

Paula Vera Estacho

Estudio de adhesivos en envase
alimentario: desarrollo de métodos
de análisis, difusión y migración de
sus componentes a los alimentos
envasados

Departamento
Química Analítica

Director/es
Nerín de la Puerta, M.C. Cristina

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE ADHESIVOS EN ENVASE
ALIMENTARIO: DESARROLLO DE MÉTODOS DE
ANÁLISIS, DIFUSIÓN Y MIGRACIÓN DE SUS
COMPONENTES A LOS ALIMENTOS ENVASADOS**

Autor

Paula Vera Estacho

Director/es

Nerín de la Puerta, M.C. Cristina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Analítica

2013



**Universidad
Zaragoza**

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Departamento de Química Analítica

**ESTUDIO DE ADHESIVOS EN ENVASE
ALIMENTARIO. DESARROLLO DE MÉTODOS
DE ANÁLISIS, DIFUSIÓN Y MIGRACIÓN DE SUS
COMPONENTES A LOS ALIMENTOS
ENVASADOS**

Paula Vera Estacho

TESIS DOCTORAL

2012



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Departamento de Química Analítica

**ESTUDIO DE ADHESIVOS EN ENVASE
ALIMENTARIO. DESARROLLO DE MÉTODOS
DE ANÁLISIS, DIFUSIÓN Y MIGRACIÓN DE SUS
COMPONENTES A LOS ALIMENTOS
ENVASADOS**

Paula Vera Estacho

TESIS DOCTORAL

2012



La **Dra. Cristina Nerín de la Puerta**, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria, titulada: “ESTUDIO DE ADHESIVOS EN ENVASE ALIMENTARIO. DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS, DIFUSIÓN Y MIGRACIÓN DE SUS COMPONENTES A LOS ALIMENTOS ENVASADOS” presentada por **Dña. Paula Vera Estacho** para optar al grado de Doctor en Ciencia Analítica, ha sido realizada bajo mi codirección en el Escuela de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de Zaragoza, de acuerdo a los objetivos presentados en el Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Química Analítica. Por tanto, autorizo su presentación para proseguir con los trámites oportunos y proceder a su calificación por el tribunal correspondiente.

En Zaragoza, a 10 de Octubre de 2012.

Dra. Cristina Nerín de la Puerta

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de Aragón a través de la beca predoctoral B185/2009.

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de investigación:

“Research Programme on Migration From Adhesives in Food Packaging Materials in Support of European Legislation and Standardisation: MIGRESIVES" UE, VI FRAME PROGRAM, Collective Research. 2007-2010.

AGRADECIMIENTOS

A la primera persona que me gustaría agradecerle el que yo hoy esté aquí, es a Cristina Nerín. Lo primero de todo, porque aquel día que vine a pedir un proyecto final de carrera me diste la oportunidad de hacerlo en el grupo, cuando lo finalicé me sugeriste que hiciera la tesis y por eso, hoy estoy aquí. Durante estos años realizando la Tesis, te doy las gracias por mostrarme tu confianza, por apoyarme en determinados momentos y como no, por dejarme estar en este grupo que tantas cosas me ha enseñado. Decirte que te admiro mucho como profesional ya que, si sigue aquí el grupo (tal y con la que está cayendo) es gracias a tu insistencia, entusiasmo e ilusión.

En segundo lugar, mi más sincero agradecimiento es a Elena, primero porque eres una gran profesional, me has enseñado muchísimas cosas, dispuesta siempre a ayudarme y me ha encantado estar siempre a tu lado trabajando. Pero lo que más me gusta de tí, que está por encima de todo, es tu persona, podría decir mil y una virtudes pero con lo más importante que me quedo es que has pasado de ser mi compañera de trabajo a ser mi amiga, MIL GRACIAS.

A Pilar y a Celia, por los buenos momentos vividos, las risas que nos hemos echado contado mil y una historias, por ofrecerme mil veces la casa.

A mis compis del laboratorio viejunos (porque estaban antes que yo) Karim y Davis siempre dispuestos a echar una mano y quienes participaron muy de cerca. A Marga, por el trabajo juntas durante el Migresives. A los nuevos que fueron llegando, Juliana, Magda, Isabel, Yolanda, Daniel, María, Elena M. y Miltofen (te recuerdo que me debes un Jamón) y como no, a Martulí la nueva adquisición, has venido tarde pero “como has cundido” y que poco a poco te he ido conociendo y me has encantado. Y como no, a las de Micro Raquel y Sofía.

Como olvidarme de la gente que se fueron Pablito (desde que te fuiste, nada fue igual), Laurita (te he echado mucho de menos), Julio (por el trabajo en el Migresives, que tanto esfuerzo nos costó), Blanca

(parte del trabajo es tuyo) y Angelorum (aunque seas del Zaragoza, eres buena gente jejeje). También de la cantidad de gente que ha pasado por el grupo durante estancias (Fabio, Lucía, Camila, Carla, Audrey, Cristiane...)

A todos los del Grupo GUIA, a Jesús (mil gracias por tu ayuda), a Jorge, Berta, Araceli, María, Esther, Carlos. Y los que se fueron Ramón, Cristina y Joaquín. También a los pertenecientes al grupo de Análisis de Aroma y Enología por enseñarme algo sobre olfatometría.

En especial, quiero dar las gracias a la gente fuera del trabajo, que sin ellos nada hubiera sido posible. A mis amigos y familia (que hecho yo, para mereceros...). En especial a mis abuelos Mari Carmen, José María y Felisa (allí donde estéis) sólo tengo palabras de agradecimiento, por enseñarme los valores de la vida.

A mi hermano Ángel que viniste tarde y yo no quería un hermanito, pero que haría sin tí, y mira que me has dado mal con la Química.

A mis Padres, Pilín y Ángel, y que deciros si siempre que hablo de vosotros es para deciros "que suerte tengo de teneros", por ser el pilar fundamental en mi vida y por vuestro incondicional apoyo y amor.

Y por último, a Carlos, por TODO, viniste a mi vida, y eres lo mejor que me ha pasado.

Pensaba que me iba a costar mucho escribir los agradecimientos, por ser una persona tímida, pero ha ido rapidísimo ya que ha sido un placer....

Si por cuestiones de memoria, me olvidó mencionar a alguien, no fue de forma intencionada.

A mis padres Pílin y Angel

A mi hermano Angel

A Carlos

ÍNDICE

GLOSARIO DE TÉRMINOS	1
PRESENTACIÓN	5
<hr/>	
SECCIÓN I INTRODUCCIÓN	11
1. Envase alimentario	14
2. Interacciones del envase alimentario	17
3. Adhesivos en el envase alimentario	19
4. Tendencias actuales y legislación de adhesivos en el envase alimentario	21
5. Migración en el envase alimentario	25
5.1. Mecanismos de migración.....	25
5.1.1. Partición.....	25
5.1.2. Difusión	27
5.2. Mecanismos de migración desde los adhesivos al alimento en el envase	28
6. Composición y clasificación de los adhesivos	31
6.1. Composición de adhesivos	31
6.2. Clasificación de adhesivos	34
7. Tipos de adhesivos termoplásticos.....	38
7.1. Adhesivos termofusibles	39
7.2. Adhesivos de acetato de polivinilo.....	42
7.3. Adhesivos de polivinilalcohol (PVOH)	43

7.4. Adhesivos acrílicos.....	44
8. Origen de sustancias sensorialmente activas	45
9. Análisis sensoriales para sustancias sensorialmente activas.....	47
10. Análisis de olores mediante cromatografía de gases-olfatometría.....	49
10.1. Cromatografía de gases-olfatometría	50
10.2. Técnicas olfatométricas	52
10.2.1. Técnicas de dilución	52
10.2.2. Técnica de frecuencia de citación: NIF	53
10.2.3. Técnica de tiempo intensidad	53
10.2.4. Técnica de intensidad posterior	54
10.2.5. Técnica de frecuencia modificada	54
10.3. Obtención de extractos aromáticos representativos	56
11. Proyecto migresives	59
<hr/>	
SECCIÓN II OBJETIVOS	63
Objetivos	65
<hr/>	
SECCIÓN III EXPERIMENTAL	67
CAPÍTULO 1 : Identificación de compuestos , determinación de su concentración inicial, coeficientes de particion y difusión en dos adhesivos termofusibles	71
1. Introducción del capítulo	75
2. Materiales y métodos	78
2.1. Materiales	78
2.1.1. Reactivos	78

2.1.2. Fibras de SPME	79
2.1.3. Muestras de adhesivos y laminados.....	79
2.2. Instrumental.....	82
2.2.1. Cromatografía de gases espectrometría de masas	82
2.3. Optimización de la condiciones de HS-SPME.....	83
2.3.1. Variables a estudio.....	83
2.3.2. Optimización	87
2.4. Identificación y clasificación de los compuestos presentes en los adhesivos termofusibles	88
2.5. Determinación de la concentración inicial en el adhesivo	90
2.6. Determinación de los coeficientes de partición.....	92
2.7. Determinación de los coeficientes de difusión.....	96
3. Resultados y discusión	99
3.1. Optimización de las condiciones HS-SPME	99
3.2. Identificación y clasificación según la toxicidad de los compuestos detectados en los adhesivos.....	107
3.3. Concentración inicial en el adhesivo.....	108
3.4. Coeficientes de partición.....	111
3.5. Coeficientes de difusión	118
4. Conclusiones	125
<hr/>	
CAPÍTULO 2: Estudios de migración de los adhesivos en el envase multicapa para envasar alimentos	127
1. Introducción del capítulo	131

2. Materiales y métodos	133
2.1. Materiales	133
2.1.1. Reactivos	133
2.1.2. Fibras de SPME	134
2.1.3. Laminados y adhesivos.....	135
2.2. Instrumental.....	137
2.2.1. Cromatógrafo de gases espectrometría masas	137
2.3. Identificación de los compuestos presentes en los laminados.....	138
2.4. Determinación de la concentración inicial en los adhesivos C_{p0} ..	139
2.5. Optimización del análisis con Tenax.....	140
2.6. Ensayos de migración.....	142
2.7. Validación del modelo de predicción de la migración	143
2.8. Relación de valores de migración con las constantes de partición y difusión.....	144
3. Resultados y discusión	145
3.1. Identificación y C_{p0} de los compuestos presentes en los adhesivos	145
3.2. Migración	154
3.3. Validación	166
3.4. Relación de valores de migración con las constantes de partición y difusión.....	167
4. Conclusiones	170

CAPÍTULO 3: Identificación y cuantificación de la migración de compuestos no volátiles de dos adhesivos termofusibles 173

1. Introducción del capítulo	177
2. Materiales y métodos	181
2.1. Materiales	181
2.1.1. Reactivos	181
2.1.2. Laminados y adhesivos.....	182
2.2. Instrumental.....	183
2.2.1. Cromatografía líquida ultra alta resolución	183
2.2.2. Detección por espectrometría de masas.....	183
2.3. Análisis cualitativo de migración e identificación de los compuestos migrantes en los adhesivos	184
2.4. Determinación de la concentración inicial (C_{p0}) de los compuestos migrantes en los adhesivos	188
2.5. Ensayo cuantitativo de migración	190
3. Resultados y discusión	190
3.1. Análisis cualitativo de migración e identificación de los compuestos en los adhesivos.....	190
3.2. Concentración inicial de los compuestos migrantes en el adhesivo	198
3.3. Migración de compuestos no volátiles	200
4. Conclusiones	203
<hr/>	
CAPÍTULO 4 Identificación y cuantificación de compuestos odorantes presentes en los adhesivos en el envase alimentario	205
1. Introducción del capítulo	209
2. Materiales y métodos	211
2.1. Materiales	211

2.1.1. Reactivos	211
2.1.2. Fibras de SPME	212
2.1.3. Laminados y adhesivos.....	212
2.2. Selección del adhesivo más odorífero y análisis sensorial.....	215
2.3. Instrumental.....	217
2.3.1. Cromatografía de gases directa con olfatometría espectrometría de masas (D-GC-O).....	217
2.3.2. Cromatografía de gases-olfatometría-espectrometría de masas. (GC-O-MS).....	219
2.4. Extracción de los compuestos volátiles desde el adhesivo.....	221
2.4.1. Extracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPE).....	221
2.4.2. Microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPME).....	223
2.5. Identificación de los compuestos odorantes de los extractos obtenidos anteriormente por HS-SPE y HS-SPME.....	226
2.6. Determinación de la concentración inicial de los compuestos odorantes en los adhesivos	231
3. Resultados y discusión	233
3.1. Selección del adhesivo más odorífero de cada tipo y análisis sensorial para cada uno de ellos	233
3.2. Optimización de la microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME).....	235
3.3. Identificación de los compuestos odorantes de los extractos del adhesivo mediante HS-SPE-GC-MS y HS-SPME-GC-MS.....	238

3.4. Cuantificación de los compuestos odorantes por HS-SPME-GC-O-MS	245
4. Conclusiones	250
<hr/>	
CAPÍTULO 5 Estudios de migración de los compuestos odorantes presentes en los adhesivos utilizados en el envase multicapa para envasar alimentos	253
1. Introducción del capítulo	257
2. Materiales y métodos	258
2.1. Materiales	258
2.1.1. Reactivos	258
2.1.2. Laminados y adhesivos.....	259
2.1. Instrumental.....	260
2.1.1. Cromatografía de gases-olfatometría- espectrometría masas (CG-O-MS).....	260
2.3. Determinación de la concentración inicial (C_{p0}) de los compuestos odorantes en los laminados.....	261
2.4. Ensayos de migración.....	262
3. Resultados y discusión	264
3.1. Determinación de la concentración inicial (C_{p0}) de los compuestos odorantes en los laminados.....	264
3.2. Ensayos de migración.....	271
4. Conclusiones	275
<hr/>	
SECCIÓN IV CONCLUSIONES	277
Conclusiones	279
<hr/>	

