

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

TRABAJO FIN DE MÁSTER

DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALÉRGENOS EN
PRODUCTOS COSMÉTICOS

Realizado por:

José Luis Lara Barranco

Tutor: Dr. Enrique Barraión Catalán

Cotutora: Noelia Sánchez Marzo

Instituto en Investigación, Desarrollo e Innovación en
Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE)

Elche, septiembre de 2020

D. ENRIQUE BARRAJÓN CATALÁN, Doctor y Profesor Ayudante Doctor del área de Farmacia y Tecnología farmacéutica de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUATIFICACION DE ALÉRGENOS EN PRODUCTOS COSMÉTICOS”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D. JOSÉ LUIS LARA BARRANCO

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 14 de septiembre de 2020.

Fdo.: Prof. Dr. Enrique Barraión Catalán.

Fdo.: Noelia Sánchez Marzo (cotutora).

Agradecimientos

Tras un año de trabajo, llega el momento de agradecer de todo corazón a todas aquellas personas que me han ayudado y dado fuerzas para poder llevar a cabo este trabajo. En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor el Dr. Enrique Barrajón Catalán, quien me dio la oportunidad y confianza de poder formar parte de su grupo de trabajo y poder llevar a cabo este trabajo fin de máster.

A mi cotutora, Noelia Sánchez Marzo por su incansable ayuda, profesionalidad en su trabajo, además de toda la formación y conocimiento que me ha aportado poder realizar este trabajo bajo su supervisión. Sin ella, este trabajo no hubiera sido el mismo.

A mis padres, José Luis y Juani, por su enorme paciencia, amor, apoyo y tiempo en mi educación. Sin ellos, no estaría escribiendo estas líneas. Han sido y serán mi mayor orgullo y referencia en la vida.

A mi hermana Carmen que la quiero con locura, pilar fundamental de mi vida y la persona que siempre me saca una sonrisa en momentos duros. Eres la mejor hermana que uno puede tener.

A mi abuelita Carmen, que desde donde esté me motiva día tras día a seguir mejorando para ser mejor persona. Eres el espejo donde mirarme por tu coraje, valor, lucha para sacar adelante a tu familia cuando apenas había que comer. Espero que te sientas orgullosa de tu nieto que te ama con locura. Eres la luz que me guía e ilumina en momentos difíciles.

A Natalia, que ha sido el eje central y motor de todo este año de trabajo. Gracias por tu paciencia infinita, por tu amor, por tu coraje y valor, por comprenderme en momentos en los que ni siquiera yo lo hacía. Me faltarían páginas para agradecerte y decirte lo mucho que has significado para mí en este periodo. Me has enseñado muchas cosas. No ha sido un año fácil, pero sin ti todo hubiera sido mucho más difícil. Mi más sincero reconocimiento a tantos sanitarios que, como tú, luchan contra esta pandemia. Te quiero muchísimo, heroína.

A mis amigos, A.J. Castán, Kevin Tomás y Yeraís por tantos momentos divertidos y risas por videollamadas.

A la familia de Ecuador, Cristián, Julio, Bryan y Jenny por enseñarme tantas cosas de vuestro hermoso país. Habéis hecho que este año haya sido más llevadero.

A todos los que habéis estado en mis pensamientos y siempre os he sentido cerca pese a los kilómetros que nos han separado, os quiero con todo mi corazón.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Abstract	2
3. Introducción y antecedentes	3
3.1. Alérgenos en los productos cosméticos.....	3
3.2. Regulación europea sobre la concentración de fragancias.....	7
3.3. La cromatografía líquida	11
3.4. Tipos de cromatografía líquida.....	11
3.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	15
3.6. Espectrometría de masas (MS)	18
4. Objetivos	22
5. Material y métodos	23
5.1. Reactivos	23
5.2. Preparación de las muestras	23
5.3. Instrumentación	24
5.4. Condiciones cromatográficas en la RP-HPLC	24
5.5. Detección del extracto de musgo de roble mediante RP-HPLC-ESI-IT-MS/MS.....	25
5.6. Rectas de calibrado de los compuestos patrón	26
5.7. Validación del método de cuantificación.....	27
5.8. Cuantificación de alérgenos en distintas muestras	28
6. Resultados.....	29
6.1. Optimización del método cromatográfico	29
6.1.1. Cambios en el gradiente multipasos.....	30
6.1.2. Cambios en el flujo y en la temperatura	32
6.1.3. Cambios en la fase móvil.....	33
6.1.4. Obtención del método cromatográfico final.....	36
6.2. Detección de los compuestos mayoritarios del extracto de musgo.....	39
6.3. Obtención de las rectas de calibrado	40
6.4. Validación del método de cuantificación.....	44
6.4.1. Límites de detección y cuantificación.....	45
6.4.2. Precisión	46
6.5. Cuantificación de alérgenos en muestras	48
7. Discusión	52
8. Conclusión y futuras líneas de investigación	55
9. Bibliografía	56
10. Anexos.....	59

1. Resumen

Al igual que ocurre con otro tipo de productos como los farmacéuticos o los alimentarios, en los productos cosméticos existen sustancias capaces de desencadenar reacciones de hipersensibilidad induciendo al origen de alergias. La legislación europea referente a productos cosméticos incluye a 26 alérgenos de fragancia (24 compuestos y 2 extractos naturales) y es de obligado cumplimiento que aparezca en el etiquetado del producto los alérgenos presentes si sobrepasan un límite legal establecido. En este trabajo, a través del uso de una de las técnicas analíticas más utilizadas, la cromatografía líquida de alta resolución (fase reversa, RP-HPLC), se ha desarrollado un método analítico capaz de identificar todos los alérgenos recogidos en el reglamento europeo y testar su validez en diferentes productos cosméticos comerciales (mascarilla capilar, champú sin alérgenos, sérum facial y desmaquillante). Se obtuvieron rectas de calibrado para la cuantificación de 20 de los alérgenos de fragancia y se determinaron sus límites de detección y cuantificación, así como la precisión del método. Para la detección de uno de esos alérgenos se empleó la espectrometría de masas (MS), al tratarse de un extracto complejo y con el fin de poder detectarlo de manera inequívoca en las muestras analizadas. Los datos obtenidos mostraron que el método es plenamente funcional y capaz de ser aplicado sobre muestras reales de productos cosméticos, si bien la aparición de algunas discrepancias con el etiquetado de estos hace necesarios futuros ensayos para concluir la validación del método para su uso rutinario.

Palabras claves: RP-HPLC, MS, cromatografía líquida, analito, alérgenos, productos cosméticos.

2. Abstract

As well as other types of products such as pharmaceuticals or food, there are substances in cosmetic products being able to trigger hypersensitivity reactions, inducing allergies origin. European legislation makes reference to cosmetic products including 26 fragrance allergens (24 pure substances and 2 natural extracts), being compulsory to show allergens presence on the product labelling if some of them exceed established legal limit.

This work, using one of the most common analytical techniques, high resolution liquid chromatography (reverse phase RP-HPLC), has been developing an analytical method qualified to identify all allergens contained in European regulation and tested its validate in different commercial cosmetic products (hair mask, allergen free shampoo, facial serum and make up remover). Calibration lines were obtained for 20 fragrance allergens quantification process in addition to their detection and quantification limits which were also achieved, as well as method precision. In order to detect one of these allergens, Mass spectrometry (MS) was used. As it was referring to a complex extract, the main objective was to detect it unequivocally in the analyzed samples. Obtained data showed that this method is fully functional due to it can be applied on real cosmetic product samples, although there were some label specified allergens which were not detected. Future test are necessary to conclude method validation for routine use.

Key words: RP-HPLC, MS, liquid chromatography, analyte, allergens, cosmetic products.

3. Introducción y antecedentes

3.1. Alérgenos en los productos cosméticos

A efectos del Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, se define en su artículo 2 a un producto cosmético como: “toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales”¹. Por lo tanto, los cosméticos son productos destinados a mejorar el aspecto de piel, sus anejos y mucosas, pero siempre de uso local.

La industria cosmética está distribuida a nivel global, si bien el consumo de cosméticos está íntimamente relacionado con el nivel de desarrollo de cada país. El valor de consumo de cosméticos en Europa en 2018 clasifica a los siguientes países como principales consumidores: Alemania, Francia, Reino Unido, Italia y España. Estos países presentan un gasto conjunto anual de 53.248 millones de euros².

Resultado de la reglamentación y el esfuerzo de los profesionales del sector, los cosméticos hoy en día son seguros, pero todavía existen algunos problemas entre los que se encuentran la inclusión, por error u omisión, de determinados alérgenos en su composición. La consecuencia más común de la inclusión de estos alérgenos en las formulaciones finales es la aparición de dermatitis alérgica de contacto. Ésta es una afección cutánea debida a una reacción inmunológica de tipo IV, fruto del contacto de ciertas sustancias o alérgenos con la piel. Esta reacción cutánea se origina tras una exposición repetida a un alérgeno, originando una sensibilización previa al contacto del alérgeno con la piel. Clínicamente, la dermatitis de contacto se distingue por la presencia de prurito, eritema, eczema, vesículas y ampollas en fases más agudas y de piel queratinizada en fases crónicas. A este tipo de hipersensibilidad se le denomina también como hipersensibilidad retardada ya que sus efectos son apreciables entre 24-72h tras la exposición al antígeno³. El protocolo para la determinación de las alergias se realiza a través de una prueba epicutánea o *patch test*, donde se expone al paciente a un conjunto de alérgenos bajo condiciones controladas.

Entre las sustancias causantes de la dermatitis de contacto se distinguen: algunos metales (níquel cobalto, oro...), determinados alérgenos presentes en productos cosméticos o ciertas sustancias que incorporan algunas especies vegetales. La intensidad de la reacción desencadenada, su localización y morfología irán determinadas por la propia alergenidad

del alérgeno. Cabe mencionar la influencia de otras variables implicadas como: el tiempo de exposición, el estado cutáneo previo al contacto, la inmunocompetencia personal y las condiciones ambientales, entre otras⁴.

Como se ha comentado anteriormente, esta reacción inflamatoria está mediada por el mecanismo inmunológico de hipersensibilidad tipo IV. Ésta, es responsable de la dermatitis por contacto, lesiones tisulares en enfermedades infecciosas y de rechazo a trasplantes de tejidos.

En cuanto a los tipos de dermatitis de contacto, se diferencian:

- a) Dermatitis de contacto alérgica inducida por vía sistémica. Se origina una inflamación de manera extendida, que es apreciable en pacientes que han sido sensibilizados por contacto a alérgenos, ya haya sido por vía oral, inhalada o intravenosa. Puede originar lesiones de tipo eczema generalizado^{5,6}.
- b) Dermatitis de contacto alérgica aerotransportada. Ciertas sustancias causantes de la dermatitis por contacto pueden encontrarse suspendidas formando parte del ambiente, en forma de pequeñas partículas, gotas o vapores. Al entrar en contacto con la piel, en ocasiones, pueden generar alteraciones respiratorias como asma, oculares como la conjuntivitis e incluso inflamación de las mucosas⁵.
- c) Dermatitis por contacto fotoalérgica. La reacción inflamatoria se origina debido a la exposición a la luz UV del sol o a otra fuente de energía radiante al reaccionar con una sustancia fotosensibilizante (fotoalérgeno o fotoantígeno)⁵.

En la fisiopatología de la dermatitis alérgica por contacto se distinguen dos etapas:

1. Una fase aferente o fase de inducción. El comienzo de esta etapa se origina con el primer contacto de un hapteno con la piel. Un hapteno no es más que una sustancia que requiere de un transportador (proteína transportadora) para poder presentar capacidad inmunogénica, ya que por sí misma no es capaz de inducir anticuerpos. Una vez formado el complejo hapteno-transportador es procesado por las células presentadoras de antígenos (APC, *antigen-presenting cells*). En esta primera etapa, las células de Langerhans migran desde la piel al ganglio linfático de la zona expuesta, provocando la activación en la dermis y epidermis de linfocitos T CD8+ (Tc) y T CD4+ (Th), tal y como se muestra en la **Figura 1**. Estas células T continúan creciendo, incorporándose al torrente sanguíneo y recorriendo los órganos linfoides y la piel⁷.

2. Fase eferente o de elicitación. Tras una segunda exposición al hapteno, aparece la dermatitis tras 24/72 horas. Como se aprecia en el tramo medio y final de la **Figura 1**, las células linfocíticas T efectoras liberan citoquinas, las cuales van a actuar sobre el endotelio vascular. Finalmente, se va a producir un reclutamiento de células fagocíticas, siendo las encargadas de estimular la respuesta inmunitaria, con la consiguiente reacción inflamatoria tisular⁷.

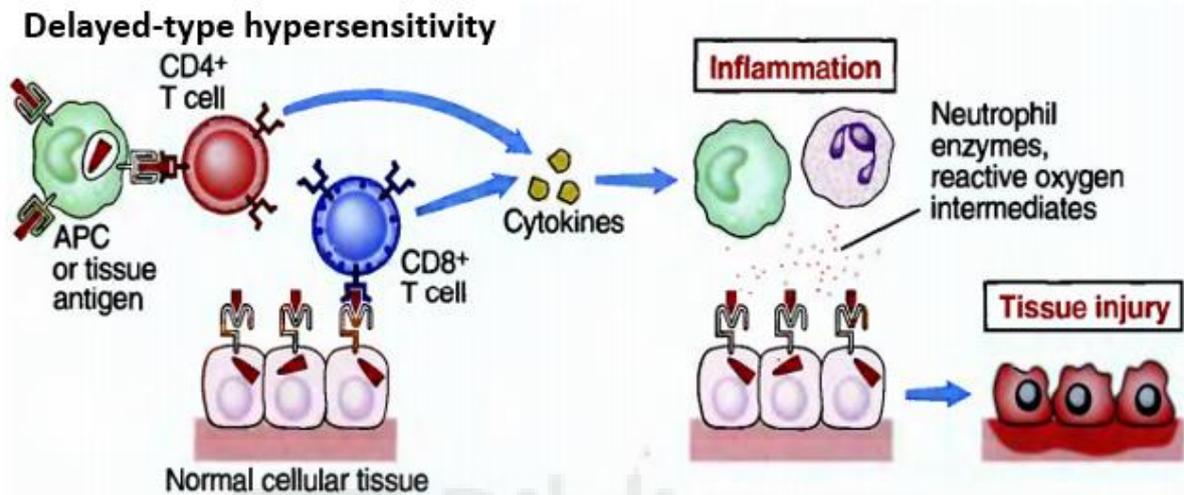


Figura 1. Reacciones implicadas en la hipersensibilidad retardada (tipo IV)⁸.

La dermatitis alérgica de contacto debida al uso de productos cosméticos resulta ser un problema dermatológico más habitual de lo que se cree. Según datos de la Academia Española de Dermatología y Venereología, su prevalencia en la población general se estima entre un 1-2%⁹. Los nuevos casos diagnosticados continúan en aumento, haciéndose importantes inversiones en nuevas estrategias preventivas y de diagnóstico. Esta irritación cutánea supone un importante impacto en la calidad de vida de aquellas personas que la padecen. En cualquier caso, estas cifras no son del todo representativas, ya que la mayoría de las personas que sufren dermatitis por contacto, simplemente, se limitan a no volver a utilizar el producto sin visitar a ningún especialista.

Los principales productos causantes de la mayoría de los casos de dermatitis de contacto son los relacionados con la higiene e hidratación cutánea, seguidos de los cosméticos ungüesales y los relacionados con el cabello. Entre sus componentes, las fragancias son responsables de la mayoría de las alergias a cosméticos, tras los tintes capilares. Según la Asociación Internacional de Fragancias (IFRA) se define a un ingrediente de fragancia como: "toda sustancia básica que se utiliza en la elaboración de perfumes por sus propiedades aromatizantes, de intensificación de los aromas o de componente para las mezclas."¹⁰.

Es probable que la falta de información junto a la gran variedad de productos cosméticos presentes en el sector, sean las principales causas de que muchos usuarios no lleguen a plantearse los potenciales efectos adversos que estas sustancias pueden originar a nivel cutáneo. Cada vez es más frecuente el número de personas que presentan algún tipo de alergia cutánea debido a su uso. Es por ello por lo que estas sustancias alergénicas juegan un papel importante en el ámbito regulatorio, y su determinación y estudio está claramente justificada.

Entre los compuestos para la síntesis de una fragancia se estiman más de 2000 ingredientes disponibles para formularla. Ésta puede estar formada entre 10 y 300 sustancias diferentes. Para detectar las alergias más comunes a las fragancias, se utiliza una mezcla de 7 sustancias presentes en ellas y 1 extracto natural para su diagnóstico. A este conjunto de fragancias se le denomina *Fragrance Mix* (Tabla 1) e incluye las sustancias alérgicas más frecuentes en Europa¹⁰.

Tabla 1. Composición del *Fragrance Mix*¹⁰.

Compuesto	%
α-Amilcinamaldehído	1
Alcohol α-amilcinamílico	1
Cinamaldehído	1
Eugenol	1
Geraniol	1
Hidroxicitronelal	1
Isoeugenol	1
Extracto de musgo de roble	1
Sesquilato de sorbitán (emulgente)	5

Con relación al conocimiento que existía en torno a las características de las fragancias empleadas en cosméticos y de los casos de alergias reportados por los consumidores, el SCCNFP (*Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products*) en 1999, reconoció y aprobó el dictamen realizado meses antes, por el cual se identificaban a las sustancias más habituales en función de su capacidad para provocar reacciones alérgicas. Es por ello, que las primeras fragancias declaradas como alérgicas de consumo fueron: α-amilcinalmadehído, alcohol de bencilo, alcohol cinamílico, citral, eugenol, hidroxicitronelal, isoeugenol, alcohol α-amilcinamílico, salicilato de bencilo, cinamaldehído, cumarina, geraniol y Lyrál® (4-(4-hidroxi-4-metilpentil)-3-ciclohexeno-1-carboxaldehído). Esta última fragancia de origen sintético es muy utilizada en Europa, con una incidencia de sensibilización en la población entre 1-3 %¹¹ (Figura 2).

De igual forma que se reconocieron a las sustancias alérgicas más habituales, también se informó de aquellas que presentaban una menor incidencia entre los consumidores. Las identificadas en este caso fueron: alcohol anisílico, cinamato de benzilo, farnesol, Lilial® (2-(4-tert-butilbencil)-propinaldehído), linalool, α -cetona, benzoato de bencilo, β -citronelol, α -hexilcinamaldehído, D-limoneno y 2-octinoato de metilo.



Figura 2. Eczema de contacto alérgico en zona axilar originado por desodorante con Lyrall¹¹.

3.2. Regulación europea sobre la concentración de fragancias

La normativa vigente se corresponde con la evolución que ha ido sufriendo la primera al respecto, que fue la Directiva 76/768/CEE del Consejo, de 27 de julio de 1976. Esta normativa unificaba a los estados miembros en materia relativa a los productos cosméticos, priorizando como objetivo principal la protección de la salud humana. El antiguo Comité Científico de Seguridad de los Consumidores, SCCNFP (1997-2004), más tarde denominado SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products, 2004-2009*) y actualmente SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*) es el organismo responsable de dictaminar las cuestiones relativas a los riesgos para la salud humana y seguridad (biológicos, químicos, físicos, etc.), relacionados con productos de consumo no alimentarios.

El 8 de diciembre de 1999, el SCCNFP expuso la problemática en referencia a un conjunto de 24 ingredientes de fragancias (13 bien documentadas y 11 con menor información) que producían dermatitis alérgica de contacto, reconocidas además por los usuarios. Sobre las bases de lo establecido en 1999, este organismo introdujo en la 7ª enmienda del Anexo III de la Directiva 2003/15/CE¹² las 24 sustancias anteriormente mencionadas junto a 2 nuevas (*Evernia prunastri* y *Evernia furfuracea*), haciendo un total de 26 ingredientes de fragancias actualmente reconocidas (Tabla 2).

Tabla 2. Listado de las 26 fragancias de declaración obligatoria el etiquetado de productos cosméticos, en función de la séptima enmienda de la Directiva de Cosmética¹¹.

