general, aunque se explica/aplica a la determinación de cinco bisfenoles mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada con un detector de diodos en serie (HPLC-DAD). La composición de la mezcla ternaria de la fase móvil (porcentajes de agua, metanol y acetonitrilo) junto con su flujo, son los CMP que se han tenido en cuenta. El ATP, por otro lado, está relacionado con las características analíticas que deseamos que tenga el cromatograma resultante. Está definido mediante seis respuestas: cuatro valores de la resolución entre picos cromatográficos consecutivos (R_{12} , R_{23} , R_{34} , R_{45}), el tiempo inicial (t_i) para evitar que el tiempo correspondiente al volumen muerto se solape con

el primer analito, y el tiempo final (t_f) con el objetivo de conseguir reducir el tiempo de análisis.

Para predecir simultáneamente las seis características que definen el ATP se ajusta un modelo PLS2 en función de los cuatro CMP (incluyendo también los cuadrados e interacciones entre algunos de ellos). PLS2 captura no solo la correlación entre los CMP del procedimiento analítico, sino también la correlación entre las características del cromatograma obtenido relacionadas con el ATP, modelando también la relación predictiva entre los CMP y el ATP.

Además de ser una aplicación general de la metodología propuesta, existen otras razones relevantes para la determinación de los bisfenoles. El carácter disruptor endocrino del bisfenol A (BPA), la alarma social que genera su uso, la progresiva sustitución por otros bisfenoles en la fabricación de productos de policarbonato de uso diario, y la atención prestada por los organismos reguladores, han generado la necesidad de poner a punto métodos rápidos y eficientes para la determinación simultánea de estos analitos.

En 1999, la Unión Europea aprobó una estrategia comunitaria para el control de los disruptores endocrinos [17], que incluía informes periódicos de la Comisión Europea sobre los avances realizados en los campos de la investigación, la cooperación internacional, la información pública y la adopción de medidas políticas adecuadas.

El primer informe de 2001 [18] contiene una lista provisional de sustancias, que ya incluía al BPA como disruptor endocrino potencial o efectivo (Categoría 1) y consideraba al bisfenol F (BPF) como sustancia con datos insuficientes. Posteriormente, el BPF fue clasificado como sustancia sin datos o con datos insuficientes sobre efectos disruptores endocrinos (Categoría 3a y 3b) [19].

Actualmente, existen normativas reguladoras sobre disruptores endocrinos en pesticidas, biocidas, productos sanitarios o agua. En particular, el BPA está sujeto a regulaciones específicas en juguetes [20], materiales en contacto con alimentos [21], papel térmico (por ejemplo, tickets) [22] y cosméticos [23]. De hecho, en 2019 la Comisión Europea [24] exigió la prohibición de bisfenoles en todos los materiales en contacto con alimentos, ampliando la prohibición que existía desde 2011 para el BPA en biberones de policarbonato [21]. Además, especificó que el BPA se está reemplazando con frecuencia por otros bisfenoles, y sugería que se debe suponer que las sustancias con una estructura química similar tienen propiedades toxicológicas tan nocivas como las de la sustancia más tóxica conocida del grupo. Hay varios estudios sobre los efectos perjudiciales de los compuestos que están sustituyendo al BPA [25-29]. Las alternativas incluyen bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF), bisfenol Z (BPZ) y bisfenol AF (BPAF), razón por la cual se han seleccionado estos bisfenoles para ser analizados en el presente trabajo.

En otra revisión bibliográfica, resumida en la Sección VII.6.5, se observó que la separación de estos cinco bisfenoles mediante HPLC-DAD generalmente se lleva a cabo en modo de elución gradiente y con mezclas binarias en la fase móvil, ya sea MeOH/H₂O o ACN/H₂O. En nuestro trabajo se explora una mezcla ternaria con ambos disolventes orgánicos, cuya composición, junto con el flujo de la fase móvil, constituyen los CMP seleccionados.

El capítulo está organizado de la siguiente manera. Los materiales y métodos analíticos se describen en la Sección VII.4. La Sección VII.5 detalla la selección del diseño experimental utilizado para obtener el conjunto de entrenamiento para el ajuste del modelo PLS2, y su inversión computacional que proporciona los CMP que garantizan un ATP definido por el analista cuando se determinan los cinco bisfenoles. Los resultados, la validación del método y su comparación con los datos ya publicados en la bibliografía consultada se muestran en la Sección VII.6.

VII.4. Material y métodos

VII.4.1. Reactivos químicos

El bisfenol A (n° CAS 80-05-7); el bisfenol F (bis(4-hydroxyphenyl)methane con n° CAS 620-92-8); y el bisfenol Z (4,4'-cyclohexylidenebisphenol con n° CAS 843-55-0) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El bisfenol AF (4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenol con n° CAS 1478-61-1) se compró a Alfa Aesar (Kandel, Alemania). El bisfenol S (bis(4-hydroxyphenyl)sulfone con n° CAS 80-09-1); y los disolventes acetonitrilo (n° CAS 75-05-8) y metanol (n° CAS 67-56-1), ambos de grado isocrático LiChrosolv[®] para cromatografía líquida, fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El agua desionizada se obtuvo con el sistema de purificación de agua Milli-Q Gradient A10 de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

VII.4.2. Instrumental

La determinación de los cinco bisfenoles, BPA, BPS, BPF, BPZ y BPAF, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo HPLC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EEUU) compuesto por una bomba cuaternaria (G1311C), un inyector (G1329B), un compartimento termostatzado para la columna (G1316A) y un detector de diodos en serie (G7117C). Para la separación se utilizó una columna Kinetex EVO-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm). Como fases móviles se utilizaron agua desionizada (disolvente A), metanol (disolvente B) y acetonitrilo (disolvente C).

Las condiciones para los análisis cromatográficos se programaron en modo de elución isocrático. La fase móvil consiste en diferentes proporciones de una mezcla de agua/metanol/acetonitrilo (Z₁:Z₂:Z₃, v/v) a diferentes flujos (U₄, mL min⁻¹),

dependiendo de las condiciones establecidas en el diseño experimental seguido, que se explica en la Sección VII.5.1. En todos los análisis, la temperatura del compartimento de la columna se fijó en 20°C y el volumen de inyección fue de 10 µL. El detector de diodos en serie se programó para medir la absorbancia a una longitud de onda de 225 nm.

VII.4.3. Disoluciones patrón y muestras

Las disoluciones madre individuales de 500 mg L⁻¹ se prepararon disolviendo cada reactivo en metanol. A partir de las disoluciones madre individuales se preparó una mezcla de 4 mg L⁻¹ de cada bisfenol mediante dilución con metanol para realizar los experimentos de acuerdo al diseño D-óptimo (Sección VII.5.1). Para construir las rectas de calibrado se prepararon, a partir de las disoluciones madre individuales y mediante dilución con metanol, los patrones de calibración que consistían en mezclas de los cinco bisfenoles a niveles de concentración entre 1 y 5 mg L⁻¹ de acuerdo a la Tabla VII.1. Todas las disoluciones se almacenaron protegidas de la luz a 4°C.

Tabla VII.1. Niveles de concentración (mg L⁻¹) de las mezclas patrón utilizadas para la construcción de las rectas de calibrado de los cinco bisfenoles.

Código	BPA	BPS	BPF	BPZ	BPAF
Patrón 1	1	2	3	4	5
Patrón 2	5	1	2	3	4
Patrón 3	4	5	1	2	3
Patrón 4	3	4	5	1	2
Patrón 5	2	3	4	5	1

VII.4.4. Software

Para la adquisición de datos se utilizó el software OpenLab CDS ChemStation. Los modelos PLS2 se ajustaron con PLS_Toolbox [30]. La inversión del modelo PLS2 y el frente Pareto óptimo se calcularon con programas escritos por nuestro grupo en MATLAB [31]. Los modelos de regresión se ajustaron y validaron utilizando STATGRAPHICS Centurion 18 [32]. El diseño experimental se seleccionó con NEMRODW [33] y la capacidad de detección (CC β) se calculó utilizando el programa DETARCHI [34].

VII.5. Procedimiento general

Establecido un ATP, todo el procedimiento realizado para obtener los CMP correspondientes consta de los siguientes pasos:

1. Elección del diseño experimental adecuado para obtener el conjunto de entrenamiento para el modelo PLS2. Incluye el establecimiento de los factores (CMP), su variación para definir el dominio experimental, un diseño experimental compuesto (mezcla-proceso) con restricciones y la definición precisa de las respuestas de interés, es decir, la definición del ATP.
2. Selección de condiciones experimentales óptimas. Incluye el ajuste e inversión de un modelo de regresión de predicción, modelo PLS2 en este caso, la obtención y exploración del frente Pareto para el ATP deseado y la selección final de un único conjunto de los CMP (las condiciones experimentales) para realizar la determinación cromatográfica.
3. Validación del método analítico con los CMP seleccionados. Incluye la validación experimental de las condiciones encontradas con el frente Pareto así como las figuras de mérito (exactitud, límite de decisión y capacidad de detección) del procedimiento analítico propuesto para determinar los cinco bisfenoles.

VII.5.1. Diseño de experimentos

Hay cuatro CMP (la composición ternaria de la fase móvil y su flujo), que se pueden cambiar y cuya variación modificará la calidad del cromatograma resultante.

Tres de estos factores definen la composición de la fase móvil, proporciones de agua (Z_1), metanol (Z_2) y acetonitrilo (Z_3), con algunas restricciones: la composición de agua en la mezcla debía estar entre 20 y 50%, y el metanol y el acetonitrilo no podían exceder el 70% en la mezcla. Las proporciones utilizadas se seleccionaron siguiendo un diseño de mezcla en un simplex restringido.

El cuarto factor, el flujo de la fase móvil, es un factor continuo que varió entre 0.6 y 1.0 mL min⁻¹. La Tabla VII.2 resume las condiciones para los cuatro factores y sus restricciones. Desde el punto de vista de la metodología de diseño de experimentos, (Z_1 , Z_2 , Z_3) constituyen los componentes de una mezcla (variando en el simplex restringido) y el factor U_4 es un factor continuo que se codifica en [-1, 1]. Como es habitual, X_4 se refiere a la variable codificada y U_4 al factor original.

Tabla VII.2. Los CMP (factores experimentales, o variables de proceso) y su variación.

Factor	Límite inferior	Límite superior	Centro	Paso de variación
Z_1 Agua	0.20	0.50		
Z_2 Metanol	0.00	0.70		
Z_3 Acetonitrilo	0.00	0.70		
U_4 Flujo (mL min ⁻¹)			0.80	0.20

Para tener un conjunto de entrenamiento "representativo" que cubra adecuadamente el dominio experimental, los experimentos realizados siguieron un diseño experimental. Como existen proporciones de una mezcla y un factor continuo, el diseño fue un diseño compuesto (con variables de mezcla y de proceso) en el dominio definido en la Tabla VII.2 y representado en la Figura VII.1, que consistía en el simplex restringido (para las mezclas) extendido a lo largo de los tres niveles considerados para el flujo.

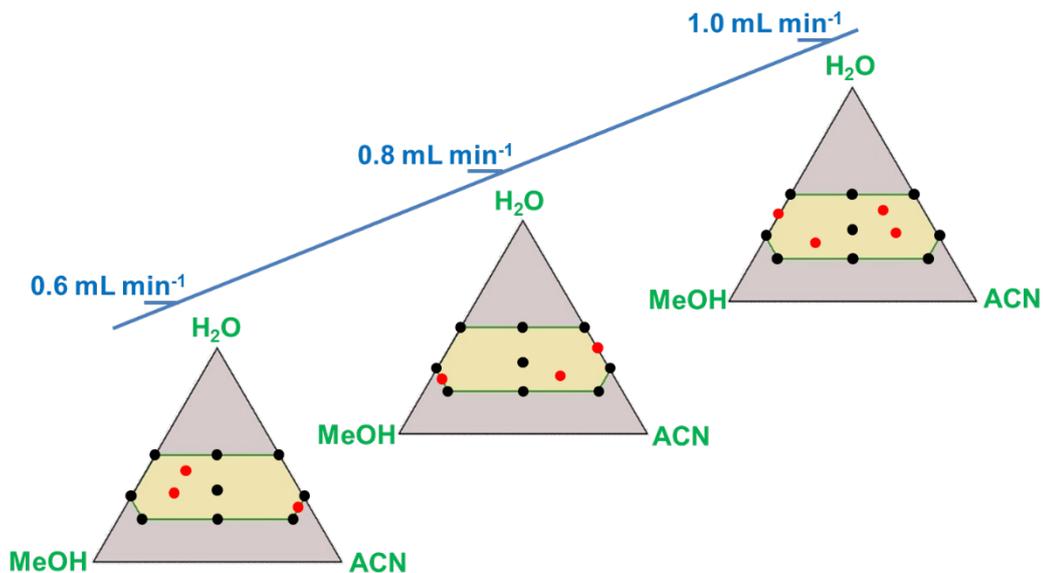


Figura VII.1. Dominio experimental para los parámetros de control del método. Para cada flujo de la fase móvil, se marca en amarillo el simplex restringido, superficie donde puede variar la composición de la mezcla ternaria. Los experimentos del diseño D-óptimo se muestran en negro y los 10 experimentos adicionales en rojo.

Finalmente, el modelo asumido para cada respuesta individual Y en el diseño multiplicativo de mezcla-proceso es cuadrático en la variable continua (flujo), de acuerdo con la Ecuación (VII.3).

$$Y = \gamma_0 + \gamma_4 X_4 + \gamma_{44} X_4^2 \quad (\text{VII.3})$$

donde cada γ_i representa también una dependencia cuadrática sobre la composición de la mezcla (Z_1, Z_2, Z_3). Por ejemplo, γ_4 en la Ecuación (VII.3) significa:

$$\gamma_4 = \beta_{41} Z_1 + \beta_{42} Z_2 + \beta_{43} Z_3 + \beta_{412} Z_1 Z_2 + \beta_{413} Z_1 Z_3 + \beta_{423} Z_2 Z_3 \quad (\text{VII.4})$$

Sustituyendo todos los términos en la Ecuación (VII.3), el modelo consta de 18 coeficientes para cada nivel de X_4 .

$$\begin{aligned}
 Y = & \beta_1 Z_1 + \beta_2 Z_2 + \beta_3 Z_3 + \beta_{12} Z_1 Z_2 + \beta_{13} Z_1 Z_3 + \beta_{23} Z_2 Z_3 \\
 & + \beta_{41} X_4 Z_1 + \beta_{42} X_4 Z_2 + \beta_{43} X_4 Z_3 + \beta_{412} X_4 Z_1 Z_2 \\
 & + \beta_{413} X_4 Z_1 Z_3 + \beta_{423} X_4 Z_2 Z_3 + \beta_{441} X_4^2 Z_1 + \beta_{442} X_4^2 Z_2 \\
 & + \beta_{443} X_4^2 Z_3 + \beta_{4412} X_4^2 Z_1 Z_2 + \beta_{4413} X_4^2 Z_1 Z_3 + \beta_{4423} X_4^2 Z_2 Z_3 \quad (\text{VII.5})
 \end{aligned}$$

El diseño experimental completo requeriría de 19 experimentos por cada nivel de flujo (X_4), lo que implicaría la necesidad de realizar 57 análisis cromatográficos porque el flujo se estableció a tres niveles, esto suponía un número elevado de análisis. Con el objetivo de reducir la cantidad de disolventes (reduciendo también el impacto en el medio ambiente y el tiempo de análisis), se seleccionó un subconjunto de experimentos, pero sin perder la calidad de la información extraída de los experimentos. Aplicando el criterio D-óptimo [35], los 19 experimentos en cada nivel de flujo se redujeron a 9 por nivel, manteniendo buenas propiedades de fiabilidad, porque el máximo de la función de varianza en el dominio experimental se mantuvo en 0.8. Estos 27 experimentos son los que se encuentran representados en negro en la Figura VII.1.

Ya se ha destacado la importancia de explorar el efecto de las mezclas ternarias en la fase móvil. Con ese propósito, se agregaron diez experimentos (en rojo en la Figura VII.1) dentro del dominio experimental con la condición de estar lo más alejados de los que ya formaban parte del diseño. Se distribuyeron en los tres niveles de flujo de la fase móvil, ocho con una fase móvil ternaria y los otros dos, mezclas binarias en algún punto medio lateral del simplex reducido. Finalmente, se incluyeron dos réplicas adicionales en el centroide del simplex para cada flujo. Por lo tanto, la matriz X contenía 43 filas (27+10+6 análisis cromatográficos) y 4 columnas correspondientes a sus valores de CMP.

Después de registrar cada cromatograma, se determinaron las seis características relacionadas con el ATP, que fueron la resolución entre picos consecutivos, R_{12} , R_{23} , R_{34} y R_{45} , el tiempo inicial, t_i , y el tiempo total (final), t_f , ambos en minutos. La resolución $R_{i,i+1}$ entre los picos cromatográficos consecutivos, el i -ésimo y el $(i+1)$ -ésimo, se calculó mediante la Ecuación (VII.6).

$$R_{i,i+1} = \frac{2.35(t_{R,i+1} - t_{R,i})}{2(w_{0.5,i+1} + w_{0.5,i})} \quad (\text{VII.6})$$

donde $t_{R,i}$ es el tiempo de retención y $w_{0.5,i}$ es el ancho a la mitad de la altura del i -ésimo pico cromatográfico.

VII.5.2. Selección de condiciones experimentales

Con la notación establecida en la introducción (Sección VII.3), \mathbf{X} era la matriz que contenía los valores de los CMP correspondientes a las 43 condiciones experimentales seleccionadas con el diseño experimental, mientras que \mathbf{Y} era la matriz que contenía los seis valores relacionados con el ATP calculados a partir de los cromatogramas correspondientes. Suponiendo que \mathbf{X} está libre de ruido, el procedimiento habitual en diseño de experimentos es ajustar modelos de regresión multilineal (MLR) individuales para cada respuesta. Aunque los factores en el presente trabajo estaban controlados, y se suponía que al menos la variabilidad en \mathbf{X} era insignificante en comparación con la de \mathbf{Y} , se esperaba que la correlación entre las respuestas fuese alta. Por lo tanto, en este trabajo, para manejar esta correlación mientras se ajustaban las seis respuestas a la vez, se construyó un solo modelo PLS2.

Hay que tener en cuenta que el modelo PLS2 propuesto incluía además de los términos lineales relacionados con las columnas que ya estaban en \mathbf{X} , otros términos, es decir, el modelo PLS2 no dependía exclusivamente de las variables Z_1, Z_2, Z_3 y X_4 (factores principales, los que se pueden modificar dentro del dominio experimental) sino también de varios términos cruzados diferentes. Esto es así porque se esperaban interacciones entre factores, no solo entre las variables de mezcla sino también entre la composición de la mezcla y el flujo de la fase móvil, además de posibles efectos cuadráticos entre todos los factores del diseño. Estas interacciones y efectos no lineales se ven reflejados en el modelo que se iba a ajustar con PLS2. El modelo con dieciséis coeficientes está definido en la Ecuación (VII.7).

$$\begin{aligned} Y = & \beta_1 Z_1 + \beta_2 Z_2 + \beta_3 Z_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} Z_1 Z_2 + \beta_{13} Z_1 Z_3 + \beta_{23} Z_2 Z_3 \\ & + \beta_{41} X_4 Z_1 + \beta_{42} X_4 Z_2 + \beta_{43} X_4 Z_3 + \beta_{412} X_4 Z_1 Z_2 + \beta_{413} X_4 Z_1 Z_3 \\ & + \beta_{423} X_4 Z_2 Z_3 + \beta_{441} X_4^2 Z_1 + \beta_{442} X_4^2 Z_2 + \beta_{443} X_4^2 Z_3 \end{aligned} \quad (\text{VII.7})$$

Esto significa que la matriz \mathbf{X} con los CMP no era la matriz de datos real utilizada para ajustar el modelo. Por el contrario, cada fila \mathbf{x}^T debía "expandirse" en un nuevo vector expandido \mathbf{x}_E (de dimensión superior) siguiendo los términos del modelo a ajustar, similarmente a cuando se construye la matriz del modelo a partir de la matriz de diseño. Por tanto, el nuevo vector expandido \mathbf{x}_E constaba de 16 coordenadas como se expresa en la Ecuación (VII.8).

$$\begin{aligned} \mathbf{x}^T &= (z_1, z_2, z_3, x_4) \\ \mathbf{x}_E^T &= (z_1, z_2, z_3, x_4, z_1 z_2, z_1 z_3, z_2 z_3, x_4 z_1, x_4 z_2, x_4 z_3, x_4 z_1 z_2, x_4 z_1 z_3, \\ &\quad x_4 z_2 z_3, x_4^2 z_1, x_4^2 z_2, x_4^2 z_3) \end{aligned} \quad (\text{VII.8})$$

Para evitar malinterpretaciones en la nomenclatura, el conjunto de entrenamiento para ajustar el modelo PLS2 se denotará como \mathbf{X}_E , lo que refleja el hecho de que \mathbf{X} se expande a \mathbf{X}_E , porque el modelo de hecho se construyó con los vectores de dimensión 16 de \mathbf{X}_E , que se proyectaban en un espacio latente de menor dimensión para predecir \mathbf{Y} .