SECCIÓN V LEGISLACIÓN Y BIBLIOGRAGÍA	283
Legislación	285
Bibliografía	287
<hr/>	
SECCIÓN VI PUBLICACIONES	309
Publicaciones	311

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AC → Acrílico

Alm → Almidón

Δm → Variación de masa

APAO → Poli-alfa-olefina amorfa

C → Cartón

$C_{(A)}$ → Concentración en el adhesivo a cualquier tiempo

$C_{(S)}$ → Concentración en el sustrato a cualquier tiempo

$C_{eq(A)}$ → Concentración en equilibrio en el adhesivo

$C_{eq(S)}$ → Concentración en equilibrio en el sustrato

$C_{eq(S)^*}$ → Concentración en equilibrio en el sustrato añadido al sándwich

CAR/PDMS → Carboxen/ poldimetilsiloxano

CF → Factor de consumo

C_{p0} → Concentración inicial

$C_{p0(A)}$ → Concentración inicial en el adhesivo

CPP → Cartón laminado con polipropileno

d → Espesor

D_A → Difusión en el adhesivo

D_0 → Difusión a altas temperaturas

D_S → Difusión en el sustrato

D-GC-O → Directa gas cromatografía olfatometría

DVB/CAR/PDMS → Divinilbenzeno / carboxen / poldimetilsiloxano

E_D → Energía de activación

EDI → Ingesta diaria estimada

- ESI**→ Ionización por electrospray
- EVA**→ Acetato de vinilo y etileno
- F(%)**→ Porcentaje de frecuencia
- D_F**→ Factor de dilución
- MF**→ Frecuencia modificada
- GC**→ Cromatografía de gases
- GC-O**→ Cromatografía gases -olfatometría
- GML**→ Límite de Migración Global
- HS**→ Espacio de cabeza
- I(%)**→ Porcentaje de intensidad
- M⁺**→ Ión característico
- iFit**→ Ajuste isotópico
- IFST**→ Institute of Food Science and Technology
- K_{A,S}**→ Constante de partición adhesivo-sustrato
- K^o_{A,S}**→ Constante de partición adhesivo-sustrato, temperatura muy elevadas
- K_{fa}**→ Constante de distribución fibra-analito
- K_{PP,C}**→ Constante de partición polipropileno-cartón
- LE**→ Extracción líquida
- LOD**→ Límite de detección
- LOQ**→ Límite de cuantificación
- MS**→ Espectrometría de masas
- MS /MS**→ Espectrometría de masas en tándem
- MS^E**→ Espectrometría de masas modo de adquisición a alta y baja energía
- NIST**→ National Institute of Standards and Technology

PA → Poliacrilato

PDMS → Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB → Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno

PVA → Acetato de polivinilo

PVOH → Polivinilalcohol

QTOF → Cuadrupolo-tiempo de vuelo.

RSD → Desviación estándar relativa

SML → Límite de Migración Específica

SPE → Extracción en fase sólida.

SPME → Microextracción en fase sólida.

T → Adhesivo termofusible

T_{ext} → Temperatura de extracción

t_{ext} → Tiempo de extracción

t_{des} → Tiempo de desorción

TOF → Tiempo de vuelo

UPLC → Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución.

VAE → Copolímero de acetato vinilo y etileno

V+AI → Mezcla de adhesivo vinílico más almidón.

ρ → Densidad

δ_A → Solubilidad del adhesivo

δ_D → Fuerzas de dispersión

δ_H → Fuerzas debido a puentes de hidrógeno

δ_m → Solubilidad del compuesto migrante

δ_P → Fuerzas de atracción

δ_S → Solubilidad del sustrato

PRESENTACIÓN

El presente trabajo se titula “ESTUDIO DE ADHESIVOS EN ENVASE ALIMENTARIO. DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS, DIFUSIÓN Y MIGRACIÓN DE SUS COMPONENTES A LOS ALIMENTOS ENVASADOS” y se enmarca en el campo de investigación sobre el estudio de adhesivos en el envase alimentario que está llevando a cabo el Grupo Universitario de Investigación Analítica (GUIA) del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza y liderado por la Dra. Cristina Nerín de la Puerta. El grupo está integrado en el Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A). Esta línea de investigación se incorporó de forma más intensa al grupo a partir del Proyecto Europeo MIGRESIVES que empezó en el año 2007.

En el marco de esta línea de investigación se han realizado diversos trabajos en forma de proyectos fin de carrera, tesis doctorales, artículos científicos y nuevos proyectos de investigación.

Esta tesis doctoral se centra en el estudio de los adhesivos utilizados en el envase alimentario. Concretamente en diversos tipos de adhesivos termoplásticos (termofusibles, en base de acetato de vinilo y etileno, polivinilalcohol, acetato de polivinilo o acrílicos) y un adhesivo de almidón. Todos ellos utilizados en envases alimentarios fabricados con diferentes sustratos de cartón o papel.

Se ha realizado un estudio exhaustivo de la composición de estos adhesivos, se han determinado algunos parámetros más influyentes en la migración de sus componentes y se han realizado los ensayos de migración. Para ello se han utilizado y optimizado diversas técnicas analíticas que han

servido como potentes herramientas para el desarrollo de métodos analíticos en dichos estudios.

La memoria se ha estructurado en varias secciones:

La sección I ofrece una introducción general del marco en el que se ha desarrollado la tesis.

La sección II presenta los objetivos que se pretenden conseguir durante el desarrollo de este trabajo.

La sección III muestra el desarrollo experimental, dividido en cinco capítulos que se exponen a continuación. Todos los capítulos son autocontenidos, es decir, incorporan inicialmente una pequeña introducción, para ayudar a que el lector se sitúe, los objetivos detallados para este capítulo, los métodos y materiales utilizados así como resultados y conclusiones.

- ✓ Capítulo 1: se estudia la identificación de los compuestos volátiles en dos adhesivos termofusibles (T), así como su concentración inicial en estos. También sus coeficientes de partición entre los sustratos y adhesivos y los coeficientes de difusión en los sustratos.
- ✓ Capítulo 2: se estudia la migración de los compuestos volátiles procedentes de los adhesivos termoplásticos (termofusibles, con una base de acetato de vinilo y etileno (VAE), acetato de polivinilo (PVA), polivinilalcohol (PVOH) y acrílico (AC)) y un adhesivo de almidón (Alm) utilizados en envases alimentarios formados por diferentes tipos de sustratos de cartón hasta un simulante alimentario.

- ✓ Capítulo 3: se estudia la identificación de los compuestos no volátiles procedentes de los adhesivos termofusibles y su migración hasta un simulante alimentario.
- ✓ Capítulo 4: se estudia la identificación de los compuestos odorantes en los adhesivos (T, VAE, PVA, AC y Alm).
- ✓ Capítulo 5: se estudia la migración de estos compuestos odorantes en los adhesivos (T, VAE, PVA, AC y Alm) hasta un simulante alimentario.

En las secciones IV, V y VI se muestra respectivamente un resumen de las conclusiones más relevantes, las referencias bibliográficas y legislación consultada y las publicaciones que derivan de este trabajo.

A continuación se muestra un esquema con la estructura de esta Tesis.

SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN

SECCIÓN II. OBJETIVOS

SECCIÓN III. EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 1: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS, DETERMINACIÓN DE SU CONCENTRACIÓN INICIAL, COEFICIENTES DE PARTICION Y DIFUSIÓN EN DOS ADHESIVOS TERMOFUSIBLES.

CAPÍTULO 2: ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LOS ADHESIVOS EN EL ENVASE MULTICAPA PARA ENVASAR ALIMENTOS.

CAPÍTULO 3: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES DE DOS ADHESIVOS TERMOFUSIBLES.

CAPÍTULO 4: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ODORANTES PRESENTES EN LOS ADHESIVOS EN EL ENVASE ALIMENTARIO.

CAPÍTULO 5: ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LOS COMPUESTOS ODORANTES PRESENTES EN LOS ADHESIVOS UTILIZADOS EN EL ENVASE MULTICAPA PARA ENVASAR ALIMENTOS

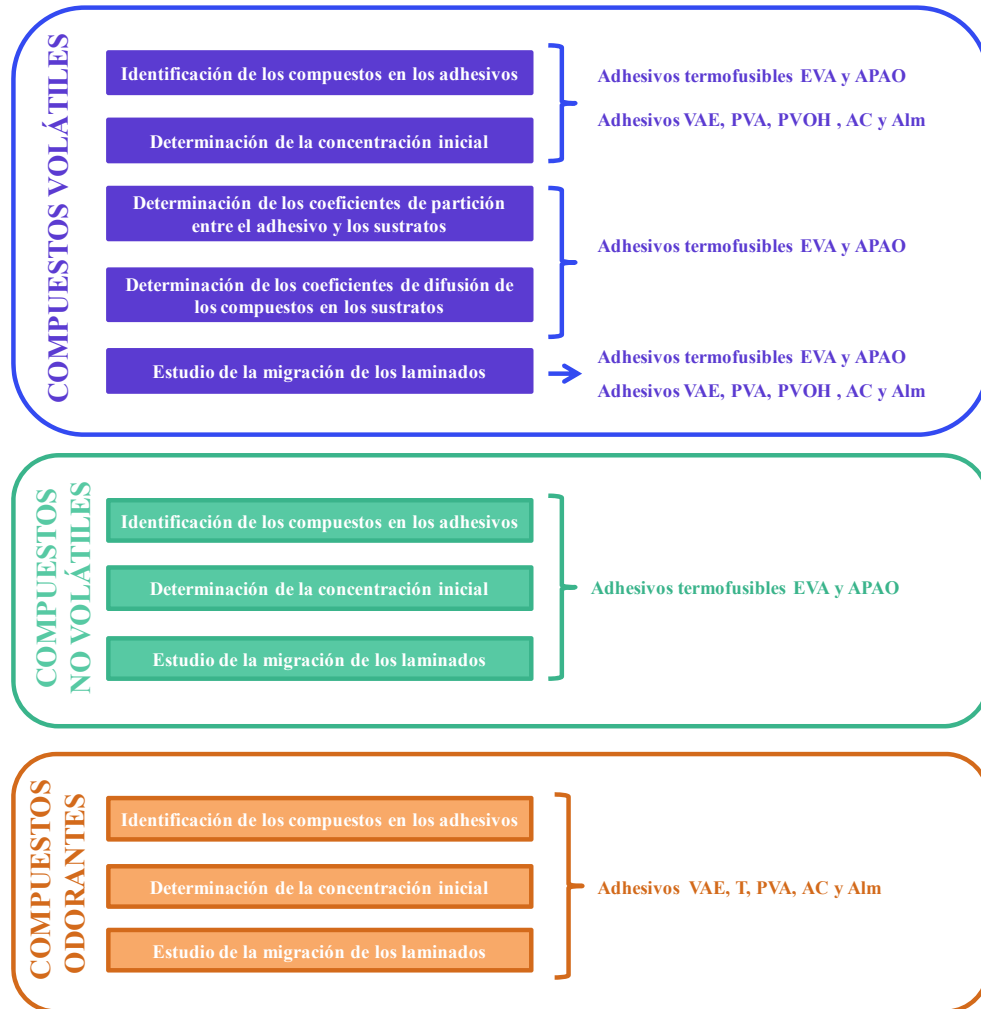
SECCIÓN IV. CONCLUSIONES

SECCIÓN V. LEGISLACIÓN Y BIBLIOGRAFÍA

SECCIÓN VI. PUBLICACIONES

Para comprender mejor el planteamiento de esta Tesis, a continuación se muestra un esquema general de la sección experimental, incluyendo los objetivos y las muestras estudiadas. Este esquema se mostrará antes de cada

capítulo dentro de la parte experimental resaltando la parte del trabajo realizado.



SECCIÓN I
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las industrias alimentarias ofrecen al consumidor productos de calidad nutritiva y sensorial en los cuales, el envase juega un papel fundamental para el logro de este objetivo. Pero también, puede convertirse en un serio problema si no se controlan algunos aspectos del envase, como por ejemplo, la transferencia de materia a través de este, conocida como la migración.

La migración, tiene un gran interés toxicológico, con el fin de evitar perjudicar la salud del consumidor. Pero también se puede mirar desde el punto de vista de la migración de sustancias sensorialmente activas que normalmente están por debajo de los límites establecidos como toxicológicos, pero perjudican las características sensoriales iniciales del alimento produciendo la aparición de un olor o sabor extraño. La aparición de este tipo de problemas puede dañar la imagen de productos o marcas comerciales generando el rechazo del consumidor.

Una parte de esta introducción, hace referencia al envase alimentario y las interacciones entre este, el alimento que contiene y el entorno que le rodea. Posteriormente se detalla el uso de los adhesivos en el envase alimentario, así como la legislación que deben cumplir. Se puntualiza sobre los procesos que rigen la migración en el caso concreto de los adhesivos que forman parte del envase alimentario multicapa. Se clasifican de forma amplia los distintos adhesivos que se pueden encontrar en el mercado y se definen los componentes principales que pueden formar parte de estos, detallando más ampliamente los adhesivos termoplásticos.