Compuestos	
α -Amilcinalmadehído	Geraniol
Alcohol α -amilcinamílico	Hidroxicitronelal
α -Hexilcinamaldehído	Isoeugenol
β -Citronelol	D-Limoneno
Alcohol de bencilo	Linalool
Benzoato de bencilo	2-Octinoato de metilo
Cinamato de bencilo	<i>Evernia prunastri</i>
Salicilato de bencilo	<i>Evernia furfuracea</i>
Cinamaldehído	Lilial [®]
Alcohol cinamílico	α -Cetona
Citral	Lyrál [®]
Cumarina	Eugenol
Farnesol	Alcohol anísico

Tras numerosas modificaciones se adoptó el Reglamento (CE) n° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 (entrada en vigor el 11 de julio de 2013). Sobre él se continúan haciendo cambios en sus diferentes anexos, entre los que cabe destacar:

- ✓ El incremento de la seguridad de los productos cosméticos respecto al cumplimiento de nuevas obligaciones de seguridad, resultando más estrictas previa comercialización de dichos productos.
- ✓ La simplificación burocrática, reduciendo así la carga administrativa y ambigüedades. También, se han reducido los procedimientos para las empresas y autoridades reguladoras propias del sector.
- ✓ La actualización de los criterios respecto a nuevos avances tecnológicos, incluyendo el uso de nanomateriales.
- ✓ El mantenimiento de la previa prohibición de la experimentación en animales (Directiva 2003/15/CE). Esta directiva entró en vigor en 2004 en la cual se prohibía la experimentación animal para productos cosméticos. Este avance culminó en el año 2009, cuando se prohibió utilizar animales también como parte de la investigación sobre ingredientes cosméticos.

Basándose en estas consideraciones, la Directiva exigía a la UE (Unión Europea) la declaración de estas 26 sustancias cuando se encontrasen en cantidades superiores a los

niveles establecidos. En relación a las cantidades presentes, resulta de obligado cumplimiento (desde el 2005) la información y declaración de la presencia de estos alérgenos cuando excedan una concentración superior al 0,001% o 10 ppm en productos que no necesitan aclarado (*leave-on*), mientras que en los que sí lo necesitan (*rinse-off*), como los geles y jabones, el límite se establece en 0,01% o 100 ppm^{11, 13}. Requerir la presencia de estas sustancias en la lista de ingredientes y la correcta información al consumidor, mejora el diagnóstico de las alergias de contacto, haciendo que los propios usuarios elijan los productos que más se adapten a su tipo de piel.

Como consecuencia del incremento en el número de personas diagnosticadas con dermatitis de contacto, y dado el uso diario de productos cosméticos y de higiene personal, surge la necesidad de plantear nuevas estrategias y metodologías que faciliten la determinación y cuantificación de aquellos alérgenos presentes en los mismos.

Con este trabajo, se pretende desarrollar un método cromatográfico que permita la identificación de forma simultánea de estas sustancias, simplificando el análisis y acelerando la obtención de resultados. Teniendo en cuenta la disponibilidad y acceso a los distintos compuestos, únicamente se ha incluido a uno de los dos extractos declarados como alérgenos, el extracto de musgo de roble (*Evernia prunastri*), dejando al extracto de musgo de árbol (*Evernia furfuracea*) fuera del estudio. Ambos extractos se corresponden con sustancias naturales, que de acuerdo con la declaración provisional dada por el SCCNFP se consideraron en un documento separado (SCCNFP/0202/99)¹⁰. Los compuestos mayoritarios en el extracto de musgo son el ácido evérico, el ácido úsnico, la atranorina y la cicloatranorina¹⁴ (**Figura 3**).

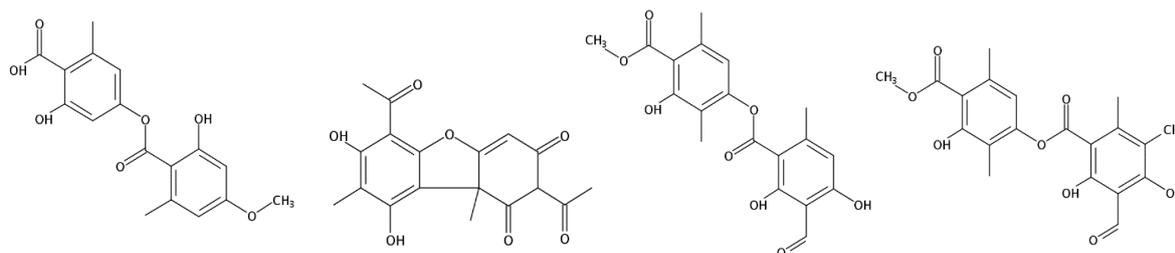
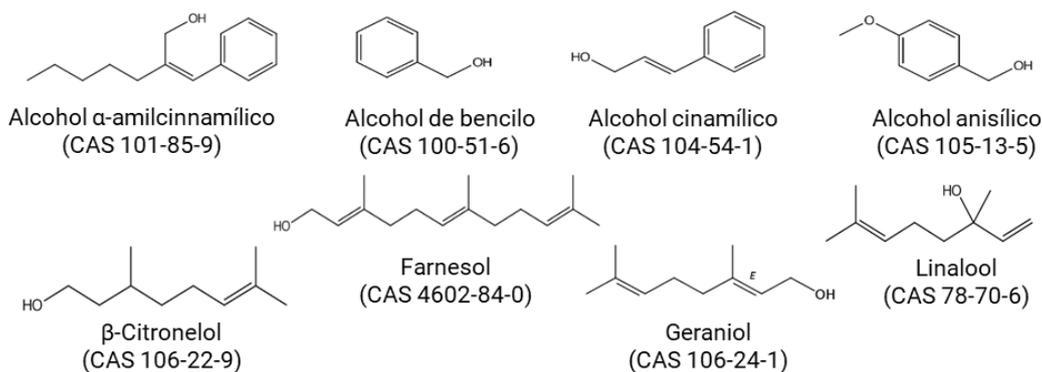


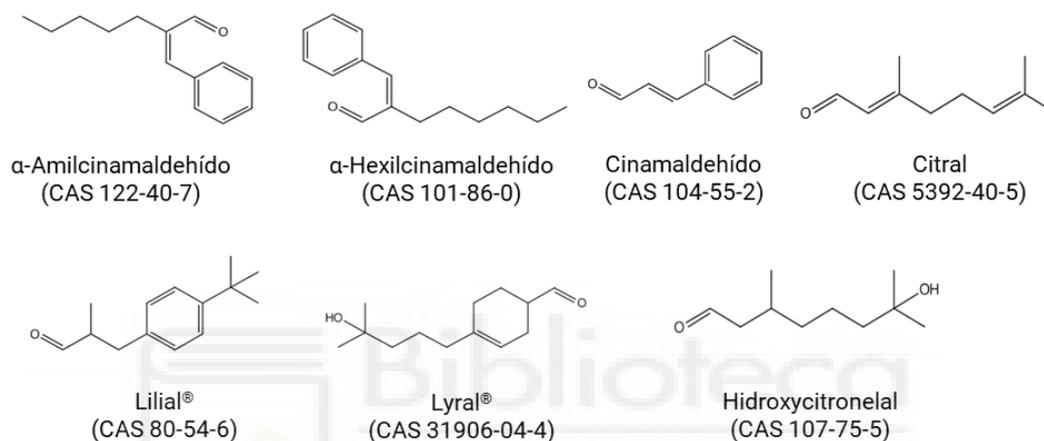
Figura 3. Estructura química de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto de musgo de roble (*Evernia prunastri*). De izquierda a derecha: ácido evérico, ácido úsnico, atranorina y cloroatranorina.

Por tanto, además del extracto mencionado, en el presente trabajo se van a analizar los otros 24 compuestos puros declarados como alérgenos en la reglamentación, los cuales presentan diferentes polaridades en base a su distinta naturaleza química (**Figura 4**).

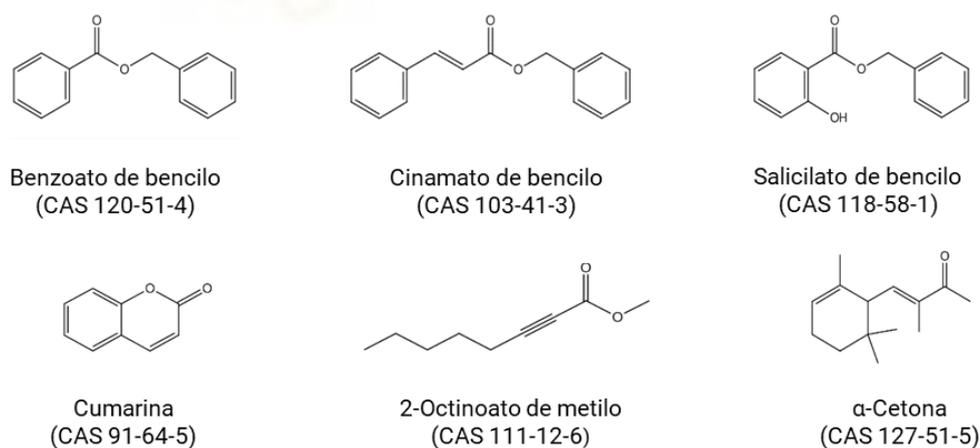
Alcoholes



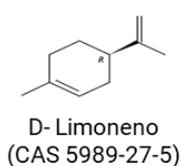
Aldehídos



Ésteres, Lactonas y Cetonas



Hidruro cíclico



Fenoles

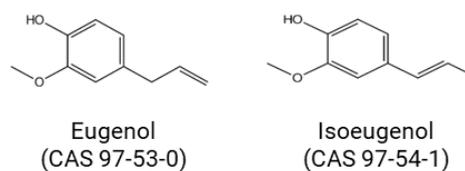


Figura 4. Estructura química de los 24 compuestos puros declarados como alérgenos.

3.3. La cromatografía líquida

Una de las técnicas más empleadas para la determinación de las distintas sustancias que conforman a un producto cosmético, es la cromatografía líquida (LC, *liquid chromatography*). Su fundamento va a permitir la separación de los distintos elementos que constituyen el producto final. En este tipo de cromatografía se emplea un fluido como fase móvil al que se le hace pasar a través de una sustancia o medio poroso, que constituye la fase estacionaria. La muestra es inyectada al sistema y los analitos son transportados por la fase móvil hasta la fase estacionaria, con la que interaccionarán en menor o mayor medida y finalmente serán eluidos, continuando el recorrido mediante la fase móvil hasta el detector.

En un contexto histórico el desarrollo de los primeros métodos cromatográficos se empieza a llevar a cabo a mediados del siglo XIX, basados en procedimientos clásicos de extracción, destilación y precipitación. El uso y aplicación de la cromatografía eran llevados a cabo por científicos habituados a trabajar con sustancias colorantes. No fue hasta el año 1861, cuando se publica la primera obra conocida al respecto, denominada "*Análisis capilar*", donde se describía el ascenso de una disolución en depósitos con colorantes a través de trozos de tela. En ella, se observaba la separación de los distintos componentes a través de la aparición de diferentes regiones coloreadas¹⁵.

Los científicos Syngé y Martin implementaron una nueva técnica denominada cromatografía de reparto, consiguiendo el Premio Nobel de Química en 1952. Se vio aumentada la lista de premios nobeles posteriores basados en el uso de técnicas cromatográficas.

3.4. Tipos de cromatografía líquida

Al botánico Tswett se le atribuye el haber asentado las bases para el desarrollo de la actual cromatografía moderna, la cromatografía en columna. Sus estudios realizados a principios del siglo XX, se centraron en la separación de pigmentos vegetales, clorofilas y xantofilas¹⁶. Para este fin, utilizó una disolución de pigmentos en éter de petróleo y filtró la muestra haciéndola pasar a través de una columna con un adsorbente formado por pequeñas partículas de carbonato cálcico. La columna de Tswett se trataba de un tubo vertical abierto en la parte superior, que contenía esas partículas adsorbentes a las que se les denomina fase estacionaria. Por ese tubo fluía una sustancia líquida denominada eluyente o fase móvil, en la cual iban las moléculas a separar. Atendiendo a la secuencia de adsorción de los distintos pigmentos, observó la separación de las sustancias presentes en la muestra mediante

diferentes franjas coloreadas. Con la realización de este experimento, Tswett demostró que la clorofila era uno de los muchos pigmentos presentes en los vegetales. Resulta evidente que el fenómeno de adsorción referido no se limita únicamente a pigmentos vegetales, sino que las mismas leyes operan en todo tipo de compuestos químicos¹⁷. Es así, como la sencilla columna de Tswett, se ha ido mejorando hasta dar lugar a los potentes equipos cromatográficos que se conocen actualmente.

No obstante, también existe la cromatografía en plano, donde la fase estacionaria se la inmoviliza sobre una placa y la fase móvil se mueve a través de ella por capilaridad, interviniendo la gravedad en algunos casos o mediante la aplicación de un potencial eléctrico. Dentro de este tipo, se distinguen la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía en papel (PC) y la electrocromatografía (EC). Entre ellos destaca la TLC como el método más rápido, simple y eficaz, obteniendo resultados fácilmente replicables.

El fundamento analítico de la cromatografía consiste en tratar de separar a los diferentes analitos, basándose en sus velocidades de desplazamiento cuando la fase móvil (líquida, gaseosa o fluido supercrítico) los arrastra a través de una fase estacionaria (sólida, gel o líquida), en función de la afinidad de los analitos por las diferentes fases. Dependiendo de las características de la muestra a analizar, para favorecer la separación de sus compuestos, se pueden utilizar combinaciones del estado físico de la fase móvil y de la estacionaria.

Según el tipo de fase estacionaria empleada, la separación de los componentes que conforman a una mezcla va a depender tanto de la naturaleza química, como de la afinidad que estos posean a su paso por dicha fase. Cada uno de ellos va a eluir a distinto tiempo, denominado tiempo de retención (t_R).

En la **Figura 5** se representa lo comentado con relación a la separación de los compuestos de una mezcla en función a sus diferentes movilidades, fruto de sus interacciones con la fase móvil y estacionaria. Al inicio de la cromatografía se aprecia la mezcla de analitos en la cabeza de columna (**Figura 5A**, zona negra). En su paso por la columna conducidos por la fase móvil, cada analito interaccionará en mayor o menor medida con la fase estacionaria según su naturaleza química. Los analitos con mayor afinidad por la fase estacionaria interaccionarán con ella, retrasando su avance, mientras que aquellos con mejor afinidad por la fase estacionaria, avanzarán más rápidamente de la mano de la fase móvil por la que tendrán mayor afinidad. Con ello, los analitos se irán separando a lo largo de la columna y cada uno de ellos eluirá a distinto tiempo (t_R) (**Figura 5B**).



Figura 5. Retención de analitos en función de sus afinidades a su paso por la fase estacionaria¹⁸.

En base a las diferentes interacciones que se pueden observar entre los analitos a separar y del estado de la fase móvil y estacionaria, se diferencian cuatro tipos principales de cromatografía líquida, que se muestran en la **Figura 6** y se listan a continuación:

- a) Cromatografía de exclusión por tamaño, también conocida como cromatografía de filtración en gel, es un método de especial utilidad en la separación de sustancias de elevado peso molecular. El relleno poroso en este tipo de cromatografía se corresponde con sustancias poliméricas o de sílice. El tiempo de retención de cada molécula en la matriz va a venir determinado por su tamaño. Las moléculas más grandes con un tamaño medio mayor al de los poros de la matriz, no van a poder penetrar en ella ni quedar retenidas, siendo las primeras en eluir. Sin embargo, aquellas que presentan tamaños menores a los poros de la matriz van a poder acceder a ellos quedando retenidas más tiempo.
- b) Cromatografía iónica, o cromatografía de intercambio iónico. La fase estacionaria va a estar formada por una resina natural o sintética en la que sus componentes presentan carga eléctrica en su superficie. Las sustancias catiónicas se intercambian gracias al uso de resinas que presentan cargas negativas (resinas de intercambio catiónico). De la misma forma, las sustancias aniónicas se intercambian con fases estacionarias con cargas positivas (resinas de intercambio aniónico)¹⁹. La carga de la resina interacciona con la carga opuesta del analito, favoreciendo su separación de aquellos que no presentan carga o de los que esta sea la misma a la que posee la resina.

- c) Cromatografía de afinidad, en la que se produce la unión reversible entre el analito a estudio y un ligando específico fijado en una matriz sólida. Este tipo de cromatografía resulta ser muy específica, permitiendo separar y purificar a sustancias de distinta naturaleza.
- d) Cromatografía de adsorción, en la que la fase sólida está compuesta por los elementos adsorbentes alúmina o sílice, siendo esta última la más utilizada por su idoneidad gracias a su capacidad de carga y características. Al igual que la cromatografía de reparto, los distintos compuestos se separarán en función del grupo funcional que presenten, interaccionando con la fase estacionaria mediante polaridad. Cabe destacar que este tipo de cromatografía permite la separación de isómeros de una muestra, a diferencia de los anteriormente comentados.

Dentro de la cromatografía de adsorción, y en función de la polaridad de las fases móvil y estacionaria, se diferencian:

- ✓ Cromatografía de líquidos de adsorción en fase normal, en la que la fase estacionaria es más polar y la fase móvil más apolar. Esto hace que los analitos más polares se retengan con más fuerza en la columna, teniendo lugar la elución primeramente de las sustancias más apolares²⁰.
- ✓ Cromatografía de líquidos de adsorción en fase reversa, en la que la fase estacionaria es más apolar y la fase móvil más polar. Se utilizan mezclas acuosas con diferentes sustancias orgánicas miscibles en agua. En este caso, va a suceder lo contrario a lo comentado anteriormente, quedando los analitos más apolares retenidos mayor tiempo en la columna. Éstos eluirán en presencia de disolventes menos polares, siendo los más empleados el metanol, el acetonitrilo, el etanol y el alcohol isopropílico²¹.
En cuanto a la fase estacionaria son dos los tipos más comunes. La más habitual de ellas es la formada por grupos no polares enlazados a la sílice, siendo los grupos orgánicos más habituales $-CH_3$, $-C_8H_{17}$, y $-C_{18}H_{37}$. La cadena más común es la de 18 átomos de carbono (n-octadecilo)²², comúnmente conocida con C_{18} . El otro tipo de fase estacionaria empleada en fase reversa se corresponde con sustancias esféricas compuestas por polímero orgánico (típicamente poliestireno y divinilbenceno). Estos materiales establecen enlaces cruzados entre sí, lo que le proporciona rigidez al material, necesaria para poder soportar deformaciones bajo efectos de presión. Se

estima que alrededor del 60-70% de los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que se realizan en general, son realizados por HPLC de fase reversa²³.

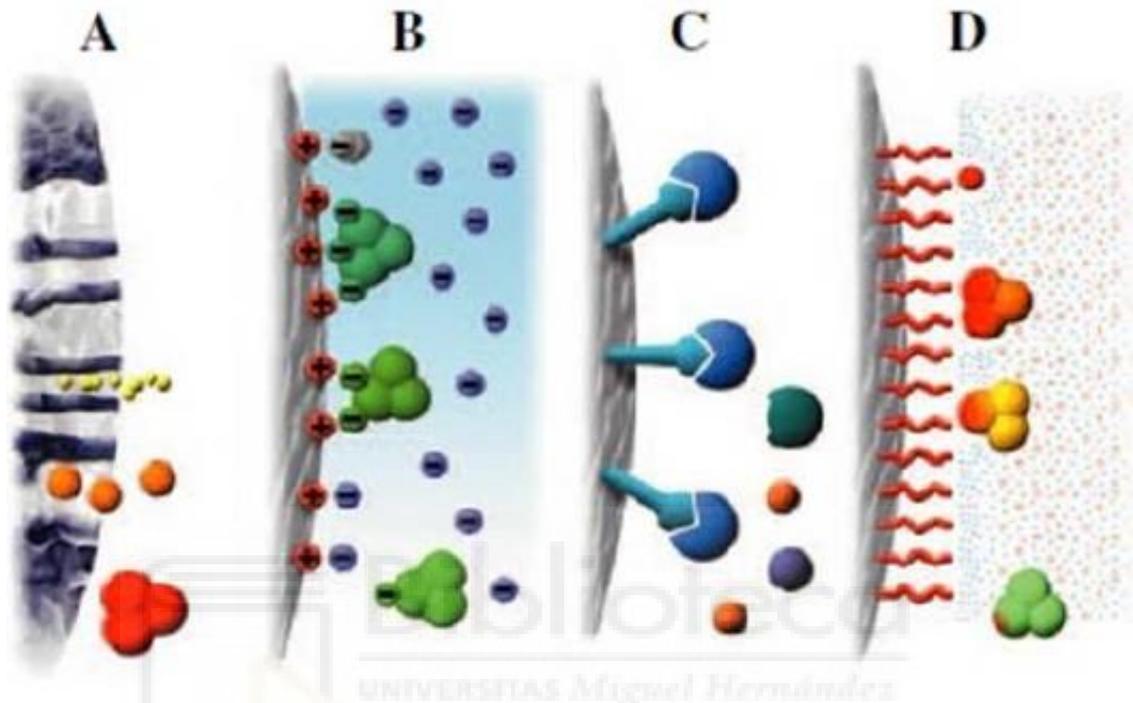


Figura 6. Los cuatro tipos básicos de cromatografía líquida. A.- Cromatografía de exclusión por tamaños, B.-Cromatografía de intercambio iónico, C.- Cromatografía de reparto, y D.- Cromatografía de adsorción. Extraído de: Tomás-Menor 2015²⁰.