Se definió L para describir el modelo ajustado a partir de los datos \mathbf{X} - \mathbf{Y} en función de \mathbf{u} , de modo que $\hat{\mathbf{y}} = L(\mathbf{u})$ era la respuesta predicha (un vector de dimensión seis) para una \mathbf{u} de dimensión cuatro en el dominio experimental de la Figura VII.1.

Para aplicar L , cada \mathbf{u} se codificó para obtener \mathbf{x} y expandirse al correspondiente vector \mathbf{x}_E de dimensión 16 como en la Ecuación (VII.8). Después, se escaló de acuerdo con el pretratamiento utilizado al ajustar el modelo PLS2. Posteriormente, como es habitual, se descartaron los vectores resultantes \mathbf{x}_S con valores de los estadísticos Q o T^2 mayores que los correspondientes límites de confianza al 95%.

En adelante, un punto "válido" será cualquier $\mathbf{u} = (z_1, z_2, z_3, x_4)$ de dimensión cuatro para el que el \mathbf{x}_S resultante cumpla con todas las restricciones para aplicar el modelo. El dominio estaba en cuatro dimensiones, el modelo se ajustó en 16 dimensiones, por lo que no se pudo aplicar el método común de inversión para los modelos de variables latentes [3-6,36].

Sin embargo, existe una alternativa [10] que, guiada por un algoritmo evolutivo, funciona moviendo los puntos dentro del dominio experimental (el dominio experimental de cuatro dimensiones de los CMP "válidos") para que los valores predichos de las respuestas estén cada vez más cerca del valor objetivo, \mathbf{y}_{des} , vector ideal con las características deseadas para el cromatograma.

Con este enfoque, la inversión del modelo PLS2 se abordó como un problema de optimización multiobjetivo o multirrespuesta. La característica más distintiva entre optimizar una sola respuesta o múltiples objetivos a la vez es que, por lo general, en este último caso no existe una única solución que cumpla con todos los requisitos simultáneamente, ya que obviamente factores del método que van bien a una respuesta no tienen por qué ser buenos para otra.

Una situación de compromiso entre todas las respuestas puede definirse en forma de soluciones óptimas Pareto, es decir, aquellas que no se pueden mejorar en una respuesta sin empeorar en otra. Estas soluciones constituyen el llamado frente Pareto, que se reduce a un solo punto si no hay conflicto entre las respuestas.

En un pseudocódigo, buscar el frente Pareto para las seis respuestas consiste en los siguientes pasos:

- a) Comenzar con una población de 'ps' puntos válidos (vectores \mathbf{u} de dimensión cuatro que cumplan con las restricciones).
- b) Calcular $\hat{\mathbf{y}} = L(\mathbf{u})$.
- c) Determinar la función de ajuste, definida como el vector de dimensión seis del valor absoluto de las diferencias individuales entre los valores predichos y los objetivos.
- d) Aplicar operadores de selección, cruce y mutación del algoritmo genético para construir 'ps' nuevos CMP válidos, los cuales también se evalúan en términos de la función de ajuste descrita en c).
- e) Combinar las poblaciones antiguas y nuevas.
- f) Organizar los miembros de la población ampliada de acuerdo con el orden Pareto para vectores multidimensionales [37] y seleccionar las soluciones no dominadas como supervivientes para la siguiente generación. Si hay más de 'ps' puntos, seleccionar aquellos con mayor dispersión a lo largo del frente de acuerdo con la distancia de Crowding [38].
- g) Repetir a)-f) para un número determinado de generaciones.

La población final está compuesta por conjuntos de los CMP que se espera que proporcionen el valor más cercano al deseado en al menos una de las respuestas, y lo que es más interesante, la estimación del frente Pareto describe la compensación o compromisos necesarios entre las seis respuestas que se están manejando. De este modo, se utiliza para decidir las condiciones experimentales necesarias para realizar la determinación de los bisfenoles.

VII.6. Resultados y discusión

VII.6.1. Datos experimentales

Una vez realizados los 43 experimentos, la matriz \mathbf{Y} recogía los valores de las respuestas calculadas a partir de los cromatogramas obtenidos. Como se ha anticipado y se puede observar en los coeficientes de correlación de estas variables mostrados en la Tabla VII.3, estaban muy correlacionadas. Las tres primeras respuestas (resolución de los picos R_{12} , R_{23} , R_{34}) estaban altamente correlacionadas positivamente entre ellas, pero con correlación negativa alta con la resolución R_{45} . Esta resolución también se comportaba de manera opuesta al compararla con el tiempo, tanto el inicial como el final, que a su vez se correlacionaban positivamente entre sí.

Tabla VII.3. Matriz de correlaciones de las variables ATP, Y .

	R_{12}	R_{23}	R_{34}	R_{45}	t_i
R_{23}	0.9607				
R_{34}	0.9497	0.9874			
R_{45}	-0.6376	-0.7013	-0.7605		
t_i	0.5152	0.4919	0.5050	-0.3764	
t_f	0.8400	0.8117	0.8456	-0.7173	0.5765

No está recogido en la tabla, pero también existía correlación entre los CMP, aunque se había diseñado la distribución de sus valores. Como era de esperar, las correlaciones más bajas se encontraron entre el flujo X_4 y las proporciones de la mezcla ternaria de la fase móvil (Z_1, Z_2, Z_3), pero existía una correlación alta (-0.899) entre Z_2 y Z_3 . Para tener en cuenta todas estas correlaciones, esperadas en el contexto de AQbD, se ajustó un modelo PLS2. Además, si se tienen en cuenta las dieciséis variables que realmente se utilizaron para ajustar el modelo PLS2 (columnas de X_E), había 120 coeficientes de correlación, 59 de ellos eran significativamente no nulos (nivel de significación del 5%) y de estos, 40 fueron superiores a 0.8 en valor absoluto.

VII.6.2. Modelo PLS2

A continuación, se ajustó un modelo PLS2 con variables predictoras X_E (43×16) y respuestas Y (43×6) autoescaladas. Las respuestas R_{45} y t_f tuvieron que transformarse (con una transformación monótona) para obtener un mejor ajuste. La transformación realizada fue $Y_4 = 2^{R_{45}}$ y $Y_6 = \log_{10}(t_f)$. Con estas seis respuestas se seleccionaron siete variables latentes, con las características que se muestran en la Tabla VII.4. Las siete variables latentes explicaron en gran medida los datos del conjunto de entrenamiento, 99.53% en el espacio de las predictoras X_E y 96.97% de la varianza total en las respuestas (Y).

Las seis respuestas estaban bien ajustadas, excepto Y_4 , como puede observarse en la Tabla VII.5 que contiene los coeficientes de determinación en ajuste y en predicción, estimado este último por validación cruzada empleando ventanas venecianas con diez divisiones. La similitud de la varianza explicada tanto en ajuste como en predicción indica modelos altamente predictivos, excepto nuevamente para Y_4 para la cual se observan diferencias mayores.

Para corroborar la elección de estos modelos se realizaron test de permutación para validar el modelo de siete variables latentes. En términos generales, consisten en ajustar modelos PLS2 a permutaciones aleatorias de los valores reales de respuesta. Si no hay diferencias significativas entre el modelo que predice la Y "verdadera" y los que predicen "cualesquiera otros" valores permutados para el mismo X_E , sería una

indicación de la inadecuación del modelo PLS2 ajustado originalmente. Para las seis respuestas que se disponían, con 50 iteraciones, la probabilidad de significación del modelo frente a la significación con las muestras permutadas era menor que $5 \cdot 10^{-3}$, es decir, el modelo ajustado con siete variables latentes es correcto.

Tabla VII.4. Varianza explicada por variables predictoras \mathbf{X}_E y respuestas \mathbf{Y} al agregar variables latentes en el modelo PLS2.

Número	Varianza explicada en \mathbf{X}_E (%)	Varianza acumulada explicada en \mathbf{X}_E (%)	Varianza explicada en \mathbf{Y} (%)	Varianza acumulada explicada en \mathbf{Y} (%)
1	41.91	41.91	43.93	43.93
2	30.72	72.63	17.17	61.10
3	17.21	89.84	12.92	74.02
4	7.30	97.14	7.09	81.11
5	1.41	98.55	3.96	85.07
6	0.35	98.90	9.09	94.16
7	0.63	99.53	2.81	96.97

Tabla VII.5. Coeficiente de determinación en ajuste y en predicción (estimado por validación cruzada) para las seis respuestas ajustadas con PLS2.

	$Y_1 = R_{12}$	$Y_2 = R_{23}$	$Y_3 = R_{34}$	$Y_4 = 2^{R_{45}}$	$Y_5 = t_i$	$Y_6 = \log_{10}(t_f)$
R^2 (%)	98.04	98.75	98.56	91.93	95.50	99.00
R^2_{pred} (%)	96.73	97.41	96.21	81.60	92.26	97.17

VII.6.3. Inversión del modelo PLS2 para obtener los CMP para un ATP deseado

Después de la validación, se disponía de un modelo PLS2 con siete variables latentes, que dependía de dieciséis variables de entrada para predecir seis respuestas. Este fue el modelo utilizado para explorar la disponibilidad de condiciones experimentales para que el cromatograma obtenido tuviese una resolución entre picos consecutivos de 1.1, con un tiempo inicial de 2 minutos y un tiempo final de 4 minutos. Teniendo en cuenta las respuestas que necesitaban ser transformadas, el vector objetivo (ATP) fue:

$$\mathbf{y}_{\text{des}} = (1.1, 1.1, 1.1, 2^{1.1}, 2.0, \log_{10}(4.0))^T \quad (\text{VII.9})$$

En consecuencia, la función de ajuste (fitness) a minimizar era:

$$\text{fitness}(\mathbf{u}) = (|\hat{y}_1 - 1.1|, |\hat{y}_2 - 1.1|, |\hat{y}_3 - 1.1|, |\hat{y}_4 - 2^{1.1}|, |\hat{y}_5 - 2.0|, |\hat{y}_6 - \log_{10}(4.0)|)^T \quad (\text{VII.10})$$

Si existiera uno de esos cromatogramas, la función "fitness" (de ajuste de las condiciones experimentales correspondientes que mediría la bondad del cromatograma) sería el vector nulo. Este no es el caso aquí, como se ha anticipado debido a las altas correlaciones en \mathbf{Y} (Tabla VII.3).

Con una selección uniforme de individuos $p_s = 50$, cruce uniforme en un solo punto y probabilidad de mutación de 0.1, la población evolucionó durante 500 generaciones. De la población final, 45 vectores constituyeron la estimación del frente Pareto cuando se había intentado alcanzar \mathbf{y}_{des} para estas seis respuestas.

El hecho de que el frente no se reduzca a un solo punto es un indicador del comportamiento conflictivo de las respuestas, que también se observa en la última fila de la Tabla VII.6 que contiene los mínimos individuales de la función de ajuste de entre estos 45 vectores. De acuerdo a la Ecuación (VII.10), se mide la magnitud de cada diferencia individual, de modo que el valor deseado para una respuesta se obtiene cuando el ajuste es igual a cero.

Así bien, el valor mínimo fue cero en todas las respuestas, excepto en R_{34} , por lo que el objetivo perseguido se consiguió en todas las respuestas menos una, aunque no simultáneamente. Esto queda más claro observando las filas restantes de la Tabla VII.6, que muestran las soluciones que alcanzan el correspondiente mínimo de ajuste para cada respuesta individual. Las primeras cuatro columnas corresponden a las condiciones experimentales. Para facilitar la interpretación, en lugar de escribir los valores de ajuste de las soluciones (que solo proporcionan información sobre la dificultad de alcanzar \mathbf{y}_{des}), las últimas seis columnas de la Tabla VII.6 muestran las respuestas predichas en la escala original tras "deshacer" las transformaciones aplicadas en las respuestas R_{45} y t_f .

Por lo tanto, la primera fila significa que con una mezcla de 32% de agua, 14% de metanol y 54% de acetonitrilo, y un flujo de 0.61 mL min^{-1} , se consigue el valor deseado para $R_{12} = 1.1$, siendo el resto de valores de resolución entre picos contiguos al menos 2.28, con 2.2 minutos de tiempo inicial y 4.5 minutos de tiempo final.

La segunda fila describe que al disminuir Z_2 y aumentar tanto Z_3 como U_4 , se obtienen $R_{23} = 1.14$ y $R_{34} = 2.25$, como valores más cercanos a 1.1. Además, en estas condiciones, la resolución entre los dos primeros picos, R_{12} , es prácticamente nula, lo cual no es admisible. Entre el tiempo final y el inicial hay una diferencia de menos de un minuto, siendo este último menor que 2 min, valor que tampoco se admite.

Tabla VII.6. Condiciones experimentales para alcanzar al menos uno de los valores de respuesta deseados, con sus valores predichos (en la escala original de los factores y de todas las respuestas).

Z ₁ (H ₂ O)	Z ₂ (MeOH)	Z ₃ (ACN)	U ₄ (mL min ⁻¹)	R ₁₂	R ₂₃	R ₃₄	R ₄₅	t _i (min)	t _f (min)
0.32	0.14	0.54	0.61	1.10*	2.28	4.15	3.08	2.21	4.51
0.33	0.03	0.64	0.95	0.05	1.14*	2.25*	2.85	1.32	2.28
0.50	0.49	0.01	0.87	10.00	12.49	27.58	1.11*	2.41	59.07
0.41	0.06	0.53	0.74	1.98	3.99	7.74	2.70	2.00*	4.95
0.28	0.18	0.54	0.63	0.76	1.74	2.98	3.11	2.15	4.01*
* Valor mínimo de la función de ajuste				2.5 10 ⁻⁵	4.4 10 ⁻⁴	1.15	8.2 10 ⁻⁵	4.6 10 ⁻⁶	1.4 10 ⁻⁴

En la tercera fila se muestra que, casi sin acetonitrilo (Z₃) y flujo de 0.87 mL min⁻¹, el valor deseado de 1.1 para R₄₅ (la resolución entre el cuarto y quinto picos) supone terminar el experimento en más de 59 minutos y, además, los valores de las tres primeras respuestas están muy lejos de sus valores deseados.

En las dos últimas filas, con 41% de agua (Z₁) y 6% de metanol (Z₂), se obtiene el t_i igual a 2.0 min que fue el valor deseado, mientras que para obtener t_f igual a 4.0 min se requiere aumentar Z₂ y disminuir Z₁, aunque en ese caso, R₁₂ no es admisible.

Aunque el análisis anterior se reduce a los puntos extremos del frente (el mejor valor posible para cada respuesta individual), sirvió para ilustrar el comportamiento conflictivo entre las respuestas e introduce la utilidad de explorar el frente Pareto. La conclusión hasta ahora es que no se puede obtener el cromatograma ideal tal y como se define en el ATP, por lo que se necesita una situación de compromiso para seleccionar las condiciones experimentales para la determinación de los bisfenoles. Esta situación de compromiso es más fácil de conseguir conociendo el conflicto existente entre las respuestas y las soluciones factibles proporcionadas por el frente Pareto.

Para analizar esta cuestión, y con la intención de simplificar la selección, se descartaron todas las soluciones con cualquier resolución menor que 1.0, tiempo inicial menor que 1.7 minutos o tiempo final mayor que 5.5 minutos. La Figura VII.2 muestra las soluciones restantes en forma de un gráfico de coordenadas paralelas, primero las condiciones experimentales y después las respuestas predichas.

En el gráfico, el valor de cada coordenada se dibuja respecto a su posición en el vector, de modo que cada línea quebrada en el gráfico representa un solo vector. Además, las diferentes escalas originales dificultan el seguimiento de los vectores, por lo que los valores se han escalado a un rango común. Como referencia, los valores mínimo y máximo de cada coordenada se encuentran en la parte inferior y superior de la línea vertical correspondiente.

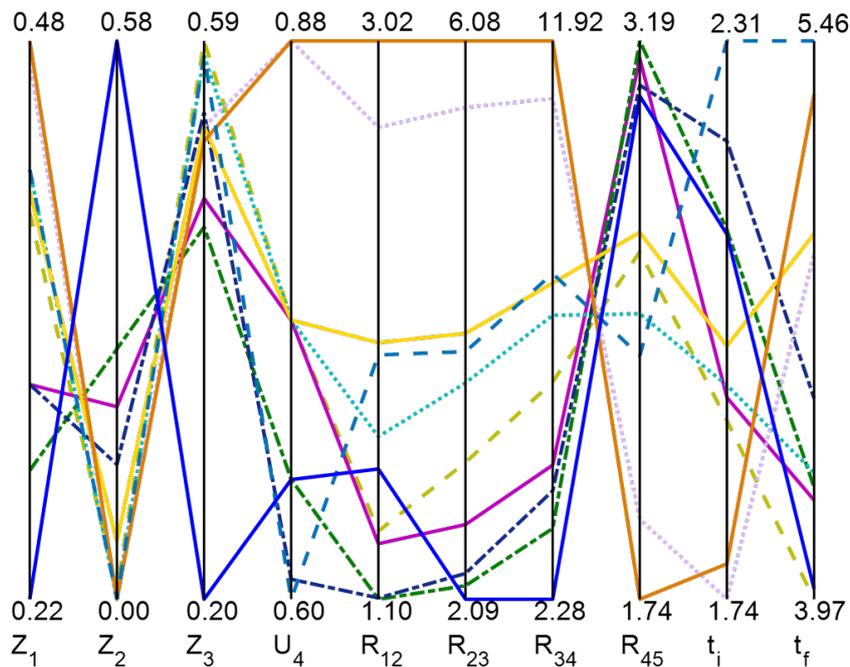


Figura VII.2. Gráfico de coordenadas paralelas del frente Pareto reducido, condiciones experimentales en las primeras cuatro coordenadas y respuestas predichas en las últimas seis coordenadas. Todos los valores están escalados en un mismo rango, mostrándose los mínimos y máximos individuales de cada coordenada en la parte inferior y superior, respectivamente.

El comportamiento conflictivo ya mencionado también se observa en el gráfico: las tres primeras resoluciones R_{12} , R_{23} , R_{34} (resolución entre los cuatro primeros picos contiguos) aumentan o disminuyen simultáneamente, aunque en diferente proporción. Sin embargo, es evidente que su comportamiento se opone al de la resolución entre el pico cuarto y quinto, R_{45} , que a su vez, también se opone al tiempo inicial t_i . El tiempo final t_f y el tiempo inicial también se comportan de manera opuesta; lo que aparentemente se contradice con su correlación positiva observada en la Tabla VII.3. La razón es que el coeficiente de correlación en la Tabla VII.3 (para los datos de entrenamiento) significa que, en general, el cromatograma necesita más tiempo para terminar si comienza más tarde. El comportamiento observado en las soluciones del frente Pareto lo que señala es que intentar aumentar el tiempo inicial es un objetivo que se opone al objetivo de reducir el tiempo final.

Entre las soluciones representadas en la Figura VII.2, el interés recae en aquellas que cumplen con los criterios. Entre ellas, las condiciones elegidas, línea azul continua, corresponden al experimento más corto con un tiempo final de cuatro minutos y más de dos minutos para el tiempo inicial.

En resumen, las condiciones experimentales óptimas para la determinación cromatográfica de los cinco bisfenoles fueron 22% de agua, mezclada con 58% de metanol y 20% de acetonitrilo, manteniendo el flujo en 0.66 mL min^{-1} .

La Figura VII.3a muestra un cromatograma obtenido con diferentes parámetros de control del método (CMP seleccionados). Para señalar la mejora obtenida con el procedimiento propuesto, la Figura VII.3b presenta tres picos solapados cuando el cromatograma se obtiene con una fase móvil que consiste en una mezcla binaria (30% de agua, 70% de acetonitrilo) y un flujo de 0.8 mL min^{-1} . Con el mismo flujo, en la Figura VII.3c los dos primeros picos se mantienen solapados aunque se utiliza una mezcla ternaria.

VII.6.4. Verificación experimental de los CMP obtenidos

Una vez seleccionados, a partir de la inversión del modelo, los parámetros de control del método (condiciones experimentales para la mezcla ternaria y flujo de la fase móvil), se realizaron en estas condiciones diez determinaciones de una mezcla que contenía 4 mg L^{-1} de cada bisfenol.