Por otro lado, en esta introducción se detalla el origen de las sustancias odorantes en los envases y los ensayos más habituales para la detección de las mismas mediante análisis sensoriales, obteniendo percepciones globales. Y la detección de compuestos de forma individual que se realiza a partir de análisis instrumentales, que constan de cromatografía de gases-olfatometría combinadas con técnicas olfatométricas.

Finalmente se expone un breve resumen del proyecto MIGRESIVES en cuyo marco se ha realizado parte del trabajo llevado a cabo en esta tesis.

1. ENVASE ALIMENTARIO

Hoy en día los envases además de cumplir la función básica de contener al alimento, protegen y conservan la calidad e integridad de este. Esta protección puede ser pasiva o activa (Risch, 2009):

La protección pasiva, evita el deterioro físico del alimento y/o evita el deterioro químico o microbiológico, proporcionando una barrera frente a distintos parámetros como oxígeno, humedad, microorganismos, luz, temperatura, aromas, sabores...que merman la calidad del producto, provocando por ejemplo su alteración microbiológica, oxidación de lípidos, destrucción de vitaminas, pardeamientos, etc.

Por otro lado, la protección activa, ayuda a mantener una atmósfera favorable al alimento que evite el deterioro químico y/o microbiológico.

Para eliminar estos daños físicos, químicos y microbiológicos del producto en general, los envases han ido evolucionando a lo largo de los años debido a factores de distinta índole.

La idea de envase surgió hace más de 10.000 años con el propósito de contener los bienes necesarios para la supervivencia, especialmente del agua. A mediados del siglo XX la gran transformación de la vida rural a la vida urbana exigió que los alimentos pudieran ser transportados desde el campo a la ciudad y pudieran mantenerse durante periodos de tiempo mayores en buen estado, lo que supuso una revolución en la tecnología y concepto de envase. Durante todos estos años ha sido necesaria una transformación tanto ideológica como tecnológica para adaptar el diseño, tecnología, logística y marketing del envase a las demandas del consumidor cada vez más exigentes velando por su seguridad y el medio ambiente (Catalá and Gavara, 2002a; Risch, 2009; Robertson, 2006).

En la actualidad se pueden distinguir tres tipos de envases, según el IFST (Institute of Food Science and Technology), véase Figura 1:

- Envase primario: unidad en contacto directo con el alimento. Sus principales funciones son proteger, contener y facilitar el almacenamiento y distribución.
- Envase secundario: utilizado generalmente para la protección física del producto. Este es muy útil en cuestiones de logística y marketing ya que facilita el manejo del envase primario durante su almacenamiento y presenta diferente información sobre el producto.
- Envase terciario: incorpora el envase secundario al sistema final de transporte, ej. cajas, pallets...

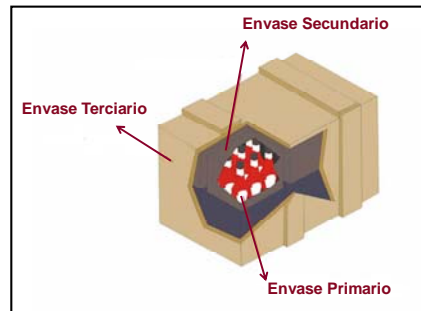


Figura1: Ejemplo de los distintos tipos de envase.

La naturaleza de los materiales que se pueden utilizar en estos envases es muy diversa: naturales, mínimamente procesados, totalmente sintéticos, puros...Entre estos se encuentran vidrio, materiales plásticos, celulosas regeneradas, elastómeros, corchos, cauchos, papel, cartón, cerámicas, metales, madera, productos textiles, ceras, resinas de intercambio iónico, siliconas, barnices, tintas de imprenta y adhesivos, véase Figura 2:

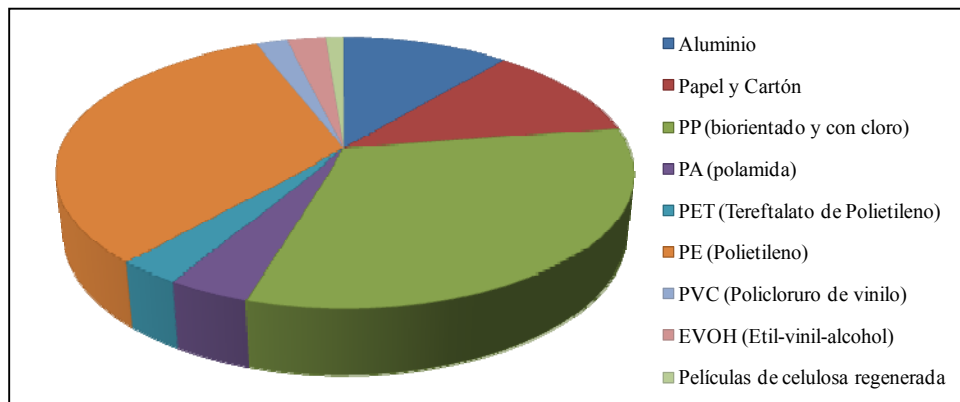


Figura2: Uso de los distintos materiales en envase alimentario. Fte: World flexible packaging demand by material (2009)

Para la selección del material del envase deben considerarse varios criterios (Ashley, et al., 1995):

- Coste.
- Atracción del consumidor.

- Identificación del contenido (etiquetado, impresión...).
- Evidencia de apertura.
- Desarrollo del envase, incluyendo resistencia mecánica, barrera a los gases, disolventes, olores, humedad, microbios, resistencia térmica e inertidad.

Muchos productos, especialmente en el campo de los alimentos, requieren materiales de alta barrera a los gases, como el O₂, CO₂, H₂O, etc., lo que exige el uso de materiales multicapa, ya que ningún material único en capas le proporciona esta exigencia. La mayoría de estos materiales multicapa se construyen por la unión de distintos materiales con adhesivos.

El coste es a menudo el factor primario más importante para las industrias en la selección del envase. Otro factor muy importante, es la tecnología del laminado para desarrollar el envase, optimizando el uso de los materiales.

2. INTERACCIONES DEL ENVASE ALIMENTARIO

Cuando el alimento es envasado para su distribución o simplemente para ser almacenado, existen unas interacciones entre el entorno, el envase y el alimento que pueden resumirse en:

- Permeación: paso de sustancias o gases como dióxido de carbono, oxígeno, vapor de agua, aroma, etc. a través del envase.

- Sorción: retención en las paredes del envase de sustancias del alimento o del entorno como puede ser la retención de aromas, radiaciones, etc.
- Migración: Transferencia de masa desde el envase al alimento

Estas pueden ser desfavorables para la calidad y salubridad del producto, como se muestra en la Figura 3, ya que pueden producir cambios en la calidad del producto como la pérdida de sabor, olores desagradables, cambios de textura y también contaminación (Catalá and Gavara, 2002a).

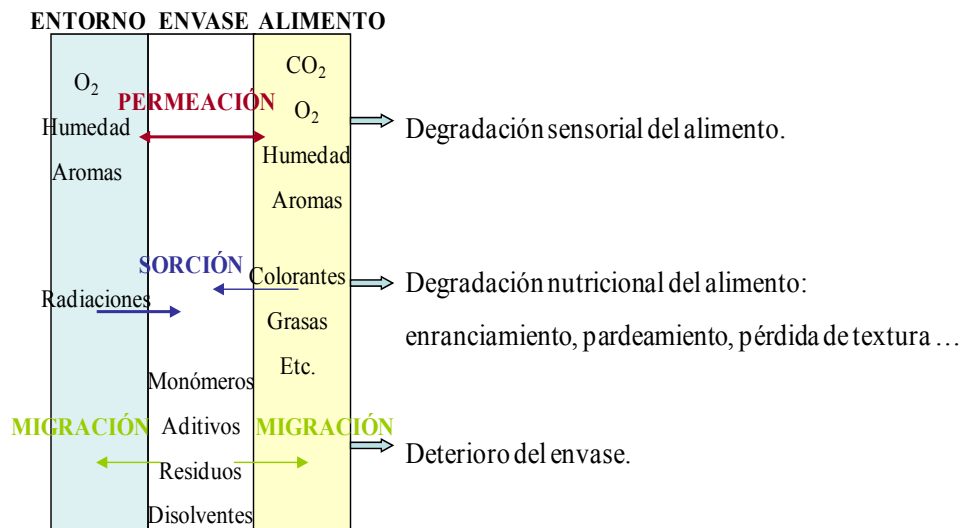


Figura 3: Interacciones entorno- envase- alimento.

No sólo estas interacciones pueden ser desfavorables para la calidad del producto, sino también puede ser aprovechada positivamente, para aportar compuestos que produzcan un efecto beneficioso en el alimento, como es el caso de los **envases activos** (*active packaging*). Se conoce como envase activo al envase capaz de modificar las propiedades del producto que contiene, alargando su vida útil (Bentayeb, et al., 2007; Bentayeb, et al.,

2009; Ozdemir and Floros, 2004; Rodriguez-Lafuente, et al., 2009; Vermeiren, et al., 1999).

3. ADHESIVOS EN EL ENVASE ALIMENTARIO

Actualmente, la mayoría de los envases que están en contacto con alimentos tienen adhesivo en su estructura. Los podemos encontrar de tres formas diferentes, véase Figura 4 (Ashley, et al., 1995):

- Formando la estructura del envase por combinación con distintos materiales (generalmente polímeros, papel, cartón o vidrio), y esta estructura se le conoce como laminado o multicapa.
- Formando la geometría del envase (sellado de cajas, etc.)
- En el etiquetado.



Estructura del envase



Dar geometría envase



Etiquetado

Figura 4: Utilidad del adhesivo en el envase alimentario

La forma más común de encontrar los adhesivos en el envase alimentario es del primer tipo; donde el adhesivo se aplica sobre la superficie total de los materiales o sustratos, uniéndolos y formando los materiales multicapa. Ejemplos de aplicaciones prácticas, son la laminación

flexible de films, combinaciones papel-film, cartón-film, aluminio-film, cartón-aluminio, cartón-aluminio-plástico, sistemas rígidos multicapa basados en plástico, sacos, bolsas, etc. (Ashley, et al., 1995; Barnes, et al., 2007a)

Para estas aplicaciones la industria de los adhesivos utiliza una gran variedad de materias primas y formulaciones, combinando distintos productos químicos, para formar diferentes tipos de adhesivos, que según las características clasificaremos en el siguiente apartado.

El consumo anual de adhesivos en Europa es aproximadamente de 1,2 millones de toneladas. Los podemos encontrar en una gran variedad de industrias como construcción, muebles, textil... véase Figura 5.

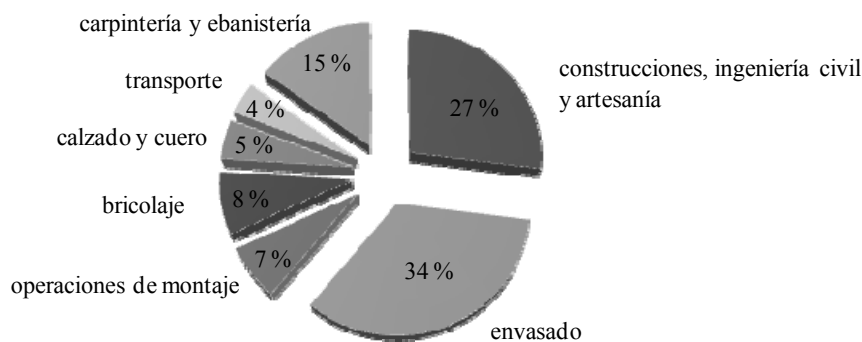


Figura 5: Mercado de adhesivos para la industria europea (2008). Fte: Adhesives and sealants industry

La industria del envasado es probablemente el mayor consumidor de adhesivos, alrededor del 34% de la demanda total de Europa. El gran avance en este sector, viene relacionado con el desarrollo de nuevas formulaciones para aplicar estos a distintos sustratos, con una tecnología de laminación que puede ser utilizada para proporcionar una estructura compuesta,

garantizando las características necesarias para el uso óptimo de materiales respecto a costo y rendimiento así como una mejora con el medio ambiente y optimización de los procesos industriales (Ashley, et al., 1995).

4. TENDENCIAS ACTUALES Y LEGISLACIÓN DE ADHESIVOS EN EL ENVASE ALIMENTARIO.

La tendencia general en la industria de adhesivos para uso en el envase alimentario, es una reducción en el uso de disolventes, así como una minimización de componentes de bajo peso molecular que forman parte del adhesivo, y que podrían migrar desde este al alimento más fácilmente (Barnes, et al., 2007b). Sin embargo, no existe una legislación específica en la Unión Europea para el uso de adhesivos en el envase alimentario, aunque algunos de sus constituyentes, podrían migrar desde el adhesivo a través del envase hasta alcanzar los alimentos. Para proporcionar la base científica y facilitar las herramientas para su control en la industria Europea, se desarrolló el Proyecto MIGRESIVES, que se explicará posteriormente.

Existe un Reglamento Marco (CE) N°1935/2004 para los materiales en contacto con alimentos. Este Reglamento marco es la legislación básica de la Comunidad Europea donde se definen los materiales en contacto alimentario:

- Materiales que están en contacto como envase primario o secundario.
- Materiales y objetos destinados a estar en contacto con los alimentos como platos, vasos, etc.

- Materiales que razonablemente se espera que en algún momento estén en contacto con los alimentos, como superficies para la preparación alimentaria, baldas de un refrigerador, etc.

También se establecen los requisitos básicos para dichos materiales:

- No deben representar un peligro para la salud humana.
- No deben provocar una modificación inaceptable de la composición de los alimentos.
- No deben provocar una alteración de las características organolépticas de éstos.