3.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En un contexto histórico, el origen de la HPLC se remonta al año 1954, cuando Giddings propuso extrapolar y aplicar los mismos factores de la cromatografía de gases a la cromatografía líquida.

El fundamento de la alta resolución de este tipo de LC proviene del pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, para lo cual es necesario usar altas presiones. Los científicos implicados en el desarrollo de esta técnica ya observaron que, al disminuir el diámetro de los poros que conformaban la columna, se podría llegar a una mejora en la eficiencia de la columna. Sin embargo, debido al escaso desarrollo de bombas capaces de originar un caudal uniforme de la fase móvil, el avance de esta técnica tuvo que esperar.

En las primeras fases del desarrollo, la LC se llevaba a cabo en columnas de vidrio de diámetros que iban desde 1 hasta los 5 cm y de longitudes de 50-500 cm (Tswett llevó a cabo

sus trabajos con este tipo de columnas). Con el objetivo de asegurar un caudal adecuado, el tamaño de las partículas de la fase sólida estacionaria se situaba habitualmente entre los 150-200 μm . Más tarde, con la evolución de la técnica desde sus primeras etapas, se observó que su eficiencia residía en la capacidad de reducir el tamaño de las partículas que rellenaban a las columnas. No fue hasta finales de los años sesenta cuando se empezó a disponer de la tecnología y herramientas necesarias para llegar a conseguir estas mejoras. Fue entonces cuando se empezaron a producir rellenos de columnas a dimensiones realmente reducidas, alcanzando tamaños de partícula de relleno de entre 3 y 10 μm ²⁴. Estos avances, junto con la mejora significativa de las bombas, fueron las que posibilitaron el gran salto de calidad de la técnica de HPLC.

Desde su origen, esta técnica no ha dejado de evolucionar, alcanzándose niveles muy elevados de precisión y resolución. Es una técnica versátil, de alta precisión y sensibilidad. Todo ello, unido a su aplicación en fundamentales procesos de la industria, ha provocado el creciente interés de muchas áreas de la ciencia, haciendo de este método una de las técnicas analíticas más utilizadas.

Este trabajo se ha desarrollado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high performance liquid chromatography*) en fase reversa. Se empleó el equipo que se muestra en la **Figura 7**, en la que se pueden distinguir los distintos componentes que lo integran: disolvente/s para la fase móvil, desgasificador, sistema de bombeo, sistema automático de inyección de muestras (*autosampler*), columna para cromatografía de líquidos (usualmente acompañada de una precolumna), detector, sistema de procesamiento de datos y recipiente para desechos.

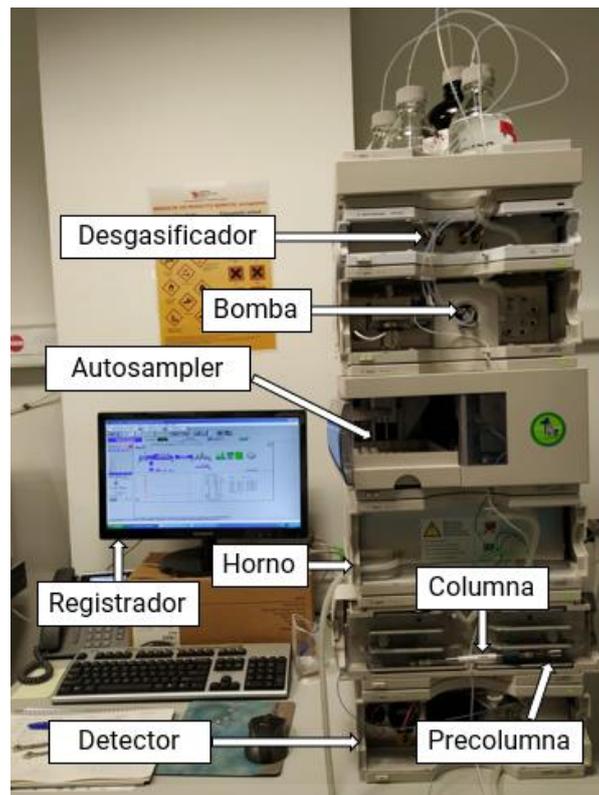


Figura 7. Esquema básico de los componentes del equipo HPLC utilizado.

En referencia a los detectores de cromatografía de líquidos, las características que debe reunir un detector y que determinan su calidad y óptimo rendimiento son las siguientes²⁵.

1. Adecuada sensibilidad (10^{-15} a 10^{-8} g de soluto/s).
2. Estabilidad y reproducibilidad.
3. Respuesta lineal de varios órdenes de magnitud.
4. Intervalo de temperatura de trabajo (hasta 60-80°C en algunos casos).
5. Tiempo de respuesta corto independiente del caudal.
6. Fiabilidad y manejo sencillo.
7. Respuesta similar para todos los solutos o, selectiva y predecible para uno o varios.
8. Que no afecte o destruya a la muestra.

El detector más empleado, y que es considerado como detector casi universal, es el de batería de diodos DAD, (*diodo-array detector*) (**Figura 8**). Se basa en la absorción UV-visible de los analitos, y permite la obtención de espectros completos a la vez que registra un amplio rango de longitudes de onda simultáneamente. Con este tipo de detector se ha llevado a cabo la detección y cuantificación de los 24 compuestos alérgenos del presente trabajo. Debido a la capacidad que ofrecen los sistemas cromatográficos de poder acoplarse a otros detectores externos, y dada la complejidad que presenta el extracto vegetal de musgo de roble (alérgeno

restante), se acopló un espectrómetro de masas (**Figura 9**) para el reconocimiento de sus compuestos mayoritarios.

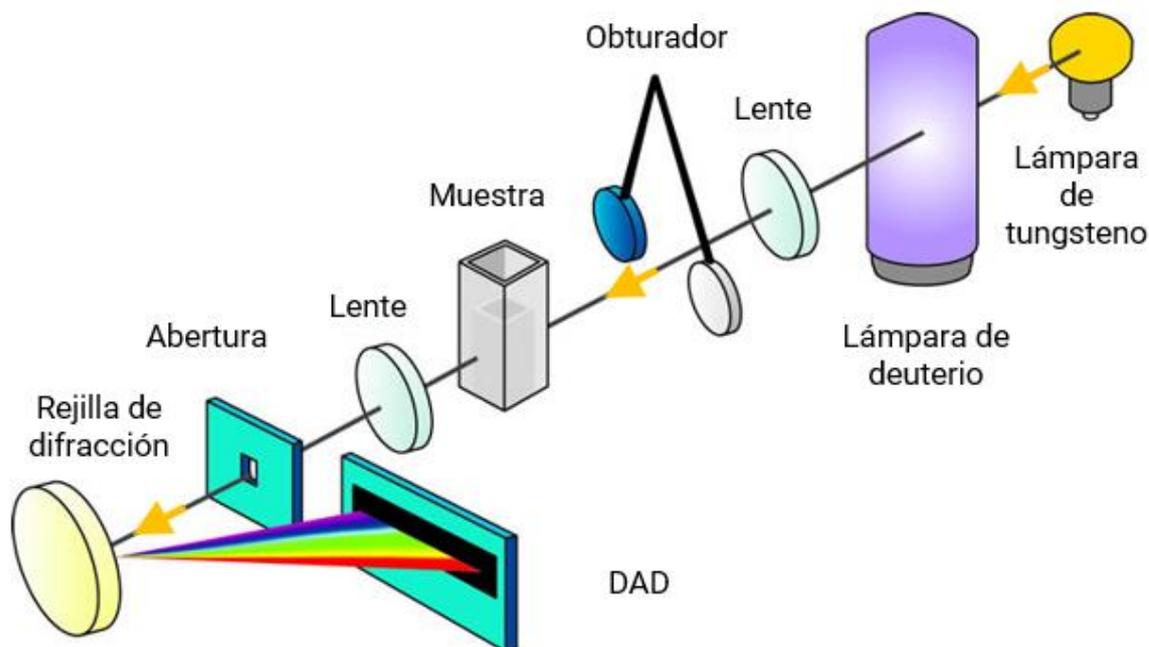


Figura 8. Esquema de los componentes básicos que conforman a un detector de batería de diodos (DAD) empleado en cromatografía líquida²⁶.

3.6. Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) es una potente técnica microanalítica capaz de identificar elementos desconocidos y de cuantificar a los conocidos en una muestra, así como de establecer sus estructuras y determinar sus concentraciones. Esta técnica es capaz de detectar cantidades de compuestos tan bajas como unos 10^{-12} g²⁷. Ofrece importantes ventajas respecto a los métodos de espectrometría ópticos atómicos, entre las que cabe destacar: límites de detección para gran número de elementos de hasta tres órdenes de magnitud, inferiores a los métodos ópticos y capacidad para originar espectros sencillos únicos fácilmente interpretables e identificables. Esta última consiste en su capacidad para medir las relaciones isotópicas atómicas.

El espectrómetro de masas es el instrumento encargado de separar y detectar a los distintos iones, que se mueven rápidamente, y medir su relación masa/carga (m/z) (**Figura 10**). Al igual que un espectrómetro óptico, el espectrómetro de masas presenta un detector que transforma el haz de iones en energía eléctrica con el fin de que pueda ser procesada, almacenada y mostrada en un ordenador. Las partes que componen a un espectrómetro de masas son:

- Sistema de entrada de las muestras
- Fuente de iones
- Analizador
- Sistema detector de iones y registrador



Figura 9. HPLC acoplado al espectrómetro de masas utilizado.

El proceso de ionización consiste en la ganancia o pérdida de electrones a fin de crear iones cargados. En el empleo de la MS, las muestras son ionizada a partir del bombardeo de electrones. Debido a este proceso se puede observar el reparto de distintas moléculas en función de la relación masa/carga (m/z) que posean. Entre las técnicas clásicas destaca el Impacto Electrónico (EI), en el que la muestra es bombardeada gracias a la utilización de electrones desde una fuente de ionización. Para ello, la muestra ha de ser vaporizada a través del uso de alto vacío y de una fuente de calor. Con este procedimiento, los elementos de la muestra van a ir perdiendo ciertos electrones y se van a ir fragmentando. Los iones (moléculas cargadas), son ahora conducidos gracias a un acelerador que los hace pasar por un tubo curvo (con un importante campo magnético), hasta el detector de masas. El detector es el elemento encargado de recoger los impactos de los iones en función de sus relaciones m/z ²⁸.

En función al modo de introducción de la muestra en el equipo MS se distinguen a las técnicas actuales más frecuentes, las cuales se consideran de ionización suave debido a que no se percibe fraccionamiento de las moléculas:

1. Ionización por desorción con láser asistida por una matriz (MALDI, *matrix-assisted laser desorption ionization*). El empleo de pulso láser de luz provoca la vaporación de la muestra.
2. Ionización por *electrospray* (ESI, *electrospray ionization*). La muestra pasa mediante una aguja o capilar al que se le induce a un elevado potencial eléctrico, siendo a su salida dispersada como *spray*. Es una ionización a presión atmosférica.

Atendiendo al tipo de analizadores de masas utilizado, se pueden distinguir:

1. Analizador magnético. Se emplea un electroimán que induce al haz de iones a realizar un trayecto circular.
2. Espectrómetro de masas cuadrupolar (no emplea campos magnéticos). Los iones se mueven en el interior de cuatro barras metálicas organizadas paralelamente y conectadas eléctricamente.
3. Analizador de tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*). Los iones son acelerados a través de un pulso de potencial eléctrico. Las masas de los iones se calculan con respecto a la diferencia de tiempo de llegada hasta al detector.
4. Analizador de trampa de iones (IT, *ion trap*). Gracias a la combinación de campos eléctricos y/o magnéticos se consigue atrapar de manera controlada a los iones. Una vez atrapados, este equipo permite el aislamiento de uno o varios iones precursores para su posterior fragmentación (MS/MS) empleando helio como gas de colisión. Los distintos fragmentos de un analito (ion precursor) aportarán información estructural del mismo.

Una vez en el detector, los iones originan una corriente eléctrica, que es amplificada y recogida en el sistema de procesamiento de datos. En pocas palabras, se podría decir que este procedimiento permite separar y analizar a distintos iones presentes en una muestra, en función de sus distintas relaciones masa/carga (m/z). Todo ello, gracias a los tiempos de llegada que cada uno presente hasta el detector.

En el desarrollo del presente trabajo se ha empleado un espectrómetro de masas con ionización por *electrospray* y como analizador una trampa de iones (ESI-IT-MS/MS).

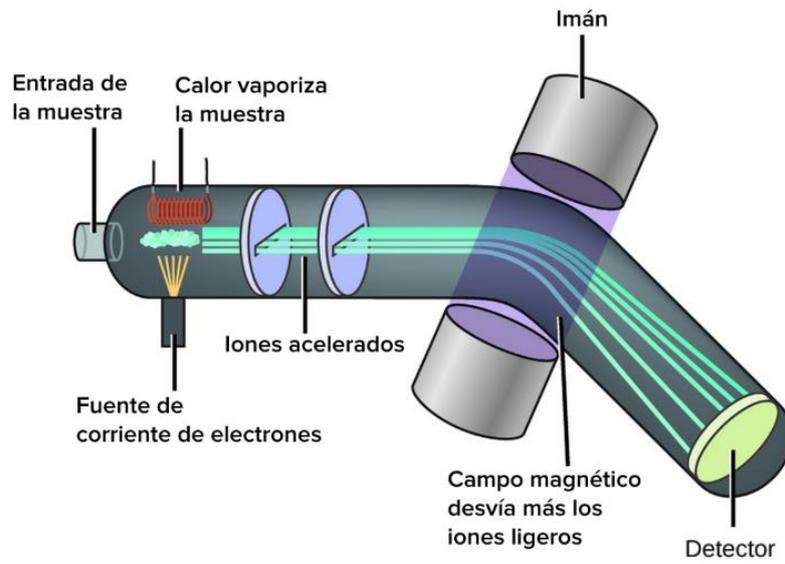


Figura 10. Esquema del fundamento y componentes del espectrómetro de masas²⁹.



4. Objetivos

La industria cosmética ofrece a los usuarios una gran variedad de productos y alternativas: desde los orientados al cuidado personal e higiene, pasando por perfumes, así como productos para la hidratación cutánea, cremas solares o tintes capilares, entre otros. Se busca que estos productos no desencadenen reacciones de hipersensibilidad en sus destinatarios, por lo que deben cumplirse los límites permitidos por la Legislación de la Unión Europea para aquellas sustancias declaradas como alérgenos.

El origen de este proyecto surge de la idea de promover un método de cromatografía líquida con el que se pueda analizar y cuantificar alérgenos de fragancia presentes en la Legislación Europea. La cromatografía de gases es la técnica más empleada para el análisis de sustancias volátiles, como son las fragancias, pero resulta una metodología más compleja en cuanto a preparación de la muestra. Además, la presencia de sustancias no volátiles en las muestras a analizar dificultaría el correcto desarrollo del análisis. Por tanto, en este trabajo se pretende desarrollar un método sencillo para cromatografía líquida, siendo esta más común en los laboratorios que la cromatografía de gases.

A partir de ello, cabe destacar los siguientes objetivos:

1. Desarrollo y optimización de un método cromatográfico adecuado para la detección de los alérgenos a estudio, mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.
2. Obtención de rectas de calibrado que permitan la cuantificación de los alérgenos seleccionados.
3. Detección de los compuestos mayoritarios de uno de los extractos naturales declarados como alérgenos (extracto de musgo de roble) mediante MS.
4. Validación del método de cuantificación desarrollado en términos de linealidad, límites de detección, de cuantificación y precisión.
5. Determinación de alérgenos en diversos productos cosméticos.

5. Material y métodos

5.1. Reactivos

Los reactivos que se han utilizado para llevar a cabo la separación cromatográfica presentaban características analíticas y propiedades destinadas al uso en HPLC-MS. Los disolventes empleados para la fase móvil han sido acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH). Ambos fueron adquiridos de Fisher Chemical® (Loughborough, United Kingdom). El agua (H₂O) empleada fue purificada mediante un sistema Mill-Q (Millipore, MA, Estados Unidos).

En cuanto a los patrones empleados todos fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich®: α-amilcinamaldehído (mezcla de isómeros *cis* y *trans*, CAS 122-40-7), alcohol α-amilcinnamílico (CAS 101-85-9), α-hexilcinamaldehído (CAS 101-86-0), β-citronelol (CAS 106-22-9), alcohol de bencilo (CAS 100-51-6), benzoato de bencilo (CAS 120-51-4), cinamato de bencilo (CAS 103-41-3), salicilato de bencilo (CAS 118-58-1), cinamaldehído (CAS 104-55-2), alcohol cinamílico (CAS 104-54-1), citral (suma de *cis* y *trans*, CAS 5392-40-5), cumarina (CAS 91-64-5), eugenol (CAS 97-53-0), farnesol (suma de isómeros, CAS 4602-84-0), geraniol (CAS 106-24-1), hidroxicitronelal (CAS 107-75-5), isoeugenol (mezcla de isómeros *cis* y *trans*, CAS 97-54-1), D-limoneno (CAS 5989-27-5), linalool (CAS 78-70-6), 2-octinoato de metilo (CAS 111-12-6), extracto de musgo de roble (CAS 90028-68-5), Lilial® (CAS 80-54-6), α-cetona (CAS 127-51-5), Liral® (mezcla de isómeros, CAS 31906-04-4) y alcohol anisílico (CAS 105-13-5).

5.2. Preparación de las muestras

En primer lugar, fue de gran utilidad basar el trabajo de cálculo de los diferentes parámetros de cada una de las sustancias en la realización de una tabla Excel. En base a ello, se recogieron todos los datos referentes a las 25 sustancias a analizar para la preparación de las disoluciones *stock*. Se tuvo en cuenta la pureza declarada por el fabricante y la densidad de todos los compuestos sin importar su naturaleza. La mayoría se correspondieron con naturaleza líquida viscosa, a excepción de la cumarina, en polvo, y el extracto de musgo, que se adquirió ya disuelto en etanol a 1 mg/mL (1000 ppm) (**Anexo I**). La concentración preparada de cada compuesto puro en las disoluciones *stock* fue 5000 ppm en acetonitrilo. Se incluyeron los porcentajes de pureza, densidades, densidades corregidas, concentraciones de interés, volumen final a preparar, cantidad en miligramos que se necesitaría de cada una de ellas, volumen a coger y el volumen de disolvente a añadir (**Anexo I y II**). Cada compuesto fue disuelto en la cantidad correspondiente de acetonitrilo en base a sus propiedades, previo cálculo en la tabla. Tras esto, las disoluciones fueron agitadas un minuto en el vórtex. En el

caso de la cumarina, se pesó en una balanza de precisión la menor cantidad posible y se calculó el volumen de acetonitrilo a añadir para obtener una concentración de 5000 ppm.