La media de los correspondientes tiempos de retención (en minutos) de los cinco bisfenoles, obtenida a partir de las diez determinaciones, fue 2.182 para BPS, 2.456 para BPF, 2.769 para BPA, 3.256 para BPAF y 3.784 para BPZ.

Para cada una de las seis características del ATP, en la Tabla VII.7 se muestran la media y los intervalos de confianza al 95%. Comparando los obtenidos a partir de los valores predichos después de la inversión del modelo PLS2 y los calculados a partir de los diez experimentos realizados, se observa que los datos obtenidos con los cromatogramas experimentales están incluidos en los intervalos de confianza calculados con el modelo PLS2, excepto para la resolución entre el cuarto y quinto pico del cromatograma, R_{45} , que era la respuesta peor ajustada por el modelo.

Después de confirmar experimentalmente que los CMP calculados proporcionan el ATP esperado, el procedimiento analítico se validó en términos de veracidad, límite de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$) fijando los riesgos de falso positivo y falso negativo. El límite de decisión se describe como "el valor de la concentración neta cuyo exceso conduce, para una probabilidad α , a la decisión de que la concentración del analito en el material analizado es mayor que la del blanco" [39,40]. Siendo la capacidad de detección, cuando se ha fijado α , "la verdadera concentración neta del analito en el material a analizar, que conducirá, con probabilidad $1-\beta$, a la conclusión correcta de que la concentración en el material analizado es mayor que la del blanco".

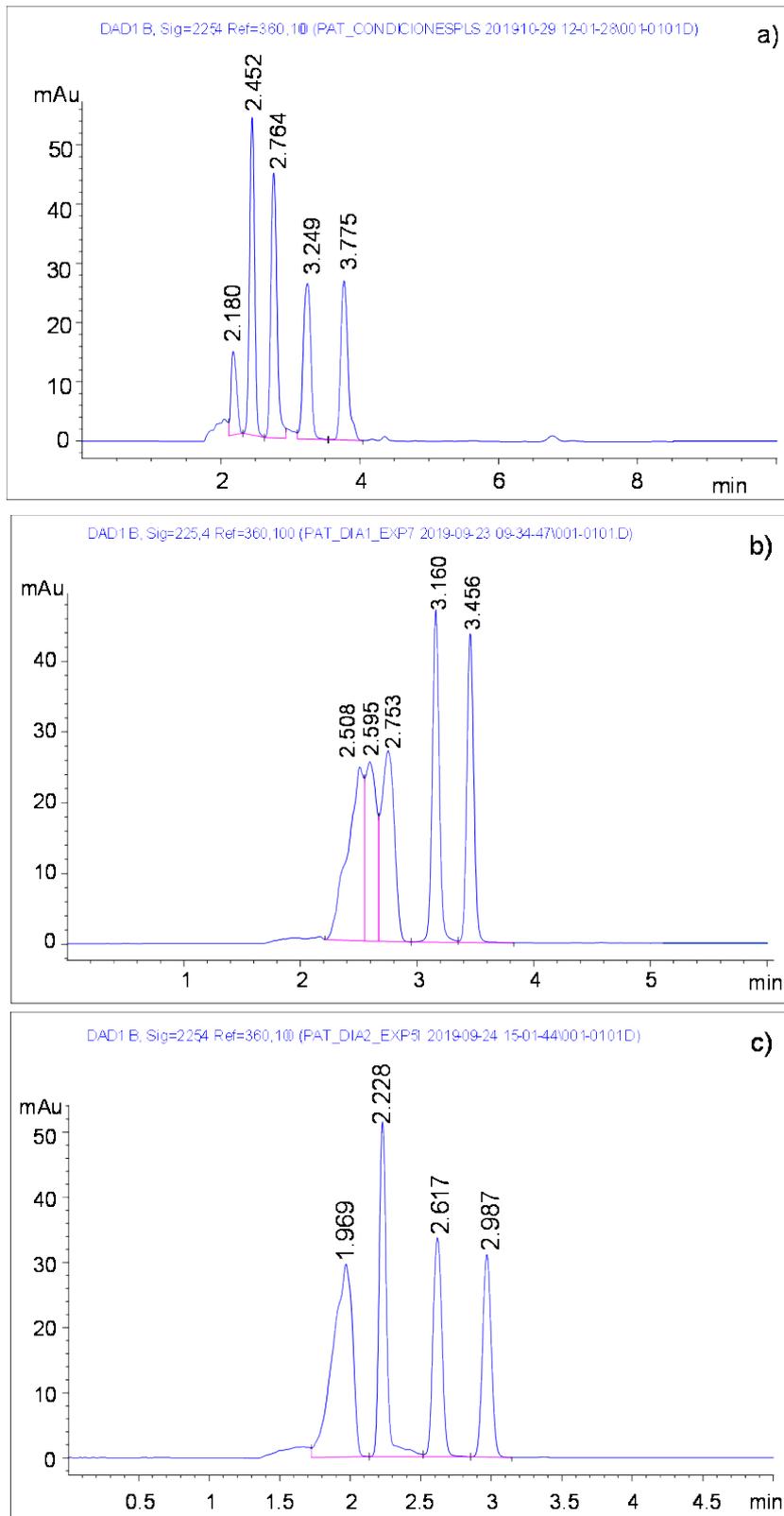


Figura VII.3. Cromatogramas obtenidos con diferentes parámetros de control del método: a) los seleccionados con el procedimiento propuesto; b) 0.8 mL min^{-1} de flujo con una mezcla binaria de agua y acetonitrilo; c) mismo flujo y una mezcla ternaria de agua, metanol y acetonitrilo.

Tabla VII.7. Intervalos de confianza al 95% para la media de los seis ATP, a) datos teóricos a partir de la inversión del modelo PLS2 y b) datos experimentales del análisis (HPLC-DAD).

	R ₁₂	R ₂₃	R ₃₄	R ₄₅	t _i	t _f
a) Límite inferior	1.015	1.498	0.701	2.823	1.974	3.074
Media	1.545	2.093	2.280	3.047	2.114	3.999
Límite superior	2.074	2.688	3.858	3.241	2.254	4.698
b) Límite inferior	1.870	2.121	2.638	2.670	2.099	4.055
Media	1.876	2.125	2.645	2.677	2.105	4.063
Límite superior	1.882	2.129	2.652	2.684	2.111	4.070

Para la validación, se ajustó una recta de calibración para cada bisfenol con los datos obtenidos para seis disoluciones patrón en el rango de 0 a 5 mg L⁻¹ (ver Tabla VII.1 en la Sección VII.4.3). Después se construyeron las rectas de exactitud (concentración predicha *versus* concentración real) y se utilizaron para calcular el límite de decisión (CC α) y la capacidad de detección (CC β), fijando las probabilidades de falso positivo y de falso negativo en 0.05.

La Tabla VII.8 muestra los parámetros de las rectas de calibrado y exactitud, así como CC α y CC β para los cinco bisfenoles. Los p-valores de la fila 6 corresponden al test de significación de la recta de regresión correspondiente (con hipótesis nula, H₀: El modelo no explica la variabilidad de la respuesta). Como todos son menores que 10⁻⁴, la conclusión es que todos los modelos de regresión son significativos (al nivel de significación del 5%).

La propiedad de veracidad se ha evaluado calculando la elipse de confianza conjunta al 95% para contrastar que el término independiente era igual a 0 y la pendiente igual a 1 en cada recta de exactitud. Las cinco elipses representadas en la Figura VII.4 contienen el punto (0, 1). Por tanto, el método es veraz para los cinco bisfenoles. Los valores de CC α y CC β calculados a partir de las rectas de exactitud figuran en la Tabla VII.8. Lo que permite concluir que, con probabilidades de falso positivo (α) y falso negativo (β) igual a 0.05, el procedimiento analítico permite determinar 0.424 mg L⁻¹ de BPA, 0.596 mg L⁻¹ de BPS, 0.334 mg L⁻¹ de BPF, 1.156 mg L⁻¹ de BPZ y 0.458 mg L⁻¹ de BPAF.

Tabla VII.8. Validación del método analítico. Parámetros de las rectas de calibrado y exactitud (s_{yx} es la desviación estándar de la regresión). Límite de decisión y capacidad de detección para $\alpha = \beta = 0.05$.

	BPA	BPS	BPF	BPZ	BPAF
Recta de calibrado					
Término independiente	36.946	0.368	-1.069	-0.007	-0.735
Pendiente	55.768	19.644	61.757	41.228	48.886
Coficiente de correlación	0.997	0.995	0.998	0.981	0.997
s_{yx}	7.652	3.785	6.662	15.411	7.233
P-valor (significación de la regresión)	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
Recta de exactitud					
Término independiente	$-2.14 \cdot 10^{-5}$	$4.76 \cdot 10^{-6}$	$9.52 \cdot 10^{-6}$	$1.19 \cdot 10^{-5}$	$-2.38 \cdot 10^{-6}$
Pendiente	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
s_{yx}	0.137	0.193	0.108	0.374	0.148
$CC\alpha$ (mg L ⁻¹)	0.217	0.305	0.171	0.591	0.234
$CC\beta$ (mg L ⁻¹)	0.424	0.596	0.334	1.156	0.458

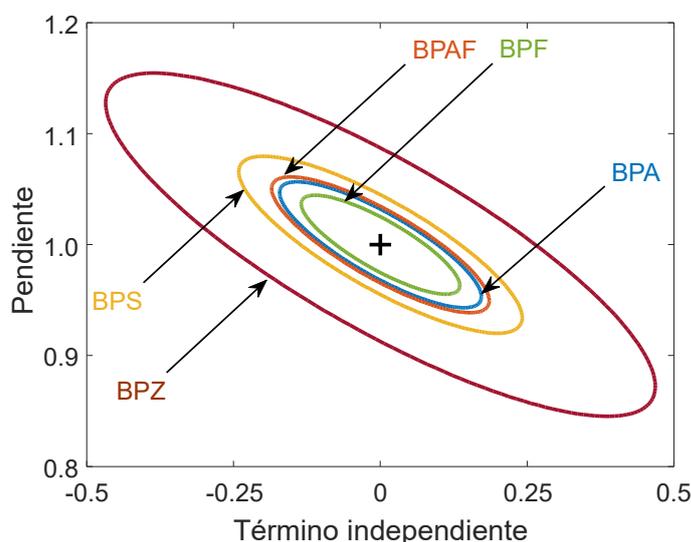


Figura VII.4. Región de confianza conjunta al 95% para el término independiente y la pendiente de las rectas de exactitud. BPA en azul, BPAF en marrón, BPF en verde, BPS en amarillo y BPZ en marrón oscuro. El símbolo + indica las coordenadas (0, 1).

VII.6.5. Análisis comparativo

El procedimiento validado representa una ventaja en comparación con trabajos similares. Esta afirmación se evidencia a la vista de los resultados recogidos en la Tabla VII.9, que muestra los 29 artículos revisados, todos ellos publicados en los 10 últimos años, en la búsqueda bibliográfica realizada incluyendo entre las palabras clave bisfenoles y HPLC-DAD. A excepción de dos trabajos (el codificado como número 19 y el presente trabajo, que se encuentra en la última fila de la Tabla VII.9), todos utilizaron mezclas binarias en la fase móvil: MeOH/H₂O en 11 trabajos, ACN/H₂O en los 17 restantes. Sobre el modo de elución, la mayoría de ellos (23 de 29) utilizaron gradiente, sólo en seis de los artículos se utilizó el modo de elución isocrático.

Finalmente, la Figura VII.5 muestra los tiempos de retención de BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ obtenidos en los 29 artículos publicados junto con los conseguidos en el presente capítulo. Los trabajos se identifican con el número de la fila que ocupan en la Tabla VII.9. En el presente trabajo, última posición (número 30), el cromatograma se registra en solo 4.06 min (tiempo total), el más corto de entre todos los representados en la Figura VII.5.

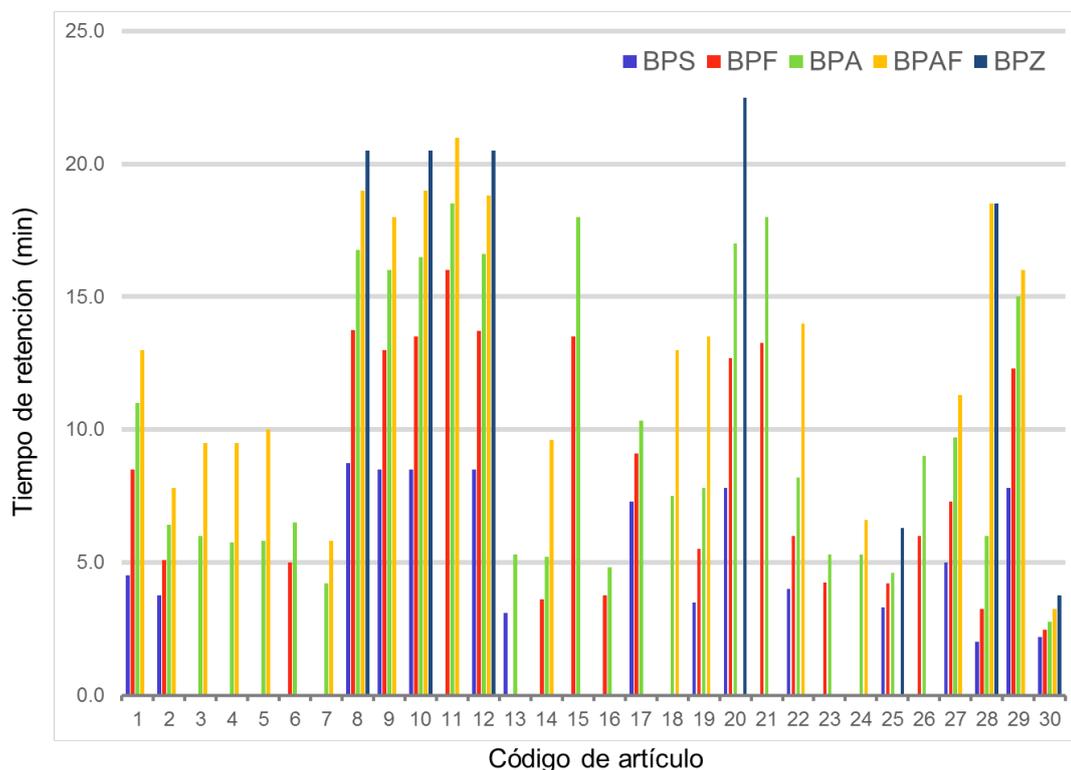


Figura VII.5. Tiempo de retención de los analitos BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ de los 29 trabajos revisados en la Tabla VII.9, cuyos números de fila sirven como identificación en el eje de abscisas. El número 30 corresponde al presente trabajo.

Tabla VII.9. Revisión de métodos HPLC-DAD para la determinación de BPA, BPS, BPF, BPZ y BPAF.

Código	Fase móvil	Modo de elución	Disolvente orgánico (%)	Referencia
1	MeOH/H ₂ O	gradiente	40 - 100	[41]
2	ACN/H ₂ O	gradiente	50 - 70	[42]
3	MeOH/H ₂ O	isocrático	40	[43]
4	ACN/H ₂ O	gradiente	42 - 85	[44]
5	ACN/H ₂ O	gradiente	42 - 85	[45]
6	MeOH/H ₂ O	gradiente	68 - 90	[46]
7	ACN/H ₂ O	gradiente	42 - 85	[47]
8	MeOH/H ₂ O	gradiente	35 - 100	[48]
9	MeOH/H ₂ O	gradiente	35 - 100	[49]
10	MeOH/H ₂ O	gradiente	35 - 100	[50]
11	MeOH/H ₂ O	gradiente	35 - 100	[51]
12	MeOH/H ₂ O	gradiente	35 - 100	[52]
13	ACN/H ₂ O	gradiente	50 - 100	[53]
14	MeOH/H ₂ O	isocrático	60	[54]
15	ACN/H ₂ O	gradiente	15 - 55	[55]
16	ACN/H ₂ O	gradiente	50 - 80	[56]
17	ACN/H ₂ O	gradiente	40 - 100	[57]
18	ACN/H ₂ O	gradiente	50 - 80	[58]
19	MeOH/iPrOH/H ₂ O	gradiente	60/5 - 80/2	[59]
20	ACN/H ₂ O	gradiente	23 - 95	[60]
21	ACN/H ₂ O	gradiente	15 - 55	[61]
22	ACN/H ₂ O	isocrático	50	[62]
23	ACN/H ₂ O	isocrático	60	[63]
24	ACN/H ₂ O	gradiente	42 y 85	[64]
25	MeOH/H ₂ O	gradiente	60 - 100	[65]
26	ACN/H ₂ O	isocrático	40	[66]
27	ACN/H ₂ O	gradiente	40 - 70	[67]
28	ACN/H ₂ O	isocrático	35	[68]
29	MeOH/H ₂ O	gradiente	40 - 90	[69]
30	MeOH/ACN/H ₂ O	isocrático	58/20	Este trabajo

Observando individualmente cada bisfenol, los tiempos de retención mínimos (en minutos), de entre todas las referencias bibliográficas incluidas en la Tabla VII.9 y que pueden verse en la Figura VII.5, son: 2.00 (número 28), 3.25 (número 28), 4.20 (número 7), 5.80 (número 7) y 6.30 (número 25) para BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ, respectivamente. A excepción del BPS, estos tiempos son mayores a los obtenidos en este trabajo, mostrados en la Sección VII.6.4: 2.182, 2.456, 2.769, 3.256 y 3.784 min, respectivamente.

VII.7. Conclusiones

La metodología desarrollada para la inversión de modelos PLS se integra en el ámbito de AQbD y permite el análisis del conflicto entre seis respuestas correlacionadas que se utilizan para definir el ATP para una determinación cromatográfica de cinco bisfenoles.

Un uso sistemático de diseños experimentales, para la construcción de un diseño compuesto y su reducción a través de un diseño D-óptimo, proporciona un conjunto de entrenamiento representativo para ajustar el modelo PLS2. Tras el ajuste y validación del modelo de predicción, el estudio de las soluciones Pareto óptimas proporcionadas por la inversión de este modelo, mediante un algoritmo genético, posibilita la selección de los CMP necesarios para realizar la determinación cromatográfica con las características preestablecidas.

Con estos CMP, el procedimiento analítico implementado y validado representa una mejora con respecto a trabajos similares.

El procedimiento desarrollado es general y se puede aplicar en cualquier otra técnica instrumental.