Además, los operadores de empresas se aseguran de que las operaciones de fabricación se lleven a cabo de conformidad con el Reglamento N° 2023/2006: “Buenas prácticas en la fabricación de materiales y artículos destinados a entrar en contacto con alimentos.”

El Reglamento Marco N°1935/2004, contiene una lista de materiales para los que se haya adoptado una legislación específica, véase Figura 6:

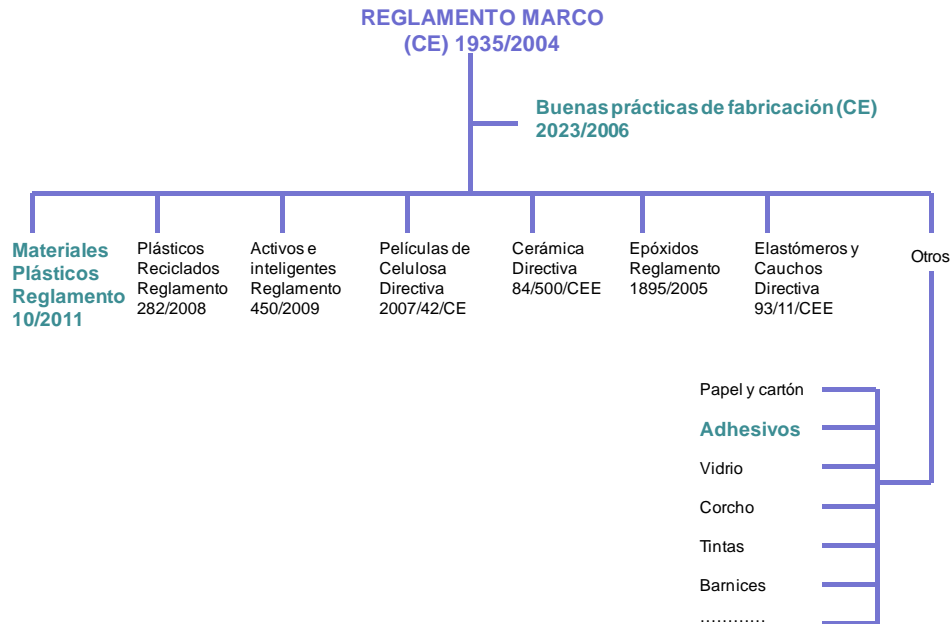


Figura 6: Marco legislativo europeo

Como se representa en la Figura 6, no existe una legislación específica, europea para adhesivos. Y en su defecto se aplica la legislación europea o la nacional de plásticos, ya que esta contiene muchas sustancias en común con los adhesivos:

- Reglamento Europeo de materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos → Reglamento 10/2011/EU.
- Real Decreto Español sobre lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos, en la que incluyen los adhesivos, siliconas y tintas de impresión → Real Decreto 847/2011.

En el Reglamento Europeo de materiales plásticos 10/2011/EU se contempla; los materiales plásticos constituidos exclusivamente de materias plásticas o compuestos de dos o más capas, cada una constituida

exclusivamente de materias plásticas y que estén unidas entre sí por medio de adhesivos o por cualquier otro medio y que, en el estado de productos acabados, estén destinados a entrar en contacto con alimentos.

En el Real Decreto 847/2011 se contemplan adhesivos, elastómeros y cauchos naturales y sintéticos, resinas de intercambio iónico, siliconas, barnices y recubrimientos, ceras y materiales plásticos no recogidos en el Reglamento 10/2011/EU.

Ambos Reglamentos establecen listas positivas de sustancias autorizadas con sus límites de migración específicos (SML), como cantidad máxima de una sustancia que puede ser liberada hacia el alimento y límites de migración globales (GML), que es la medida de la masa total de todas las sustancias transferidas los alimentos.

Además, en el Reglamento Europeo 10/2011/EU aparecen las normas para realizar dichos ensayos de migración, como los simulantes alimentarios y las condiciones que deben de utilizarse en cada caso. También, según esta legislación se pueden utilizar sustancias que no aparezcan en las listas positivas de sustancias autorizadas siempre que haya una barrera funcional (capa de materiales barrera entre el alimento y la capa de estudio, que impide o reduce la migración) y que se cumplan los siguientes requisitos:

- Migración específica de cada compuesto inferior 10 µg/Kg de alimento en las condiciones de contacto previstas.
- Y que el compuesto no haya sido clasificado como mutagénico, carcinogénico o tóxico para la reproducción en la Directiva 67/548/EEC.

5. MIGRACIÓN EN EL ENVASE ALIMENTARIO

5.1. MECANISMOS DE MIGRACIÓN

La migración de componentes presentes en el envase alimentario al alimento es un proceso submicroscópico de transferencia de masa consecuencia de la tendencia al equilibrio de todo sistema químico (Catalá and Gavara, 2002a; Wan, et al., 1995).

Sus consecuencias son, por un lado; la alteración de las características físico-químicas y mecánicas del material del envase, por pérdidas presentes en el mismo. Y por otro lado, afecta al producto envasado, cambiando su composición por la incorporación de sustancias que pueden afectar sensiblemente a las características sensoriales del mismo o pueden afectar de manera tóxica al organismo humano.

En la práctica se distingue entre migración global y migración específica. La migración global se refiere a la cantidad total de masa del envase que es transferido al alimento. Y la migración específica representa la cantidad de una sustancia concreta que se trasfiere al alimento.

La migración está controlada por dos mecanismos; la partición y la difusión (Mannheim and Passy, 1990).

5.1.1. PARTICIÓN

La partición expresa la distribución del migrante entre dos fases cuando se ha establecido el equilibrio termodinámico. Es por tanto un

concepto termodinámico y se define el coeficiente de partición (K) (Ecuación 1) como la relación entre la concentración en equilibrio del migrante en ambas fases en (mol.m⁻³) (Catalá and Gavara, 2002a; Tehrany and Desobry, 2004):

$$K_{1,2} = \frac{C_{eq(1)}}{C_{eq(2)}} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde K_{1,2} es el coeficiente de partición, C_{eq(1)} es la concentración del migrante en la fase1 (envase) y C_{eq(2)} es la concentración en la fase2 (alimento).

Cuando la constante K_{1,2} (Figura 7) presenta un valor K>1, el elemento tendrá una gran tendencia a permanecer en la fase 1 (envase) y si por el contrario, si el valor es <1 tendrá una tendencia migrar a la fase 2 (alimento)

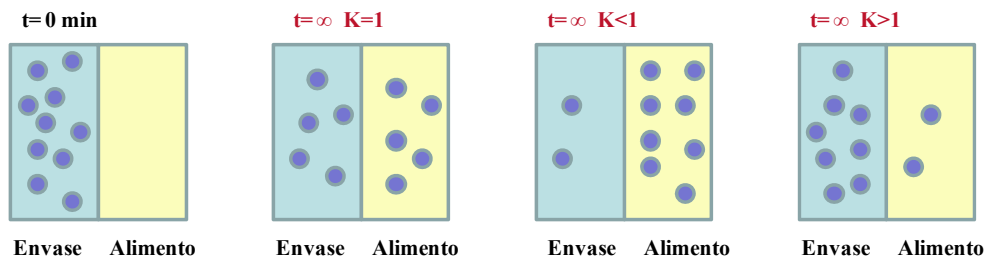


Figura 7: Ejemplo de constantes de partición.

La constante de partición depende en gran medida de la solubilidad, es decir la afinidad del migrante con los materiales del envase o con el alimento. Además depende de la temperatura, estructura química y tamaño del compuesto migrante, contenido en grasa y cristalinidad del alimento (Canellas, et al., 2010a; Tehrany and Desobry, 2004).

5.1.2. DIFUSIÓN

La difusión (D) de una molécula en una matriz, es un parámetro cinético que está relacionado con la movilidad de las moléculas en el material. Dicho parámetro está representado por una magnitud de flujo (J) que pasa perpendicularmente a través de un área de distintas secciones de fase homogénea, con un gradiente de concentración de los migrantes. Se basa en un proceso dimensional en estado estacionario, que puede describirse según la primera ley de Fick (Crank and Gupta, 1975), (Ecuación 2):

$$J = -D(C) \frac{dC}{dx} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde J es el flujo migrante ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), D(C) es el coeficiente de difusión (m^2s^{-1}), C es la concentración del compuesto migrante (mol m^{-3}) y x es el espesor del material (m).

Cuando la concentración varía con el tiempo, el coeficiente de difusión se expresa según la segunda ecuación de Fick (Barnes, et al., 2007a; Catalá and Gavara, 2002a; Dole, et al., 2006; Tehrany and Desobry, 2004), véase Ecuación 3:

$$\frac{dC}{dt} = -D(C) \frac{d^2C}{dx^2} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Se muestra una figura ilustrativa (Figura 8) para comprender el mecanismo de la difusión.

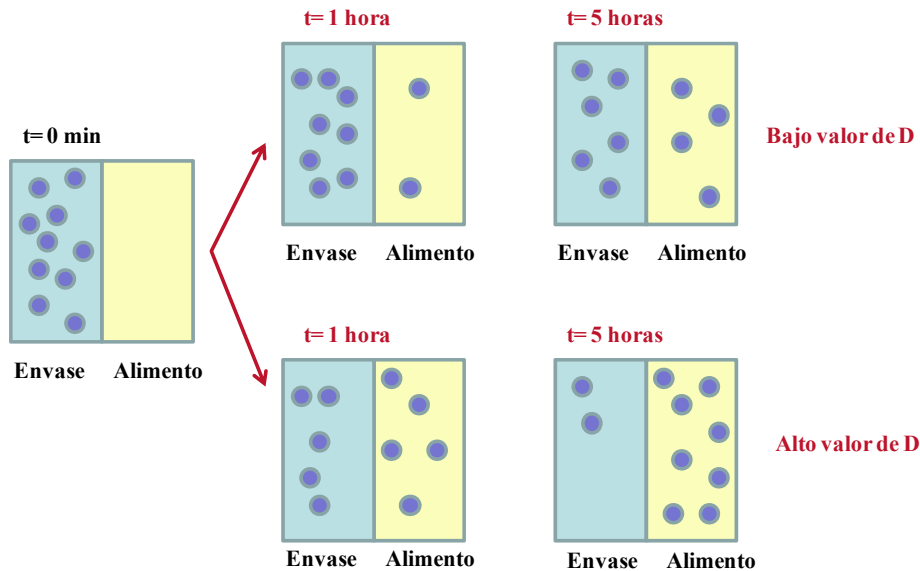


Figura 8: Ejemplo de coeficientes de difusión.

El coeficiente de difusión dependerá en gran medida del tamaño y el peso molecular del compuesto migrante así como su forma y flexibilidad. También dependerán las características del material del envase principalmente tipo de material (papel, polímero...), su cristalinidad, estado vítreo o gomoso, porosidad, orientación, plastificación y formulación (Dole, et al., 2006; Reynier, et al., 2001a; Reynier, et al., 2001b),

5.2. MECANISMOS DE MIGRACIÓN DESDE LOS ADHESIVOS AL ALIMENTO EN EL ENVASE

Como ya se ha expuesto anteriormente, los adhesivos se utilizan habitualmente en el envase alimentario. Los encontramos formando una estructura de como mínimo tres capas, conocida como Laminado [sustrato 1-adhesivo-sustrato2]. Hay que destacar que oficialmente al adhesivo no se

le considera una “capa” de material, por lo que esta estructura se identificará como material “bicapa”. Sin embargo, para facilitar la descripción del fenómeno, se considerará el adhesivo como una capa más de la estructura.

De esta forma el mecanismo de migración es más complejo, ya que se disponen de más capas. Por tanto el proceso global de migración de un compuesto hacia el alimento se desarrolla en las siguientes etapas (Catalá and Gavara, 2002a), véase Figura 9:

- I. Difusión del migrante en las áreas amorfas de la matriz polimérica del adhesivo. En este caso, la migración está controlada por el proceso de difusión, que consiste en la transferencia de masa a través de los espacios libres transitorios originados por los movimientos naturales aleatorios de los fragmentos de la matriz polimérica del adhesivo (D_A)
- II. Equilibrio químico entre el adhesivo y los sustratos a los que está adherido. Este puede expresarse de forma simple a través de las concentraciones de cada migrante en las dos fases (constante de partición). ($K_{A,S1}$, $K_{A,S2}$)
- III. Difusión del migrante en las áreas amorfas del sustrato al igual que ocurría en el adhesivo. (D_{S1} , D_{S2})
- IV. Etapa de solvatación en la interfase alimento-envase: consiste en una disolución de los migrantes en el alimento, produciéndose el equilibrio químico. ($K_{AL,S2}$)
- V. Dispersión en el alimento: el migrante ya disuelto en el alimento difunde en este. La difusión en la matriz polimérica es mayor que en el alimento, por tanto esta etapa no interviene en la práctica ni en el equilibrio ni en la cinética de difusión.