Todas las disoluciones fueron centrifugadas durante 5 minutos a 13000 rpm, para comprobar la correcta disolución de los compuestos y evitar la introducción de partículas sin disolver en el equipo de HPLC, lo que podría obstruir el sistema. Se mantuvieron a -80°C y se comprobó la estabilidad de los compuestos, comparando los cromatogramas obtenidos en los sucesivos análisis.

Para la optimización del método cromatográfico se realizó una mezcla con los 24 compuestos puros, a partir de sus correspondientes disoluciones *stock*, a una concentración final de 50 ppm para cada uno de ellos. Del alérgeno restante, el extracto de musgo, se preparó una dilución 1:2 en acetonitrilo para su análisis mediante HPLC-ESI-IT-MS/MS; teniendo en cuenta la concentración a la que se encontraba disuelto el extracto tras su recepción, la concentración resultante fue 500 ppm. Tras la optimización del método con los compuestos puros, se preparó una segunda mezcla que también contenía el extracto de musgo a una concentración final de 50 ppm.

5.3. Instrumentación

Para la separación de los compuestos y obtención de los cromatogramas se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se empleó un cromatógrafo LC *Agilent 1100 series* (Agilent Technologies®, Palo Alto, CA, Estados Unidos) controlado mediante el software ChemStation®. Además, integraban al equipo una bomba binaria, un compartimento termostatzado de columna, un inyector automático y un detector DAD (UV-Visible).

Respecto al espectrómetro de masas utilizado, se corresponde con el modelo *Bruker Esquire 3000 plus* (Bruker Daltonics GmbSH, Bremen, Alemania), de tipo trampa de iones (IT) y con ionización por *electrospray* (ESI).

5.4. Condiciones cromatográficas en la RP-HPLC

La separación de los compuestos fue llevada a cabo con una columna de sílice con colas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono y un tamaño de partícula de 2,7 µm (Poroshell 120 SB-C18, 4,6 x 150 mm). Como fase móvil se emplearon varias combinaciones de agua, acetonitrilo y metanol durante la optimización del método cromatográfico, estableciendo como fase móvil final las siguientes mezclas: H₂O:ACN (90:10) como eluyente

A y ACN:MeOH (60:40) como eluyente B. En cuanto a las condiciones cromatográficas iniciales, se partió con 100% del eluyente A. El flujo establecido fue de 0,5 mL/min y el gradiente multipasos final obtenido con la optimización del método constó de las siguiente etapas: 0 min, 0% B; 5 min, 0% B; 7 min, 20% B; 15 min, 35% B; 20 min, 50% B; 25 min, 55% B; 28 min, 60% B; 45 min, 100% B; 48 min, 100% B; 55 min, 0% B; 60 min, 0% B. Cabe señalar que, con el fin de acondicionar la columna y estabilizar la presión en el sistema, se mantuvieron las condiciones iniciales durante 5 minutos al inicio y final de cada análisis. El volumen inyectado por muestra fue de 10 μ L, con un monitoreo de estas por parte del detector DAD a 210, 254, 280, 310 y 370 nm de longitud de onda. La temperatura del compartimento termostatzado de la columna se estableció en 25°C.

5.5. Detección del extracto de musgo de roble mediante RP-HPLC-ESI-IT-MS/MS

El equipo de HPLC utilizado fue incorporado y acoplado a un espectrómetro de masas IT, con el fin de identificar a los compuestos separados cromatográficamente mediante la cuantificación precisa de sus masas.

El flujo empleado en la cromatografía fue 0,5 mL/min. Flujos mayores a 0,3 mL/min condicionan la fiabilidad de los resultados y no aseguran el correcto funcionamiento del *electrospray* de la interfase ESI. Por tanto, se precisó la utilización de un divisor de flujo 1:2 en el extremo distal a la salida del detector DAD. Por consiguiente, se obtuvo un flujo de entrada al espectrómetro de 0,25 mL/min, adecuado para el análisis de la muestra.

Se procedió a trabajar en modo de ionización positiva a lo largo del análisis muestral, considerando un rango m/z de 50-1400. Asimismo, el voltaje que se utilizó del capilar fue de 2340 V. En cuanto a otros parámetros del equipo, se establecieron en los siguientes valores: temperatura de secado, 360°C; flujo de gas de secado, 9 ml/min; amplitud de la fragmentación, 1 V; y presión del gas nebulizador, 45 psi.

La obtención y procesado de datos de las masas de los iones parentales y sus correspondientes fragmentos fue llevado a cabo mediante el uso del software *Data Analysis 4.0* (Bruker Daltonics, Alemania).

5.6. Rectas de calibrado de los compuestos patrón

Para la cuantificación de los alérgenos presentes en una muestra desconocida, es necesario disponer de rectas de calibrado en las que extrapolar el área del pico que se obtenga para un determinado compuesto, obteniendo su concentración. Por tanto, se prepararon distintas disoluciones de los compuestos en acetonitrilo para determinar el área del pico que correspondía a cada concentración conocida y así realizar la regresión lineal con la que obtener la ecuación de la recta de calibrado.

Para reducir el número de análisis se agruparon los compuestos en distintas mezclas, de tal forma que dos analitos que eluyeran muy próximos en el cromatograma, no coincidieran en la misma mezcla para evitar posibles dificultades durante la cuantificación si se daba algún error durante la cromatografía. A cada uno de estos grupos se les denominó "mix". En el *mix* 1 se agruparon los compuestos: alcohol de bencilo, alcohol cinamílico, isoeugenol, geraniol, 2-octinoato de metilo, α -amilcinamaldehído, D-limoneno. En el *mix* 2 se incluyeron: alcohol anísico, cinamaldehído, linalool, β -citronelol, benzoato de bencilo, salicilato de bencilo y farnesol. En cuanto al *mix* 3, los compuestos que se incluyeron fueron: cumarina, eugenol, citral, alcohol α -amilcinamílico, cinamato de bencilo, α -cetona, α -hexilcinamaldehído.

En un primer momento, con los resultados obtenidos se observaron posibles evidencias de degradación de los compuestos hidroxicitronelal, Lilial® y Liral®. Los compuestos se enviaron sin seguir el protocolo de refrigeración establecido y adecuado para este caso. Debido a sus propiedades y a la alta sensibilidad que presentan a los cambios de temperatura, se sugiere que esto podría haber afectado a la naturaleza de los compuestos. Tras realizar las correspondientes reclamaciones al fabricante en hasta tres ocasiones, quedaron descartados del estudio.

Tras analizar los tres *mixes* que incluían a todos los compuestos puros, se constituyó un nuevo *mix*, denominado *mix* 4, que agrupaba a ciertos compuestos que mostraron variaciones al eluir en cuanto a la intensidad de los picos. Conformaron a este grupo las sustancias: benzoato de bencilo, salicilato de bencilo, cinamato de bencilo, α -amilcinamaldehído, α -cetona, farnesol y D-limoneno. Tras numerosas pruebas (variación de la temperatura, preparación de nuevas disoluciones *stock*, aplicación de gas inerte a los viales, repetitividad en los análisis) se acabaron descartando, por motivos de degradación, a los compuestos α -hexilcinamaldehído y D-limoneno, por lo que se realizaron rectas de calibrado para un total de 19 compuestos puros.

Se analizaron diluciones de cada *mix* entre 0,5-150 ppm en H₂O:ACN (90:10), coincidiendo con la fase móvil de la cromatografía al comienzo del análisis, por duplicado. Para detectar y solventar problemas derivados de variaciones en el equipo, la cuantificación se realizó mediante el método estándar interno. Como patrón interno se empleó *p*-anisaldehído a una concentración final de 10 ppm. Para ello, se prepararon las diluciones de cada *mix* al doble de concentración (1-300 ppm) y se mezcló 100 µL de cada una de estas con 100 µL de disolución de patrón interno a 20 ppm en los viales de HPLC, resultando en las concentraciones finales indicadas. Merece la pena resaltar el importante papel que ha jugado la implantación del *p*-anisaldehído. Su aplicación ha permitido estimar con mayor exactitud a los alérgenos presentes en las muestras, pudiendo corregir pequeñas variaciones entre los t_R de estas y de los compuestos patrón utilizados.

Se llevó a cabo la integración de los picos obtenidos en cada análisis mediante el software del equipo. Las distintas áreas obtenidas fueron divididas entre la señal mostrada por el estándar interno. Se obtuvo la ecuación de la recta de calibrado para cada compuesto mediante regresión lineal de las concentraciones preparadas y el ratio “área de compuesto/área de estándar interno” obtenido para cada una de ellas empleando Microsoft Office Excel.

5.7. Validación del método de cuantificación

Los parámetros que se analizaron para la validación del método cromatográfico desarrollado con el fin de cuantificar los alérgenos fueron: linealidad, límites de detección (LOD, *limit of detection*) y de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*), y precisión.

La linealidad de cada recta de calibrado se determinó matemáticamente a partir de los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de analitos. Se incluyó también al coeficiente de determinación (R^2), obteniendo con este procedimiento las regresiones lineales de los compuestos.

Tradicionalmente, se ha considerado como LOD aquella concentración a la que no se observa el analito en cuestión en los análisis y LOQ a la mínima concentración que se ha podido cuantificar, a partir de la preparación de distintas diluciones. No obstante, existe un método matemático por el cual estimar ambos límites con confianza estadística. Por tanto, los límites se determinaron de ambas formas para su comparación. El cálculo del LOD y LOQ para cada compuesto se realizó a partir de la desviación estándar de la ordenada de cada recta de regresión obtenida (s_y), también dada por Microsoft Office Excel, y su pendiente (b),

como se muestra en las ecuaciones 1 y 2. En cuanto a las diluciones empleadas para estos dos parámetros, se realizaron pruebas con la siguiente secuencia de concentraciones, todas ellas en ppm: 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005.

$$LOD = \frac{3 \cdot s_a}{b} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_a}{b} \quad (2)$$

Seguidamente, se evaluó la precisión del método. Esta se determinó mediante la realización de 3 análisis cromatográficos por compuesto, realizándose el mismo día (repetitividad) y en días diferentes (reproducibilidad). Referente a las concentraciones analizadas para evaluar la precisión del método, se prepararon diluciones a 10 y 100 ppm.

5.8. Cuantificación de alérgenos en distintas muestras

Se aplicó el método analítico desarrollado para la cuantificación de los posibles alérgenos presentes en distintos productos comerciales. Estos productos fueron:

- ✓ Muestra A: mascarilla capilar.
- ✓ Muestra B: preparador capilar con aceite de árbol de té (champú sin alérgenos según su etiquetado).
- ✓ Muestra C: sérum facial.
- ✓ Muestra D: desmaquillante.

Para su análisis, cada muestra de producto fue pesada y diluida a una concentración final de 50 mg/ml en acetonitrilo. Con el fin de favorecer el proceso de extracción de los distintos componentes, las muestras fueron sonicadas durante un periodo de 15 minutos. A continuación, se filtraron con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro y se procedió a su análisis mediante HPLC. Cada una de las muestras fue duplicada.

6. Resultados

6.1. Optimización del método cromatográfico

En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica con el fin de ver si se había publicado algún método de cromatografía líquida para la detección de los alérgenos a estudio. Se encontró el trabajo publicado por Villa et al., en el que empleaban agua como eluyente A y acetonitrilo como eluyente B¹³. Se procedió al análisis de la mezcla de los 24 compuestos con la fase móvil y el gradiente multipasos descrito en la **Tabla 3**, denominado método de partida, y se obtuvo el cromatograma que se muestra en la **Figura 11**.

Tabla 3. Condiciones del gradiente multipasos 1 correspondiente al método de partida, basado en el estudio publicado por Villa et al.

Gradiente 1	
Tiempo	% B
0	50
5	50
15	60
24	60
40	90
45	50
50	50

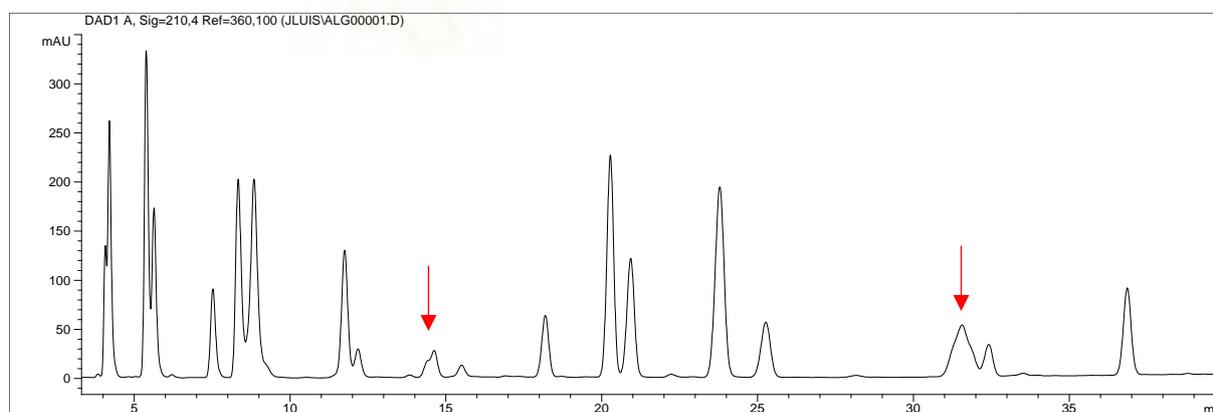


Figura 11. Cromatograma obtenido a 210 nm empleando el gradiente 1, basado en el estudio publicado por Villa et al., a partir de la mezcla de compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC. Las flechas rojas indican picos fruto de la coelución de varios compuestos.

Tomando como referencia las condiciones del artículo mencionado, se puede observar en el cromatograma como había compuestos que se encontraban coeluyendo a los minutos 14 y 31 aproximadamente (flechas rojas **Figura 11**). Esto se debe, principalmente, a que no se ha empleado la misma columna que en el estudio publicado, donde el tamaño de las partículas

es mayor, lo que permite trabajar a flujos diferentes. Es por ello por lo que se tuvo que optimizar el método a diferentes condiciones de trabajo.

6.1.1. Cambios en el gradiente multipasos

Se realizaron una serie de cambios en el gradiente multipasos utilizando la misma fase móvil que en el método de partida. En la **Tabla 4**, se detallan los cambios realizados en el gradiente que se realizaron para los métodos 2, 3 y 4.

Tabla 4. Gradientes multipasos de los métodos 2, 3 y 4.

Gradiente 2		Gradiente 3		Gradiente 4	
Tiempo	Porcentaje de eluyente B	Tiempo	Porcentaje de eluyente B	Tiempo	Porcentaje de eluyente B
0	50	0	5	0	50
5	50	5	50	5	50
8	55	15	50	15	55
15	60	25	55	16	60
24	60	26	58	22	60
37	80	30	60	34	90
39	100	39	60	35	100
43	50	41	70	40	50
45	50	44	75	45	50
-	-	48	75	-	-
-	-	55	100	-	-
-	-	60	5	-	-
-	-	65	5	-	-

En cuanto a las diferencias con respecto al gradiente 1, en el gradiente 2 se procedió a ampliar el tiempo a los porcentajes de B en las franjas temporales cercanas que presentaban coelución de compuestos. En la **Figura 12A** se puede apreciar que pese a aplicar estos cambios, seguía existiendo esa coelución inicial de ciertos compuestos (flechas rojas).

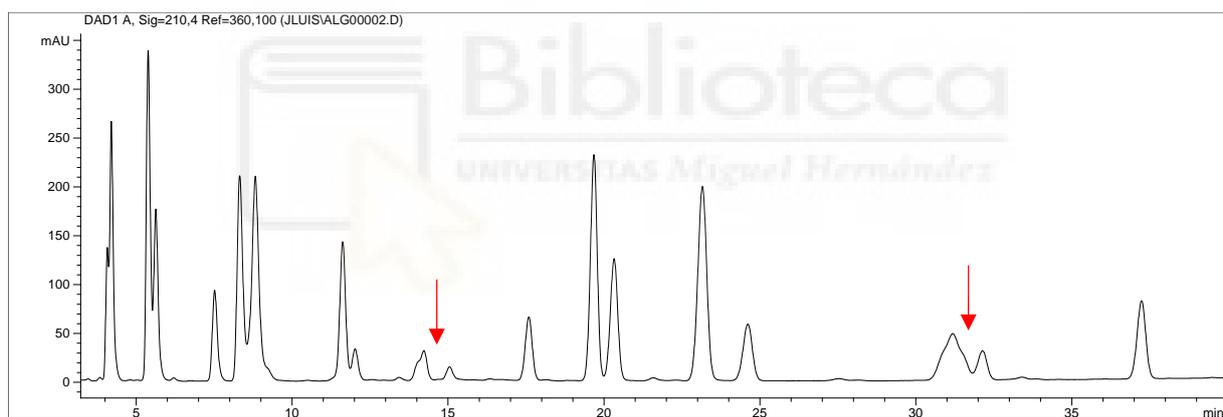
Con las condiciones establecidas en el gradiente 3 de la **Tabla 4**, se trató de registrar mejoras en la separación con un gradiente temporalmente más extenso llevando el análisis hasta los 65 minutos. Con ello, se esperó poder obtener alguna pista que llevase a la mejora de la separación de los compuestos. En la **Figura 12B** se observa (flechas rojas) la coelución por pares de los primeros cuatro picos cromatográficos de la **Figura 12A**. No obstante, se

consiguió que los compuestos que coelúan en torno a los 14 minutos se presentaran como picos separados en torno a los 21 minutos con este gradiente (flecha verde). Sin embargo, los compuestos del final del cromatograma de naturaleza más apolar, seguían coeluyendo.

El gradiente 4 resultó ser una combinación de los gradientes 2 y 3:

- En el gradiente 3 se juntaron los compuestos del principio y se mantuvieron las condiciones iniciales del gradiente 2.
- En el gradiente 2 se da cierta separación de los compuestos que coeluyen al final del cromatograma (montaña más ancha). En ese gradiente, la fase móvil pasó de 60% de B a 90% de B gradualmente a lo largo de 16 minutos (desde el minuto 24 hasta el minuto 40). En el gradiente 3, dándole más tiempo empeoró la separación, por lo que en este caso se probó un gradiente más acusado, con 12 minutos (desde el minuto 22 al minuto 34).

A



B

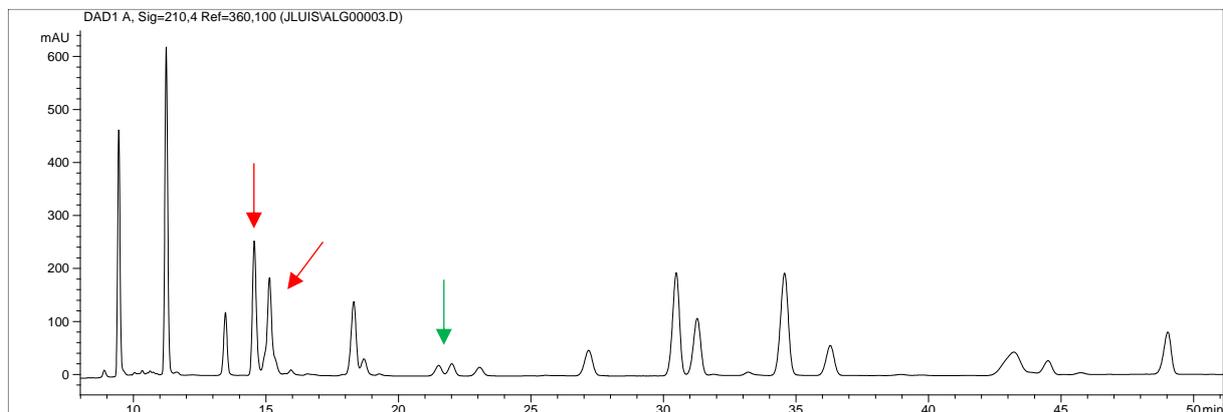


Figura 12. Cromatogramas obtenidos a 210 nm empleando los métodos 2 (A), 3 (B) y 4 (C). Cada imagen se corresponde a la mezcla de los compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC. Las flechas rojas indican picos fruto de la coelución de varios compuestos. La flecha verde muestra la mejora mencionada en el texto.