VII.8. Referencias

- [1] FDA, Guidance for industry, PAT – A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance, U.S. Department of Health and Human Services – U.S. Food and Drug Administration, Rockville, September 2004. <https://www.fda.gov/media/71012/download>
- [2] EU guidelines for good manufacturing practice for medicinal products for human and veterinary use, Volume 4, Annex 15, European Commission, 2015. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2015-10_annex15.pdf (Last access on 22 May 2020).
- [3] S. García-Muñoz, T. Kourti, J.F. MacGregor, F. Apruzzese, M. Champagne, Optimization of batch operating policies. Part I. Handling multiple solutions, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45 (2006) 7856-7866. <https://doi.org/10.1021/ie060314g>
- [4] E. Tomba, M. Barolo, S. García-Muñoz, General framework for latent variable model inversion for the design and manufacturing of new products, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51 (2012) 12886-12900. <https://doi.org/10.1021/ie301214c>
- [5] M. Ottavian, E. Tomba, M. Barolo, Advanced process decision making using multivariate latent variable methods, in: M. Ierapetritou, R. Ramachandran (Eds.), *Process simulation and data modeling in solid oral drug development and manufacture*, Humana Press, Springer, New York, 2016, pp. 159-189. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2996-2_6
- [6] F. Yacoub, J.F. MacGregor, Product optimization and control in the latent variable space of nonlinear PLS models, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 70 (2004) 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2003.10.004>
- [7] S. Lakshminarayanan, H. Fujii, B. Grosman, E. Dassau, D.R. Lewin, New product design via analysis of historical databases, *Computers & Chemical Engineering* 24 (2000) 671-676. [https://doi.org/10.1016/S0098-1354\(00\)00406-3](https://doi.org/10.1016/S0098-1354(00)00406-3)
- [8] U.G. Indahl, The O-PLS methodology for orthogonal signal correction – is it correcting or confusing?, *Journal of Chemometrics* 34 (2020) e2884. <https://doi.org/10.1002/cem.2884>
- [9] S. Yin, S.X. Ding, P. Zhang, A. Hagahni, A. Naik, Study on modifications of PLS approach for process monitoring, *IFAC Proceedings Volumes* 44 (2011) 12389-12394. <https://doi.org/10.3182/20110828-6-IT-1002.02876>

-
- [10] S. Ruiz, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, A computational approach to partial least squares model inversion in the framework of the process analytical technology and quality by design initiatives, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 182 (2018) 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.08.014>
- [11] S. Ruiz, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, M.S. Sánchez, Residual spaces in latent variables model inversion and their impact in the design space for given quality characteristics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 203 (2020) 104040. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104040>
- [12] R. Peraman, K. Bhadraya, Y.P. Reddy, Analytical Quality by Design: A tool for regulatory flexibility and robust analytics, *International Journal of Analytical Chemistry* 868727 (2015) 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/868727>
- [13] P. Das, A. Maity, Analytical Quality by Design (AQbD): A new horizon for robust analytics in pharmaceutical process and automation, *International Journal of Pharmaceutics and Drug analysis* 5 (2017) 324-337. <http://ijpda.com/index.php/journal/article/view/295>
- [14] T. Tome, N. Žigart, Z. Časar, A. Obreza, Development and optimization of liquid chromatography analytical methods by using AQbD principles: Overview and recent advances, *Organic Process Research & Development* 23 (2019) 1784-1802. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00238>
- [15] S. Orlandini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Application of quality by design to the development of analytical separation methods, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 443-450. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6302-2>
- [16] S. Orlandini, B. Pasquini, C. Caprini, M. Del Bubba, L. Squarcialupi, V. Colotta, S. Furlanetto, A comprehensive strategy in the development of a cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatographic method for the assay of diclofenac and its impurities: Mixture-process variable experiments and quality by design, *Journal of Chromatography A* 1466 (2016) 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.013>
- [17] COM (1999) 706, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. Community Strategy for Endocrine Disrupters, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, Commission of the European Communities, 1999.
- [18] COM (2001) 262, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters, a range of substances suspected of interfering with

- the hormone systems of humans and wildlife, COM (1999) 706, Commission of the European Communities, 2001.
- [19] SEC (2007) 1635, Commission Staff Working Document on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, (COM (1999) 706), (COM (2001) 262) and (SEC (2004) 1372), Commission of the European Communities, 2007.
- [20] Commission Directive (EU) 2017/898 of 24 May 2017 amending, for the purpose of adopting specific limit values for chemicals used in toys, Appendix C to Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards bisphenol A, Official Journal of the European Union L 138/128, 2017.
- [21] Commission Regulation (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials, Official Journal of the European Union L 41/6, 2018.
- [22] Commission Regulation (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bisphenol A, Official Journal of the European Union L 337/3, 2016.
- [23] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, Official Journal of the European Union L 342/59, 2009.
- [24] 2019/C 404/07, Opinion of the European Committee of the Regions — Towards a comprehensive EU framework on endocrine disruptors, Official Journal of the European Union C 404/34, 2019.
- [25] A. Ullah, M. Pirzada, S. Jahan, H. Ullah, N. Turi, W. Ullah, M.F. Siddiqui, M. Zakria, K.Z. Lodhi, M.M. Khan, Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: A focus on the possible hormonal mode of action, *Food and Chemical Toxicology* 121 (2018) 24-36. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.024>
- [26] J. Moreman, O. Lee, M. Trznadel, A. David, T. Kudoh, C.R. Tyler, Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in Zebrafish

- embryo-larvae, *Environmental Science & Technology* 51 (2017) 12796-12805. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03283>
- [27] G. Russo, A. Capuozzo, F. Barbato, C. Irace, R. Santamaria, L. Grumetto, Cytotoxicity of seven bisphenol analogues compared to bisphenol A and relationships with membrane affinity data, *Chemosphere* 201 (2018) 432-440. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.014>
- [28] A. Usman, M. Ahmad, Computational study suggesting reconsideration of BPA analogues based on their endocrine disrupting potential estimated by binding affinities to nuclear receptors, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171 (2019) 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.071>
- [29] K. Owczarek, B. Kudłak, V. Simeonov, Z. Mazerska, J. Namieśnik, Binary mixtures of selected bisphenols in the environment: Their toxicity in relationship to individual constituents, *Molecules* 23 (2018) 3226. <https://doi.org/10.3390/molecules23123226>
- [30] B.M. Wise, N.B. Gallagher, R. Bro, J.M. Shaver, W. Winding, R.S. Koch, PLS Toolbox 8.8.1, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA, 2020.
- [31] MATLAB, version 9.7.0.1190202 (R2019b), The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA, 2019.
- [32] STATGRAPHICS Centurion 18 Version 18.1.12, Statpoint Technologies, Inc., Herndon, VA, USA, 2020.
- [33] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu, NEMRODW, Version 2015, L.P.R.A.I., Marsella, Francia, 2015.
- [34] L. Sarabia, M.C. Ortiz, DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85052-6](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85052-6)
- [35] L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, M.S. Sánchez, Response surface methodology, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics 2nd edition. Chemical and Biochemical Data Analysis*, Elsevier, 2020, pp. 287-326. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14756-0>
- [36] C.M. Jaeckle, J.F. Macgregor, Product design through multivariate statistical analysis of process data, *AIChE Journal* 44 (1998) 1105-1118. <https://doi.org/10.1002/aic.690440509>
- [37] L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, M.C. Ortiz, Introduction to ranking methods, in: M. Pavan, R. Todeschini (Eds.), *Scientific data ranking methods: Theory and applications*, *Data Handling in Science and Technology*, volume 27, Elsevier,

- 2008, pp. 1-50. [https://doi.org/10.1016/S0922-3487\(08\)10001-6](https://doi.org/10.1016/S0922-3487(08)10001-6)
- [38] K. Deb, *Multi-objective optimization using evolutionary algorithms*, Wiley Interscience Series in Systems and Optimization, Wiley, Chichester, 2001.
- [39] ISO 11843, *Capability of detection, Part 1: Terms and definitions and Part 2: methodology in the linear calibration case*, International Organization for Standardization, 2000.
- [40] Commission Decision (EC) No 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities* L 221/8, 2002.
- [41] L. Wang, Q. Li, L. Zhang, A convenient approach for the determination of multiple trace BPs using an in-syringe-assisted solid phase microextraction system packed with elastic spongy graphene rods coupled with HPLC, *Analytical Methods* 9 (2017) 2673-2681. <https://doi.org/10.1039/c7ay00352h>
- [42] Q. Zhou, Z. Jin, J. Li, B. Wang, X. Wei, J. Chen, A novel air-assisted liquid-liquid microextraction based on in-situ phase separation for the HPLC determination of bisphenols migration from disposable lunch boxes to contacting water, *Talanta* 189 (2018) 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.072>
- [43] L. Wang, D. Zhang, X. Xu, L. Zhang, Application of ionic liquid-based dispersive liquid phase microextraction for highly sensitive simultaneous determination of three endocrine disrupting compounds in food packaging, *Food Chemistry* 197 (2016) 754-760. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.042>
- [44] Y. Li, C. Yang, J. Ning, Y. Yang, Cloud point extraction for the determination of bisphenol A, bisphenol AF and tetrabromobisphenol A in river water samples by high-performance liquid chromatography, *Analytical Methods* 6 (2014) 3285-3290. <https://doi.org/10.1039/C3AY42191K>
- [45] Y. Li, Y. Jiao, Y. Guo, Y. Yang, Determination of bisphenol-A, 2,4-dichlorophenol, bisphenol-AF and tetrabromobisphenol-A in liquid foods and their packaging materials by vortex-assisted supramolecular solvent microextraction/high-performance liquid chromatography, *Analytical Methods* 5 (2013) 5037-5043. <https://doi.org/10.1039/C3AY40586A>
- [46] J. Yin, Z. Meng, Y. Zhu, M. Song, H. Wang, Dummy molecularly imprinted polymer for selective screening of trace bisphenols in river water, *Analytical Methods* 3 (2011) 173-180. <https://doi.org/10.1039/C0AY00540A>

- [47] D. Yang, G. Li, L. Wu, Y. Yang, Ferrofluid-based liquid-phase microextraction: Analysis of four phenolic compounds in milks and fruit juices, *Food Chemistry* 261 (2018) 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.038>
- [48] X. Sun, J. Wang, Y. Li, J. Jin, J. Yang, F. Li, S.M. Shah, J. Chen, Highly class-selective solid-phase extraction of bisphenols in milk, sediment and human urine samples molecularly using well-designed dummy molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography A* 1360 (2014) 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.055>
- [49] X. Sun, J. Wang, Y. Li, J. Jin, B. Zhang, S.M. Shah, X. Wang, J. Chen, Highly selective dummy molecularly imprinted polymer as a solid-phase extraction sorbent for five bisphenols in tap and river water, *Journal of Chromatography A* 1343 (2014) 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.063>
- [50] J. Yang, Y. Li, J. Wang, X. Sun, R. Cao, H. Sun, C. Huang, J. Chen, Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by Pickering emulsion polymerization for selective solid-phase extraction of eight bisphenols from human urine samples, *Analytica Chimica Acta* 872 (2015) 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.058>
- [51] J. Yang, Y. Li, J. Wang, X. Sun, S.M. Shah, R. Cao, J. Chen, Novel sponge-like molecularly imprinted mesoporous silica material for selective isolation of bisphenol A and its analogues from sediment extracts, *Analytica Chimica Acta* 853 (2015) 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.051>
- [52] H. Sun, Y. Li, J. Yang, X. Sun, C. Huang, X. Zhang, J. Chen, Preparation of dummy-imprinted polymers by Pickering emulsion polymerization for the selective determination of seven bisphenols from sediment samples, *Journal of Separation Science* 39 (2016) 2188-2195. <https://doi.org/10.1002/jssc.201501305>
- [53] T. Tuzimski, D. Pieniążek, G. Buszewicz, G. Teresiński, QuEChERS-based extraction procedures for the analysis of bisphenols S and A in breast milk samples by LC-QqQ-MS, *Journal of AOAC International* 102 (2019) 23-32. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0297>
- [54] L. Wang, Z. Zhang, X. Xu, D. Zhang, F. Wang, L. Zhang, Simultaneous determination of four trace level endocrine disrupting compounds in environmental samples by solid-phase microextraction coupled with HPLC, *Talanta* 142 (2015) 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.043>
- [55] E. Herrero-Hernández, R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, Use of a bisphenol-A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination

- of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta* 650 (2009) 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.043>
- [56] D.C. Morelli, G. Bernardi, L. Morés, M.E. Pierri, E. Carasek, A green - high throughput –extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography – diode array detection, *Journal of Chromatography A* 1626 (2020) 461377. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461377>
- [57] T. Tuzimski, S. Szubartowski, Method development for selected bisphenols analysis in sweetened condensed milk from a can and breast milk samples by HPLC-DAD and HPLC-QqQ-MS: Comparison of sorbents (Z-SEP, Z-SEP Plus, PSA, C18, Chitin and EMR-Lipid) for clean-up of QuEChERS extract, *Molecules* 24 (2019) 2093. <https://doi.org/10.3390/molecules24112093>
- [58] P. Baile, J. Medina, L. Vidal, A. Canals, Determination of four bisphenols in water and urine samples by magnetic dispersive solid-phase extraction using a modified zeolite/iron oxide composite prior to liquid chromatography diode array detection, *Journal of Separation Science* 43 (2020) 1808-1816. <https://doi.org/10.1002/jssc.201901022>
- [59] H. Wang, S. Song, M. Shao, Y. Gao, C. Yang, Y. Li, W. Wang, Y. He, P. Li, Determination of bisphenol analogues in food-contact plastics using diode array detector, charged aerosol detector and evaporative light-scattering detector, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 186 (2019) 109778. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109778>
- [60] M. Eckardt, T.J. Simat, Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts - a German market analysis from 2015 to 2017, *Chemosphere* 186 (2017) 1016-1025. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.037>
- [61] E. Herrero-Hernández, E. Rodríguez-Gonzalo, M.S. Andrades, S. Sánchez-González, R. Carabias-Martínez, Occurrence of phenols and phenoxyacid herbicides in environmental waters using an imprinted polymer as a selective sorbent, *Science of The Total Environment* 454-455 (2013) 299-306. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.029>
- [62] Z. Liu, Z. Xu, Y. Liu, Y. Liu, B. Lu, L. Ma, Supramolecular imprinted polymeric stir bar sorptive extraction followed by high-performance liquid chromatography for endocrine disruptor compounds analysis, *Microchemical Journal* 158 (2020) 105163. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105163>
- [63] J. Liu, H. Qiu, F. Zhang, Y. Li, Zeolitic imidazolate framework-8

- coated Fe₃O₄@SiO₂ composites for magnetic solid-phase extraction of bisphenols, *New Journal of Chemistry* 44 (2020) 5324-5332. <https://doi.org/10.1039/d0nj00006j>
- [64] D. Yang, Y. Wang, H. Li, Y. Yang, Acid-base-governed deep eutectic solvent-based microextraction combined with magnetic solid-phase extraction for determination of phenolic compounds, *Microchimica Acta* 187 (2020) 124. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4109-y>
- [65] M. Háková, L. C. Havlíková, J. Chvojka, J. Erben, P. Solich, F. Švec, D. Šatínský, Polycaprolactone nanofibers functionalized with a dopamine coating for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids, *Microchimica Acta* 186 (2019) 710. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3846-2>
- [66] N. Li, J. Chen, Y.P. Shi, Magnetic nitrogen-doped reduced graphene oxide as a novel magnetic solid-phase extraction adsorbent for the separation of bisphenol endocrine disruptors in carbonated beverages, *Talanta* 201 (2019) 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.002>
- [67] X. Han, J. Chen, H. Qiu, Y.P. Shi, Solid/liquid phase microextraction of five bisphenol-type endocrine disrupting chemicals by using a hollow fiber reinforced with graphene oxide nanoribbons, and determination by HPLC-PDA, *Microchimica Acta* 186 (2019) 375. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3498-2>
- [68] A. Kaleniecka, P. K. Zarzycki, Analysis of selected endocrine disrupters fraction including bisphenols extracted from daily products, food packaging and treated wastewater using optimized solid-phase extraction and temperature-dependent inclusion chromatography, *Molecules* 24 (2019) 1285. <https://doi.org/10.3390/molecules24071285>
- [69] G. Peng, Y. Lu, W. You, Z. Yin, Y. Li, Y. Gao, Analysis of five bisphenol compounds in sewage sludge by dispersive solid-phase extraction with magnetic montmorillonite, *Microchemical Journal* 157 (2020) 105040. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105040>

CAPÍTULO VIII

**DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE CINCO
BISFENOLES EN VASOS DE POLICARBONATO "LIBRE
DE BPA" MEDIANTE HPLC-DAD Y PARAFAC**

VIII.1. Resumen*

El bisfenol A (BPA) es un compuesto ampliamente utilizado en la fabricación de policarbonatos pero presenta el inconveniente de que actúa como disruptor endocrino (EDC por sus siglas en inglés) ya que provoca alteraciones en el sistema hormonal del ser humano.

Los EDC están presentes en muchos productos de uso diario. Debido a la exposición continua de la población al BPA, las regulaciones europeas han limitado su uso industrial en cosméticos, papel térmico, juguetes y materiales en contacto con alimentos (FCM por sus siglas en inglés), y han planteado controlar la exposición que sufren los trabajadores a este contaminante en el lugar de trabajo. Para hacer frente a estas restricciones, el BPA está siendo reemplazado por otros bisfenoles, que también muestran efectos nocivos similares.

En este capítulo se ha determinado la migración de cinco bisfenoles (BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ) en vasos de policarbonato "libre de BPA" utilizando simulante B (ácido acético al 3% (p/v) en solución acuosa) mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de diodos en serie (HPLC-DAD). Para ello, se expusieron veinte vasos a un ensayo de migración a 70°C durante 24 horas, condiciones más severas que las sugeridas en las guías técnicas.

Con los datos obtenidos se aplicó la descomposición PARAFAC. Los modelos PARAFAC resultantes se validaron, evaluando también el límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$). El método analítico propuesto permitió determinar 92.3, 61.4, 44.0, 138.9 y 65.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ respectivamente. La recuperación del procedimiento se calculó para cada bisfenol a partir de tres diluciones de tres muestras de recuperación, analizadas todas por duplicado ($n = 18$). En todos los casos la recuperación fue superior al 95%.

A continuación, se realizó un estudio comparativo entre los resultados poblacionales (concentraciones) obtenidos para los blancos analíticos ($n = 40$) *versus* los obtenidos para el test de migración de los vasos de policarbonato cuya etiqueta indicaba libre de BPA ($n = 40$). Con este objetivo, se ajustaron funciones de distribución para la concentración de cada bisfenol y población.

Posteriormente se realizó un test de hipótesis con los datos obtenidos a partir de la población de blancos analíticos, cuya hipótesis nula fue H_0 : No hay bisfenol en la muestra *versus* la hipótesis alternativa, H_a : Hay bisfenol en la muestra. En el caso del bisfenol A, para una probabilidad de falso positivo (α) igual a 0.05 el valor crítico fue 0.49 $\mu\text{g L}^{-1}$, y la probabilidad de falso negativo (β) igual a 0.07. Por tanto, para todas

* Este capítulo se encuentra preparado para ser enviado (en diciembre de 2020) a Journal of Chromatography A para su publicación.

las concentraciones superiores a este valor crítico se debe rechazar la hipótesis nula y concluir que sí que hay BPA en la muestra.

Sin embargo, la cantidad máxima de BPA migrado desde los vasos de PC fue $5.60 \mu\text{g L}^{-1}$, valor inferior al límite establecido para la migración específica de una sustancia no autorizada ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Para el resto de bisfenoles, no fue posible distinguir, con significación estadística, que la cantidad migrada desde los vasos analizados es distinta a la de los blancos analíticos.

VIII.2. Palabras clave

Bisfenoles, migración, vaso libre de BPA, HPLC-DAD, PARAFAC

VIII.3. Introducción

Desde 2001 [1], el bisfenol A (4,4'-isopropylidenediphenol; BPA) está considerado un compuesto químico disruptor endocrino (EDC, por sus siglas en inglés), ya que fue clasificado en el grupo 1 como sustancia con evidencias (potenciales o efectivas) de disruptor endocrino. Esta clasificación fue publicada en el primer informe emitido por la Comisión Europea sobre los avances en relación a la estrategia comunitaria para el control de disruptores endocrinos aprobada en 1999 [2].

Los EDC son compuestos que pueden alterar el sistema hormonal del ser humano y, en consecuencia, pueden causar graves efectos perjudiciales sobre la salud: en la reproducción y el metabolismo o el crecimiento, entre otros procesos biológicos. Estas sustancias están contenidas en productos de uso diario como alimentos, cosméticos, productos de cuidado personal, etc. [3]. Por este motivo, la mayor fuente de exposición al BPA es mediante ingestión o a través de la piel.

Varios autores han desarrollado estudios sobre las diversas fuentes de exposición al BPA: i) prendas de vestir como medias [4] y calcetines [5]; ii) una amplia variedad de alimentos que forman parte de la dieta habitual [6-11]; iii) envases alimenticios fabricados con diferentes materiales [12-19]; iv) productos de cuidado personal [20,21]; v) fuentes de exposición ambientales como el polvo del hogar [22] o el aire del lugar de trabajo [23]; vi) otros tipos de muestras como: juguetes [24], medicinas líquidas (jarabes e inyectables) [25], tickets (papel térmico) [26], tintas de impresión [27], material dental [28] o dispositivos médicos [29,30]. Además, también debería tenerse en cuenta la exposición que sufren los animales al BPA, ya que la bioacumulación a lo largo de la cadena alimentaria puede representar una fuente adicional de BPA para los seres humanos [31].

Durante décadas, la preocupación por la exposición continua a los EDC (y más específicamente al BPA) y los efectos adversos derivados de ella ha crecido muy rápidamente. En consecuencia, las regulaciones europeas han limitado el uso industrial del BPA en cosméticos en 2009 [32], en papel térmico en 2016 [33], en juguetes en 2017 [34] y más recientemente, en 2018 en materiales en contacto con alimentos (FCM) [35]. Además, se ha reducido el límite de exposición al BPA en el lugar de trabajo [36]. Para hacer frente a estas restricciones, el BPA está siendo reemplazado por otros compuestos. En FCM se pueden emplear otros bisfenoles [37], pero solo se encuentra limitada desde 2011 la migración de bisfenol S (4,4'-sulfonyldiphenol; BPS) [38].

Entre la bibliografía consultada, cabe destacar la amplia variedad de sustituyentes del BPA que se han determinado en diferentes muestras: alimentos [7], FCM [18,39], papel térmico [26,39], agua de manantial y agua de consumo [40], suero sanguíneo humano [41]. Sin embargo, estas alternativas pueden no ser tan seguras.