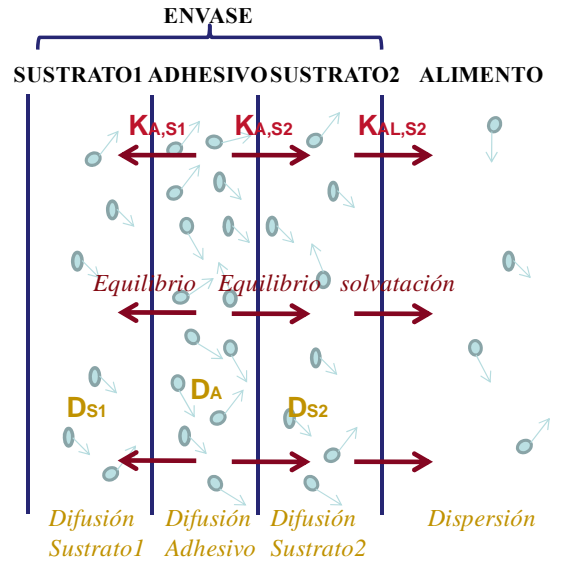


Figura 9: Etapas del proceso de migración de los compuestos del adhesivo al alimento

Como se ha mencionado anteriormente (apartado 5.1), el equilibrio y la cinética son los mecanismos que influyen directamente en la migración, y por tanto, estarán relacionados con las características del adhesivo, sustrato, migrante y alimento, como (Catalá and Gavara, 2002a):

- La composición química y la estructura de la matriz polimérica del envase. La composición química afecta a la disolución inicialmente del migrante en el sustrato y posteriormente en el alimento (un polímero polar, absorberá preferiblemente las sustancias polares). La estructura del polímero afectará a la densidad del polímero ya que los constituyentes voluminosos y la irregularidad de las cadenas limitará la cristalinidad del material, reduciendo la densidad e incrementando el volumen libre y por tanto incrementando la difusión.
- El proceso de fabricación de los adhesivos y los envases lleva consigo diferencias tanto morfológicas como estructurales de la matriz polimérica.

- La superficie de contacto y el espesor del adhesivo y del sustrato.
- La estructura química de las sustancias migrantes relacionada con la compatibilidad del polímero y por lo tanto con la difusión o la concentración, el tamaño, polaridad y la forma de la molécula relacionada con la transferencia de masa.
- Condiciones del medio, factores como la temperatura, presión, tiempo, agitación, etc.

6. COMPOSICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS ADHESIVOS

6.1. COMPOSICIÓN DE ADHESIVOS

Los adhesivos son las sustancias capaces de unir como mínimo dos superficies juntas de manera fuerte y permanente (Petrie, 2000a). Según la RAE, se definen, como las sustancias que interpuestas entre dos superficies son capaces de pegarlas.

El mecanismo de unión de los adhesivos se basa en la propiedad de adhesión, que es la atracción molecular entre dos materiales diferentes debido a las fuerzas intermoleculares entre ambos, llamadas fuerzas de Van der Waals. Para que se produzca la adhesión entre el sustrato y el adhesivo, influyen muchos factores como las fuerzas entre estos, aspectos químicos, etc., no sólo en el momento de la adhesión sino también en la transformación durante la vida útil de estos.

La primera vez que se utilizaron adhesivos fue muchos años atrás, cuando los cazadores para mejorar su caza pusieron plumas en sus flechas pegadas con cera de abeja. Hasta hace relativamente poco tiempo la mayoría de los adhesivos provenían de vegetales, animales y sustancias minerales. A partir de 1900 fue cuando los adhesivos poliméricos sintéticos fueron desplazando a estos productos naturales por su fuerte poder de adhesión, a la vez que se consolidaba la industria de los polímeros. Un importante incremento de estos es en los años 1940-1950 con el desarrollo de adhesivos para la industria militar aeronáutica.

Hoy en día, los adhesivos son complejas formulaciones de componentes que realizan funciones especializadas. La selección de los componentes que formarán parte del adhesivo, dependerá de las propiedades finales que se requieren para dicho adhesivo, de la aplicación y de los requisitos del procesamiento, así como del objetivo global de costes.

Entre los distintos componentes que constituyen la formulación de los adhesivos se pueden destacar:

- **La base adhesiva**, es el componente principal de un adhesivo y le proporciona muchas de las principales características como mojabilidad, propiedades de curado, la fuerza y la resistencia al medio ambiente. Es a menudo por peso, el componente mayoritario en la formulación y es el que le da el nombre al adhesivo.
- **El endurecedor o agente de curado** es una sustancia añadida con el fin de promover la reacción de polimerización y formar parte en ella por la combinación química con el polímero base.
- **El catalizador** es una sustancia que, añadida al adhesivo, promueve la reacción de polimerización pero sin formar parte de esta, es decir permanecerá sin cambios durante la reacción. Los ácidos, bases, sales,

compuestos de azufre y los peróxidos son ejemplos de catalizadores usados en la industria de adhesivos.

- **El acelerador, inhibidor, o retardador** se incorporan a veces en la formulación del adhesivo para controlar la velocidad de curado (acelerándola o decelerándola). Estos compuestos son importantes para el curado, así como para el tiempo de almacenamiento del adhesivo y la vida útil de este.
- **Los disolventes** son necesarios para dispersar el adhesivo a una consistencia que sea más fácil de aplicar sobre el sustrato, como con brocha o pulverización. También se utilizan para ayudar en la formulación del adhesivo mediante la reducción de la viscosidad del polímero base, de modo que la adición de otros componentes proporcione una mezcla uniforme. Estos deben evaporarse por completo antes de curar el adhesivo para evitar la formación de burbujas.
- **Las cargas** son sustancias que suelen tener algunas propiedades adhesivas y se añaden al adhesivo para reducir la concentración de otro componente del adhesivo y por tanto reducir el coste de la formulación general.
- **Los polvos de piedra** son sustancias no adhesivas que proporcionan en el adhesivo mejoras relacionadas con las propiedades de trabajo como expansión térmica, viscosidad, resistencia termal...Entre los polvos más utilizados estarían la sílica, alúmina, óxido de titanio...
- **El respaldo** suele ser una tela fina, de tela o de papel utilizados para apoyar la composición del adhesivo semicurado para proporcionar una cinta o la película. El respaldo puede ser utilizado para fines funcionales o decorativos.

- **Plastificantes** son sustancias que forman parte de la formulación del adhesivo para proporcionarle flexibilidad y elongación al adhesivo así como, reducir la viscosidad tras la fusión en los adhesivos termofusibles. Estos plastificantes actúan separando las cadenas del polímero y así, hacen posible su deformación.
- **Taquificantes** son promotores de adhesión que se añaden para aumentar la adhesión de los sustratos favoreciendo la resistencia al desgarro y disminuyendo la resistencia al corte.
- **Espesantes** son sustancias que mantienen un espesor del adhesivo razonable a través del ajuste de la viscosidad.
- **Antioxidantes y estabilizantes** son las sustancias que se añaden al adhesivo para retrasar el envejecimiento de este y por tanto alargar su vida útil.
- **Humectantes y tensioactivos** se añaden para estabilizar la emulsión de tantos componentes que forman el adhesivo.

Esta descripción de los distintos aditivos utilizados en la formulación de adhesivos es muy genérica y breve, ya que hay miles de aditivos que se pueden utilizar en sistemas adhesivos.

6.2. CLASIFICACIÓN DE ADHESIVOS

Los adhesivos se clasifican en la industria (Petrie, 2000b):

Según los materiales de los que están fabricados

- **Sintéticos**: Fabricados con materiales sintéticos como por ejemplo polímeros.

- Naturales: Fabricados por materiales derivados de productos animales y agrícolas. Un ejemplo de estos serían los adhesivos de almidón, objeto de estudio, que son adhesivos de origen agrícola derivados principalmente de la planta de yuca. El almidón se calienta, por lo general en disoluciones alcalinas, y después en frío se prepara la dispersión. Suelen ser solubles en agua. Estos se suelen aplicar para sustratos porosos (madera, papel y cartón) que se unen por la pérdida de agua.

La función que desempeñan

- Estructurales: Capaces de soportar grandes fuerzas sin deformarse
- No estructurales: Soportan pequeñas cargas y se degradan en periodos cortos de tiempo por exposición a condiciones ambientales como temperaturas adversas, compuestos químicos, etc.

Según la composición química (Petrie, 2000b; Ureta, 1996)

- Termoendurecibles: Son los adhesivos que se curan mediante una reacción química irreversible llamada reticulada. En esta reacción se produce un entrecruzamiento por polimerización de dos polímeros lineales dando lugar a una estructura química reticulada rígida, véase Figura 10.

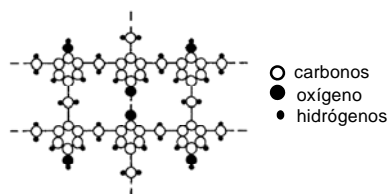


Figura 10: Estructura reticulada tras el curado de los adhesivos

Para que se produzca la reacción en algunos casos se requieren calor para la iniciación y terminación de la reacción, y en otros casos puede ser efectuada a temperatura ambiente. Estos adhesivos presentan gran resistencia al calor y a los disolventes puesto que las moléculas son altamente reticuladas, y muestran poca deformación. Ejemplos de estos adhesivos son los epoxy y los uretanos.

- Termoplásticos: Son la clase de adhesivos que se pueden formar sin necesidad de reacción química. Dentro de este grupo se encuentran los adhesivos termofusibles que son originalmente polímeros sólidos, que para ser curados, se calientan hasta derretirlos para posteriormente enfriarlos. También pueden aparecer disueltos en agua o en emulsiones de base agua, estos se curan por la evaporación del disolvente.

Su estructura molecular es lineal (Figura 11) o ramificada (Figura 12).

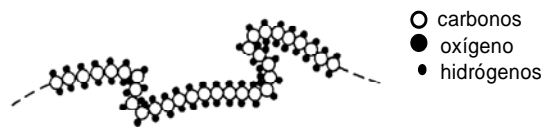


Figura 11: Estructura lineal

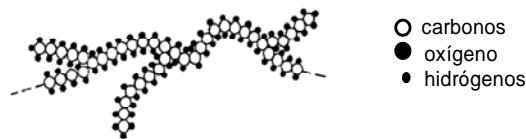


Figura 12: Estructura Ramificada

Los adhesivos termoplásticos tienen en general poca resistencia a los disolventes o productos químicos. Ejemplos de estos adhesivos son los adhesivos termofusibles, acetatos de polivinilo (PVA), etc. Los cuales se explicaran con profundidad en el apartado 7.

- Elastoméricos: Están basados en resinas elastoméricas sintéticas o naturales con un alto grado de extensión y compresión. Recuperan rápidamente sus dimensiones y su forma inicial después de retirar la carga. Adhesivos de elastómeros pueden ser termoendurecibles o termoplásticos.

Según el modo de aplicación o reacción con el sustrato

Es decir la manera en la que los adhesivos reaccionan o se solidifican:

- **Reacción química**: incluyendo la reacción con un endurecedor así como mediante una fuente de energía exterior, como calor, radiación, catalizador...

Dentro de este grupo nos encontramos con la mayoría de los adhesivos termoendurecibles. Por un lado los formados por la reacción de condensación, generalmente con agua como subproducto (resinas fenólicas y aminoácidos), y los formados por polimerización por adición de un producto (poliésteres y resinas epóxicas). También se incluyen la mayoría de elastómeros y acrílicos que sólo necesitan la presión de contacto para ser efectivos.

- **Pérdida de disolvente o de agua**: Una vez aplicado, el agua o disolvente, debe de ser eliminado, bien por evaporación en el aire o por difusión en una superficie porosa del sustrato. Por tanto, a menudo se utilizan para aplicaciones con sustratos porosos como la madera, papel, cuero, y tela.

Una vez aplicado y seco, el adhesivo puede proporcionar un enlace duro, convirtiéndose en una resina de cohesión, como acetato de polivinilo o pegamentos de madera, o se podría formar una película que luego se reactiva con disolventes o con agua o por el calor, como en el caso de un adhesivo en un laminado.

- Por enfriamiento tras una fusión: Se trata generalmente de adhesivos termoplásticos que, como se ha explicado anteriormente, se ablandan y se funden cuando se calientan y se endurecen tras el enfriamiento. Cuando el adhesivo se funde debe presentar una viscosidad baja y no debe enfriarse demasiado rápido para así lograr mojar el sustrato y que ambos se unan mejor.

Según la forma física

- Líquido
- Pasta
- Sólido (polvo, cintas, películas, ect.)

7. TIPOS DE ADHESIVOS TERMOPLÁSTICOS

Dentro de los adhesivos termoplásticos se encuentran diferentes tipos en forma de emulsión, disolución o termofusibles. La Tabla 1 muestra las ventajas e inconvenientes de estos adhesivos:

Tabla 1: Ventajas e inconvenientes de los adhesivos termoplásticos

Forma	Ventajas	Inconvenientes
Base agua	Bajo coste Sin disolvente tóxico Amplio rango de viscosidades Se puede utilizar gran cantidad de componentes de alto peso molecular	Pobre resistencia al agua Corrosivo a algunos metales Lento proceso de curado Bajas propiedades eléctricas
Base disolvente	Resistencia al agua Rápido proceso de curado Aplicable a amplio rango de sustratos	Peligro de incendio. Riesgo para la salud Equipo de ventilación necesario
Termofusibles	El equipo de secado es innecesario El enlace entre el sustrato y el adhesivo, es rápido y fuerte. El espacio que ocupa es menor que otros, esto repercute positivamente en el coste del adhesivo Estable durante el almacenamiento No se congela Es impermeable y resistente al agua.	Para su aplicación se requieren equipos especiales Se degrada si se calienta de forma continuada Posee aplicaciones limitadas debido a la viscosidad y a los límites de temperaturas de calentamiento

Los adhesivos termoplásticos que se van a estudiar en este trabajo son los siguientes:

7.1. ADHESIVOS TERMOFUSIBLES

Los adhesivos termofusibles son adhesivos termoplásticos, originalmente polímeros sólidos (polvos, cintas, películas, gránulos, pastillas...) a temperaturas inferiores a 80 °C, que al ser calentados se ablandan y funden (temperaturas típicas de aplicación 150°C -200°C). Una vez fundido, se aplica sobre un sustrato y a continuación, se unen las partes

del sustrato al solidificar por enfriamiento el adhesivo. El adhesivo termofusible debe alcanzar una viscosidad relativamente baja y no debe enfriarse rápidamente para así poder disponer de tiempo suficiente para cubrir la rugosidad del sustrato y unir perfectamente ambas partes (Petrie, 2000a; Petrie, 2000b).