C

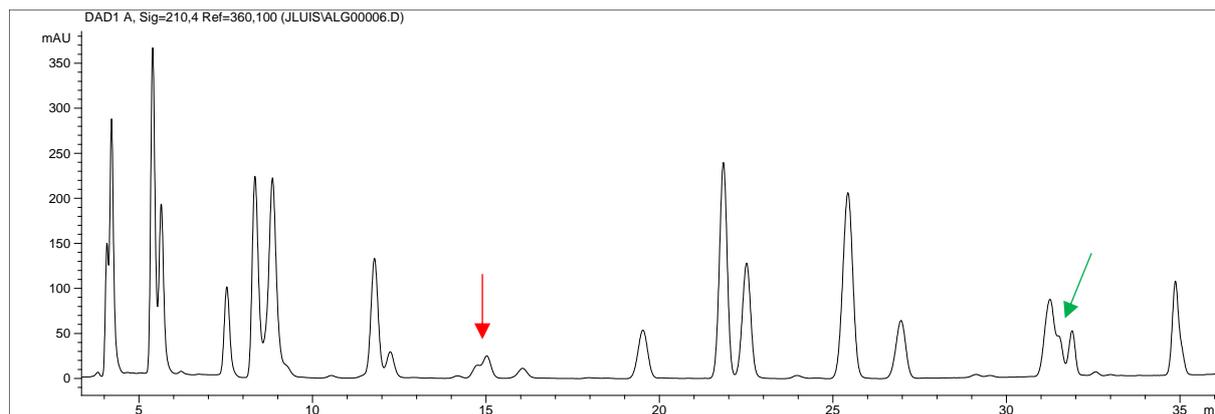


Figura 12 (continuación). Cromatogramas obtenidos a 210 nm empleando los métodos 2 (A), 3 (B) y 4 (C). Cada imagen se corresponde a la mezcla de los compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC. La flecha roja indica el pico fruto de la coelución de varios compuestos. La flecha verde muestra la mejora mencionada en el texto.

Observando la imagen del cromatograma superior (**Figura 12C**), se distingue cómo se han juntado los picos alrededor del minuto 14 (flecha roja), pero se ha logrado cierta separación y mejora en torno al minuto 31 (flecha verde).

6.1.2. Cambios en el flujo y en la temperatura

Ante las dificultades para conseguir la completa separación de todos los compuestos mediante cambios en el gradiente multipasos, se desarrollaron los métodos 5 y 6 modificando otros parámetros. En ambos casos se empleó el gradiente 4 como condición de partida, pero en el método 5 se modificó el flujo de 0,5 mL/min a 0,6 mL/min en el intervalo entre los 23 y los 34 minutos de análisis. Cabe mencionar la importancia vinculada a un aumento del flujo de la fase móvil, el cual puede producir el estrechamiento de los picos cromatográficos. La temperatura a la que se encuentre la columna a la hora de realizar el análisis también juega un papel importante en la distribución y separación de los compuestos. Normalmente, su aumento se asocia a una mejor resolución en la separación de los picos adyacentes.

A

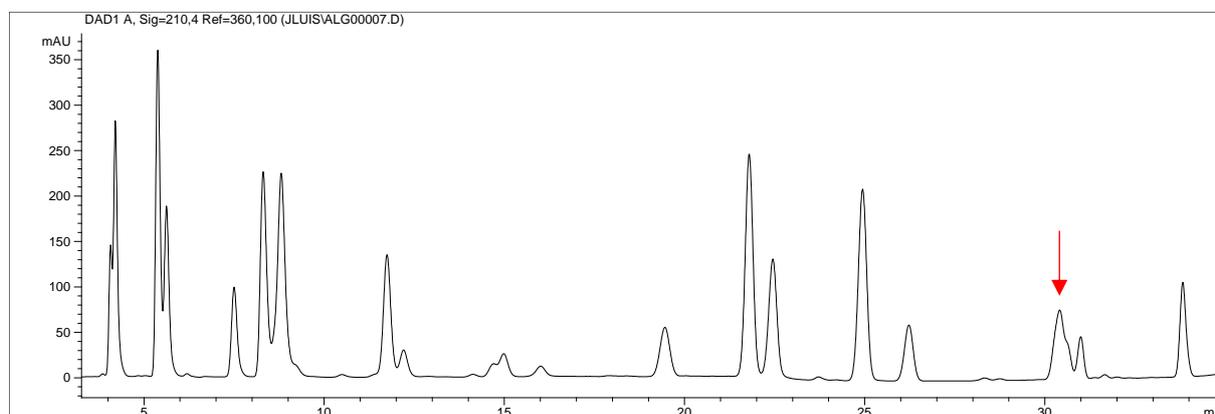


Figura 13. Cromatogramas obtenidos a 210 nm empleando los métodos 5 (A) y 6 (B) correspondientes a la mezcla de los compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC. La flecha roja indica el pico fruto de la coelución de varios compuestos.

B

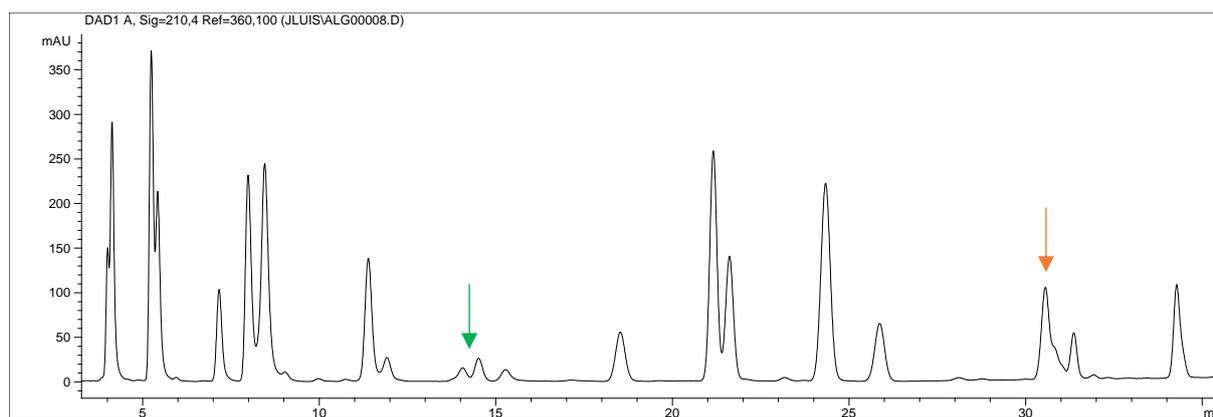


Figura 13 (continuación). Cromatogramas obtenidos a 210 nm empleando los métodos 5 (A) y 6 (B) correspondientes a la mezcla de los compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC. La flecha naranja indica el pico de mejora, pero no separación de compuestos. La flecha verde muestra la mejora mencionada en el texto.

En la **Figura 13A**, se aprecia como el aumento del flujo ha empeorado la separación de los compuestos en una de las zonas de coelución (flecha roja), en torno a los 30 minutos. Sin embargo, en la **Figura 13B**, se puede distinguir como la influencia de la temperatura hasta los 35°C ha favorecido la separación de los picos en esta otra zona de coelución, a los 14 minutos (flecha verde). En la zona de los 30 minutos se aprecia cambio, pero aún no se consiguió su separación (flecha naranja).

6.1.3. Cambios en la fase móvil

Como no se consiguió la completa separación de todos los compuestos, se probaron otras combinaciones de eluyentes en la fase móvil manteniendo al gradiente 4 como referente para el desarrollo de las siguientes pruebas. En este apartado se incluyen a los métodos 7, 8, 9 y 10 detallados a continuación.

Se procedió al cambio del eluyente B, acetonitrilo, a metanol en el método 7. Como se puede observar en su correspondiente cromatograma, **Figura 14A**, al realizar la elución con un disolvente polar prótico (capaz de formar enlaces de hidrógeno al poseer grupos -OH o -NH) como es el caso del metanol, se produjo la coelución de gran parte de los compuestos. El cambio de un eluyente polar aprótico (acetonitrilo, CH₃CN) a otro polar prótico (metanol, CH₃OH) podría haber influido en la interacción de cada uno de los compuestos en la fase móvil. Por lo tanto, la inclusión de este disolvente habría modificado las velocidades relativas de los analitos, interaccionando en mayor medida con los compuestos más polares, lo que hizo que empeorara la separación al inicio del cromatograma. A diferencia de esto, se puede

distinguir como en la parte final del cromatograma de la **Figura 14A** las sustancias más apolares que coelúan, sí pudieron ser separadas (flecha verde).

En referencia a lo comentado, al desarrollar el siguiente procedimiento (método 8) se optó por añadir metanol en los dos eluyentes y volver a emplear acetonitrilo, en vez de sustituir todo el eluyente B con metanol. Se empleó la mezcla H₂O:MeOH (90:10) como eluyente A y otra mezcla ACN:MeOH (70:30) como eluyente B. Como diferencia significativa se observó que en el tramo final del cromatograma de la **Figura 14B**, entre los minutos 33-35, se aprecia mejoría en la separación con respecto a cromatogramas anteriores (flechas verdes). Tras los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se pensó que la presencia de acetonitrilo favorecía la separación cromatográfica de los picos más polares, mientras que el metanol mejoraría la de los más apolares. Por tanto, se desarrolló el método 9 (**Figura 14C**) añadiendo acetonitrilo al eluyente acuoso (eluyente A) para aumentar su presencia en las primeras etapas del gradiente multipasos, y mayor cantidad de metanol en el eluyente B.

A



B

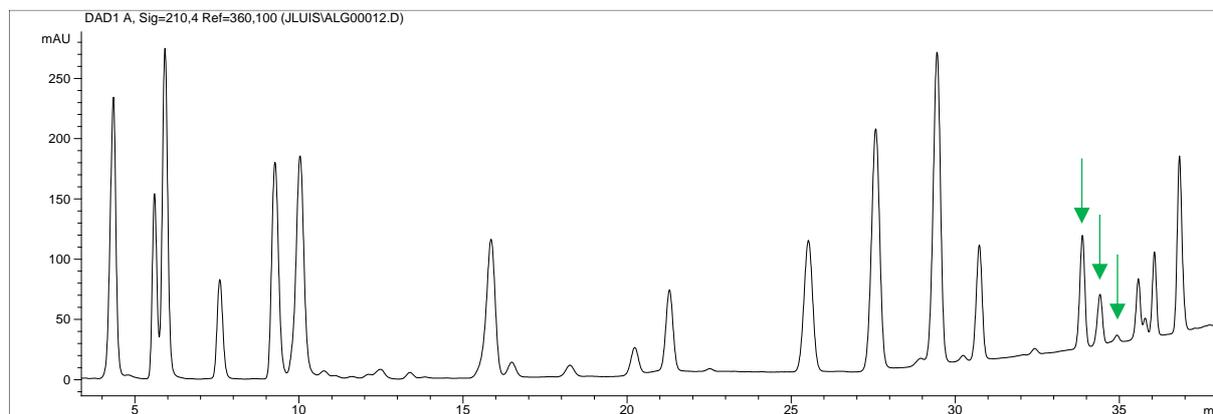
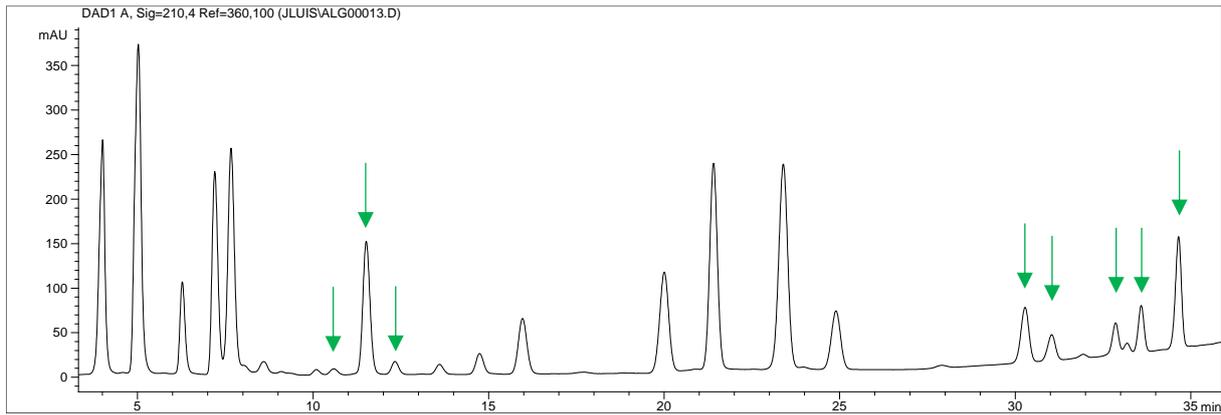


Figura 14. Cromatogramas obtenidos a 210 nm empleando los métodos 7 (A), 8 (B), 9 (C) y 10 (D) correspondiente a la mezcla de los compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC. Las flechas verdes muestran las mejoras mencionadas en el texto.

C



D

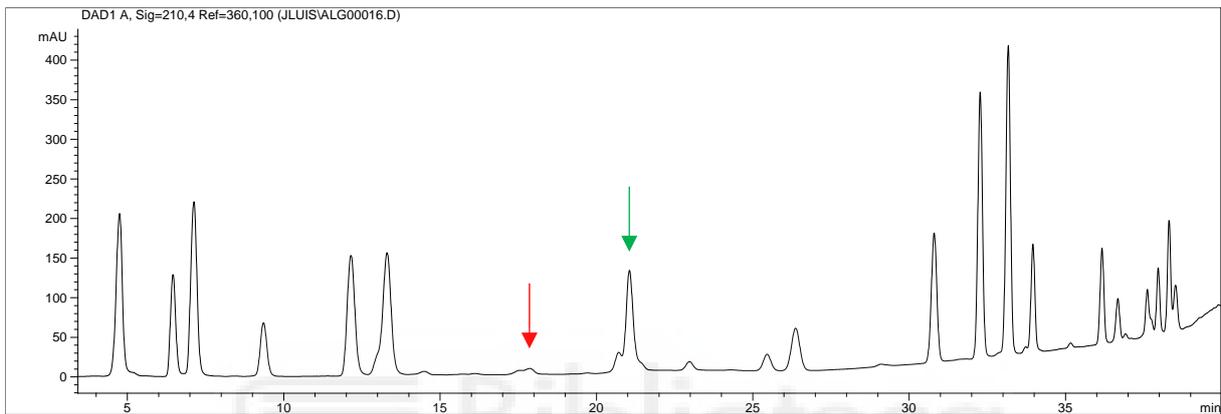


Figura 14 (continuación). Cromatogramas obtenidos a 210 nm empleando los métodos 7 (A), 8 (B), 9 (C) y 10 (D) correspondiente a la mezcla de los compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC. La flecha roja indica el pico fruto de la coelución de varios compuestos. La flecha verde muestra la mejora mencionada en el texto.

Se emplearon las siguientes mezclas: eluyente A, H₂O:ACN (80:20); y eluyente B, ACN:MeOH (60:40). Al comienzo del minuto 10 de la **Figura 14C** (flecha verde), se observa cómo se ha conseguido obtener la separación de varios compuestos. De la misma forma, en su tramo final entre los minutos 30-35 se observan los mismos picos encontrados en esta misma región que en el gradiente 4, pero con una notable mejoría. Si se observa el rango temporal citado (30-35 minutos) se pueden reconocer nuevos picos (flechas verdes), mejorando su distribución y separación en las zonas donde anteriormente no se separaban del todo bien. Se contempla de este modo, una mejora significativa con respecto a la separación de los compuestos en los cromatogramas obtenidos en los apartados anteriores (4.1.1 y 4.1.2).

Los resultados de las condiciones del método 10 (**Figura 14D**) son similares a los obtenidos con el método 9 (**Figura 14C**). En este caso, se le añadió menor cantidad de acetonitrilo al agua (H₂O:ACN, 90:10), y B permaneció del mismo modo (ACN:MeOH, 60:40). Sin embargo, se puede apreciar como todos los picos eluyen mucho más tarde. También se descubre otro pico que estaba enmascarado (flecha verde, minuto 20-21). Como se ha

conseguido mejor separación de los primeros, finalmente se optó por estos solventes en las proporciones mencionadas.

6.1.4. Obtención del método cromatográfico final

Hasta el momento, en los cromatogramas mostrados se habían incluido todas las sustancias puras a estudio, a excepción del extracto de musgo de roble. Se vio conveniente separar e ir analizando, en primer lugar, a las sustancias puras que resultaban ser más simples, hasta el extracto, de mayor complejidad. De haberse incluido el extracto con el resto de las sustancias, los numerosos compuestos que forman parte de él hubieran entorpecido la correcta identificación de los otros picos de los compuestos puros en la optimización del método cromatográfico. Por lo tanto, una vez obtenidos los tiempos de retención de las sustancias puras, se pasó a incluir al extracto de musgo de roble con el resto de las sustancias del análisis.

En el método 11 se optimizó el gradiente multipasos empleando la fase móvil seleccionada (**Tabla 5**) y se obtuvo el cromatograma que se muestra en la **Figura 15**. Fue con estas condiciones con las que se llegó a obtener una separación óptima de los compuestos del inicio y de muchos otros que se encontraban coeluyendo. Por tanto, se seleccionaron a las mezclas H₂O:ACN (90:10) y ACN:MeOH (60:40) como eluyentes A y B definitivos, respectivamente.

Tabla 5. Gradiente multipasos correspondiente a los métodos 11, 12 y 13.

Gradiente 11	
Tiempo	% B
0	0
5	0
7	20
15	35
20	50
25	55
28	60
45	100
48	100
55	0
60	0

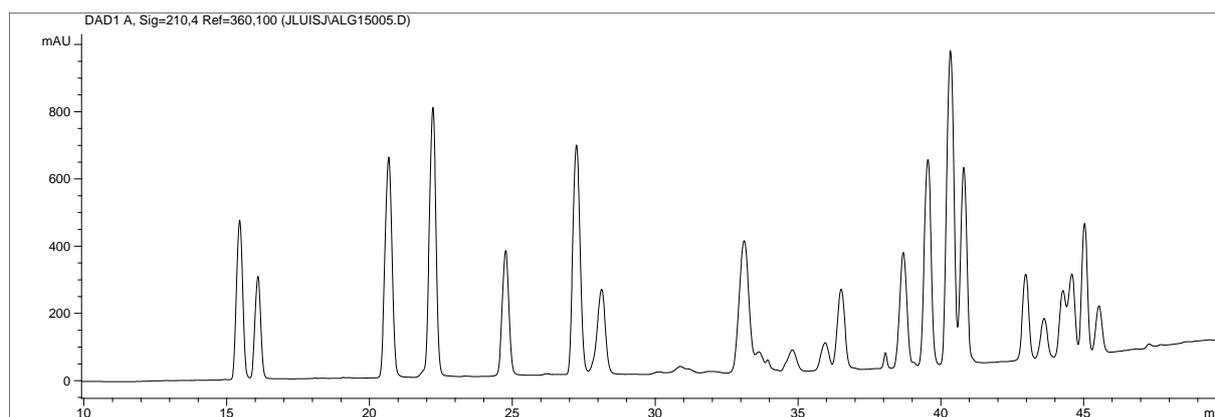


Figura 15. Cromatograma obtenido a 210 nm empleando el método 11 correspondiente a la mezcla de los compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC.