Un gran número de investigaciones [42-49] muestran que otros bisfenoles presentan efectos similares al BPA. Estos estudios consideran que el bisfenol AF (4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenol; BPAF) es más tóxico [44,45,48] y el BPS menos perjudicial [42,44,45] en comparación con el BPA. Además, la Comisión Europea sugirió en 2019 [50] que se debería suponer que las sustancias con una estructura similar tienen propiedades toxicológicas tan dañinas como las de la sustancia más tóxica conocida del grupo. Ese documento también explicó que el BPA está siendo reemplazado por otros bisfenoles y exigió la prohibición de los bisfenoles en todos los FCM.

El BPA es un compuesto químico muy utilizado en la fabricación de resinas epoxi y policarbonato (PC). Debido a la prohibición en 2011 del BPA en los biberones infantiles fabricados con PC [51], en la actualidad se comercializan diferentes productos de PC etiquetados como "libre de BPA". Sin embargo, esto no significa que estén libres de otros bisfenoles o de actividad disruptora endocrina.

En este trabajo, se ha llevado a cabo la determinación y cuantificación de BPA y otros cuatro bisfenoles: BPS, bisfenol F (4,4'-methylenediphenol; BPF), BPAF y bisfenol Z (4,4'-cyclohexylidenebisphenol; BPZ), en vasos de PC libre de BPA sometidos a un test de migración. Estos vasos fueron adquiridos en un almacén de artículos de cocina y restauración de la ciudad.

Las correspondientes guías técnicas [52] consideran a los vasos como utensilios de cocina que se pueden utilizar con alimentos fríos, calientes o a temperatura ambiente. Por tanto, el ensayo de migración podría realizarse en dos condiciones diferentes: a 40°C durante 24 horas, simulando un uso en frío (<20°C) o a temperatura ambiente; o por contra a 70°C durante 2 horas, simulando su empleo en caliente (> 40°C) o a temperatura ambiente.

Además, la elección del simulante para efectuar el ensayo de migración dependerá del alimento con el que se pretenda llenar el vaso. De esta forma, se puede reproducir el comportamiento del zumo (bebida turbia) a través del simulante B o D1, mientras que el del agua o café (bebidas claras) se realiza a través del simulante B o C, y el de la leche a través del simulante D1. Por tanto, podrían utilizarse en el test de migración de los vasos los simulantes B, C y D1, siendo éstos ácido acético al 3% (p/v), etanol al 20% (v/v) y etanol al 50% (v/v) respectivamente [38].

Finalmente, la realización del test de migración se llevó a cabo con el simulante B. La elección de este simulante se basó en los resultados obtenidos en un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación, en el que se concluyó que la migración de BPA era mayor con el simulante B que con el D1 [53]. En cuanto al tiempo y temperatura de exposición, se eligieron condiciones más severas que las sugeridas en las guías técnicas (70°C durante 24 horas).

Los datos cromatográficos experimentales se obtuvieron mediante cromatografía de líquidos acoplada con un detector de diodos en serie (HPLC-DAD), utilizando el método analítico previamente optimizado en el Capítulo VII [54]. A continuación, se utilizó la descomposición PARAFAC para la cuantificación e identificación inequívoca de los bisfenoles, así como para la detección de posibles interferentes que pueden estar presentes en las muestras de migración.

Los modelos PARAFAC obtenidos se validaron en términos de veracidad y precisión. Además, se evaluó tanto el límite de decisión ($CC\alpha$) como la capacidad de detección ($CC\beta$) con probabilidades de falso positivo y falso negativo fijadas en 0.05. La recuperación del procedimiento se calculó para cada bisfenol a partir de tres diluciones de tres muestras de recuperación, analizadas por duplicado ($n = 18$).

Uno de los objetivos de este trabajo fue comprobar que la cantidad de BPA que pueda migrar no supere los límites de migración específica (SML por sus siglas en inglés) establecidos. Este está regulado en $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ [35], excepto para artículos destinados a lactantes y niños, en cuyo caso el uso de BPA está prohibido y solo se autoriza una cantidad máxima migrada de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ [38]. Por otro lado, sería útil conocer si en los vasos examinados se ha empleado alguno de los bisfenoles analizados en este trabajo (BPS, BPF, BPAF y BPZ) como alternativa al BPA. Para cumplir esto, se realizaron comparaciones entre poblaciones (concentraciones) obtenidas de blancos analíticos y las obtenidas de muestras de test de migración. No sería correcto comparar resultados medios ya que lo que se pretende es demostrar que en una población de vasos, todos ellos distintos (ya que a cada uno hay que someterlo al test de migración) las concentraciones cuantificadas son distintas de aquellas encontradas en otra población de blancos analíticos.

Esta comparación se ha realizado ajustando las distribuciones de probabilidad para ambas poblaciones (blancos analíticos y muestras de test de migración). A través de un test de hipótesis cuya hipótesis nula es "No hay bisfenol en la muestra" frente a la

hipótesis alternativa "Hay bisfenol en la muestra", se ha establecido un valor crítico (región de rechazo de H_0) para una probabilidad de falso positivo (α) igual a 0.05 y se ha determinado la probabilidad de falso negativo (β) para cada bisfenol. Los valores mayores que este valor crítico pueden considerarse diferentes de los blancos analíticos.

VIII.4. Material y métodos

VIII.4.1. Reactivos químicos

El bisfenol A (4,4'-isopropylidenediphenol con n° CAS 80-05-7), el bisfenol F (4,4'-methylenediphenol con n° CAS 620-92-8) y el bisfenol Z (4,4'-cyclohexylidenebisphenol con n° CAS 843-55-0) se compraron a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El bisfenol AF (4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenol con n° CAS 1478-61-1) fue suministrado por Alfa Aesar (Kandel, Alemania). El bisfenol S (4,4'-sulfonyldiphenol con n° CAS 80-09-1); y los disolventes acetonitrilo (n° CAS 75-05-8) y metanol (n° CAS 67-56-1), ambos de grado isocrático LiChrosolv® para cromatografía líquida, fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido acético glacial (n° CAS 64-19-7; HiPerSolv Chromanorm para HPLC) se compró a VWR Prolabo Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francia). El agua desionizada se obtuvo con el sistema de purificación de agua Milli-Q Gradient A10 de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

VIII.4.2. Disoluciones patrón y muestras

Disoluciones patrón. Las disoluciones madre individuales de 500 mg L^{-1} se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada reactivo en metanol. Para cada bisfenol se prepararon disoluciones intermedias de 100 mg L^{-1} a partir de las disoluciones madre por dilución con metanol. Los patrones de calibrado utilizados, también preparados en metanol, fueron mezclas de los cinco bisfenoles a doce niveles de concentración diferentes en el rango de 0 a 5 mg L^{-1} (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4 y 5 mg L^{-1}). Todas las disoluciones se guardaron protegidas de la luz a 4°C .

Muestras de test de migración. Para obtener las muestras del ensayo de migración, se rellenó cada vaso con un volumen de 170 mL de simulante alimentario B (ácido acético al 3% (p/v) en solución acuosa), precalentado en la estufa a 70°C . Como indican las directrices técnicas [55], el contenido de simulante B se vierte hasta aproximadamente 0.5 cm del borde de los vasos (los cuales se consideran artículos cuyo ensayo se realiza por llenado). Se expusieron veinte vasos de PC a un ensayo de migración a 70°C en la estufa durante 24 horas, previamente deslavados solo con agua (sin jabón ni detergente) con el fin de eliminar cualquier rastro de polvo y suciedad. Se seleccionó este tiempo ya que en experimentos de migración realizados con

anterioridad durante 2 (como indican las guías técnicas [52]) y 10 horas no se detectaron los bisfenoles analizados. Una vez realizado el test de migración, los extractos obtenidos se recogieron en botes de vidrio ámbar de 250 mL y se almacenaron a 4°C. En una inspección visual de los vasos después del procedimiento de migración no se observaron daños, roturas o grietas. Finalmente, cada uno de los extractos se concentró a sequedad en un rotavapor a una presión de 72 mbar y el residuo se disolvió en 5 mL de metanol siguiendo estos pasos tres veces: i) añadir 1.5 mL de metanol, ii) poner el extracto en baño de ultrasonidos durante 10 min, iii) verter en un matraz de 5 mL; con el objetivo de recuperar el máximo del residuo obtenido.

Blancos analíticos. Se prepararon veinte blancos analíticos reproduciendo todo el procedimiento anterior, excepto el paso del ensayo de migración, es decir, volúmenes de 170 mL de simulante B se concentraron a sequedad en el rotavapor y los residuos se disolvieron en 5 mL de metanol.

Recuperación. Para calcular la recuperación de todo el procedimiento, se prepararon tres disoluciones mezcla (0.2, 0.3 y 0.4 mg L⁻¹ de cada bisfenol) por dilución con el simulante B. Como en el caso anterior, se expusieron 170 mL de cada disolución al procedimiento de preconcentración (rotavapor y disolución en metanol). Después del procedimiento de preconcentración, los extractos recolectados se diluyeron en metanol (volúmenes de 800, 500 y 200 µL en matraces de 5 mL).

Por lo tanto, se realizaron un total de 136 análisis distribuidos de la siguiente forma: 20 blancos analíticos, 20 muestras de test de migración, 12 muestras de recuperación y 12 patrones de calibrado, todos ellos analizados por duplicado y además 8 muestras de control (blancos de metanol).

VIII.4.3. Instrumental

El simulante B se precalentó antes de las extracciones en una estufa 200209 JP Selecta (Barcelona, España). Para la obtención de las muestras de ensayo de migración se empleó una estufa Thermo Fisher Scientific Heratherm OMS180 (Langenselbold, Alemania). La preconcentración de la muestra se llevó a cabo en un evaporador rotatorio (ILMVAC, Ilmenau, Alemania) a una presión de 72 mbar. Para disolver el residuo obtenido del evaporador rotatorio se utilizó un baño de ultrasonidos Ultrasonic Cleaner (VWR International BVBA, Lovaina, Bélgica).

Para la determinación de los bisfenoles (BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ) se utilizó un cromatógrafo HPLC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EEUU) compuesto por una bomba cuaternaria (G1311C), un inyector (G1329B), un compartimento termostatzado para la columna (G1316A) y un detector de diodos en serie (G7117C). La columna empleada para la separación de los analitos fue una Kinetex EVO-C18

(150 mm x 4.6 mm, 5 μm) y como fases móviles se utilizaron agua desionizada, metanol y acetonitrilo.

Las condiciones para el análisis cromatográfico (flujo y composición de la fase móvil) se optimizaron en el Capítulo VII de esta memoria (la Ref. [54]). Estos parámetros consistían en una fase móvil isocrática de agua-metanol-acetonitrilo (22:58:20, v/v) y un flujo de 0.66 mL min^{-1} . La temperatura del compartimento de la columna se fijó a 20°C y el volumen de inyección fue de 10 μL . El detector de diodos en serie se programó para registrar la absorbancia entre 200 y 500 nm, cada 2 nm, durante el análisis, 10 min. La Figura VIII.1 muestra un ejemplo de un cromatograma obtenido en el análisis HPLC-DAD de un patrón de calibración registrado a una longitud de onda de 224 nm.

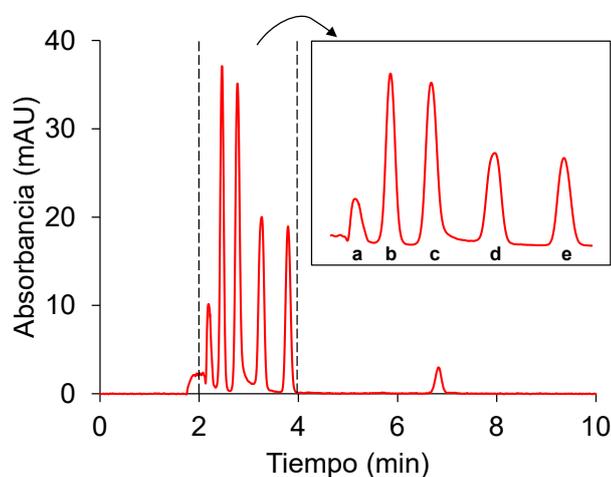


Figura VIII.1. Cromatograma registrado a la longitud de onda de 224 nm de un patrón de calibración de 3 mg L^{-1} de cada bisfenol: a) BPS, b) BPF, c) BPA, d) BPAF y e) BPZ.

VIII.4.4. Análisis de factores paralelos (PARAFAC)

Un instrumento HPLC-DAD permite obtener matrices de valores de absorbancia (x_{ijk}) registradas a I tiempos de retención y J longitudes de onda para K muestras. Esas matrices pueden organizarse en un tensor de tres vías ($I \times J \times K$), $\underline{\mathbf{X}}$, y descomponerse con la técnica PARAFAC (análisis de factores paralelos) [56].

PARAFAC es una técnica quimiométrica con la "ventaja de segundo orden", lo que significa que, si son trilineales los datos del tensor, una descomposición PARAFAC de $\underline{\mathbf{X}}$ proporciona una estimación única de los perfiles cromatográfico, espectral y muestral. El modelo trilineal PARAFAC se puede escribir como en la Ecuación (VIII.1) [57].

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}, \quad i=1, 2, \dots, I; \quad j=1, 2, \dots, J; \quad k=1, 2, \dots, K; \quad (\text{VIII.1})$$

donde F es el número de factores; \mathbf{a}_f , \mathbf{b}_f y \mathbf{c}_f son los vectores de loadings de los perfiles cromatográfico, espectral y muestral, respectivamente; y e_{ijk} es el residuo del modelo de ajuste.

El diagnóstico de consistencia del núcleo, conocido como índice de CORCONDIA [58], mide el grado de trilinealidad del tensor de datos experimentales, siendo 100 el máximo valor alcanzable. La "propiedad de unicidad" hace posible la identificación inequívoca de analitos, incluso en presencia de interferentes que comparten el tiempo de retención con los analitos de interés. En este trabajo, la identificación inequívoca se realizó calculando el coeficiente de correlación lineal entre los perfiles espectrales obtenidos de la descomposición PARAFAC y los espectros de una muestra de referencia de cada bisfenol y en la vía cromatográfica se identifica por la coincidencia del tiempo de retención experimental de cada bisfenol y el perfil cromatográfico obtenido en la descomposición PARAFAC.

VIII.4.5. Software

Las matrices de datos de absorbancia de cada análisis se registraron mediante el software OpenLab CDS ChemStation. A través del software PLS_Toolbox [59] para MATLAB [60] se llevaron a cabo las descomposiciones PARAFAC. Los modelos de regresión y las rectas de exactitud se ajustaron y validaron utilizando STATGRAPHICS Centurion 18 [61], programa que también se utilizó para el ajuste de las distribuciones de las poblaciones experimentales (blancos analíticos y muestras de test de migración). El límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) se determinaron mediante el programa DETARCHI [62].

VIII.5. Resultados y discusión

VIII.5.1. Modelos PARAFAC

Las muestras analizadas se organizaron en cuatro tensores (uno de los tensores se utilizó para los bisfenoles BPF y BPA) de dimensión ($I \times 151 \times 136$). El valor de I corresponde al número de barridos registrados para la ventana de tiempo seleccionada para cada bisfenol (como se puede ver en la Tabla VIII.1). Por otro lado, 151 corresponde al número de longitudes de onda (entre 200 y 500 nm) y 136 son las muestras analizadas (descritas en la Sección VIII.4.2).

Los modelos PARAFAC se ajustaron con restricción de unimodalidad en el perfil cromatográfico, restricción de no negatividad en el perfil espectral y sin restricción en el perfil muestral. Como se puede observar en la Tabla VIII.1, el índice CORCONDIA y la varianza explicada obtenidos para los cuatro modelos fue al menos de un 99% y de un 89.59% respectivamente. Los perfiles cromatográfico, espectral y muestral de los cuatro modelos PARAFAC se muestran en las Figuras VIII.2, VIII.3 y VIII.4. Los bisfenoles se representan en diferentes colores: naranja para BPS, amarillo para BPF, morado para BPA, azul para BPAF y verde para BPZ; los interferentes detectados se representan en gris.

Tabla VIII.1. Parámetros de los modelos obtenidos mediante la descomposición PARAFAC.

Análito	Ventana cromatográfica (min)	Dimensión ($I \times J \times K$)	CORCONDIA (%)	Número de factores	Varianza explicada (%)
BPS	2.15 - 2.30	$46 \times 151 \times 136$	100	2	95.30
BPF y BPA	2.35 - 2.90	$166 \times 151 \times 136$	99	3	89.59
BPAF	3.15 - 3.40	$76 \times 151 \times 136$	100	2	93.62
BPZ	3.65 - 3.95	$91 \times 151 \times 136$	99	2	97.98

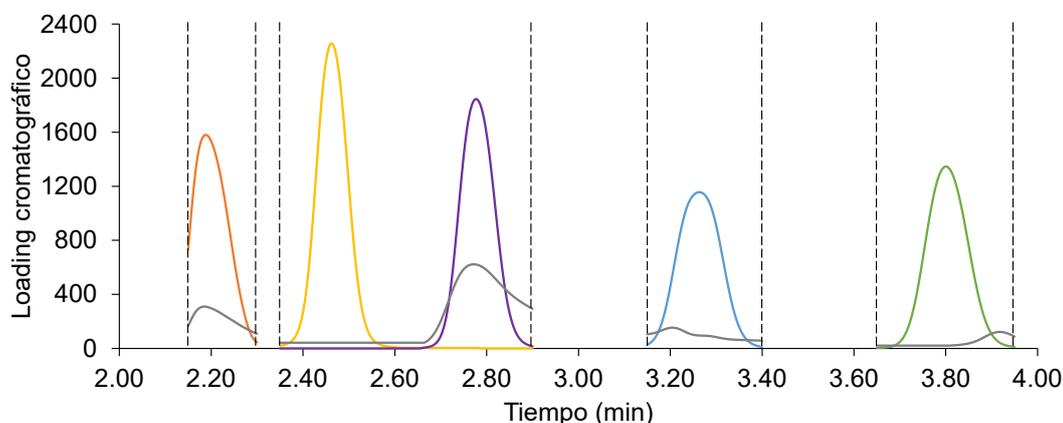


Figura VIII.2. Loadings de los perfiles cromatográficos de los cuatro modelos PARAFAC. BPS se representa en naranja, BPF en amarillo, BPA morado, BPAF en azul, BPZ en verde y todos los interferentes detectados en gris.

Como se puede observar en la Figura VIII.2, los interferentes del primer y segundo modelo PARAFAC, que coeluyen con BPS y BPA respectivamente, presentan loadings cromatográficos bastante grandes. La utilización de la técnica PARAFAC ha permitido la detección de esas sustancias y su diferenciación de los analitos de interés, lo que ha supuesto evitar la sobreestimación y por tanto disminuir la probabilidad de

cometer falsos positivos, ya que de haber utilizado un calibrado univariante el área de pico del bisfenol correspondiente se habría visto incrementada.

Los factores de los modelos PARAFAC representados en gris, no corresponden a ningún bisfenol. Como se muestra en la Figura VIII.3, sus espectros son muy diferentes a los obtenidos para BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ (representados en colores naranja, amarillo, morado, azul y verde).

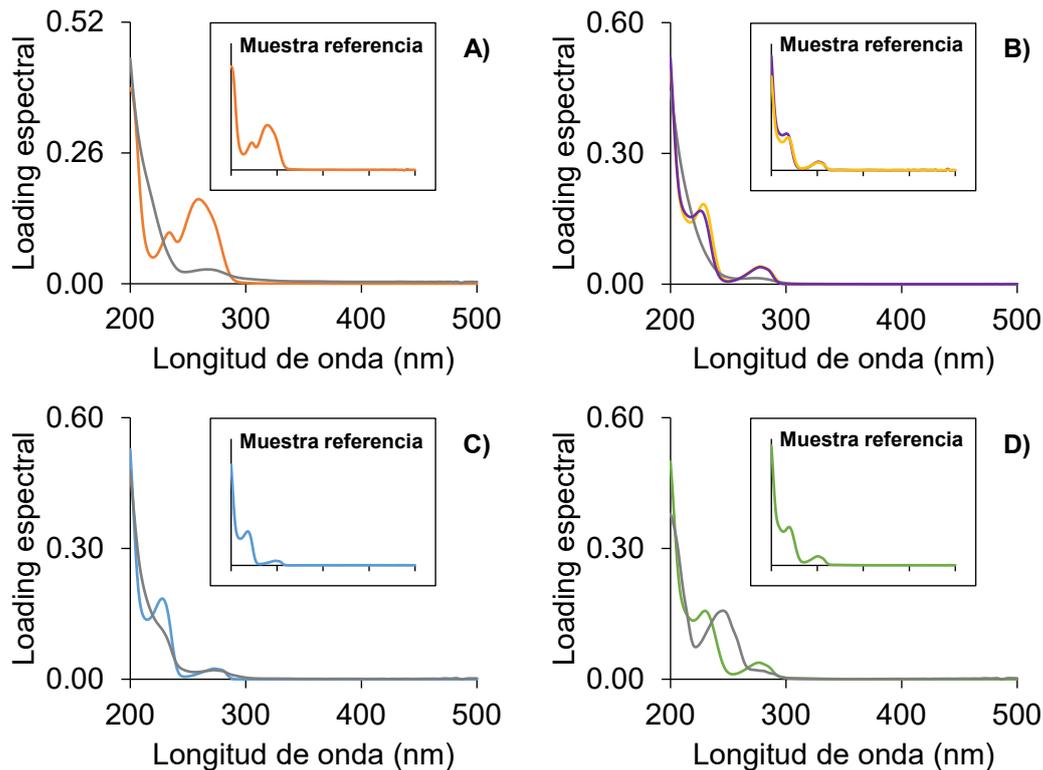


Figura VIII.3. Loadings de los perfiles espectrales de los cuatro modelos PARAFAC: A) para BPS, representado en naranja, B) para BPF y BPA, en amarillo y morado respectivamente, C) para BPAF, en azul, y D) para BPZ, en verde. Todos los interferentes detectados se muestran en gris. Los espectros de las respectivas muestras de referencia se representan en los mismos colores.