Los principales polímeros que forman parte del adhesivo termofusible pueden ser polímeros acetato de vinilo y etileno, poliolefinas como polietileno o polipropileno o también poliolefinas amorfas, poliamidas o los polímeros en bloque (caucho de butadieno estireno), poliamidas o poliéster. La formulación debe ser elegida cuidadosamente basándose en el equipo de aplicación disponible así como en la velocidad a la que se puede aplicar el adhesivo. Estos equipos pueden ser un tanque de calefacción con mangueras de calefacción, para aplicar el adhesivo fundido rápidamente sobre un sustrato precalentado previamente, y así evitar que el adhesivo se enfríe inmediatamente al ponerse en contacto con la superficie del sustrato más frío. Posteriormente, se aplica presión hasta que el adhesivo se solidifica.

Los aditivos principales en los adhesivos termofusibles son por un lado, un plastificante, que proporciona flexibilidad y / o alargamiento a la cadena polimérica para permitir una mejor deformación, y un taquificante, que son “agentes adherentes”. Los taquificantes más comunes son los hidrocarburos alifáticos o aromáticos, terpenos y ésteres de colofonia. También se utilizan ceras como las parafinas para reducir la viscosidad y mejorar la fuerza de adhesión y antioxidantes.

Los sustratos utilizados por lo general para estos adhesivos son el papel, cartón, madera, cuero, metales, vidrios, etc. Sus aplicaciones habituales son la encuadernación, envases alimentarios, juguetes, automóviles, muebles, electrónica, etc.

Existen distintos tipos de adhesivos termofusibles según el polímero base que se utiliza para la formulación. En este trabajo se van a estudiar en profundidad:

- **Adhesivos termofusibles de acetato de vinilo y etileno (EVA):** La formulación contiene hasta un 30% de acetato de vinilo en el etileno. Como con todas las formulaciones de fusión en caliente, la viscosidad depende del peso molecular del polímero base. Los taquificantes se añaden para reducir la viscosidad y mejorar la humectación y adherencia. Las ceras, como por ejemplo las parafinas, se añaden para reducir el coste y la viscosidad. La carga inorgánica se utiliza para reducir el coste y aumentar la viscosidad. Los antioxidantes son necesarios para proteger el adhesivo durante la aplicación y durante su vida útil. Se utilizan en sustratos de cartón, encuadernación de libros, etc.
- **Adhesivos termofusibles de poliolefinas:** Las resinas de poliolefina poseen una propiedad adherente muy importante que es una energía de superficie baja y por tanto se humedece y se adhiere a la mayoría de los sustratos poliméricos y metálicos. Las poliolefinas que se utilizan para adhesivos son compuestos relativamente puros con alto peso molecular. Los adhesivos que se basan en estas resinas se utilizan principalmente en bloque o en forma de película. En forma de película, proporcionan una excelente resistencia al desgarro, como un adhesivo de laminación en caliente para películas de plástico y láminas metálicas.

7.2. ADHESIVOS DE ACETATO DE POLIVINILO.

Estos adhesivos termoplásticos son los que comúnmente se conocen como “cola blanca” y están formados por la base adhesiva de polímero acetato de polivinilo (PVA). Junto a la base, también se utilizan habitualmente cargas, plastificantes y pigmentos dependiendo de sus aplicaciones. Se encuentran disponibles en forma de disoluciones, emulsiones de agua o como adhesivos termofusibles.

Se utilizan para la pegar materiales porosos en especial la madera y papel cuando se encuentra en forma de emulsión y vidrio, cerámica y plásticos cuando se encuentra en forma de disolución. Se emplea en la industria general de embalajes para el pegado de etiquetas, precintos, etc. diluyéndola con agua hasta lograr la viscosidad deseada.

Su proceso de curado es mediante la evaporación del disolvente o del agua cuando se encuentra en forma de disolución o emulsión y en el caso de adhesivos termofusibles por enfriamiento y presión tras el calentamiento previo.

Es el tipo de adhesivo más versátil en términos de formulación y uso. Posee un excelente poder adhesivo presentando gran resistencia a la fuerzas de tracción. Muestra una gran resistencia al aceite, grasa y ácidos y menor resistencia al agua. Buena extensibilidad y por tanto fácil manejo en su aplicación. (Petrie, 2000b; Ureta, 1996)

7.3. ADHESIVOS DE POLIVINILALCOHOL

Este adhesivo está formado por una base adhesiva del polímero polivinilalcohol (PVOH). A diferencia de muchos polímeros vinílicos, el PVOH no se prepara por la polimerización del correspondiente monómero, dado que el alcohol vinílico es inestable. El PVOH se prepara por alcoholólisis (se emplean también los términos menos exactos hidrólisis y saponificación) parcial o total de acetato de polivinilo para eliminar los grupos acetato. Véase figura 13.

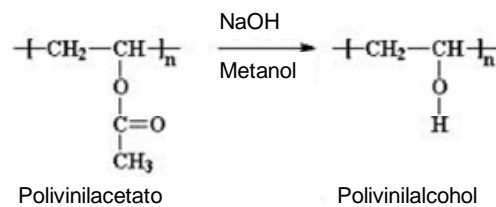


Figura 13: Formación de polímero de Polivinilalcohol (PVOH)

Para efectuar la alcoholólisis puede utilizarse etanol o metanol, con un ácido o una base como catalizador. La hidrólisis alcalina es mucho más rápida.

Son adhesivos termoplásticos solubles en agua y se utilizan habitualmente para la unión de materiales porosos como papel, catón y tejido, tras su proceso de curado por la evaporación del agua. Entre las propiedades más importantes, se encuentra la pegajosidad en húmedo que los hacen ser muy versátiles y muy útiles aportando una gran facilidad de manejo en fábrica, limpieza y coste razonable. Tiene una gran resistencia a las grasas y los aceites y justa al agua, pero es suficiente para la mayoría de aplicaciones en el interior. Tiene alta resistencia y flexibilidad, así como alta

propiedades de barrera para el oxígeno y los aromas por consiguiente se utilizan habitualmente para envase alimentario. (Petrie, 2000b)

7.4. ADHESIVOS ACRÍLICOS

Los adhesivos acrílicos están formados por una base adhesiva del polímero formado por polimerización de monómeros de acrílico como el metacrilato de metilo. Están disponibles como disoluciones en base acuosa o disolventes, y también como emulsiones donde el polímero está modificado con agentes tensoactivos, de humedad, de liberación de aire y espuma y otros ingredientes que mejoran su desempeño y su habilidad de recubrimiento.

Presentan buenas propiedades de adhesión, largo tiempo de vida útil y estabilidad mecánica. Una resistencia media al agua, y muy buena a aceites, sin embargo, una poca resistencia a disolventes orgánicos y al calor.

Se utilizan habitualmente para pegar vidrio, metales, papel, textil y plásticos. (Petrie, 2000b)

Una vez detallado el uso el de los adhesivos (tipos y componentes que los forman) en el envase alimentario, así como las interacciones de este con el alimento, haciendo hincapié, en los procesos que rigen la migración y la importancia de esta para cumplir unas determinadas legislaciones. Se procede a la segunda parte de la introducción la cual se centra en la procedencia de las sustancias sensoriales activas dentro del envase, así como los análisis sensoriales necesarios para la determinación de estas.

8. ORIGEN DE SUSTANCIAS SENSORIALMENTE ACTIVAS

Las posibles fuentes de generación de sustancias sensorialmente activas susceptibles de migrar al alimento pueden ser (Catalá and Gavara, 2002b):

- I. Materias primas utilizadas para la fabricación de envases como monómeros, polímeros de bajo peso molecular, restos de agentes de polimerización (catalizadores, antioxidantes, estabilizantes...), aditivos utilizados para la formulación del plástico (plastificantes, lubricantes...), impurezas y aditivos utilizados para el procesamiento de envases de papel, cartón, etc.
- II. Productos de degradación formados por oxidación de componentes orgánicos de los materiales plásticos como aldehídos, cetonas, alcoholes...por termo-oxidación o por foto-oxidación (Hashizume, et al., 2007). La termo-oxidación puede producirse durante el proceso de transformación de los materiales, tratamiento del producto envasado o en el almacenamiento en condiciones inadecuadas (Chen, et al., 2006; Jacobsson, et al., 2004; Lozano, et al., 2007; Raj, et al., 1990; Spitzer and Buettner, 2010).
- III. Disolventes orgánicos como tolueno, xileno, cetonas....e impurezas de dichos disolventes, utilizados para la aplicación de tintas de impresión, adhesivos de laminación, barnices, recubrimientos, lacas.
- IV. Promociones que se utilizan como herramientas de marketing como cupones, figuritas, etiquetas...los cuales se colocan en el interior de envases en contacto directo con los alimentos o separados con

materiales utilizados como barreras funcionales. Estos suelen contener metales pesados, disolventes para las pinturas, barnices o adhesivos.

- V. Productos de limpieza por la contaminación durante el almacenamiento de los mismos en depósitos en que se utilizan detergentes o limpiadores de ambiente perfumados.
- VI. Compuestos halogenados generados por la acción de microorganismos en maderas tratadas con desinfectantes halo-fenólicos.

A continuación se presentan algunos ejemplos (Tabla 2) de trabajos encontrados en bibliografía sobre la migración de compuestos odorantes generados en las distintas fuentes antes mencionadas, produciendo un olor no deseado en el alimento envasado.

Tabla2: Ejemplos de migraciones de compuestos odorantes presentes en los envases

Ejemplos
Migración de un monómero de estireno del envase de plástico a dulce de leche envasado en el mismo (Catalá and Gavara, 2002b).
Migración de compuestos odorantes de un elastómero utilizado en los cierres de botellas de cerveza (Linssen, et al., 1998).
Migración de compuestos odorantes de un plástico tras la termooxidación, utilizados para envasar carne y vegetales (Kontominas, et al., 2006)
Migración de compuestos odorantes de diferentes tipos de plásticos tras la foto-oxidación (por radicación) para envase alimentario (Deschenes, et al., 1995; Goulas, et al., 2004; Welle, et al., 2002).
Migración de disolventes de las tinta de impresión utilizados en el envase para conservar chocolate o a bolsas de té (Catalá and Gavara, 2002b).
Migración de diclorofenol durante el almacenamiento de un vino en un depósito que había sido previamente desinfectado con dicho compuesto (Catalá and Gavara, 2002b).

En la mayoría de casos la migración produce alteraciones en el olor de los alimentos envasados, pero esta migración, se encuentra en concentraciones por debajo de los límites considerados de riesgo toxicológico. Y en muchas de las ocasiones esta concentración se encuentra también por debajo de los límites de detección instrumentales, lo cual supone una dificultad para su análisis.

Esto significa que el único camino para determinar los compuestos responsables de un olor, es utilizar técnicas sensoriales, estudios que únicamente pueden ser llevados a cabo por personas capaces de detectarlos de diferenciarlos.

9. ANÁLISIS SENSORIALES PARA SUSTANCIAS SENSORIALMENTE ACTIVAS.

El análisis sensorial es una ciencia multidisciplinaria en la que se analizan e interpretan las reacciones características percibidas por el olfato, la vista, el gusto y el tacto (Catalá and Gavara, 2002b). Esta técnica es muy utilizada en las industrias del envase y de alimentos, permitiendo el control de productos finales, así como la aceptabilidad de nuevos productos.

La utilización de análisis sensoriales para la detección de contaminantes capaces de alterar el olor de los alimentos es muy importante, ya que permite discernir con el olfato las sustancias que alteran el olor del alimento natural, aunque estén a muy bajas concentraciones. Esta capacidad de percibir estas especies químicas en los alimentos depende de la estructura química, concentración, tipo de alimento y sensibilidad del sujeto (Catalá and Gavara, 2002b).

Los ensayos que se realizan habitualmente para dicho análisis sensorial están recogidos en la norma ISO 6658 (Rock, et al., 2008):

- Ensayos de diferenciación: permiten determinar si existe diferencia sensorial entre productos.

- Ensayos de escalas y categorías: permiten estimar el orden o magnitud de las diferencias.
- Ensayos descriptivos: permiten identificar las propiedades sensoriales de una muestra.
- Ensayos de sensibilidad: permiten seleccionar y entrenar evaluadores.

Para estudiar los problemas causados por la migración de componentes del envase al alimento, son de gran utilidad los ensayos de diferenciación, entre los que se encuentran:

- Comparación por pares: Las muestras se presentan en pares con el fin de compararlas sobre la base de criterios bien definidos.
- Ensayo triangular: Presentación simultánea de tres muestras codificadas, dos de las cuales son idénticas y el sujeto debe indicar la muestra diferente.
- Ensayo dúo-trío: se presenta una muestra control en primer término y enseguida dos muestras, una de las cuales es igual a la muestra de control que el evaluador debe identificar.
- Ensayo A-no A: ensayo en el cual una serie de muestras, que pueden ser A o diferente de A, se presentan a cada evaluador, quien debe indicar si las muestras son A o diferentes de A.