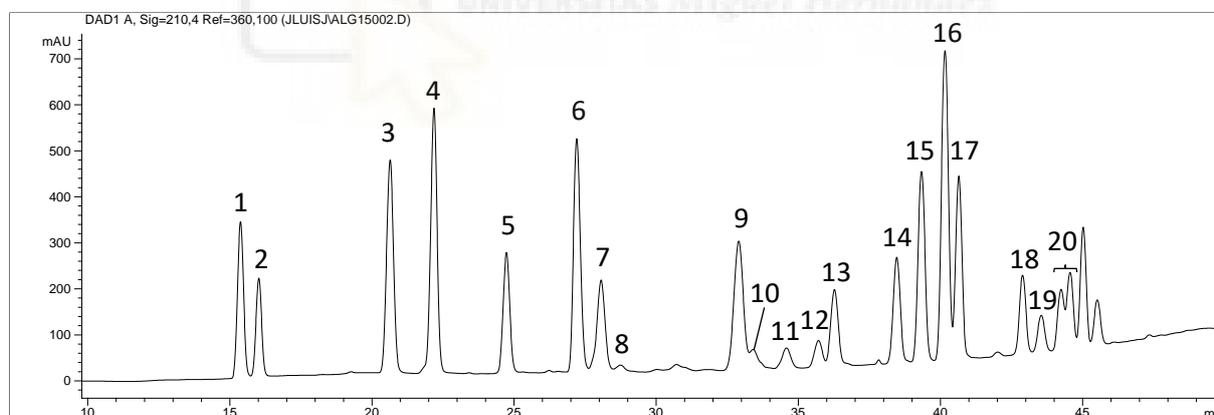
Partiendo del mismo gradiente que el caso anterior, se probó a aumentar la temperatura hasta los 40°C para comprobar si existían diferencias (método 12). Del mismo modo, aprovechando la tolerancia que presentaban las columnas empleadas hasta los 80-90°C, se decidió realizar otro análisis llevándolo hasta los 75°C (método 13). Se pueden percibir diferencias poco significativas si se compara al cromatograma de la **Figura 17A** a 40°C, con respecto al cromatograma de la **Figura 17B** a 75°C. Como se ha referido en el primer párrafo del punto 4.1.2, el aumento de la temperatura de la columna permite modular la retención del analito y por ende la separación de los compuestos. Se pensó que un aumento de la temperatura favorecería el número de transiciones entre las fases, dándose una mejor separación. Pese a esto, tras la realización de todas las pruebas realizadas y ante la similitud de ambos cromatogramas a estas dos temperaturas, se seleccionó el **método 11 como método definitivo**.

Finalmente, se analizó el extracto de musgo con el método definitivo para determinar su validez o necesidad de modificación. Como se muestra en la **Figura 16B**, el pico mayoritario del extracto, que se emplearía para cuantificar, no coelúa con otros picos propios del mismo (flecha verde). Además, este pico tampoco coelúa con ninguna de las 19 sustancias puras que finalmente se emplearon en el presente trabajo (**Figura 16A**), por lo que no se precisó la modificación del método cromatográfico. Siguiendo el orden de elución de los picos y su correspondiente numeración en la **Figura 16A**, se recoge en la **Tabla 6** la identificación de cada uno de ellos y su tiempo de retención.

Tabla 6. Orden de elución de los 20 alérgenos a estudio. Se indica el tiempo de retención (t_R) como la media aritmética y desviación estándar (SD).

Pico	Compuesto	$t_R \pm SD$
1	Alcohol de bencilo	15,329 \pm 0,070
2	Alcohol anísico	15,963 \pm 0,033
3	Cumarina	20,600 \pm 0,081
4	Alcohol cinamílico	22,142 \pm 0,078
5	Cinamaldehído	24,685 \pm 0,095
6	Eugenol	27,198 \pm 0,102
7	Isoeugenol	27,993 \pm 0,047
8	Extracto de musgo de roble	28,56 5 \pm 0,139
9	Geraniol	32,901 \pm 0,031
10	Linalool	32,924 \pm 0,333
11	Citral	33,446 \pm 0,147
12	β -Citronelol	35,799 \pm 0,450
13	2-Octinoato de metilo	36,185 \pm 0,050
14	Benzoato de bencilo	38,702 \pm 0,179
15	Alcohol α -amilcinamílico	39,298 \pm 0,151
16	Salicilato de bencilo	40,449 \pm 0,100
17	Cinamato de bencilo	40,895 \pm 0,111
18	α -Amilcinamaldehído	43,059 \pm 0,031
19	α -Cetona	43,709 \pm 0,057
20	Farnesol	44,753 \pm 0,080

A



B

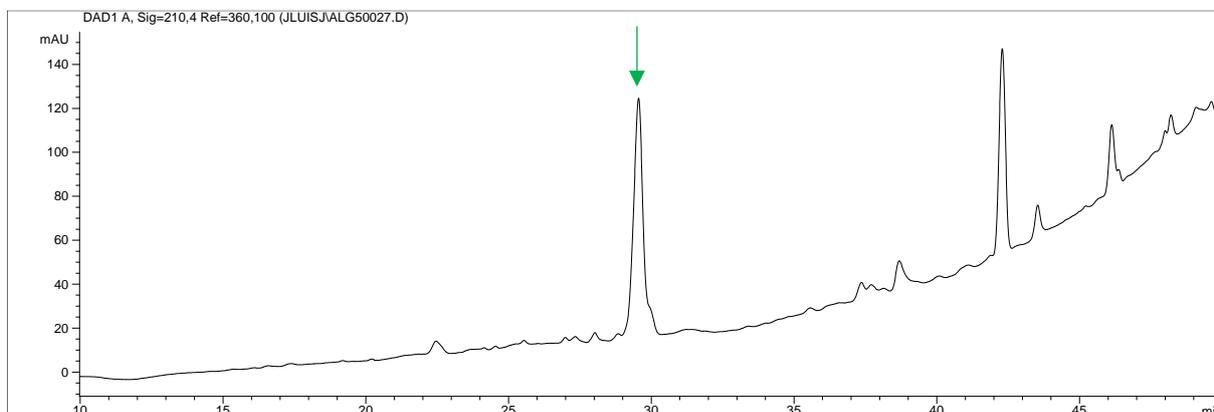
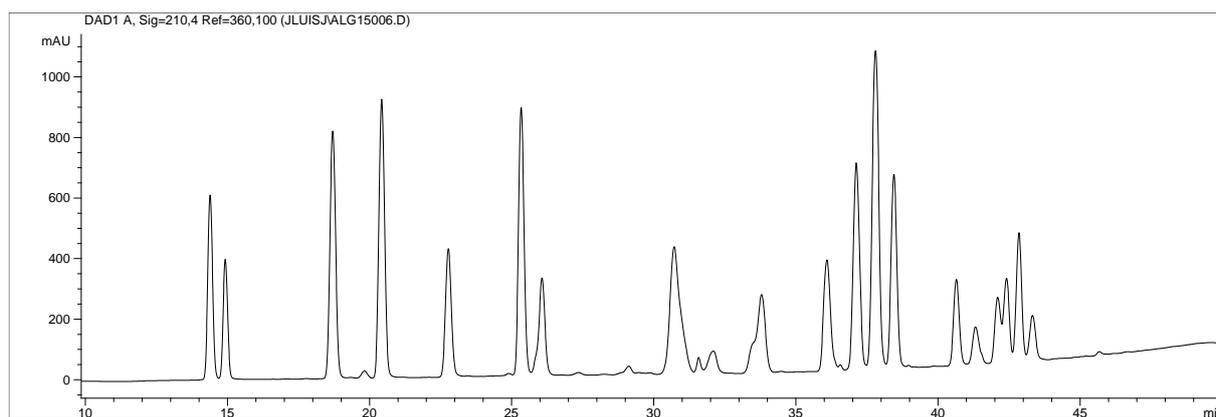


Figura 16. Cromatogramas obtenidos a 210 nm correspondientes al extracto de musgo a 500 ppm en solitario (A) y tras su incorporación a 50 ppm en la mezcla de compuestos puros (B) empleando el gradiente 11 para su análisis mediante RP-HPLC. Se numeran los picos por orden de elución. La flecha verde muestra la mejora mencionada en el texto.

A



B

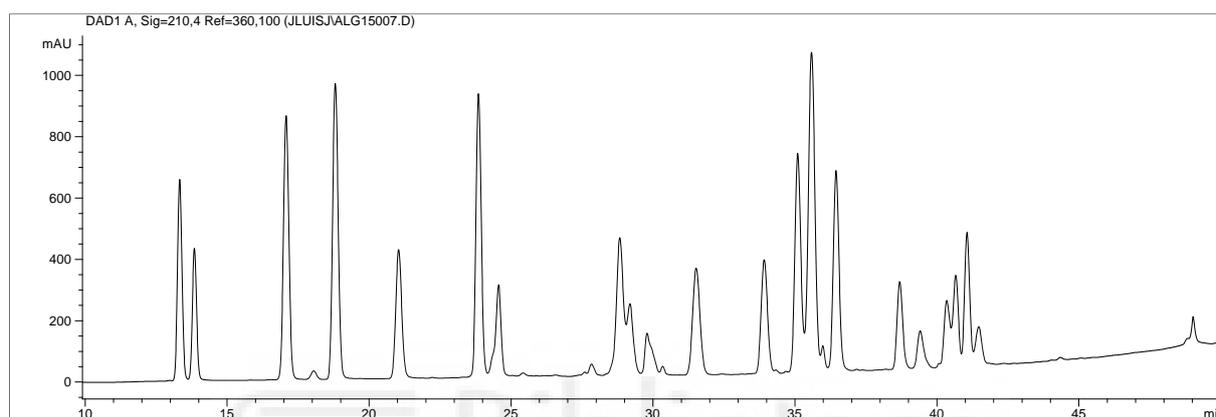


Figura 17. Cromatogramas obtenidos a 210 nm empleando los métodos 12 (A) y 13 (B) correspondientes a la mezcla de los compuestos puros (50 ppm) analizada mediante RP-HPLC.

6.2. Detección de los compuestos mayoritarios del extracto de musgo

Mediante el uso del MS, se trató de buscar a las sustancias predominantes en el extracto de musgo de roble. Al ser un extracto y estar formado por varios compuestos, se vio conveniente su análisis por este método. Junto a la electropulverización en modo positivo y con la ayuda de los espectros MS-MS se pudo establecer la relación estructural de los compuestos mayoritarios del extracto. A partir del método definitivo desarrollado, se procedió a su análisis. En la **Tabla 7** se identifican los compuestos detectados, encontrándose los ácidos lecanórico, thamnólico y evérnico³⁰.

Tabla 7. Análisis del extracto de musgo de roble con los compuestos identificados mediante RP-HPLC-ESI-IT-MS/MS.

Pico	t _R (min)	[M+H] ⁺	Fragmentos	Compuesto propuesto
1	29,6	314	295,2; 196,9; 164,9	Ácido Lecanórico
2	37,4	415,2	416,1; 397,1; 303,1; 119,1	Ácido Thamnólico
3	42,3	332,6	332,3; 304,3; 240,2; 212,1	Ácido Evérnico
4	46,1	304,3	304,3; 212,1; 129	Desconocido

Pese a la gran variedad de compuestos que forman parte del extracto de musgo de roble, tal y como se ha podido observar en la **Tabla 7**, se han detectado 4 picos coincidentes en los espectros MS-MS. Para el proceso de identificación, se ha tenido en cuenta las masas de los compuestos recogidas en la bibliografía³⁰.

6.3. Obtención de las rectas de calibrado

Para obtener las concentraciones de cada analito de interés, se empleó el procedimiento de calibración analítica. Las curvas de calibrado de cada compuesto se obtuvieron a partir de inyecciones duplicadas, preparando un mínimo de cinco disoluciones de cada analito a distintas concentraciones.

Tras la obtención de las rectas se debe comprobar que se ajusta adecuadamente a los distintos puntos experimentales. Todo ello, con el fin de garantizar un buen ajuste³¹. El empleo de rectas de calibrado en el método analítico (**Figura 18**), junto con la obtención de los valores de la ordenada en el origen, la pendiente y el coeficiente de determinación (R^2), permitieron comprobar si los puntos del analito en cuestión se ajustan al modelo matemático de la ecuación³² y si existía linealidad. La linealidad es una característica fundamental en el desarrollo de cualquier método analítico y hace referencia a la capacidad para adquirir resultados proporcionales a la concentración del analito en un rango definido³³.

La cuantificación se llevó a cabo a través del método de patrón interno con *p*-anisaldehído como patrón. Esto se hizo con el fin de compensar las pequeñas variaciones referentes al volumen inyectado que el equipo pueda hacer entre una inyección y otra. Con ello, se corrigieron posibles errores tanto sistemáticos como debidos al azar³⁴. Con el empleo del patrón interno en cantidad conocida, se pretendió mantener en todo momento la relación existente entre los analitos y éste. Entre las características de la sustancia utilizada como patrón interno, cabe destacar su comportamiento, que debe ser muy similar a los analitos

problema con el fin de que sufra las mismas variaciones (señal analítica similar pero distinguible del resto de analitos de interés)¹³.

Cabe mencionar que la recta de calibrado para el extracto de musgo (número 8) se llevó a cabo considerando el área de su compuesto mayoritario.

En referencia al estudio de la bondad del ajuste, atendiendo el parámetro R^2 se observa que los 20 compuestos analizados presentan valores muy próximos a 1, por lo que se puede concluir que el modelo de regresión es preciso en su predicción, con un buen ajuste lineal.

Como se ha visto, cada compuesto ha estado representado por su correspondiente recta de calibrado. Asimismo, en la **Tabla 8** se incluyen dos nuevos parámetros: la longitud de onda de cada compuesto y el rango lineal de los mismos. Primeramente, la longitud de onda hace referencia a aquella longitud donde se observó el máximo de absorción de cada sustancia (mayor área del pico) y que, por tanto, se empleó para su cuantificación. Por otro lado, el rango lineal de un detector cromatográfico se corresponde al intervalo de concentraciones donde existe y se aprecia correlación lineal entre dichas concentraciones y las señales analíticas. Los valores comprendidos en este rango lineal han de ser precisos, por lo que no pueden estar por debajo del límite de cuantificación (LOQ)³⁵. En el siguiente apartado se hablará con más detalle y se profundizará en los LOQ obtenidos en cada uno de los compuestos, junto a sus límites de detección (LOD).

En cuanto a la preparación de las disoluciones a distintas concentraciones para la obtención de las áreas, se siguió en todo momento lo establecido en las fichas de datos de seguridad de cada compuesto. La preparación de las disoluciones se llevó a cabo en frío con objeto de evitar posibles degradaciones a los cambios de temperatura. Pese a ello, tal como se ha comentado en el correspondiente apartado de material y métodos, se observó la degradación de 5 de los compuestos inicialmente introducidos en el estudio. Como requerimiento específico previo a la preparación de algunas de ellas, estas fueron tratadas con gas inerte (nitrógeno) para evitar reacciones químicas no deseadas con el aire que pudieran degradar su composición.

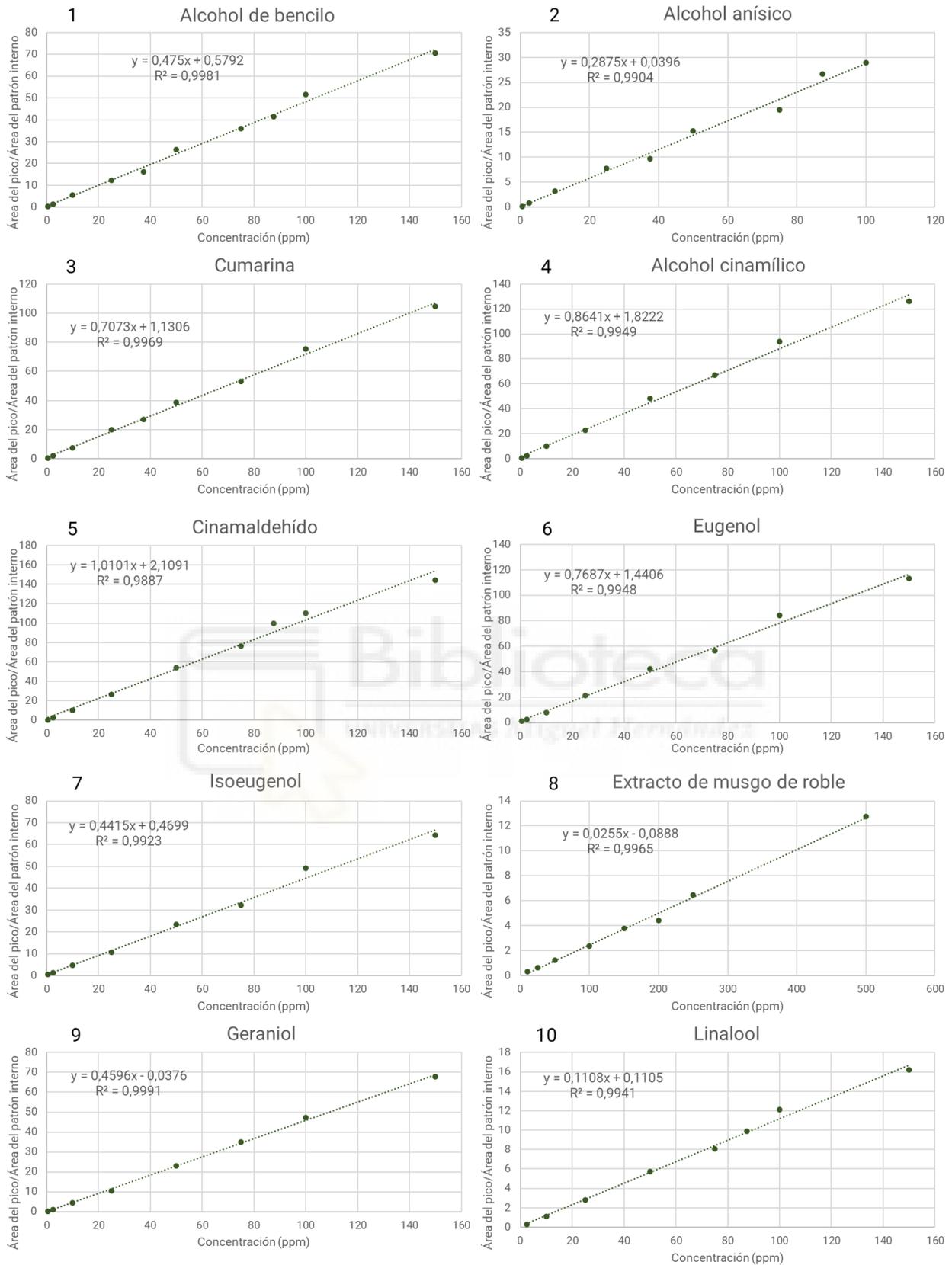


Figura 18. Rectas de calibrado, ecuaciones de la recta y coeficientes de determinación de los 20 alérgenos a estudio.

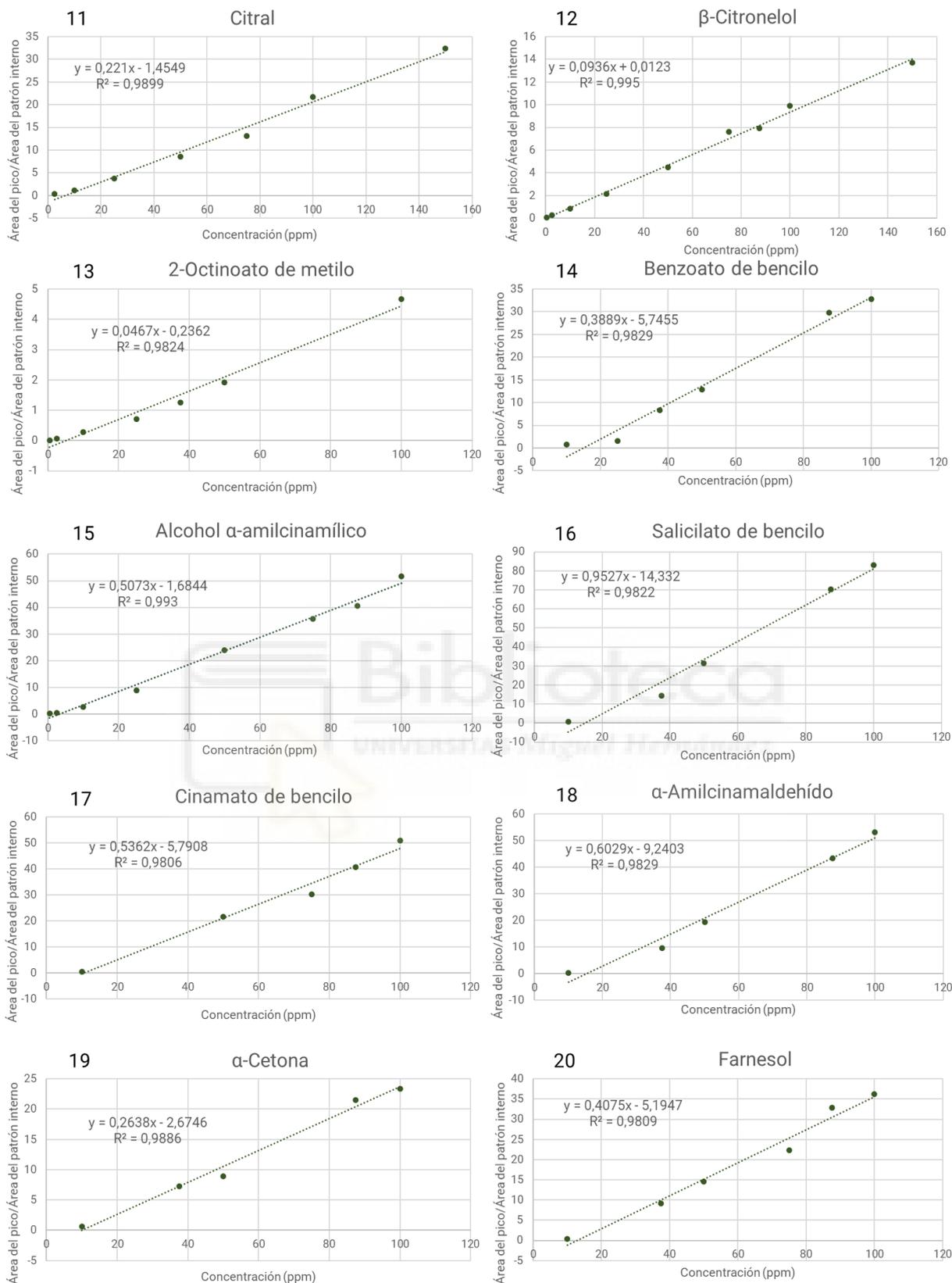


Figura 18 (continuación). Rectas de calibrado, ecuaciones de la recta y coeficientes de determinación de los 20 alérgenos a estudio.