La Figura VIII.4 recoge los loadings muestrales de los 136 análisis realizados. Como se puede observar, se obtuvieron loadings similares para los blancos analíticos y las muestras de test de migración. Para saber si los bisfenoles realmente migraron desde los vasos de PC al simulante, y si sus muestras podían distinguirse de los blancos analíticos, se realizó una comparación estadística entre ambas poblaciones (cada una de ellas formada por 40 datos).

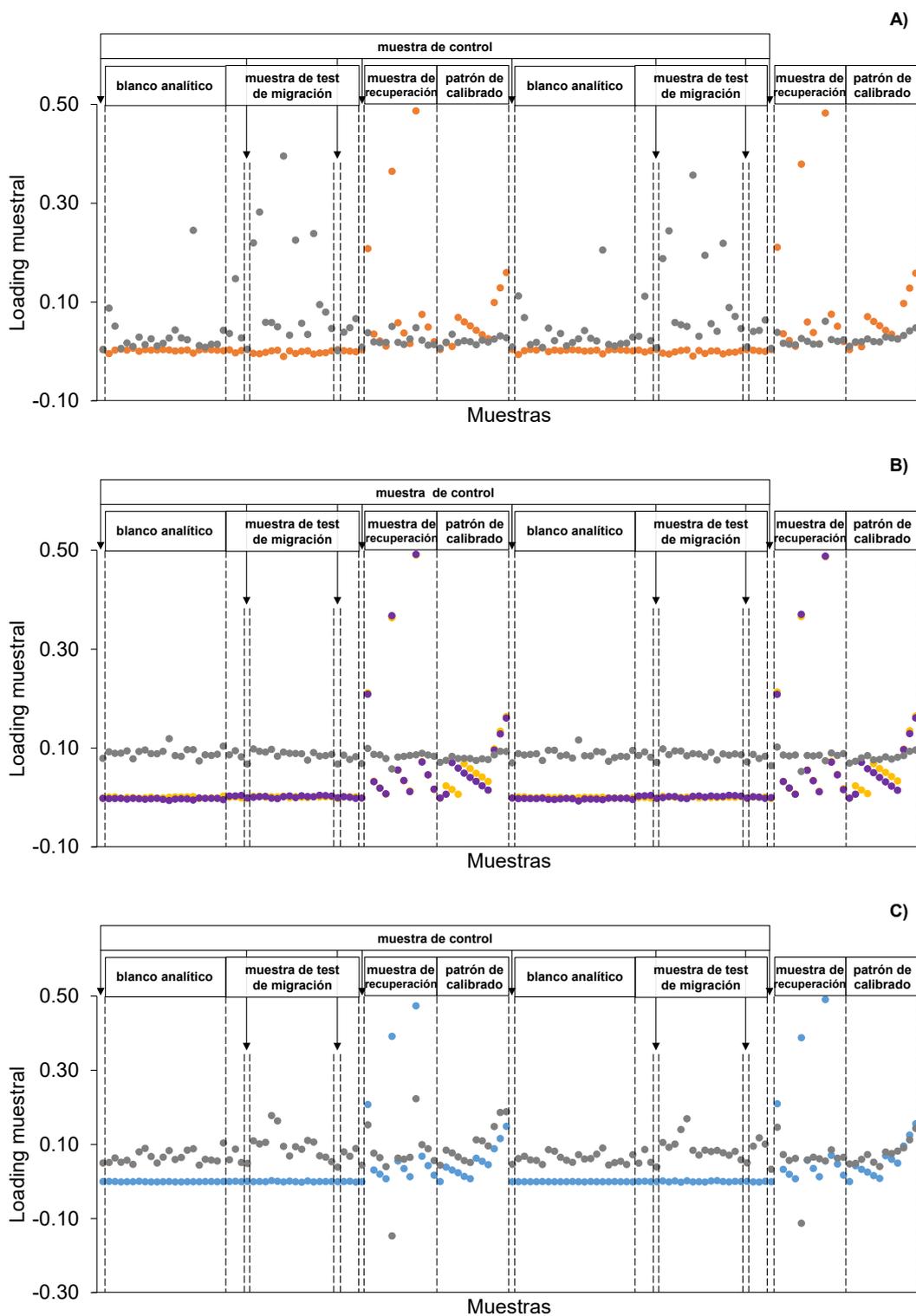


Figura VIII.4. Loadings de los perfiles muestrales de los cuatro modelos PARAFAC: A) para BPS, representado en naranja, B) para BPF y BPA, en amarillo y morado respectivamente, C) para BPAF, en azul y D) para BPZ, en verde. Todos los interferentes detectados se muestran en gris.

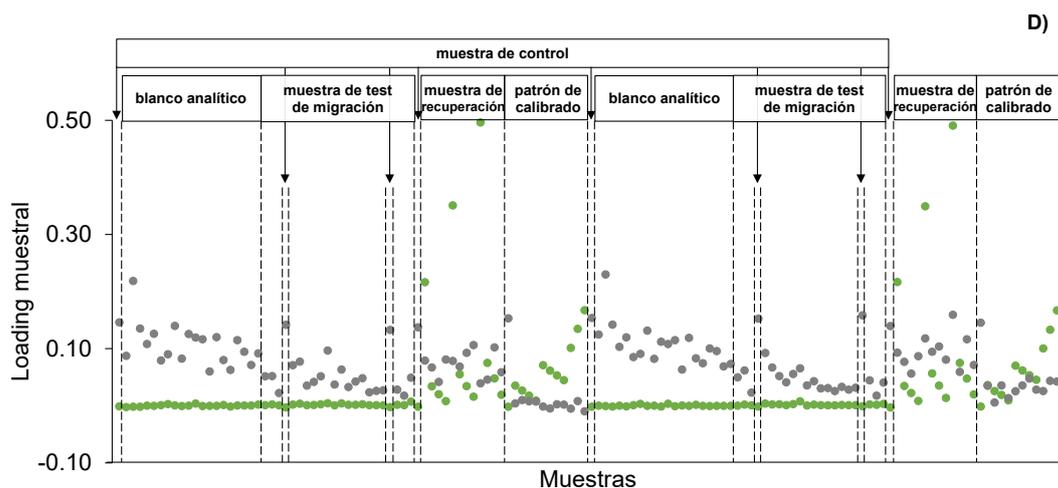


Figura VIII.4. Continuación.

VIII.5.2. Identificación inequívoca

La identificación inequívoca de los cinco bisfenoles fue garantizada en base a dos criterios de confirmación establecidos para HPLC-DAD:

- i) El tiempo de retención del analito, obtenido del perfil cromatográfico del modelo PARAFAC, será el mismo que el de la muestra de referencia, con un margen de $\pm 2.5\%$.
- ii) El espectro del analito, obtenido del perfil espectral del modelo PARAFAC, deberá coincidir con el de la muestra de referencia, dentro de un margen en los máximos de absorción de ± 2 nm como se indica en la Ref. [63].

No se encontraron desplazamientos significativos en el tiempo de retención de los analitos de una muestra a otra. Los tiempos de retención de los bisfenoles en las muestras de referencia coincidieron con los obtenidos a partir de los modelos PARAFAC (valores mostrados en la Tabla VIII.2). En este trabajo, la identificación inequívoca en el perfil espectral se realizó mediante el coeficiente de correlación entre el espectro de una muestra de referencia y el obtenido del modelo PARAFAC para este perfil. Los espectros de las muestras de referencia se muestran en la Figura VIII.3. Los coeficientes de correlación calculados (para las absorbancias registradas en 151 longitudes de onda) se recogen en la Tabla VIII.2, y como se puede observar, todos son próximos a 1. Por lo tanto, se cumplen ambos criterios.

Tabla VIII.2. Criterios de validación para la identificación inequívoca de los bisfenoles.

Analito	Tiempo de retención (min)		Coeficiente de correlación
	Muestra de referencia	PARAFAC	
BPS	2.186	2.186	0.9997
BPF	2.460	2.463	1.0000
BPA	2.773	2.776	0.9992
BPAF	3.263	3.263	1.0000
BPZ	3.793	3.800	1.0000

VIII.5.3. Validación del método

VIII.5.3.1. Rectas de calibrado y de exactitud

Las rectas de calibrado "loading del perfil muestral *versus* concentración real" se ajustaron para cada bisfenol con los siete patrones en el rango de concentración de 0 a 1.5 mg L⁻¹ (todos los niveles se analizaron por duplicado). Las filas 1 a 6 de la Tabla VIII.3 muestran las características de estos modelos de regresión. Todos ellos fueron significativos a un nivel de confianza del 95%, ya que el p-valor obtenido para el test de hipótesis (H_0 : La regresión no es significativa) fue menor que 10⁻⁴. A excepción de un modelo, el p-valor para el test de fallo de ajuste (H_0 : No hay fallo de ajuste en el modelo) fue superior a 0.05, por lo que no hay evidencias para rechazar H_0 .

La veracidad y la precisión del método se verificaron a partir las rectas de exactitud "concentración predicha *versus* concentración real", cuyos resultados se recogen en las filas 7 a 11 en la Tabla VIII.3. Los términos independientes no fueron diferentes de 0 ni las pendientes distintas de 1 para ninguna de las cinco rectas, pudiendo concluir que el método era insesgado. La precisión del método puede estimarse a partir de la desviación estándar residual (s_{yx}), cuyos valores se muestran en la fila 11 de esta tabla.

VIII.5.3.2. Límites de decisión y capacidad de detección

El límite de decisión ($CC\alpha$) se define como "el valor de la concentración neta cuyo exceso conduce, para una probabilidad α , a la decisión de que la concentración del analito en el material analizado es mayor que la del blanco" [63,64]. Por otro lado, la capacidad de detección ($CC\beta$) se define como "la verdadera concentración neta del analito en el material a analizar, que conducirá, con probabilidad 1- β , a la conclusión correcta de que la concentración en el material analizado es mayor que la del blanco", habiendo asumido una probabilidad de falso positivo α .

Los valores de $CC\alpha$ y $CC\beta$ calculados para este trabajo se muestran en las filas 12 a 13 de la Tabla VIII.3. De estos valores se deduce que el método analítico permite la cuantificación de BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ, por encima de 92.3, 61.4, 44.0, 138.9 y 65.9 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, con probabilidades de cometer un falso positivo (α) y un falso negativo (β) del 0.05.

Tabla VIII.3. Validación del método analítico. Parámetros de las rectas de calibrado y exactitud (s_{yx} es la desviación estándar de la regresión). Límite de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$) expresados en $\mu\text{g L}^{-1}$, para $\alpha = \beta = 0.05$.

		BPS	BPF	BPA	BPAF	BPZ
Recta de calibrado	Término independiente	0.002	-0.001	-0.002	-0.001	-0.001
	Pendiente	0.032	0.034	0.034	0.032	0.036
	Coefficiente de correlación	0.9985	0.9993	0.9996	0.9964	0.9992
	s_{yx}	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
	P-valor (H_0 : La regresión no es significativa)	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
	P-valor (H_0 : No existe sesgo)	0.003	0.564	0.133	0.828	0.046
	Recta de exactitud	Término independiente	$-1.3 \cdot 10^{-5}$	$-2.7 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-6}$	$-3.6 \cdot 10^{-6}$
P-valor (H_0 : Término independiente = 0)		0.999	0.998	1.000	1.000	0.999
Pendiente		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
P-valor (H_0 : Pendiente = 1)		1.000	0.997	0.999	1.000	1.000
s_{yx}		0.030	0.020	0.015	0.046	0.022
$CC\alpha$	46.0	30.5	22.3	71.6	33.2	
$CC\beta$	92.3	61.4	44.0	138.9	65.9	

VIII.5.3.3. Recuperación del procedimiento

La recuperación del procedimiento solo se calculó en nueve de las doce muestras de recuperación analizadas. La exclusión de las otras tres se debió a que su loading muestral obtenido de los modelos PARAFAC se encontraba fuera del rango de concentración del calibrado (como se puede ver en la Figura VIII.4).

Para el cálculo de la recuperación, se ajustaron nuevas rectas de calibrado para cada bisfenol con los diez patrones de concentración comprendida entre 0 y 3 mg L^{-1} (todos los niveles se analizaron por duplicado). Para el BPAF se detectó un dato anómalo

(residuo estudentizado igual a -3.89), que correspondía a una réplica del patrón de 3 mg L⁻¹. Este dato se eliminó y se rehizo el modelo de regresión. Estas nuevas rectas de calibración se validaron siguiendo el procedimiento ya descrito en la Sección VIII.5.3.1.

Los resultados de recuperación obtenidos para este trabajo se muestran en la Tabla VIII.4. Estos valores se calcularon para tres diluciones (800, 500 y 200 µg L⁻¹) de tres disoluciones mezcla (0.2, 0.3 y 0.4 mg L⁻¹ de cada bisfenol), que se analizaron por duplicado. Las filas 1 a 9 de la Tabla VIII.4 recogen la recuperación calculada expresada en porcentaje (%). Las filas 10 a 11 de esta misma tabla muestran el resumen estadístico (media y coeficiente de variación) de estos 18 datos. Con el procedimiento de preconcentración seguido se obtuvo una buena recuperación para los cinco bisfenoles, ya que sus valores medios fueron todos superiores al 95%.

Tabla VIII.4. Los resultados de la recuperación, expresados en porcentaje (%), se calcularon para tres diluciones (800, 500 and 200 µg L⁻¹) de tres disoluciones diferentes (0.2, 0.3 and 0.4 mg L⁻¹ de cada bisfenol). Todas ellas se analizaron por duplicado.

Muestra (mg L ⁻¹)	Dilución (µg L ⁻¹)	BPS		BPF		BPA		BPAF		BPZ	
0.2	800	92.4	94.5	92.2	91.4	90.8	91.6	88.9	93.1	88.8	91.2
	500	85.1	89.7	85.9	85.5	87.8	89.2	91.7	90.0	83.7	92.9
	200	91.9	90.9	82.7	82.3	93.6	85.5	91.4	91.5	79.4	83.1
0.3	800	105.0	107.6	101.8	102.9	103.5	102.6	104.6	108.4	97.2	100.0
	500	105.4	108.4	100.4	102.9	103.2	101.9	105.9	106.6	96.1	99.1
	200	100.8	98.2	100.1	95.3	93.5	93.2	99.9	98.9	107.6	92.0
0.4	800	102.8	103.3	100.4	100.9	99.9	99.4	96.5	99.9	99.8	99.6
	500	106.5	109.5	102.2	103.8	102.5	102.4	98.3	107.1	101.4	100.5
	200	98.0	99.6	93.0	101.0	98.7	92.5	97.3	99.0	98.6	102.8
Recuperación media (n = 18)		99.4		95.8		96.2		98.3		95.2	
Coeficiente de variación (%)		7.31		7.83		6.20		6.42		7.96	

VIII.5.4. Test de migración

Para cuantificar la cantidad de cada bisfenol que migra de cada vaso de PC se realizó el correspondiente test de migración, que como se ha comentado anteriormente consiste en rellenar los vasos con simulante B y mantenerlos en la estufa a 70°C durante 24 horas. De esta manera se obtuvieron veinte muestras de migración sobre las que se aplicó el procedimiento de preconcentración. Este mismo

procedimiento se llevó a cabo con los veinte blancos analíticos (todo ello descrito en la Sección VIII.4.2).

Una vez analizadas tanto las veinte muestras del test de migración como los veinte blancos analíticos, todas ellas por duplicado, a partir de la descomposición PARAFAC se obtuvieron los correspondientes loadings muestrales que se muestran en la Figura VIII.4. Con estos loadings y las rectas de calibrado descritas en la Sección VIII.5.3.1 se obtuvieron las concentraciones de los bisfenoles presentes en las muestras preconcentradas. El resumen estadístico de ambas poblaciones (blancos analíticos y test de migración) se recoge en la Tabla VIII.5.

Tabla VIII.5. Resumen estadístico de los blancos analíticos (40 datos) y de las muestras del test de migración (40 datos). Los valores corresponden a la concentración (mg L^{-1}) de analito presente en las muestras preconcentradas.

Analito	Muestra	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
BPS	Blanco	-0.010	0.015	-0.267	0.143	0.084
	Test	-0.102	-0.072	-0.386	0.028	0.101
BPF	Blanco	0.035	0.033	-0.015	0.123	0.032
	Test	0.061	0.064	0.005	0.116	0.027
BPA	Blanco	-0.032	-0.024	-0.152	0.023	0.039
	Test	0.103	0.111	-0.017	0.183	0.057
BPAF	Blanco	-0.005	-0.005	-0.021	0.036	0.011
	Test	0.008	0.000	-0.042	0.079	0.033
BPZ	Blanco	0.022	0.014	-0.047	0.123	0.039
	Test	0.073	0.062	0.020	0.231	0.046

Posteriormente, se buscaron las distribuciones que mejor se ajustaban a los datos experimentales para cada bisfenol y para cada población (blancos analíticos y muestras de test de migración). En las columnas 1 a 5 de la Tabla VIII.6 se observa el tipo y los parámetros que definen las distribuciones seleccionadas. En la Figura VIII.5 se muestran los ajustes entre las distribuciones acumuladas elegidas (representadas por curvas en color azul y rojo) y los datos experimentales de las poblaciones (representadas por cuadrados en color azul y rojo).

Tabla VIII.6. Tipo de distribución ajustada y sus parámetros para las concentraciones encontradas en blancos analíticos ($n = 40$) y en las muestras del test de migración ($n = 40$). La hipótesis nula del test de hipótesis (H_0 : No hay bisfenol en la muestra) se postuló en la población de blancos analíticos. El valor crítico y la probabilidad de falso negativo (β) se calcularon a una probabilidad fija de falso positivo (α) igual a 0.05.