Su utilización conlleva como inconveniente la necesidad de emplear un panel de catadores entrenados, constituido por un número considerable de individuos, lo que supone un elevado coste.

Por ello, en la actualidad, todos los esfuerzos están relacionados con el desarrollo de instrumentos, que puedan realizar estos análisis como si fuera un catador, pero de manera rápida y objetiva. Se trata de las denominadas “narices electrónicas” (Rock, et al., 2008). Las cuales intentan imitar las

funciones olfativas de los catadores. Consiste en la absorción y desorción de sustancias volátiles en la superficie de sensores que ocasionan cambios en las resistencias eléctricas, al interactuar con los compuestos químicos, dependiendo de la polaridad, tamaño y forma de las moléculas, produciendo perfiles característicos o “mapas de aroma”. Estos se comparan con patrones conocidos. Por tanto realiza un análisis global del aroma aportando información básicamente cualitativa: diferencias y similitudes entre muestras, de manera similar a un panel sensorial, pero no identifica los compuestos no proporciona un resultado en términos absolutos, sino la respuesta de un conjunto de sensores de diferente naturaleza, conectados en serie. Tampoco identifica el olor percibido.

Estos tipos de ensayos sensoriales no son válidos para detectar e identificar sustancias individuales, sino que se obtiene una percepción global de la presencia o ausencia del olor en el alimento. Por tanto es necesaria otra herramienta. De ahí la existencia y empleo extendido del análisis instrumental, cromatografía de gases, dado que los compuestos que constituyen el aroma son moléculas volátiles, acoplado a olfatometría, que se explicará en el siguiente apartado.

10. ANÁLISIS DE OLORES MEDIANTE CROMATOGRÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA

Como ya se ha mencionado anteriormente, los seres humanos no somos capaces de distinguir individualidades que conforman el aroma, sino que percibimos un único estímulo global. Si se busca encontrar los compuestos específicos responsables del olor es necesario llevar a cabo un

análisis cromatográfico que permita la separación individual de compuestos. Pero el perfil cromatográfico obtenido mediante un detector químico convencional, no coincide con el perfil aromático de un producto, ya que existen numerosos compuestos volátiles que no presentan olor pero al encontrarse en concentraciones elevadas, proporcionan picos cromatográficos importantes. Por el contrario, hay odorantes de los que no se consigue señal instrumental porque se encuentran en concentraciones inferiores al límite de detección del detector pero, sin embargo sus umbrales de percepción son tan bajos que contribuyen al aroma en gran medida. Por tanto es necesario acoplar a la cromatografía de gases la detección olfatométrica (GC-O)

10.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA

Esta técnica contribuyó a una nueva etapa y supuso una revolución en el análisis del aroma: poder asignar descriptores olfativos a los picos cromatográficos, y más aún, detectar con la nariz olores originados por compuestos que los detectores instrumentales no conseguían registrar.

Fue desarrollada por Fuller y col (Fuller, et al., 1964), y en general consiste en evaluar con la nariz humana las cualidades aromáticas de los compuestos separados que eluyen de la columna cromatográfica, a la vez que el detector instrumental instalado proporciona un cromatograma.

Por tanto, se pueden asignar olores a los picos y/o determinarse a qué tiempos de retención se detectan dichos olores. Por tanto la detección olfatométrica e instrumental son simultaneas, lo que permite relacionar la información sensorial con la información química.

En el análisis por GC-O es necesario introducir un extracto aromático representativo a través del puerto de inyección. Tras la separación de los componentes de la mezcla en la columna capilar cromatográfica, a la salida de la misma se divide el flujo, una parte del efluente se dirige al detector químico mientras que la otra va hacia el puerto de olfatométrico donde se sitúa el analista, tal y como se muestra en la Figura 14.

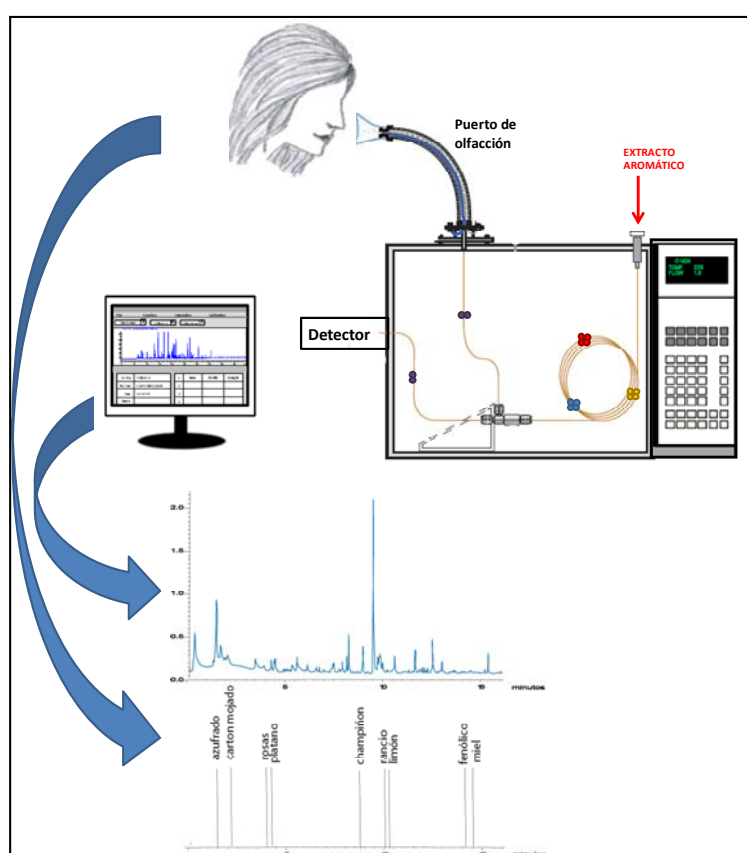


Figura14: Esquema del análisis cromatográfico-olfatométrico

En los primeros estudios se olía directamente el efluente que salía directamente del cromatógrafo. Pero este era un gas seco y muy caliente lo que provocaba la deshidratación nasal. En 1971 se diseñó el primer cromatógrafo de gases con detector olfatométrico “real”, en el que se

mezclaba el efluente caliente con aire humidificado (Dravniek and Odonnell, 1971).

Desde la aparición de GC-O se han desarrollado distintas técnicas olfatométricas con el fin de evaluar la importancia sensorial de los compuestos aromáticos que eluyen de la columna cromatográfica y debe de ser el analista quien, en función de sus objetivos, elija una u otra.

10.2. TÉCNICAS OLFATOMÉTRICAS

Las técnicas olfatométricas, permiten una jerarquización aromática de los compuestos, con el fin de evaluar la importancia sensorial de estos, tras el paso por la columna cromatográfica.

Estas pueden agruparse en: técnicas de dilución, técnica de frecuencia de impacto, técnica de tiempo intensidad, técnica de intensidad posterior y mezcla de la técnica de intensidad y frecuencia (frecuencia modificada).

10.2.1. TÉCNICAS DE DILUCIÓN

El extracto aromático obtenido se analiza mediante GC-O para determinar los tiempos de retención en los que aparecen olores. A continuación se diluye sucesivamente el extracto y se analiza con GC-O, hasta que los odorantes dejan de ser percibidos. Posteriormente, se calcula el factor de dilución d_F , que es la última dilución en la que se ha detectado el olor. Cuanto mayor es este factor, mayor es su contribución al aroma del producto. Dentro de esta técnica existen dos tipos de análisis:

- Análisis Charm “combined hedonic aroma response measurements” que fue inventado por Acree y col en 1984 (Acree, et al., 1984). Los analistas deben describir el olor que detectan e indicar el momento en el que este empieza y termina.
- Análisis AEDA viene del ingles “Aroma Extract dilution Análisis”. Esta técnica fue diseñada por Grosch y col. 1987 (Schieberle and Grosch, 1987; Ullrich and Grosch, 1987). En ella los analistas únicamente deben describir el olor percibido.

10.2.2. TÉCNICA DE FRECUENCIA DE CITACIÓN: NIF

NIF significa “Nasal Impact Frequency” y fue desarrollada por Pollien y col. (Pollien, et al., 1997) en 1997. En esta técnica el panel de analistas analiza el mismo extracto aromático mediante GC-O. Y cada individuo debe registrar los tiempos de retención en los que se detectan los olores, la descripción y la duración de los mismos. Los olores detectados con una mayor frecuencia, son los que presentan una mayor importancia relativa. Con esto se dibuja un “aromagrama” donde se representa la frecuencia de detección (%) con los tiempos de retención. Mientras la altura de pico representa el número de analistas que han detectado el olor (NIF: nasal impact frequency) el área relaciona la duración del olor (SNIF: surface of nasal impact frequency) (van Ruth, 2001).

10.2.3. TÉCNICA DE TIEMPO INTESIDAD

En estas técnicas, no sólo se determina la ausencia o presencia de un odorante y su duración, sino también la intensidad a la que se percibe. Esta

técnica fue desarrollada por McDaniel y col (Dasilva, et al., 1994) conocida con el nombre de OSME. En este análisis el analista detecta el olor y evalúa su intensidad aromática en una escala de 15cm donde 0 corresponde la intensidad nula y 15 la intensidad extrema moviendo un indicador electrónico conectado a un sistema informático. Por tanto tras realizar el ensayo se obtiene, el tiempo, el olor percibido y su intensidad. Este ensayo se lleva a cabo por cuatro catadores que repiten el ensayo cuatro veces. Con esto se construye un osmeograma con los compuestos que han sido detectados en un 50% de los casos, donde se representan las intensidades de los olores con el tiempo de retención de los mismos. La dificultad de esta técnica consiste en evaluar la intensidad de forma continua, así como el uso del dispositivo indicador de la intensidad.

10.2.4. TÉCNICA DE INTENSIDAD POSTERIOR

En esta técnica también se mide la intensidad del olor, pero en una escala previamente fijada, y el valor de intensidad que se asigna es la media de las intensidades proporcionadas por cada individuo, con lo que se reduce la subjetividad. El mayor problema que representa esta técnica es el uso de la escala por cada analista, ya que la percepción difiere considerablemente de un individuo a otro (van Ruth, 2001).

10.2.5. TÉCNICA DE FRECUENCIA MODIFICADA

Esta técnica es una mezcla de la técnica de intensidad y frecuencia, en la que un panel de 8 analistas analiza el mismo extracto aromático mediante GC-O. Cada individuo debe registrar los tiempos de retención en los que se

detectan los olores, la descripción de los mismos, así como su intensidad, mediante una escala del 1 al 3, donde 1 corresponde a un olor suave (baja intensidad), 2 olor fuerte (intensidad media) y 3 a un olor extremo (alta intensidad). Los valores intermedios también están permitidos.

Una vez realizado el mismo ensayo para los distintos analistas, se calcula la frecuencia modificada (MF) por la fórmula propuesta por Dravnieks (Dravnieks, 1985), véase Ecuación 1:

$$FM(\%) = [F(\%) \times I(\%)]^{0.5} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Donde:

F(%) es el porcentaje de frecuencia, es decir, el porcentaje de catadores que detectan el olor

I(%) es el porcentaje de intensidad calculado a partir de la media de los valores de intensidad obtenida por los distintos catadores que detectaron el olor frente al máximo valor de intensidad posible, es decir, entre tres.

Cuanto mayor es este factor, mayor es su contribución al aroma del producto.

El mayor problema que representa esta técnica al igual que la técnica de intensidad posterior, es el uso de la escala por cada analista, ya que la percepción difiere considerablemente de un individuo a otro.

Todas las técnicas olfatométricas, presentan ventajas e inconvenientes. Además, cada una de ellas se basa en principios diferentes, por lo que su aplicación a una misma muestra también proporciona resultados diferentes. De modo que según los objetivos que se busquen o los requerimientos que

se dispongan, será más adecuado emplear una técnica u otra, para seleccionar y clasificar los odorantes.

De forma general las técnicas de frecuencias y las que miden intensidades son más adecuadas a la hora de comparar muestras diferentes o para análisis cuantitativos y las técnicas de dilución son las idóneas si lo que se pretende es jerarquizar los odorantes en función a su contribución sensorial al aroma (van Ruth, 2001).

Además de las limitaciones explicadas anteriormente propias de cada método, es necesario considerar aquellas que aparecen por el hecho de utilizar la nariz humana; es el caso del cansancio y de la saturación sensorial que puede sufrir el analista afectando a los resultados obtenidos, por lo que deben acortarse los tiempos de los análisis.

Asimismo, el ambiente influye, por lo que deben de evitarse ruidos y olores extraños. Además, se debe asegurar el confort del analista con la temperatura de la habitación así como que se sitúe en una posición cómoda. También se debe tener en cuenta la sensibilidad de los analistas y si han sido entrenados o no (Delahunty, et al., 2006). En última instancia, para caracterizar adecuadamente el aroma, el extracto obtenido debe ser representativo del mismo. Este paso, no es nada sencillo, dado el número de volátiles presentes en la muestra y el amplio rango de concentraciones en las que puede aparecer.

10.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS AROMÁTICOS REPRESENTATIVOS

El extracto aromático debe contener, no sólo los compuestos volátiles responsables del aroma del producto, sino que, además, estos deben

aparecer en las mismas proporciones que se encuentran en la matriz. Entre las técnicas más utilizadas encontradas en bibliografía para el análisis de compuestos odorantes encontrados o bien en el alimento o en el envase alimentario, se encuentran:

Técnicas de destilación.