Tabla 8. Parámetros analíticos para la cuantificación de los 20 alérgenos a estudio.

Pico	Compuesto	Longitud de onda (nm)	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación (R ²)	Rango lineal (ppm)
1	Alcohol de bencilo	210	$y = 0,4750x + 0,5792$	0,9981	0,5 - 250
2	Alcohol anísico	210	$y = 0,2875x + 0,0396$	0,9904	0,5 - 100
3	Cumarina	210	$y = 0,7073x + 1,1306$	0,9969	0,5 - 150
4	Alcohol cinamílico	210	$y = 0,8641x + 1,8222$	0,9949	0,5 - 150
5	Cinamaldehído	280	$y = 1,0101x + 2,1091$	0,9887	0,5 - 150
6	Eugenol	210	$y = 0,7687x + 1,4406$	0,9948	0,5 - 150
7	Isoeugenol	210	$y = 0,4415x + 0,4699$	0,9923	0,5 - 150
8	Extracto de musgo de roble	210	$y = 0,0255x - 0,0888$	0,9965	0,5 - 500
9	Geraniol	210	$y = 0,4596x - 0,0376$	0,9991	0,5 - 150
10	Linalool	210	$y = 0,1108x + 0,1105$	0,9941	2,5 - 150
11	Citral	254	$y = 0,2210x - 1,4549$	0,9899	2,5 - 150
12	β-Citronelol	210	$y = 0,0936x + 0,0123$	0,9950	0,5 - 150
13	2-Octinoato de metilo	210	$y = 0,0480x - 0,3193$	0,9844	2,5 - 100
14	Benzoato de bencilo	210	$y = 0,3889x - 5,7455$	0,9829	10 - 100
15	Alcohol α-amilcinamílico	210	$y = 0,5073x - 1,6844$	0,9930	0,5 - 100
16	Salicilato de bencilo	210	$y = 0,9527x - 14,332$	0,9822	10 - 100
17	Cinamato de bencilo	280	$y = 0,5362x - 5,7908$	0,9806	10 - 100
18	α-Amilcinamaldehído	280	$y = 0,6029x - 9,2403$	0,9829	10 - 100
19	α-Cetona	254	$y = 0,2638x - 2,6746$	0,9886	10 - 100
20	Farnesol	210	$y = 0,4075x - 5,1947$	0,9809	10 - 100

6.4. Validación del método de cuantificación

A la hora de poder validar un método analítico, se deben de seguir una serie de directrices que garanticen la calidad del método en cuestión. Para ello, se deben de determinar y verificar una serie de parámetros. En este trabajo se han realizado los dos más importantes:

- ✓ Linealidad, referente a la capacidad de poder obtener resultados proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Este aspecto ha sido abordado en el apartado de obtención de las rectas de calibrado, como característica fundamental en el desarrollo de un correcto método analítico. Además, se han calculado los valores de LOD y LOQ como se detalla en el siguiente apartado.
- ✓ Precisión, que representa si los resultados de una serie de reiteradas pruebas analíticas presentan uniformidad entre ellos. Se basa en el análisis de la repetitividad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

6.4.1. Límites de detección y cuantificación

En base a la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en la que se establecen las condiciones necesarias que se deben cumplir en los laboratorios de ensayos y calibración, para garantizar la calidad, competencia y fiabilidad de los análisis químicos,³⁶ se realizaron análisis referentes al límite de detección (LOD) y al límite de cuantificación (LOQ).

“El límite de detección (LOD) se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Intuitivamente, el LOD sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente”³⁷. El LOQ se correspondería con la menor concentración de la sustancia cuantificable.

Atendiendo a la **Tabla 9**, tras preparar y analizar diluciones a muy bajas concentraciones, se pudieron observar los LOD detectados para cada una de ellas. Los valores incluidos fueron desde el rango de las 0,005 ppm en algunos casos, hasta las 5 ppm en otros. En cuanto a los LOQ detectados de la columna contigua, los valores resultantes fueron desde las 0,1 ppm hasta las 10 ppm. Con el fin de poder poner a punto otro procedimiento para el cálculo de los LOD y LOQ (columna de valores calculados), se diseñó una matriz en Excel para cada una de las sustancias, a través de la cual se intentaba obtener estos parámetros matemáticamente con confianza estadística, empleando para ello la desviación estándar de la ordenada de cada recta como se describe en el apartado de la introducción.

Comparando los LOD/LOQ observados y los calculados de la **Tabla 9**, se puede apreciar notables diferencias, siendo en todos los casos siempre mayor el valor calculado que el observado. Además, todos los LOD observados están por debajo de los límites que establece la normativa. Las concentraciones por encima del LOQ calculado podrán considerarse estadísticamente correctas, mientras que las determinadas por debajo precisarán de un mayor número de réplicas para confirmar la correcta cuantificación. Otra manera de corroborar los valores de concentración obtenidos para un determinado analito sería, la adición de ese mismo analito a la muestra a una concentración superior al LOQ calculado. La diferencia de concentración entre la muestra con y sin adición de analito serviría para confirmar la concentración inicialmente determinada.

Tabla 9. Límites de detección observados y calculados para los 20 alérgenos a estudio.

Pico	Compuesto	Observados		Calculados	
		LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
1	Alcohol de bencilo	0,1	0,5	4,43	14,76
2	Alcohol anísico	0,1	0,5	6,21	20,7
3	Cumarina	0,1	0,5	4,34	14,49
4	Alcohol cinamílico	0,1	0,5	6,29	20,99
5	Cinamaldehído	0,1	0,5	8,93	29,79
6	Eugenol	0,05	0,1	6,39	21,31
7	Isoeugenol	0,05	0,1	7,77	25,9
8	Extracto de musgo de roble	2,5	5	15,93	53,13
9	Geraniol	0,1	0,5	2,68	8,96
10	Linalool	1	2,5	7,39	24,66
11	Citral	0,5	1	10,4	34,69
12	β -Citronelol	0,1	0,5	5,91	19,72
13	2-Octinoato de metilo	1	2,5	9,32	31,06
14	Benzoato de bencilo	5	10	12,07	40,23
15	Alcohol α -amilcinamílico	0,1	0,5	5,92	19,75
16	Salicilato de bencilo	5	10	15,33	51,12
17	Cinamato de bencilo	2,5	5	17,53	58,45
18	α -Amilcinamaldehído	5	10	15,03	50,12
19	α -Cetona	5	10	12,26	40,88
20	Farnesol	5	10	14,11	47,05

6.4.2. Precisión

El estudio de la precisión del método se llevó a cabo comprobando que el método proporcionaba datos que concordaban entre sí al realizarlos en el mismo día (repetitividad) y en días diferentes (reproducibilidad). Los valores referentes a la precisión del método se muestran en la **Tabla 10**. En cuanto a los estudios de repetitividad, se realizaron en el mismo día un conjunto de análisis en las muestras bajo las mismas condiciones, es decir: mismo analista, mismos aparatos, componentes, reactivos, en el mismo laboratorio y en un mismo tiempo definido. En cuanto a la reproducibilidad, los análisis también se realizaron en el mismo laboratorio, pero en diferentes días con la intención de contrastar la variabilidad del método, aumentando los tiempos de análisis (muestras hechas el mismo día). Estas determinaciones se llevaron a cabo con el objetivo de asegurar la calidad del procedimiento analítico.

Tabla 10. Análisis de repetitividad y reproducibilidad del método analítico empleando dos concentraciones para cada uno de los 20 alérgenos a estudio. Conc.: concentración.

Pico	Compuesto	Conc. preparada (ppm)	Repetitividad		Reproducibilidad	
			Conc. determinada (ppm)	Precisión (%)	Conc. determinada (ppm)	Precisión (%)
1	Alcohol de bencilo	10	10,299	102,998	9,312	93,123
		100	107,826	107,826	94,771	94,771
2	Alcohol anísico	10	10,835	108,351	10,988	109,888
		100	100,507	100,507	94,73	94,73
3	Cumarina	10	8,944	89,443	9,173	91,738
		100	105,126	105,126	99,763	99,763
4	Alcohol cinamílico	10	9,364	93,646	11,378	113,785
		100	107,212	107,212	106,641	106,641
5	Cinamaldehído	10	8,194	81,943	8,074	80,743
		100	107,289	107,289	82,636	82,636
6	Eugenol	10	8,687	86,874	8,043	80,439
		100	107,663	107,663	99,66	99,66
7	Isoeugenol	10	9,362	93,624	8,47	84,706
		100	110,386	110,386	57,994	57,994
8	Extracto de musgo de roble	10	15,702	157,02	25,526	255,264
		100	122,234	122,234	21,183	21,183
9	Geraniol	10	9,904	99,043	9,76	97,607
		100	105,356	105,356	96,671	96,671
10	Linalool	10	9,173	91,737	7,32	73,202
		100	108,276	108,276	89,436	89,436
11	Citral	10	11,995	119,958	10,534	105,349
		100	105,125	105,125	96,639	96,639
12	β -Citronelol	10	8,828	88,281	7,7888	77,888
		100	105,45	105,45	99,614	99,614
13	2-Octinoato de metilo	10	12,754	127,542	30,227	302,276
		100	101,73	101,73	303,128	303,128
14	Benzoato de bencilo	10	17,346	173,46	16,629	166,294
		100	94,554	94,554	59,67	59,67
15	Alcohol α -amilcinamílico	10	8,425	84,254	9,3	93
		100	113,998	113,998	103,542	103,542
16	Salicilato de bencilo	10	15,913	159,13	16,913	169,133
		100	104,555	104,555	51,326	51,326
17	Cinamato de bencilo	10	13,496	134,966	16,14	161,409
		100	90,296	90,296	79,942	79,942
18	α -Amilcinamaldehído	10	15,846	158,461	x	x
		100	106,06	106,06	40,54	40,54
19	α -Cetona	10	12,541	125,411	16,679	166,793
		100	81,883	81,883	76,657	76,657
20	Farnesol	10	13,591	135,917	13,609	136,091
		100	86,483	86,483	60,526	60,526

Los valores de repetitividad obtenidos para los diferentes compuestos fueron en general cercanos todos al valor óptimo del 100%, si bien algunos compuestos presentaron valores más altos y bajos. En el caso de la reproducibilidad, los valores obtenidos presentaron una mayor variabilidad, sugiriendo que es uno de los aspectos a mejorar en pasos posteriores de la validación del método.

6.5. Cuantificación de alérgenos en muestras

Con la finalidad de verificar y comprobar la eficacia del método analítico desarrollado, se seleccionaron cuatro productos cosméticos. Se llevó a cabo su análisis y se procedió a comparar los t_R y perfiles de absorción de los distintos analitos de cada muestra, con los de los compuestos patrón empleados en las rectas de calibrado.

La primera muestra analizada (muestra A) se correspondió a una mascarilla capilar de una conocida marca del sector cosmético (**Figura 19**). En esta muestra el número de alérgenos detectados fue de 6, que se correspondieron con alcohol de bencilo, cumarina, geraniol/linalool, β -citronelol, salicilato de bencilo y cinamato de bencilo. En lo que respecta a los compuestos geraniol y linalool, atendiendo a la **Tabla 6**, se observa que sus t_R son muy próximos (32,901 y 32,924). Además, sus perfiles de absorción son iguales. Es por ello que no podría afirmarse que el compuesto que se observa tanto al minuto 32,8 en la primera réplica como al minuto 32,89 en la segunda (**Tabla 11**) se corresponda al geraniol (compuesto 9) o, por el contrario, al linalool (compuesto 10). Para poder distinguir cuál de ellos es el presente en el producto, sería necesario un análisis posterior a través de la adición de una concentración conocida e independiente de ambos compuestos sobre la muestra para ver si el pico cambia en t_R y/o en área o bien el uso de la espectrometría de masas para identificar de manera más fiable el compuesto. En relación con las concentraciones presentes en las muestras analizadas, se cuantificaron las siguientes: alcohol de bencilo, 1404,38 ppm; cumarina, 91,71 ppm; geraniol, 129,27 ppm; β -citronelol, 186,89 ppm; salicilato de bencilo, 506,35 ppm y cinamato de bencilo 366,76 ppm (muestra A). 2-octinioato de metilo, 924,92 ppm; (muestra B). Geraniol, 59,60 ppm; (muestra D).

Como se puede observar en el etiquetado del producto de la **Figura 19**, aparte de los compuestos ya identificados se incluye también al citral y limoneno (compuesto descartado durante las fases de puesta a punto). El citral no se observó a su respectivo t_R en los cromatogramas obtenidos en ninguna de las dos réplicas realizadas. Tampoco se vio perfil de absorción que pudiera identificarlo. El tercer alérgeno (limoneno) formaba parte de los 5

alérgenos incluidos en posibles degradados que se descartaron en fases anteriores. Por lo tanto, de un total de 8 alérgenos presentes en la etiqueta, sin incluir al posible degradado, 6 fueron correctamente identificados.

La segunda muestra analizada (muestra B) fue el preparador capilar con aceite de árbol de té de la **Figura 20**. Se consideró interesante incluir a este tipo de producto debido a que, según su etiquetado, no presentaba ninguno de los alérgenos incluidos y analizados en este estudio. Con el objetivo de contrastar la veracidad e información del fabricante, se comprobó la existencia de alérgenos. Se encontró en ambas réplicas un compuesto que encajaba en el t_R y perfil de absorción del 2-octinoato de metilo. El 2-octinoato de metilo presenta en la **Tabla 6** de los compuestos patrón un t_R de 36,185 minutos, con máxima absorción a una longitud de onda de 210 nm. Tal y como muestra la **Tabla 12**, si se estima rápidamente la media de los t_R en ambas réplicas, sale muy similar al 2-octinoato de metilo. Aunque todo parece indicar que dicho pico se podría identificar como tal, sería necesario un análisis posterior como el descrito para la muestra A para identificar de manera más fiable al compuesto.

En la muestra del sérum facial (muestra C) no se encontraron coincidencias con ningún alérgeno patrón de referencia, lo cual coincide con el etiquetado declarado por el fabricante. Al no incluir sus ingredientes en el propio bote del producto, se extrajeron directamente de la *web* oficial de la marca, tal y como ilustra la **Figura 21**.

La última muestra analizada (muestra D) fue la perteneciente al desmaquillante de la **Figura 22**. En el etiquetado de dicho producto se incluyen los alérgenos linalool y β -citronelol. El análisis mostró un único pico. Realizando una estimación de la media de los valores de los t_R de las dos réplicas (**Tabla 13**), el tiempo obtenido se correspondió a 33 minutos. Al comparar este valor con el de la **Tabla 6**, se observa muy poca diferencia entre el valor obtenido de la muestra y el de la tabla de referencia. Esto permite identificar dicho pico como el linalool, con un t_R en la de 32,924 minutos. En la etiqueta de la **Figura 21**, el LOD del β -citronelol es mayor que la concentración a partir de la cual se debe declarar. Esto explicaría el motivo de no ver el pico a su correspondiente t_R .

Tabla 11. Cuantificación de alérgenos en la muestra A (mascarilla capilar) mediante RP-HPLC. Conc.: concentración.

Compuesto	Réplica	t _R	λ máx	Otras λ	Conc. en disolución (ppm)	Conc. en producto (ppm)		Porcentaje en producto (% p/p)	
						Mean	SD	Mean	SD
1	1	15,195	210	254	70,2353	1404,3815	0,4589	0,1404	0,0000
	2	15,283	210	254	70,2029				
3	1	20,505	210	254, 280, 310	4,5612	91,7194	0,7013	0,0092	0,0001
	2	20,578	210	254, 280, 310	4,6108				
9	1	32,798	210	x	6,4499	129,2732	0,3892	0,0129	0,0000
	2	32,890	210	x	6,4774				
12	1	35,303	210	x	3,0018	186,8974	179,4095	0,0187	0,0179
	2	35,383	210	x	15,6880				
16	1	40,094	210	254, 280, 310, 370	25,5547	506,3535	6,7047	0,0506	0,0007
	2	40,148	210	254, 280, 310, 370	25,0806				
17	1	40,560	280	254, 280, 310, 370	18,3294	366,7625	0,2470	0,0367	0,0000
	2	40,614	280	254, 280, 310, 370	18,3469				

Tabla 12. Cuantificación de alérgenos en la muestra B (preparador capilar con aceite de árbol de té) mediante RP-HPLC. Conc.: concentración.

Compuesto	Réplica	t _R	λ máx	Otras λ	Conc. en disolución (ppm)	Conc. en producto (ppm)		Porcentaje en producto (% p/p)	
						Mean	SD	Mean	SD
13	1	36,092	210	x	49,8856	924,9219	102,9416	0,0925	0,0103
	2	35,837	210	x	42,6066				

Tabla 13. Cuantificación de alérgenos en la muestra D (desmaquillante) mediante RP-HPLC. Conc.: concentración.

Compuesto	Réplica	t _R	λ máx	Otras λ	Conc. en disolución (ppm)	Conc. en producto (ppm)		Porcentaje en producto (% p/p)	
						Mean	SD	Mean	SD
9	1	32,938	210	x	2,9522	59,6016	0,7899	0,0060	0,0001
	2	33,067	210	x	3,0080				

7. Discusión

El empleo de la cromatografía líquida de fase reversa fue apropiado para poder separar a los distintos compuestos incluidos en el estudio y para poder regular los t_R de cada uno de ellos. Se trató de seguir en todo momento la metodología de trabajo definida al inicio del estudio, con el fin de poder alcanzar los objetivos previamente establecidos. Tras la realización de numerosas pruebas y ensayos orientados a conseguir una correcta separación de los picos cromatográficos correspondientes a las sustancias incluidas, se acabó por variar la composición de la fase móvil empleando combinaciones de agua, acetonitrilo y metanol. Con el método cromatográfico final, con H₂O:ACN (90:10) como eluyente A y ACN:MeOH (60:40) como eluyente B, se consiguió obtener una separación adecuada de los compuestos además de una correcta amplitud de sus picos.

La optimización del método siguió los criterios analíticos básicos y es un claro ejemplo de la dificultad asociada a optimizar un método analítico que permita el análisis de muestras complejas, permitiendo la identificación simultánea de diferentes analitos. El trabajo realizado pone de manifiesto la necesidad de adaptar los métodos publicados al aparatado disponible y la necesidad de un trabajo de innovación tecnológica que conlleve a la puesta en marcha de esta metodologías en nuevos laboratorios.