Analito	Muestra	Distribución y parámetros					Análisis estadístico	
		Tipo	Media	Escala	Moda	Desviación estándar	α	Valor crítico
BPS	Blanco	Laplace	0.0153	19.2409			0.05	0.1350
	Test	Smallest Extreme Value		0.0733	-0.0568			1.00
BPF	Blanco	Largest Extreme Value		0.0260	0.0206		0.05	0.0978
	Test	Normal	0.0611			0.0267		0.92
BPA	Blanco	Smallest Extreme Value		0.0280	-0.0146		0.05	0.0162
	Test	Smallest Extreme Value		0.0434	0.1285			0.07
BPAF	Blanco	Largest Extreme Value		0.0079	-0.0095		0.05	0.0141
	Test	Largest Extreme Value		0.0262	-0.0070			0.64
BPZ	Blanco	Laplace	0.0137	36.6166			0.05	0.0765
	Test	Inverse Gaussian	0.0732	3.1601				0.64

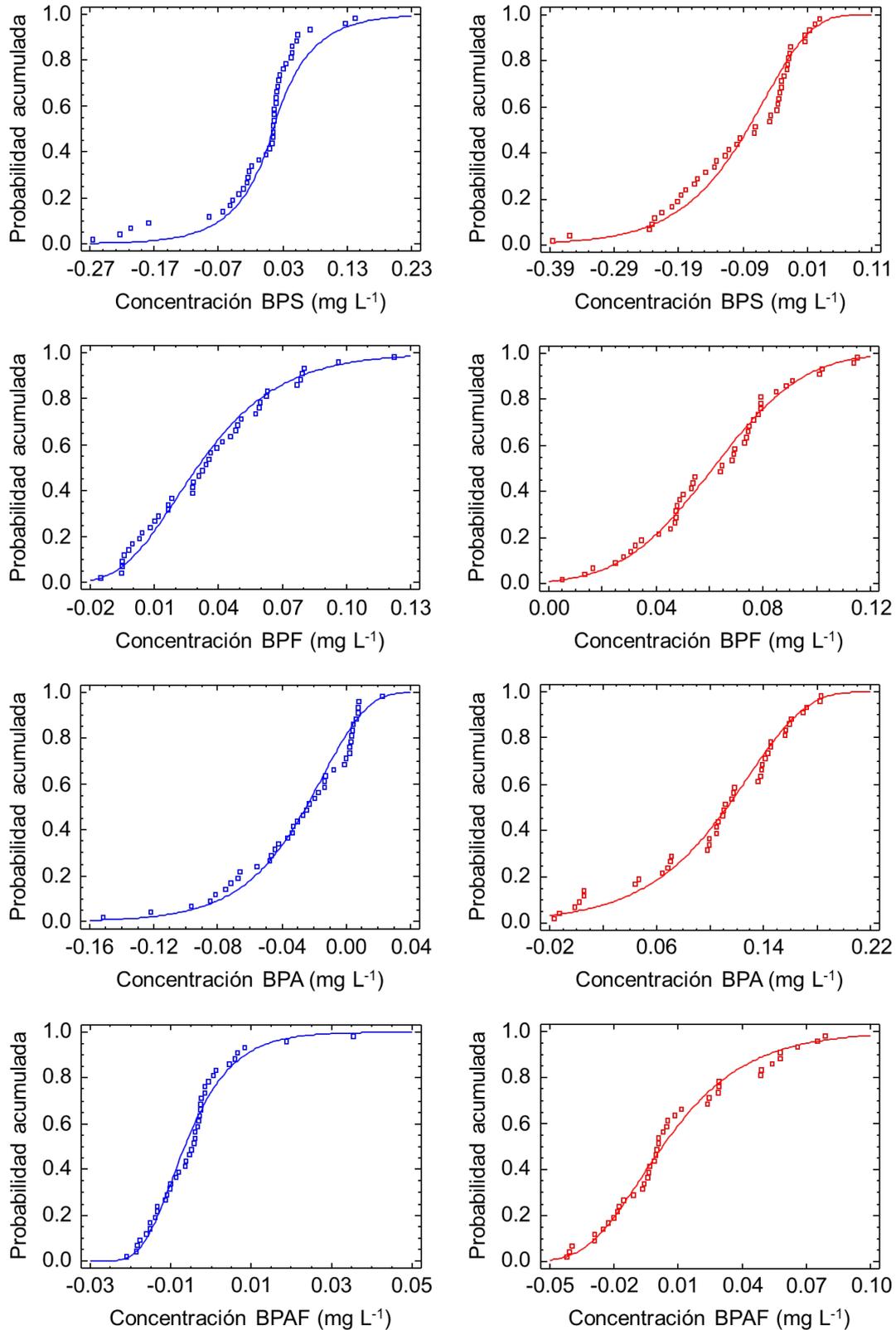


Figura VIII.5. Funciones de distribución acumulada ajustadas (líneas continuas), datos experimentales de las poblaciones (cuadrados). Para cada bisfenol, la población de blancos analíticos (n = 40) se representa en azul y la de las muestras del test de migración (n = 40) en rojo. Los datos corresponden a la concentración de bisfenol presente en todas las muestras preconcentradas.

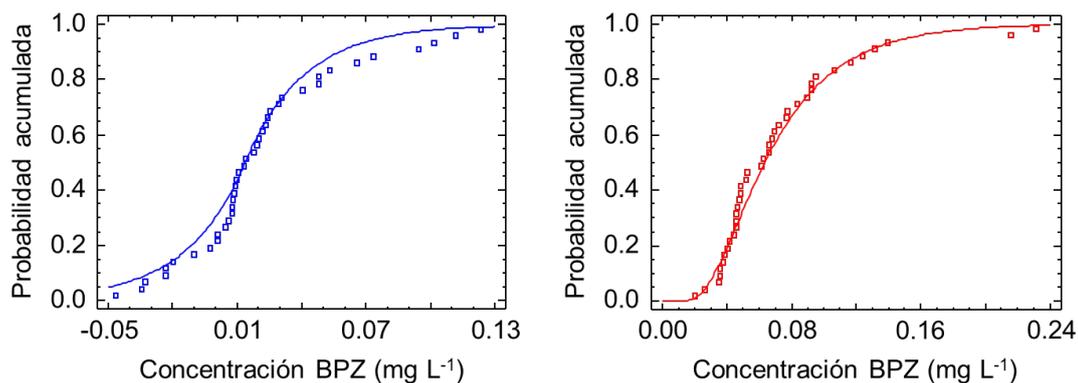


Figura VIII.5. Continuación.

Una vez definidas las distribuciones se realizó un test de hipótesis. La hipótesis nula del test se postuló para la población de blancos analíticos (H_0 : No hay bisfenol en la muestra) *versus* la hipótesis alternativa (H_a : Hay bisfenol en la muestra). Para una probabilidad de falso positivo (α) igual a 0.05, se obtuvo el valor crítico y después se evaluó la probabilidad de falso negativo (β). Los valores de ambas probabilidades y del valor crítico obtenidos para cada distribución se muestran en las columnas 6 a 8 de la Tabla VIII.6. Estos resultados se pueden describir también de forma gráfica de acuerdo a la Figura VIII.6.

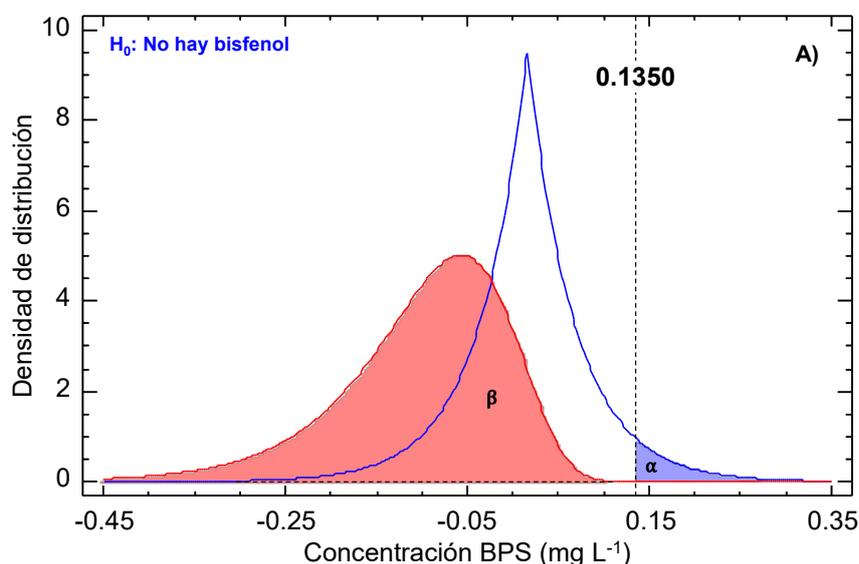


Figura VIII.6. Funciones de distribución, descritas en la Tabla VIII.6, de los blancos analíticos (color azul) y de las muestras del test de migración (color rojo): A) BPS, B) BPF, C) BPA, D) BPAF y E) BPZ. Los datos corresponden a la concentración (mg L^{-1}) de bisfenol presente en las muestras preconcentradas. Probabilidad de falso positivo (α) igual a 0.05 (área coloreada en azul), valor crítico (línea vertical discontinua) y probabilidad de falso negativo (β , área coloreada en rojo).

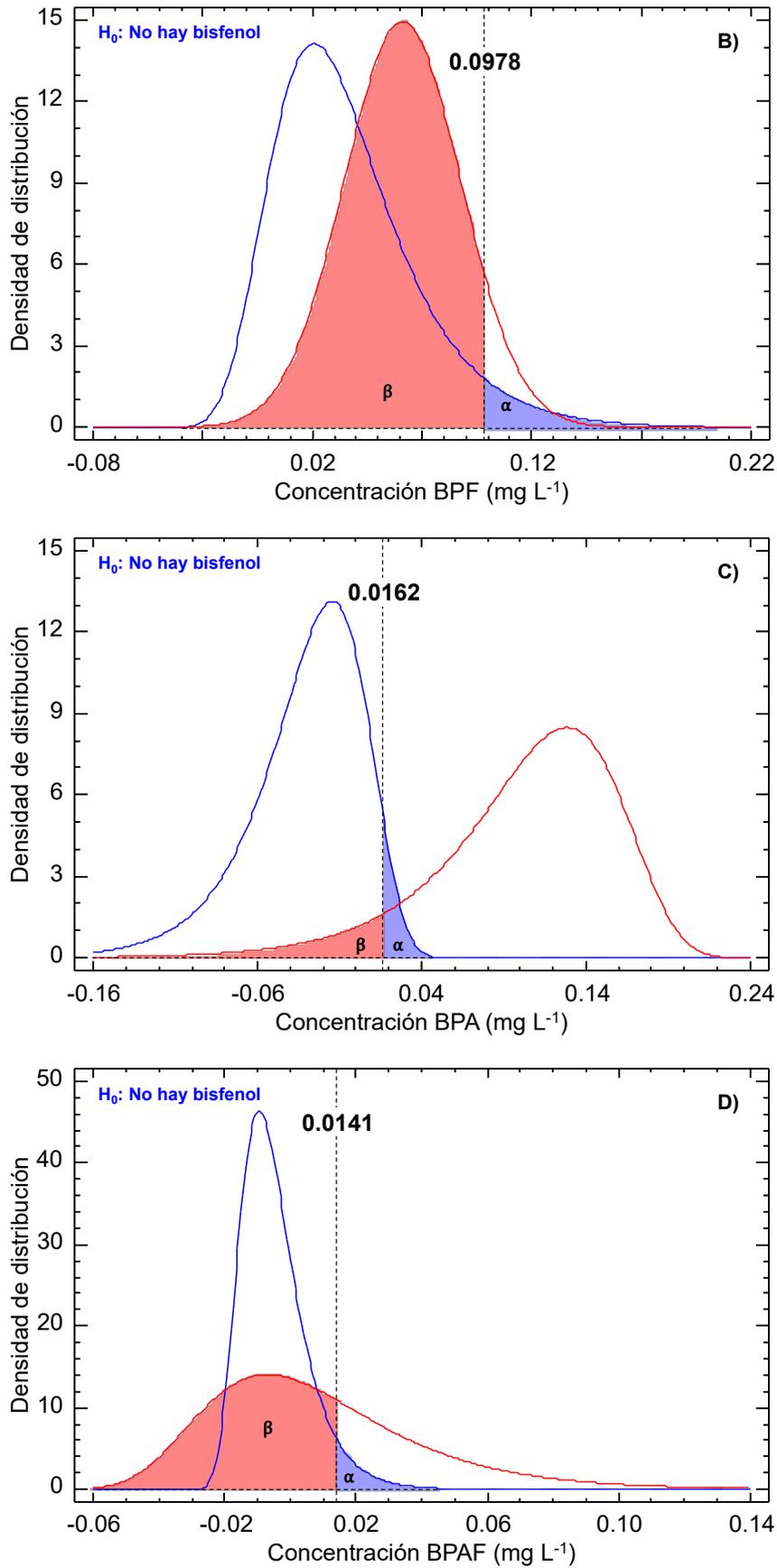


Figura VIII.6. Continuación.

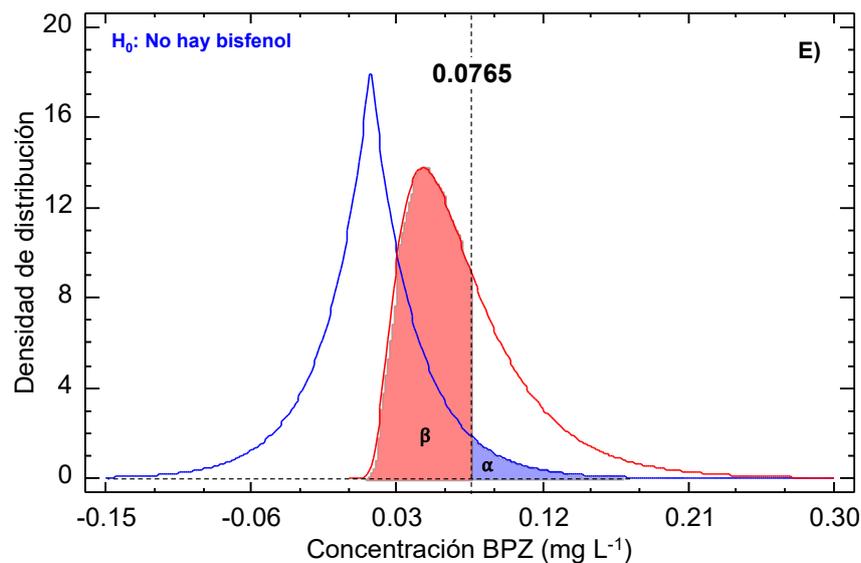


Figura VIII.6. Continuación.

De los cinco bisfenoles analizados, únicamente se encontró diferencia estadística significativa entre los blancos analíticos y las muestras del ensayo de migración para el BPA, en concreto, para α igual a 0.05, el valor crítico fue 0.0162 mg L^{-1} y β igual a 0.07. En este caso, se puede afirmar que el BPA realmente migró desde los vasos para muestras cuya concentración calculada estaba por encima de este valor crítico.

Aplicando los factores de preconcentración y recuperación, siendo estos $170/5$ y 96.2% respectivamente, el valor crítico para el BPA pasó a ser $0.49 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, referido a la concentración en la matriz original de migración. De la misma forma, el mínimo y el máximo de la población de las muestras de los test de migración para el BPA (cuyos valores correspondientes para las muestras preconcentradas fueron -0.017 y 0.183 mg L^{-1} respectivamente, ver Tabla VIII.5) se convirtieron en -0.51 y $5.60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Teniendo en cuenta que la densidad de cualquier simulante permitido puede considerarse igual a 1 g cm^{-3} según se indica en la Ref. [65], los resultados de migración obtenidos en este trabajo (en unidad de $\mu\text{g L}^{-1}$) se pueden comparar directamente con el SML, regulado en unidad de $\mu\text{g kg}^{-1}$. Por tanto, la cantidad máxima migrada de BPA, $5.60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, fue mucho menor que el SML permitido ($50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) [35]. Además, considerando que estos vasos pueden estar destinados a lactantes y niños, en cuyo caso estaría prohibido el uso de BPA, $5.60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ tampoco alcanza el límite de $10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ establecido para una sustancia no autorizada [38].

Por el contrario, no se puede confirmar la migración de BPS, BPF, BPAF o BPZ desde los vasos de PC ya que las distribuciones ajustadas para las concentraciones encontradas al llevar a cabo el test de migración no son estadísticamente diferentes de las de los blancos analíticos, como puede observarse en los valores que toman las

probabilidades de falso negativo β , que van desde 0.64 a 1.00 (véase Tabla VIII.6) y en el solapamiento de las distribuciones mostrado en la Figura VIII.6.

VIII.6. Conclusiones

Los vasos de policarbonato libre de BPA se sometieron a condiciones de migración extremas (70°C durante 24 horas) con el objetivo de determinar la cantidad migrada de los cinco bisfenoles considerados. Las muestras se analizaron mediante HPLC-DAD y se realizó descomposición PARAFAC para asegurar la identificación inequívoca de los analitos.

La comparación de las poblaciones de blancos analíticos frente a las de muestras de test de migración, a través de sus funciones de distribución ajustadas, permitió concluir que solo es posible distinguirlas con significación estadística para el BPA. En cuyo caso, para una probabilidad de falso positivo (α) igual a 0.05 y una probabilidad evaluada de falso negativo (β) igual a 0.07, se puede afirmar que el BPA migra desde los vasos de PC analizados cuando la concentración encontrada sea superior a 0.49 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La concentración máxima de BPA migrada desde los vasos de PC fue de 5.60 $\mu\text{g L}^{-1}$, cantidad muy inferior al límite establecido para la migración de una sustancia no autorizada, 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Además, no se ha detectado la migración de BPS, BPF, BPAF o BPZ desde los vasos de PC.

VIII.7. Referencias

- [1] COM (2001) 262, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, COM (1999) 706, Commission of the European Communities, 2001.
- [2] COM (1999) 706, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. Community Strategy for Endocrine Disrupters, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, Commission of the European Communities, 1999.
- [3] C. Frye, E. Bo, G. Calamandrei, L. Calzà, F. Dessì-Fulgheri, M. Fernández, L. Fusani, O. Kah, M. Kajta, Y. Le Page, H.B. Patisaul, A. Venerosi, A. K. Wojtowicz, G.C. Panzica, Endocrine disrupters: A review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems, *Journal of Neuroendocrinology* 24 (2011) 144-159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x>
- [4] A.J. Li, K. Kannan, Elevated concentrations of bisphenols, benzophenones, and antimicrobials in pantyhose collected from six countries, *Environmental Science & Technology* 52 (2018) 10812-10819. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03129>
- [5] C. Freire, J.M. Molina-Molina, L.M. Iribarne-Durán, I. Jiménez-Díaz, F. Vela-Soria, V. Mustieles, J.P. Arrebola, M.F. Fernández, F. Artacho-Cordón, N. Olea, Concentrations of bisphenol A and parabens in socks for infants and young children in Spain and their hormone-like activities, *Environment International* 127 (2019) 592-600. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.013>
- [6] W.H. Chang, S.C. Liu, H.L. Chen, C.C. Lee, Dietary intake of 4-nonylphenol and bisphenol A in Taiwanese population: Integrated risk assessment based on probabilistic and sensitive approach, *Environmental Pollution* 244 (2019) 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.040>
- [7] C. Liao, K. Kannan, Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 4655-4662. <https://doi.org/10.1021/jf400445n>
- [8] C. Liao, K. Kannan, A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China, *Food Additives & Contaminants* 31:2

- (2014) 319-329. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.868611>
- [9] G. Di Bella, H.B. Mansour, A.B. Tekaya, A. Beltifa, A.G. Potortì, E. Saiya, G. Bartolomeo, G. Dugo, V. Lo Turco, Plasticizers and BPA residues in Tunisian and Italian culinary herbs and spices, *Journal of Food Science* 83:6 (2018) 1769-1774. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14171>
- [10] E. Herrero-Hernández, R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, Use of a bisphenol-A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta* 650 (2009) 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.043>
- [11] X. Tu, S. Wu, W. Liu, Z. Gao, S. Huang, W. Chen, Sugar-ing-out assisted liquid-liquid extraction combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of bisphenol A and bisphenol B in royal jelly, *Food Analytical Methods* 12 (2019) 705-711. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1398-4>
- [12] J. López-Cervantes, P. Paseiro-Losada, Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging, *Food Additives and Contaminants* 20:6 (2003) 596-606. <https://doi.org/10.1080/0265203031000109495>
- [13] Q.B. Lin, L.F. Cai, S.J. Wu, X. Yang, Z.N. Chen, S.H. Zhou, Z.W. Wang, Determination of four types of hazardous chemicals in food contact materials by UHPLC-MS/MS, *Packaging Technology and Science* 28 (2015) 461-474. <https://doi.org/10.1002/pts.2116>
- [14] Ş. Sungur, M. Köroğlu, A. Özkan, Determination of bisphenol A migrating from canned food and beverages in markets, *Food Chemistry* 142 (2014) 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.034>
- [15] M.J. Lopez-Espinosa, A. Granada, P. Araque, J.M. Molina-Molina, M.C. Puertollano, A. Rivas, M. Fernández, I. Cerrillo, M.F. Olea-Serrano, C. López, N. Olea, Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers, *Food Additives & Contaminants* 24:1 (2007) 95-102. <https://doi.org/10.1080/02652030600936375>
- [16] A. Guart, F. Bono-Blay, A. Borrell, S. Lacorte, Effect of bottling and storage on the migration of plastic constituents in Spanish bottled waters, *Food Chemistry* 156 (2014) 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.075>
- [17] J.E. Cooper, E.L. Kendig, S.M. Belcher, Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless

- steel water bottles, *Chemosphere* 85:6 (2011) 943-947.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.060>
- [18] J. Hwang, I.A. Bae, C. Lee, S. Lee, J.C. Choi, S.J. Park, J.H. Hong, G. Lee, M. Kim, Simultaneous analysis and exposure assessment of migrated bisphenol analogues, phenol, and p-tert-butylphenol from food contact materials, *Food Additives & Contaminants* 35:11 (2018) 2270-2278.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1523571>
- [19] L. Wang, D. Zhang, X. Xu, L. Zhang, Application of ionic liquid-based dispersive liquid phase microextraction for highly sensitive simultaneous determination of three endocrine disrupting compounds in food packaging, *Food Chemistry* 197 (2016) 754-760.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.042>
- [20] C. Liao, K. Kannan, A Survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67 (2014) 50-59.
<https://doi.org/10.1007/s00244-014-0016-8>
- [21] S. Lu , Y. Yu, L. Ren, X. Zhang, G. Liu, Y. Yu, Estimation of intake and uptake of bisphenols and triclosan from personal care products by dermal contact, *Science of the Total Environment* 621 (2018) 1389-1396.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.088>
- [22] M. Liu, S. Jia, T. Dong, Y. Han, J. Xue, E.R. Wanjaya, M. Fang, The occurrence of bisphenol plasticizers in paired dust and urine samples and its association with oxidative stress, *Chemosphere* 216 (2019) 472-478.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.090>
- [23] W. Kouidhi, L. Thannimalay, C.S. Soon, M.A. Mohd, Occupational exposure to bisphenol A (BPA) in a plastic injection molding factory in Malaysia, *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 30:5 (2017) 743-750. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00917>
- [24] M.M. Arce, S. Sanlloriente, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, Easy-to-use procedure to optimise a chromatographic method. Application in the determination of bisphenol-A and phenol in toys by means of liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 1534 (2018) 93-100.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.049>
- [25] K. Mitani, S. Narimatsu, F. Izushi, H. Kataoka, Simple and rapid analysis of endocrine disruptors in liquid medicines and intravenous injection solutions by automated in-tube solid-phase microextraction/high performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32:3

- (2003) 469-478. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00221-8)
- [26] M. Eckardt, T.J. Simat, Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts - a German market analysis from 2015 to 2017, *Chemosphere* 186 (2017) 1016-1025. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.037>
- [27] K. Vinković, M. Rožić, N. Galić, Development and validation of an HPLC method for the determination of endocrine disruptors bisphenol A and benzophenone in thermochromic printing inks, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 40:19 (2017) 959-966. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1391102>
- [28] J.B. Lewis, F.A. Rueggeberg, C.A. Lapp, J.W. Ergle, G.S. Schuster, Identification and characterization of estrogen-like components in commercial resin-based dental restorative materials, *Clinical Oral Investigations* 3 (1999) 107-113. <https://doi.org/10.1007/s007840050087>
- [29] A. Bacle, S. Thevenot, C. Grignon, M. Belmouaz, M. Bauwens, B. Teychene, N. Venisse, V. Migeot, A. Dupuis, Determination of bisphenol A in water and the medical devices used in hemodialysis treatment, *International Journal of Pharmaceutics* 505 (2016) 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.003>
- [30] F. Gosetti, B. Bolfi, E. Robotti, M. Manfredi, M. Binotti, F. Ferrero, G. Bona, E. Marengo, Study of endocrine disrupting compound release from different medical devices through an on-line SPE UHPLC-MS/MS method, *Analytica Chimica Acta* 1042 (2018) 141-154. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.028>
- [31] R. Wang, Y. Huang, S. Dong, P. Wang, X. Su, The occurrence of bisphenol compounds in animal feed plastic packaging and migration into feed, *Chemosphere*. (Article In-Press, accepted on 16 November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129022>
- [32] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, *Official Journal of the European Union* L 342/59, 2009.
- [33] Commission Regulation (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bisphenol A, *Official Journal of the European Union* L 337/3, 2016.
- [34] Commission Directive (EU) 2017/898 of 24 May 2017 amending, for the

purpose of adopting specific limit values for chemicals used in toys, Appendix C to Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards bisphenol A, Official Journal of the European Union L 138/128, 2017.

- [35] Commission Regulation (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials, Official Journal of the European Union L 41/6, 2018.
- [36] Commission Directive (EU) 2017/164 of 31 January 2017 establishing a fourth list of indicative occupational exposure limit values pursuant to Council Directive 98/24/EC, and amending Commission Directives 91/322/EEC, 2000/39/EC and 2009/161/EU, Official Journal of the European Union L 27/115, 2016.
- [37] Commission Recommendation (EU) 2019/794 of 15 May 2019 on a coordinated control plan with a view to establishing the prevalence of certain substances migrating from materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 129/37, 2019.
- [38] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 12/1, 2011.
- [39] Y. Yang, Y. Yang, J. Zhang, B. Shao, J. Yin, Assessment of bisphenol A alternatives in paper products from the Chinese market and their dermal exposure in the general population, *Environmental Pollution* 244 (2019) 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.049>
- [40] H. Zhang, Y. Zhang, J. Li, M. Yang, Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China, *Science of The Total Environment* 655 (2019) 607-613. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.053>
- [41] K. Owczarek, P. Kubica, B. Kudłak, A. Rutkowska, A. Konieczna, D. Rachoń, J. Namieśnik, A. Wasik, Determination of trace levels of eleven bisphenol A analogues in human blood serum by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Science of The Total Environment* 628-629 (2018) 1362-1368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.148>
- [42] A.K. Rosenmai, M. Dybdahl, M. Pedersen, B.M.A. van Vugt-Lussenburg, E.B. Wedebye, C. Taxvig, A.M. Vinggaard, Are structural analogues

- to bisphenol A safe alternatives?, *Toxicological Sciences* 139 (2014) 35-47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu030>
- [43] D. Chen, K. Kannan, H. Tan, Z. Zheng, Y.L. Feng, Y. Wu, M. Widelka, Bisphenol analogues other than BPA: Environmental occurrence, human exposure, and toxicity — A Review, *Environmental Science & Technology* 50 (2016) 5438-5453. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05387>
- [44] J. Moreman, O. Lee, M. Trznadel, A. David, T. Kudoh, C.R. Tyler, Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in Zebrafish embryo-larvae, *Environmental Science & Technology* 51 (2017) 12796-12805. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03283>
- [45] G. Russo, A. Capuozzo, F. Barbato, C. Irace, R. Santamaria, L. Grumetto, Cytotoxicity of seven bisphenol analogues compared to bisphenol A and relationships with membrane affinity data, *Chemosphere* 201 (2018) 432-440. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.014>
- [46] K. Owczarek, B. Kudłak, V. Simeonov, Z. Mazerska, J. Namieśnik, Binary mixtures of selected bisphenols in the environment: Their toxicity in relationship to individual constituents, *Molecules* 23 (2018) 3226. <https://doi.org/10.3390/molecules23123226>
- [47] A. Ullah, M. Pirzada, S. Jahan, H. Ullah, N. Turi, W. Ullah, M.F. Siddiqui, M. Zakria, K.Z. Lodhi, M.M. Khan, Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: A focus on the possible hormonal mode of action, *Food and Chemical Toxicology* 121 (2018) 24-36. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.024>
- [48] J.S. Siracusa, L. Yin, E. Measel, S. Liang, X. Yu, Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review, *Reproductive Toxicology* 79 (2018) 96-123. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005>
- [49] A. Usman, M. Ahmad, Computational study suggesting reconsideration of BPA analogues based on their endocrine disrupting potential estimated by binding affinities to nuclear receptors, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171 (2019) 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.071>
- [50] 2019/C 404/07, Opinion of the European Committee of the Regions — Towards a comprehensive EU framework on endocrine disruptors, *Official Journal of the European Union* C 404/34, 2019.
- [51] Commission Implementing Regulation (EU) No 321/2011 of 1 April 2011

- amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the restriction of use of bisphenol A plastic infant feeding bottles, Official Journal of the European Union L 87/1, 2011.
- [52] JRC 116750, Testing conditions for kitchenware articles in contact with foodstuffs – Part 1: Plastics, European Commission, 2019. <https://europa.eu/!cM98gv>
- [53] C. Reguera, S. Sanllorente, A. Herrero, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, Study of the effect of the presence of silver nanoparticles on migration of bisphenol A from polycarbonate glasses into food simulants, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 176 (2018) 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.03.005>
- [54] M.M. Arce, S. Ruiz, S. Sanllorente, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, A new approach based on inversion of a Partial Least Squares model searching for a preset Analytical Target Profile. Application to the determination of five bisphenols by liquid chromatography with diode array detector. (Submitted to *Analytica Chimica Acta* on 28 October 2020).
- [55] EUR 24815 EN, JRC 64903, Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware, European Commission, 2011. <https://doi.org/10.2788/19565>
- [56] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, A. Herrero, S. Sanllorente, C. Reguera, Usefulness of PARAFAC for the quantification, identification, and description of analytical data, in: A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri (Eds.), *Data Handling in Science and Technology: Fundamentals and analytical applications of multiway calibration*, volume 29, Elsevier, Amsterdam, 2015, pp. 37-81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63527-3.00002-3>
- [57] C.A. Andersson, R. Bro, The N-way toolbox for MATLAB, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 52 (2000) 1-4. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(00\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(00)00071-X)
- [58] R. Bro, H.A.L. Kiers, A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models, *Journal of Chemometrics* 17 (2003) 274-286. <https://doi.org/10.1002/cem.801>
- [59] B.M. Wise, N.B. Gallagher, R. Bro, J.M. Shaver, W. Winding, R.S. Koch, *PLS Toolbox 8.7*, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA, 2019.
- [60] MATLAB version 9.4.0.813654 (R2018a), The Mathworks Inc., Natick, MA,

- USA, 2018.
- [61] STATGRAPHICS Centurion 18 version 18.1.11 (64 bit). Statgraphics Technologies Inc., Herndon, VA, USA, 2018.
- [62] L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85052-6](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85052-6)
- [63] Commission Decision (EC) No 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities* L 221/8, 2002.
- [64] ISO 11843, Capability of detection, Part 1: Terms and definitions and Part 2: methodology in the linear calibration case, International Organization for Standardization, 2000.
- [65] Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo, Ministerio de la Presidencia, Gobierno de España, BOE núm. 131, 2008. (Last update on 25 March 2011).

CAPÍTULO IX

CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones más relevantes extraídas a partir de la investigación desarrollada se resumen en:

Conclusión 1. En los Capítulos V y VIII se han implementado métodos analíticos basados en la cromatografía líquida (HPLC-FLD y HPLC-DAD), desarrollados a partir de la aplicación de una metodología sostenible, es decir, disminuyendo el impacto tanto económico como medioambiental. Los métodos desarrollados se han aplicado para la determinación de sustancias perjudiciales para la salud en materiales de uso cotidiano.

En el Capítulo V se ha aplicado la metodología de diseño de experimentos en la optimización de las condiciones de análisis (temperatura, composición y flujo de la fase móvil) para la determinación de fenol y bisfenol A migrados, en juguetes y envases de suero mediante HPLC-FLD. Una vez validado y aplicado el método sobre las muestras, no se ha encontrado bisfenol A en ninguna de las muestras analizadas. Sin embargo, se ha detectado fenol, siempre en cantidades inferiores al límite permitido, en las muestras de juguetes empleando agua como simulante y en las muestras de suero fisiológico.

En el Capítulo VIII se ha aplicado el método de análisis mediante HPLC-DAD, previamente desarrollado en el Capítulo VII, en la determinación de cinco bisfenoles (BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ) en muestras de migración obtenidas de vasos de policarbonato "libre de BPA". Contrariamente al etiquetado de los mismos, se ha encontrado bisfenol A en las muestras, aunque en cantidades inferiores al límite permitido. Sin embargo, no se ha podido identificar la presencia de ninguno de los otros cuatro bisfenoles analizados.

Conclusión 2. En el Epígrafe I del Capítulo VI se ha realizado la determinación de melamina y formaldehído migrados desde utensilios de cocina de resina de melamina. Con los datos obtenidos mediante HPLC-DAD a partir de las muestras procedentes de los test de migración se ha aplicado un análisis univariante con las áreas de pico cromatográfico calculadas a una longitud de onda fija. La cantidad encontrada de ambos analitos en las muestras no ha sobrepasado el límite permitido en ningún caso.

La presencia de interferentes en la determinación de melamina ha requerido la aplicación de una técnica multivariante. En el Epígrafe II del mismo capítulo se ha aplicado la técnica quimiométrica PARAFAC (PARAFAC2) que posee la "ventaja de segundo orden". Dicha ventaja ha permitido abordar el problema de la cuantificación y de la identificación inequívoca de la melamina cuando se han realizado test de migración en recipientes de resina de melamina-formaldehído. La aplicación de esta descomposición PARAFAC ha supuesto, respecto al análisis univariante, la disminución del error relativo en predicción en patrones de calibrado de melamina,

así como la mejora del coeficiente de correlación entre el espectro obtenido en cada uno de los análisis y el de una muestra de referencia.

Conclusión 3. En el Epígrafe I del Capítulo VI se ha realizado la determinación de la cantidad de melamina y formaldehído acumulada cuando se han expuesto utensilios de cocina de resina de melamina a sucesivos ciclos de migración de 30 minutos. Con los datos obtenidos mediante HPLC-DAD para las muestras de la cinética de migración, se ha realizado un análisis univariante utilizando como respuesta las áreas de pico. Después de un número de ciclos no muy elevado se ha comprobado que la cantidad acumulada de ambos analitos sobrepasaba el límite máximo permitido para cada uno de ellos.

En el Epígrafe II del Capítulo VI, nuevamente ha sido necesaria la aplicación de una descomposición PARAFAC (PARAFAC2) que ha permitido solventar el problema de la identificación inequívoca, así como disminuir los errores relativos en predicción y obtener una mejor correlación espectral.

Conclusión 4. En el Capítulo VI, Epígrafe III, se ha comparado la cantidad de melamina migrada en muestras que provenía de test y cinéticas de migración en utensilios de cocina de resina de melamina-formaldehído, cuando se aplica un análisis univariante (área de pico cromatográfico) frente a un análisis multivariante (loadings muestrales obtenidos por descomposición PARAFAC o PARAFAC2). La detección de interferentes con tiempos de retención cercanos a la melamina ha puesto de manifiesto la sobreestimación de la cantidad migrada cuando se ha utilizado un método univariante y, por tanto, las ventajas que supone el análisis multivariante para evitar falsas no conformidades. Concretamente, los resultados han mostrado que la sobreestimación en los test de migración ha sido mayor al 30% (de media para cada utensilio analizado), mientras que para la cinética del bol solamente para el primer ciclo la concentración obtenida ha sido 10 veces mayor (3.379 frente a 0.324 mg L⁻¹ del análisis multivariante).

Conclusión 5. En el Capítulo VII por primera vez se ha utilizado una inversión de un modelo PLS2, con un método computacional que utiliza un algoritmo genético, en el ámbito de la Calidad Analítica Diseñada (AQbD), para establecer los parámetros de control del método analítico que proporcionan un "perfil analítico objetivo". El procedimiento se ha implementado para el análisis de cinco bisfenoles (BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ) mediante HPLC-DAD, lo que permitió acortar el tiempo de ejecución del cromatograma a 4 minutos sin perder resolución entre picos.

Conclusión 6. En el Capítulo VIII ha sido de gran utilidad la comparación de distribuciones de población en la determinación de cinco bisfenoles (BPS, BPF, BPA, BPAF y BPZ) en muestras de migración de vasos de policarbonato "libre de BPA".

La comparación de las poblaciones (concentraciones) de blancos analíticos frente a las de las muestras del test de migración, a través de sus funciones de distribución ajustadas para cada uno de los cinco bisfenoles analizados, ha permitido establecer que solo es posible distinguirlas con significación estadística para el caso del bisfenol A. Para una probabilidad de falso positivo (α) igual a 0.05 y una probabilidad evaluada de falso negativo (β) igual a 0.07, se puede afirmar que el BPA migra desde los vasos de policarbonato analizados cuando la concentración encontrada sea superior a $0.49 \mu\text{g L}^{-1}$.

PUBLICACIONES

Artículos

M.M. Arce, S. Sanllorente, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia (2018).

Easy-to-use procedure to optimise a chromatographic method. Application in the determination of bisphenol-A and phenol in toys by means of liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1534, 93-100.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.049>

M.M. Arce, S. Sanllorente, M.C. Ortiz (2019).

Kinetic models of migration of melamine and formaldehyde from melamine kitchenware with data of liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1599, 115-124.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.006>

M.C. Ortiz, S. Sanllorente, A. Herrero, C. Reguera, L. Rubio, M.L. Oca, L. Valverde-Som, M.M. Arce, M.S. Sánchez, L.A. Sarabia (2020).

Three-way PARAFAC decomposition of chromatographic data for the unequivocal identification and quantification of compounds in a regulatory framework. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 200, 104003.

<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104003>

M.M. Arce, S. Ruiz, S. Sanllorente, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez.

A new approach based on inversion of a Partial Least Squares model searching for a preset Analytical Target Profile. Application to the determination of five bisphenols by liquid chromatography with diode array detector.

Enviado a *Analytica Chimica Acta* el 28 de Octubre de 2020.

M.M. Arce, M.C. Ortiz, S. Sanllorente.

HPLC-DAD and PARAFAC for the determination of bisphenol-A and other four bisphenols migrating from BPA-free polycarbonate glasses.

Pendiente de enviar a *Journal of Chromatography A* en diciembre de 2020.

M.M. Arce, M.C. Ortiz, S. Sanllorente.

Univariate data analysis versus a multivariate approach in liquid chromatography. An application in the migration from food contact materials.

En proceso de elaboración para su envío a *Talanta*.

Comunicaciones a congresos

Póster-flash. M.M. Arce, S. Sanllorente, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz (Junio 2017).

Optimal design determining bisphenol-A and phenol in toys and in other objects of daily use by means of HPLC-FLD.

IX Colloquium Chemiometricum Mediterraneum (Arles, Francia).

Póster. M.M. Arce, S. Sanllorente, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz (Octubre 2018).

Study of the migration of melamine and formaldehyde from materials in contact with foodstuffs with HPLC-DAD data.

XVIII Reunión de la Sociedad Española de Cromatografía Y Técnicas Afines (Granada, España).

Comunicación oral. M.M. Arce, S. Sanllorente, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz (Diciembre 2018).

Diseño D-óptimo para la determinación de bisfenol-A y fenol en juguetes y en otros objetos de uso diario mediante HPLC-FLD.

V Jornadas de Doctorandos de la UBU (Burgos, España).

Póster. M.M. Arce, S. Sanllorente, L.A. Sarabia, M.C. Ortiz (Julio 2019).

Advantages of using PARAFAC with HPLC-DAD data for the identification and quantification of melamine migrated from melaware.

XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (Valladolid, España).

Póster. M.M. Arce, S. Sanllorente, M.C. Ortiz (Noviembre 2019).

Usefulness of PARAFAC for the unequivocal identification of three bisphenols with overlapping peaks.

I Jornadas del Doctorado en Química Avanzada de la UBU (Burgos, España).

Comunicación oral. M.M. Arce, S. Sanllorente, M.C. Ortiz (Noviembre 2019).

Diseño D-óptimo para elegir el flujo y composición de la mezcla ternaria de la fase móvil en la determinación de cinco bisfenoles mediante HPLC-DAD.

I Jornadas del Doctorado en Química Avanzada de la UBU (Burgos, España).

Comunicación oral. M.M. Arce, S. Sanllorente, M.C. Ortiz (Diciembre 2019).
Migración de formaldehído y melamina desde utensilios de cocina y sus cinéticas de migración.
VI Jornadas de Doctorandos de la UBU (Burgos, España).

Libros

Capítulo de libro electrónico (Diciembre 2018).
María del Mar Arce, Silvia Sanllorente, Luis Antonio Sarabia, María Cruz Ortiz, Diseño D-óptimo para la determinación de bisfenol-A y fenol en juguetes y en otros objetos de uso diario mediante HPLC-FLD.
V Jornadas de Doctorandos de la Universidad de Burgos, Congresos y cursos, Volumen 67, Servicio de Publicaciones e Imagen Institucional de la Universidad de Burgos, pp. 39-49. ISBN: 978-84-16283-583

Capítulo de libro electrónico (Diciembre 2019).
María del Mar Arce, Silvia Sanllorente, María Cruz Ortiz, Migración de formaldehído y melamina desde utensilios de cocina y sus cinéticas de migración.
VI Jornadas de Doctorandos de la Universidad de Burgos, Congresos y cursos, Volumen 69, Servicio de Publicaciones e Imagen Institucional de la Universidad de Burgos, pp. 185-196. ISBN: 978-84-16283-86-6

Divulgación científica

Comunicación de divulgación de la investigación (Septiembre 2019).
Análisis de juguetes y envases de suero para la determinación de fenol y bisfenol A.
<http://www3.ubu.es/ubuinvestiga/analisis-de-juguetes-y-envases-de-suero-para-la-determinacion-de-fenol-y-bisfenol-a/>

Comunicación de divulgación de la investigación (Octubre 2019).
Melamina y formaldehído: analitos que migran desde utensilios de cocina al alimento.
<http://www3.ubu.es/ubuinvestiga/melamina-y-formaldehido-analitos-que-migran-desde-utensilios-de-cocina-al-alimento/>

A veces el final solo es el comienzo de algo nuevo.

*El mundo es redondo
y cualquier lugar que podría parecer el fin
puede ser el principio.*

Ivy Baker Priest