El método optimizado ha demostrado una muy buena linealidad, pero no tan buenos resultados en cuanto a la precisión. La primera explicación de este hecho es la necesidad de estandarizar las condiciones que reduzcan esta falta de precisión interdía. Sin embargo, también hay que tener en cuenta la posible degradación de las muestras, ya que en algunos casos se pudo observar que ésta era evidente. Tampoco hay que descartar el error humano a la hora del pipeteo, ya que estos ensayos de precisión requieren una gran experiencia a la hora del mismo, lo cual requeriría de personal técnico altamente especializado. Todo lo anterior, indica que es necesario un estudio de la estabilidad de los patrones empleados para asegurar la precisión del método. Este estudio será abordado en futuros ensayos del grupo de investigación encaminados a culminar la optimización del método.

Con respecto al método analítico en sí mismo, éste fue desarrollado y testado siguiendo una serie de parámetros que lo validasen. Entre ellos, se determinaron la linealidad de las rectas de calibrado, límites LOD/LOQ y la precisión del método. La linealidad del método fue evaluada realizando análisis de cada una de las sustancias por triplicado. Esto, junto al rango de concentraciones a las cuales se realizaron los análisis, permitió estimar un

coeficiente de determinación en todos los casos de $R^2 > 0,98$, indicando un ajuste lineal bastante aceptable.

En consideración a los valores LOD/LOQ observados frente a los LOD/LOQ calculados, se distinguió una variación considerable entre los valores de ambos parámetros. Pese al haber intentado incluir un procedimiento más completo, la falta de coincidencia entre valores observados y calculados, indica que existe margen de mejora que ajuste la similitud de los datos representados.

En lo referente al análisis de las muestras de los 4 productos cosméticos analizados y con la intención de identificar a los alérgenos presentes, se observó que no hubo interferencia de ninguno de los ingredientes incluidos en ellos. A pesar de esto, el análisis de dos de las muestras pone de manifiesto la necesidad de un método posterior de confirmación que permita asegurar inequívocamente la presencia e identidad de los picos. De esta manera, el método aquí optimizado se constituiría como método de cribado de primer paso que necesitaría una confirmación posterior. Este hecho no resta ni validez ni relevancia al presente trabajo, ya que precisamente son los métodos de cribado los más necesarios en la industria para asegurar de una manera rápida, ágil y barata la calidad y seguridad de sus productos.

El método se ha puesto a prueba analizando muestras comerciales reales, para ello, se eligieron cuatro preparaciones cosméticas diferentes en fórmula y finalidad, intentando cubrir un amplio tipo de muestras. En la muestra A (mascarilla capilar), fueron detectados 6 alérgenos indicados en el etiquetado de un total de 8. Fueron detectados el alcohol de bencilo, cumarina, geraniol/linalool, β -citronelol, salicilato de bencilo y cinamato de bencilo, que se correspondían con los picos 1, 3, 9/10, 12, 16 y 17. Quedó sin confirmar la presencia de limoneno debido al ya mencionado problema con la estabilidad del patrón comercial disponible. En la muestra B (champú sin alérgenos), se sospechó de la posibilidad de encontrar al compuesto 2-octinoato de metilo correspondiéndose al pico 13, pero tal y como se ha comentado más arriba, es necesario la confirmación mediante un método posterior ya que no está declarado en el etiquetado del producto. En la muestra C (sérum facial) y coincidiendo con la etiqueta del fabricante, no se detectó alérgeno alguno. Por último, en la muestra D (desmaquillante) se consiguió identificar al linanool relativo al pico 10.

En contraposición a lo comentado en el párrafo anterior, hubo 3 alérgenos incluidos en el estudio que se encontraban presentes pero que no fueron identificados. En el caso de la muestra A, los compuestos que no se consiguieron identificar fueron el citral (pico 11) y el geraniol o linalool (pico 9 y 10). Haciendo referencia a lo comentado en el apartado 6.5, al coincidir el valor del t_R medio de las dos réplicas con el rango de tiempo de los alérgenos

geraniol y linalool, no se sabe con exactitud a cuál de los alérgenos se correspondería el pico observado en la muestra A, por ello, tal y como se menciona también en apartados anteriores, se hace necesario el mencionado método de confirmación. Continuando con la muestra B, se encontró en ella a un compuesto que eluía a un tiempo análogo al 2-octinoato de metilo y presentaba mismo perfil de absorción. Debido a la infinidad de compuestos que se emplean en la industria cosmética, muchos de ellos presentan características y naturaleza muy similares entre sí. Por este motivo, junto a que el 2-octinoato de metilo no se encuentra incluido entre los ingredientes del producto, se hace necesario confirmar la identificación con un método posterior. Como se ha citado en el segundo párrafo de este apartado, el análisis de la muestra C evidenció la ausencia de alérgenos en el producto sin picos coincidentes con ningún alérgeno patrón de referencia. Pasando al último producto analizado, muestra D, no se consiguió determinar al β -citronelol especificado en el etiquetado del producto, pese a que los LOD obtenidos están por debajo de los límites que marca la normativa.

Atendiendo a todas las consideraciones realizadas, se podría decir que el método analítico desarrollado y presentado aporta datos interesantes y relevantes a la hora de llevar a cabo la detección de alérgenos en productos cosméticos. Es un método sencillo, rápido y barato. Asimismo, cabe mencionar que antes de desarrollar un método analítico, ya sea para la detección de alérgenos en cosmética, pesticidas, drogas, etc., es fundamental entre otras cosas que sea fiable y aplicable, presente especificidad y selectividad exclusivamente por los compuestos que se desean analizar, y que sea lo más preciso posible. Este método cumple con la mayoría de estos requisitos y está listo para, tras algunas mejoras que se mencionan en párrafos anteriores, cumplir con la totalidad de estos. Junto a todo esto, es aconsejable tener bien definida una línea de trabajo que conduzca a la consecución de los objetivos previamente definidos. En definitiva, la calidad de los resultados obtenidos tras desarrollar un método analítico va a depender de la correcta ejecución de las etapas que lo conforman, antes, con una correcta planificación, durante, mientras está en ejecución y tras, cuando se testea, valida y comprueba. Desarrollos como el llevado a cabo en el presente trabajo pretenden ser un ejemplo de esta calidad en el diseño y ejecución, si bien, tal y como se ha comentado anteriormente, existen algunos aspectos pendientes de mejora para concluir la validación del método.

8. Conclusión y futuras líneas de investigación

Tras la realización del presente trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- ✓ Se ha conseguido detectar a 20 de los 25 alérgenos de fragancia iniciales recogidos en la normativa.
- ✓ El método ha resultado ser, en la mayoría de los casos, efectivo para la detección de estos en las muestras cosméticas analizadas.
- ✓ Existe margen de mejora en distintos aspectos del método, especialmente en la precisión y en especial la reproducibilidad.
- ✓ La no detección de algunos alérgenos presentes (según etiquetado) en las muestras cosméticas analizadas, refleja que se podría seguir optimizando el método.
- ✓ Se ha observado que cualquier mínima variación en la manipulación, pipeteo, temperatura de los compuestos al preparar las diluciones, almacenaje, tiempo del vial en el equipo hasta su análisis, etc. provocaron que no siempre los resultados obtenidos entre réplicas fueran semejantes a las mismas concentraciones. Se debe tener en cuenta el mayor número de variables posibles con el fin de optimizar el tiempo y la calidad del análisis.

Como futuras líneas de investigación, sería interesante poder completar la optimización de este método para posibilitar la detección y cuantificación de las 26 sustancias declaradas por el reglamento europeo como alérgenas en este estudio. Durante el desarrollo del presente trabajo se excluyeron a 5 sustancias posiblemente degradadas de origen, pero que sería interesante incorporar si se consigue un proveedor de garantías. La sustancia restante (*Evernia furfuracea*) no se incluyó en el estudio al tratarse de un extracto complejo no disponible comercialmente, pero en el caso de encontrarla, se podría emplear la misma metodología utilizada para el extracto de *Evernia prunastri*. A fin de poder implementar este método en empresas relacionadas con el sector, sería interesante valorar la opción de poder validarlo de manera externa. Por ello, queda abierta la opción de continuar lo ya iniciado y poder aprovechar todo lo desarrollado en este estudio.

9. Bibliografía

1. Parlamento Europeo y del Consejo. Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos (Texto pertinente a efectos del EEE). Consultado en enero de 2020:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex%3A32009R1223> (2009).
2. Statista. Consumption value of cosmetics and personal care in Europe in 2018, by country. Consultado en enero de 2020: <https://www.statista.com/statistics/382100/european-cosmetics-market-volume-by-country/b> (2018).
3. Abbas A., Lichtman A. Inmunología celular y molecular 411-431 (Madrid; 2003).
4. E. Serra, L.P. Dermatitis de contacto alérgica. Revisión. *Farmacia Profesional* 25, 40 (2011).
5. E. Serra, L.P. Dermatitis de contacto alérgica. Revisión. *Farmacia Profesional* 25, 42 (2011).
6. Miquel, D.V. Dermatitis de contacto. Universidad de Valencia. Consultado en marzo de 2020: <https://www.uv.es/derma/CLindex/CLcontacto/CLcontacto.html> (2020).
7. E. Serra, L.P. Dermatitis de contacto alérgica. Revisión. *Farmacia Profesional* 25, 41-42 (2011).
8. Pierina A. Catelli. Hipersensibilidad. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. Consultado en marzo 2020:
http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Clase_27.10.09_Hipersensibilidad.pdf (2009).
9. Academia Española de Dermatología y Venereología. Las dermatitis de contacto alérgicas afectan al 1-2% de la población. Consultado en marzo de 2020: <https://aedv.es/comunicacion/notas-de-prensa/la-aedv-conciencia-a-la-poblacion-sobre-el-problema-de-las-alergias/> (2015).
10. The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers. Fragrance allergy in consumers 5-9 (1999).
11. González-Muñoz, P., Conde-Salazar, L. & Vañó-Galván, S. Dermatitis alérgica de contacto a cosméticos. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 105, 822-832 (2014).
12. Comisión Europea. Alergia a los perfumes. Consultado en abril de 2020: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/perfume-allergies/es/acerca-alergia-perfumes.htm#29 (2012).
13. Villa, C., Gambaro, R., Mariani, E. & Dorato, S. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, 755-762 (2007).
14. Orus, M.I. Alteraciones fisiológicas inducidas por *Evernia Prunastri* (L.) ACH. al crecer epifíticamente sobre ramas de *Quercus Rotundifolia*, Lam. Universidad Complutense de

- Madrid. Consultado en abril de 2020: <https://eprints.ucm.es/52829/1/5309860662.pdf> (2015).
15. Sogorb-Sánchez M.A. Vilanova-Gisbert, E. Técnicas analíticas de contaminantes químicos, Edn. Primera 121 (2004).
16. Douglas, A. Skoog, F. Holler, J. Nieman, T.A. Nieman. Principios de análisis instrumental 730 (Madrid; 2001).
17. Kenneth A. Rubinson y Judith F. Rubinson. Análisis instrumental 586 (Madrid; 2004).
18. Arsenault, J., & McDonald, P. P. (2009). *Beginners Guide to Liquid Chromatography*. Milford: Waters Corporation.
19. Sogorb-Sánchez M.A. Vilanova-Gisbert, E. Técnicas analíticas de contaminantes químicos, Edn. Primera 147 (2004).
20. Menor, L.T. Caracterización analítica y funcional de extractos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas del género Cistus. Universidad Miguel Hernández de Elche (2015).
21. Sogorb-Sánchez M.A. Vilanova-Gisbert, E. Técnicas analíticas de contaminantes químicos, Edn. Primera 142 (2004).
22. Rubinson, K.A. Rubinson, J.F. Análisis instrumental 640 (Madrid; 2004).
23. Rubinson, K.A. Rubinson, J.F. Análisis instrumental 637 (Madrid; 2004).
24. Douglas, A. Skoog, F. Holler, J. Nieman, T.A. Principios de análisis instrumental 785 (Madrid; 2001).
25. Douglas, A. Skoog, F. Holler, J. Nieman, T.A. Principios de análisis instrumental 765 (Madrid; 2001).
26. Chopra, D. Benefits of Photodiode Array Detection over conventional Scanning detection. Consultado en abril de 2020: <https://lab-training.com/2015/07/13/benefits-of-photodiode-array-detection-over-conventional-scanning-detection/> (2015).
27. Sogorb-Sánchez M.A. Vilanova-Gisbert. Técnicas analíticas de contaminantes químicos, Edn. Primera 248 (2004).
28. Espectrometría de Masas. Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI). Universidad de Málaga. Consultado en abril de 2020: <http://www.scai.uma.es/areas/aqcm/ems/ems.html>
29. Serna-Guerrero, D. Espectrometría De Masas (MS); Fundamento Y Equipos De Tecnología Avanzada. Consultado en mayo de 2020: <http://blog.analitek.com/espectrometria-de-masas-ms-fundamento-y-equipos-de-tecnologia-avanzaca-0-1> (2018).

30. Joulain, D. & Tabacchi, R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: Oakmoss. *Flavour and Fragrance Journal* 24, 49-61 (2009).
31. Riu, J. Boqué, R. Calibración lineal. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Universitat Rovira i Virgili - Tarragona. 676-680 (2003). Consultado en mayo de 2020: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/callin.pdf>
32. Dosal-Marcos M.A. Villanueva-Marzo, M. Introducción a la metrología química. Curvas de calibración en los métodos analíticos (2008). Consultado en junio de 2020: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf
33. Printing, M. in United States Pharmacopeial Convention USP XXII: United States Pharmacopeia. 22ed. 1225,1710 (1990).
34. Castillo R.J. Aplicación del Método de Estándar Interno a la Cromatografía de Gases. Consultado en julio de 2020: <https://es.scribd.com/doc/235014530/Estandar-Interno> (2010).
35. Jurado, J.M. Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos. (2008).
36. ICSA consultora de laboratorios analíticos. Consultado en agosto de 2020: <https://www.icsa.es/laboratorios-analiticos/consultoria-de-laboratorios/norma-iso-17025#:~:text=La%20Norma%20ISO%2017025%20proporciona,fiabilidad%20de%20los%20resultados%20anal%C3%ADticos> (2020).
37. Boqué, R. El límite de detección de un método analítico. Consultado en agosto de 2020: <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/lod.pdf> (2004).

10. Anexos

Anexo I. Características de las 25 sustancias inicialmente incluidas en el estudio. Ordenadas según su orden de elución.

Pico	Compuesto	Tª almacenaje (°C)	Condiciones especiales	Tipo de industria	Estado	% pureza	Densidad (g/ml)
1	Alcohol de bencilo CAS 100-51-6	25	Atmósfera inerte	Cosmética	Líquido	99,81	1,05
2	Alcohol anisílico CAS 105-13-5	25	x	Cosmética	Sólido	99,5	1,11
3	Cumarina CAS 91-64-5	25	x	Cosmética y farmacéutica	Sólido granulado	100	0,935
4	Alcohol cinamílico CAS 104-54-1	25	x	Cosmética	Líquido viscoso	100	1,04
5	Cinamaldehído CAS 104-55-2	25	x	Cosmética, alimentaria y agroquímica	Líquido	98,6	1,05
6	Eugenol CAS 97-53-0	-20	x	Cosmética, alimentaria y farmacológica	Líquido	98,9	1,07
7	Isoeugenol CAS 97-54-1	25	x	Cosmética y alimentaria	Líquido	98,9	1,08
8	Extracto de musgo de roble CAS 90028-68-5	2-8	x	Cosmética	Líquido	1 mg/ml en etanol	0,79
9	Geraniol CAS 106-24-1	25	x	Cosmética	Líquido	98	0,38
10	Linalool CAS 78-70-6	25	x	Cosmética y química	Líquido	98,8	0,87
11	Citral CAS 5392-40-5	25	Atmósfera inerte	Cosmética y química	Líquido	98,4	0,89
12	β-Citronelol CAS 106-22-9	25	x	Cosmética y química	Líquido	97,4	0,86

Anexo I (continuación). Características de las 25 sustancias inicialmente incluidas en el estudio. Ordenadas según su orden de elución.

13	2-Octinoato de metilo CAS 111-12-6	25	x	Cosmética	Líquido	99,8	0,92
14	Benzoato de bencilo CAS 120-51-4	25	x	Cosmética y alimentaria	Líquido	100	1,12
15	Alcohol α -amilcinnámico CAS 101-85-9	25	x	Cosmética, química y alimentaria	Líquido	99,4	0,95
16	Salicilato de bencilo CAS 118-58-1	25	x	Cosmética	Sólido	99,9	1,18
17	Cinamato de bencilo CAS 103-41-3	25	x	Cosmética y química	Sólido	99,4	1,11
18	α -Amilcinamaldehído CAS 122-40-7	25	x	Cosmética y química	Líquido	98	0,97
19	α -Cetona CAS 127-51-5	25	Atmósfera inerte	Cosmética y química	Líquido	90,1	0,93
20	Farnesol CAS 4602-84-0	25	x	Cosmética	Líquido	98,4	0,89
21	α -Hexilcinamaldehído CAS 101-86-0	Entre 2-8	Atmósfera inerte	Cosmética y química	Líquido	99,8	0,95
22	Hidroxicitronelal CAS 107-75-5	25	x	Cosmética y química	Líquido	99,3	0,92
23	d- Limoneno CAS 5989-27-5	Entre 2-8	x	Cosmética, farmacéutica y química	Líquido	99,5	0,84
24	Lilial CAS 80-54-6	Entre 2-8	Atmósfera inerte	Cosmética y química	Líquido	98,4	0,95
25	Liral CAS 31906-04-4	Entre 2-8	Atmósfera inerte	Cosmética y química	Líquido	97,8	1,00

Anexo II. Volúmenes necesarios en función a las densidades de las 25 sustancias inicialmente incluidas en el estudio. Ordenadas según su orden de elución.

Pico	Densidad corregida (mg/ml)	Concentración de interés (mg/ml)	Volumen final (mL)	Cantidad requerida (mg)	Volumen a coger (ml)	Volumen a coger (µl)	Volumen de disolvente (µL)
1	1043,015	0,5	1,5	0,75	0,000719	0,71907	1499,281
2	1107,435	0,5	1,5	0,75	0,000677	0,677241	1499,323
3	935	0,5	1,5	0,75	0,000802	0,802139	1499,198
4	1044	0,5	1,5	0,75	0,000718	0,718391	1499,282
5	1033,328	0,5	1,5	0,75	0,000726	0,72581	1499,274
6	1055,263	0,5	1,5	0,75	0,000711	0,710723	1499,289
7	1065,153	0,5	1,5	0,75	0,000704	0,704124	1499,296
8	7,9	0,5	1,5	0,75	0,094937	94,93671	1405,063
9	371,42	0,5	1,5	0,75	0,002019	2,019277	1497,981
10	859,56	0,5	1,5	0,75	0,000873	0,872539	1499,127
11	873,792	0,5	1,5	0,75	0,000858	0,858328	1499,142
12	834,718	0,5	1,5	0,75	0,000899	0,898507	1499,101
13	918,16	0,5	1,5	0,75	0,000817	0,816851	1499,183
14	1118	0,5	1,5	0,75	0,000671	0,670841	1499,329
15	946,288	0,5	1,5	0,75	0,000793	0,792571	1499,207
16	1174,824	0,5	1,5	0,75	0,000638	0,638393	1499,362
17	1102,346	0,5	1,5	0,75	0,00068	0,680367	1499,32
18	950,6	0,5	1,5	0,75	0,000789	0,788975	1499,211
19	837,93	0,5	1,5	0,75	0,000895	0,895063	1499,105
20	871,824	0,5	1,5	0,75	0,00086	0,860265	1499,14
21	948,1	0,5	1,5	0,75	0,000791	0,791056	1499,209
22	916,539	0,5	1,5	0,75	0,000818	0,818296	1499,182
23	837,79	0,5	1,5	0,75	0,000895	0,895212	1499,105
24	930,864	0,5	1,5	0,75	0,000806	0,805703	1499,194
25	973,11	0,5	1,5	0,75	0,000771	0,770725	1499,229