Basadas en la distinta volatilidad de los componentes de la muestra, en la que los compuestos odorantes presentan una mayor volatilidad. Por este motivo se separa de forma rápida de su matriz mediante su vaporización y posterior condensación con el disolvente extractor. En muchos casos, antes de la inyección en la cromatografía de gases es necesario concentrarlos (Czerny and Buettner, 2009; Tyapkova, et al., 2009).

Extracción con disolventes.

Es una, de las técnicas más utilizadas para la extracción de compuestos volátiles en alimentos. Se distingue entre la extracción líquido-líquido, cuando la matriz es líquida, y la extracción directa con disolventes, cuando la matriz es sólida. Finalmente es necesaria una concentración del extracto. Aunque estas técnicas dan muy buenos resultados y presentan muchas ventajas, entre los inconvenientes más destacados esta que necesitan tiempos muy largos de ensayo y grandes volúmenes de disolventes.

Técnicas de espacio de cabeza (headspace)

Consiste en extraer los compuestos volátiles del espacio de cabeza que está en equilibrio con la matriz, de forma que se obtiene un extracto lo más

parecido posible a la fracción volátil que inhalamos. Estas técnicas se caracterizan por una mínima manipulación de las muestras y proporcionan cromatogramas mucho más limpios, al no incluir el extracto en la matriz.

Se dividen en dos grupos: las técnicas estáticas (Landy, et al., 2004) y dinámicas (Campo, et al., 2005; Deschenes, et al., 1995; Linssen, et al., 1998). En las primeras, una vez alcanzado el equilibrio entre la matriz y la fase gaseosa, una porción del espacio de cabeza se introduce directamente en el puerto de inyección, lo que hace que sea una técnica muy sencilla. Tiene una baja sensibilidad para los compuestos semivolátiles, porque no existe etapa de concentración de los compuestos, y por tanto es insuficiente para los compuestos con una menor concentración. Pero por el contrario, es muy adecuada para separar los compuestos mayoritarios del aroma, y por tanto resulta de un gran interés (Rock, et al., 2008).

En las técnicas dinámicas, no se deja alcanzar dicho equilibrio, sino que el espacio de cabeza es constantemente desplazado (purgado) de forma continua por un gas inerte hacia una trampa donde son retenidos los compuestos. Las trampas son materiales adsorbentes, como polímeros porosos o carbón activo. Posteriormente la trampa se desorbe térmicamente e introduce todos los compuestos concentrados en la columna cromatográfica (GC-O).

Técnicas de extracción en fase sólida.

En los últimos años las técnicas de extracción en fase sólida han sido de las más utilizadas para el análisis de compuestos aromáticos de los alimentos, gracias a su rapidez, sensibilidad y a que emplean cantidades de disolventes mucho menores. De todas las existentes cabe distinguir la extracción en fase sólida (SPE) (Culleré, et al., 2009; Escudero, et al., 2007;

San-Juan, et al., 2010) y la microextracción en fase sólida (SPME) (Culleré, et al., 2009; Ezquerro, et al., 2002; Kataoka, et al., 2000; Kontominas, et al., 2006).

La SPE consiste en que en sólido absorbente, en forma de cartuchos o discos, actúa como fase estacionaria (materiales de sílice o copolímeros de estireno-divinilbenzeno) a través de la cual tras un breve acondicionamiento, se hace pasar la muestra. En función de la fase estacionaria y del acondicionamiento puede tener lugar un proceso de adsorción, reparto, intercambio iónico, etc. En el análisis de aromas los mecanismos preferentes son adsorción y reparto. Tras esto, es necesario un proceso posterior de elución mediante disolventes orgánicos, con el objetivo de recuperar los analitos. El rendimiento de esta técnica depende del tipo de fase estacionaria y de los disolventes utilizados.

La SPME (Pawliszyn, 1997; Pawliszyn, 2009; Zhang, et al., 1994) permite la extracción y concentración simultáneas de los compuestos. En este caso la fase estacionaria es un capilar de sílice fundida de pequeñas dimensiones que actúa como soporte y de una fase estacionaria polimérica, ligada a la sílice. Posteriormente se lleva a cabo la desorción térmica en el portal de inyección del cromatógrafo de gases. Esta técnica, se explicará ampliamente en el capítulo 1.

11. PROYECTO MIGRESIVES

Como se ha descrito anteriormente, los adhesivos utilizados en el envase alimentario no están regulados con un reglamento específico. Por tanto, en el caso de que se aplique la legislación de plásticos como

aproximación, cientos de compuestos contenidos en los adhesivos, que no están en los plásticos, quedan fuera de la misma.

Por ello se llevo a cabo el Proyecto MIGRESIVES, cuyos principales objetivos eran:

- Proporcionar una evaluación científica del riesgo de los adhesivos en el envase alimentario para una futura legislación europea.
- Suministrar una herramienta para las industrias fabricantes de adhesivos que prediga la migración de los compuestos del adhesivo al alimento, permitiéndoles asegurar que los adhesivos que están fabricando, no tienen ningún riesgo sobre la salud del consumidor.

En este proyecto europeo, de 3 años duración, han trabajado 7 centros tecnológicos europeos, entre el que se encuentra el grupo GUIA de la Universidad de Zaragoza liderado por la Dra. Cristina Nerín, 7 PYMES europeas, 6 asociaciones nacionales de adhesivos y la asociación europea de adhesivos FEICA.

Este proyecto estaba dividido en 8 paquetes de trabajo.

WP1. Clasificación de adhesivos comúnmente utilizados en envase alimentario, así como los sustratos para formar el envase multicapa.

WP2. Estudios experimentales: Que se distribuyeron en dos grandes grupos;

2.1 Identificación de compuestos en los adhesivos.

2.2 Estudio de la partición y difusión en el adhesivo y los sustratos, que son los mecanismos que rigen la migración (explicadas en el apartado 5.1).

WP3. Desarrollo de un modelo matemático de predicción de la migración.

WP4. Estudios de migración de al menos 40 muestras representativas del mercado europeo.

WP5. Bioensayos de citotoxicidad y genotoxicidad.

WP6. Transferencia de conocimientos desarrollados a la empresa.

WP7. Instrucciones del uso de la herramienta de predicción de la migración a la empresa.

WP8. Transferencia de resultados a las autoridades y sectores de interés.

De los distintos paquetes de trabajo, el más costoso era desarrollar el modelo predictivo de migración, que estaba basado en modelos matemáticos de migración de plásticos ya existentes (Begley, et al., 2005; Gnanasekharan and Floros, 1997; Lau and Wong, 2000). Para poder desarrollar este modelo, fue necesario un intenso y laborioso trabajo experimental, desarrollado en su mayoría por el grupo GUIA, que consistía en el desarrollo de distintas técnicas analíticas para determinar la composición inicial de los adhesivos, y las concentraciones de los compuestos migrantes en los distintos sustratos, para posteriormente calcular las constantes que influyen en la migración (partición y difusión).

Tras el diseño matemático, se realizó la validación del mismo, mediante ensayos de migración con 40 muestras de mercado que contenían 8 tipos diferentes de adhesivos, realizado en su totalidad por el grupo GUIA. La validación, se realizó comparando los datos predichos por el modelo matemático y los datos reales de migración obtenidos experimentalmente.

SECCIÓN II
OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis están orientados al estudio de los compuestos presentes en varios tipos de adhesivos termoplásticos y un adhesivo de almidón, todos ellos utilizados en el envase alimentario multicapa fabricado con diferentes sustratos de cartón. También se va a estudiar su posible migración y los parámetros que dependen de esta. En conjunto se han establecido los siguientes objetivos:

- ✓ Identificación de los principales compuestos volátiles en los adhesivos termoplásticos.
- ✓ Desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación en diferentes matrices (adhesivos, sustratos y simulantes) de los compuestos volátiles identificados.
- ✓ Determinación de los coeficientes de partición y difusión de los compuestos volátiles identificados en los adhesivos termofusibles en los laminados multicapa elaborados en el laboratorio.
- ✓ Determinación de la migración experimental y teórica de los compuestos volátiles identificados en 30 muestras de mercado elaboradas con estos adhesivos termoplásticos. Y además validar la predicción de la migración teórica.
- ✓ Desarrollar un método UPLC-MS/QTOF para identificar y cuantificar los compuestos no volátiles que migran de cuatro laminados fabricados con los adhesivos termofusibles.
- ✓ Identificación de los compuestos odorantes presentes en cinco tipos de adhesivos termoplásticos diferentes.
- ✓ Determinar la migración de los compuestos odorantes de doce laminados formados con los adhesivos termoplásticos.

SECCIÓN II
EXPERIMENTAL

CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS, DETERMINACIÓN DE SU CONCENTRACIÓN INICIAL, COEFICIENTES DE PARTICION Y DIFUSIÓN EN DOS ADHESIVOS TERMOFUSIBLES.

CAPÍTULO 2: ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LOS ADHESIVOS EN EL ENVASE MULTICAPA PARA ENVASAR ALIMENTOS

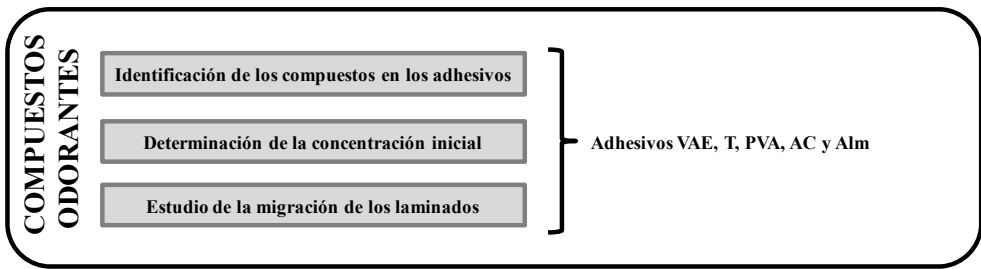
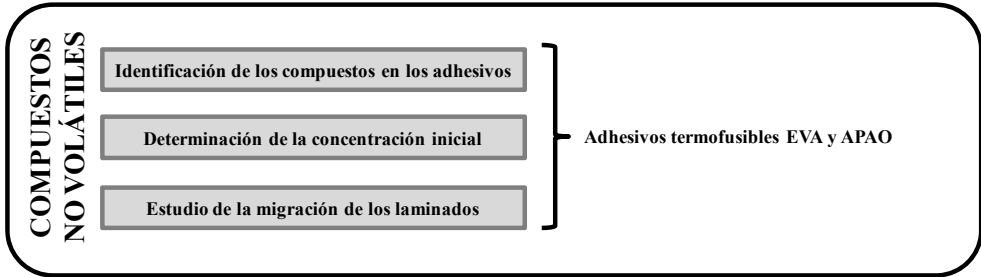
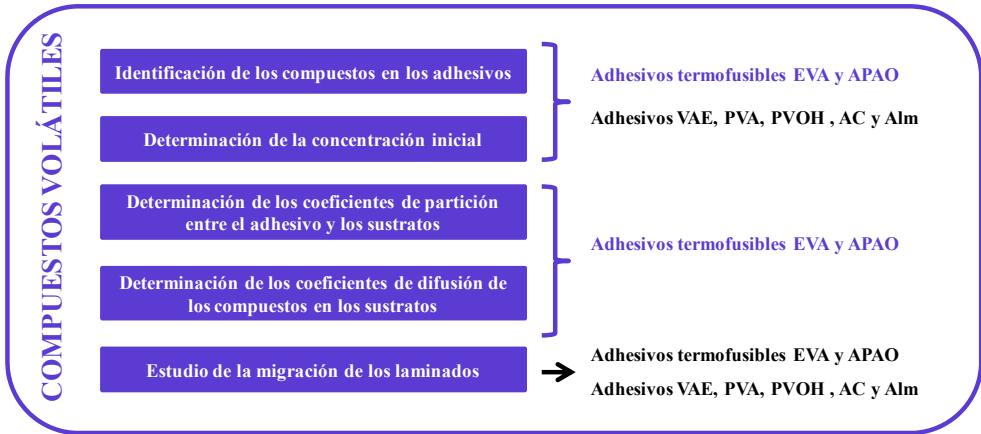
CAPÍTULO 3: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES DE DOS ADHESIVOS TERMOFUSIBLES.

CAPÍTULO 4: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ODORANTES PRESENTES EN LOS ADHESIVOS EN EL ENVASE ALIMENTARIO

CAPÍTULO 5: ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LOS COMPUESTOS ODORANTES PRESENTES EN LOS ADHESIVOS UTILIZADOS EN EL ENVASE MULTICAPA PARA ENVASAR ALIMENTOS

CAPÍTULO 1:

*IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS,
DETERMINACIÓN DE SU
CONCENTRACIÓN INICIAL,
COEFICIENTES DE PARTICIÓN Y
DIFUSIÓN EN DOS ADHESIVOS
TERMOFUSIBLES*



IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS, DETERMINACIÓN DE SU CONCENTRACIÓN INICIAL, COEFICIENTES DE PARTICION Y DIFUSIÓN EN DOS ADHESIVOS TERMOFUSIBLES.

1. INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO

El trabajo realizado en este capítulo está enmarcado dentro del proyecto europeo MIGRESIVES, cuyo objetivo era crear la base científica necesaria para poder proponer una legislación europea que regule el uso de adhesivos en envases alimentarios con la máxima seguridad alimentaria, así como diseñar un modelo teórico de predicción de la migración.

Dentro de este proyecto, como se ha mencionado, existen distintos paquetes de trabajo. El estudio realizado en este capítulo correspondería al WP 2 y 3, que consistía en la identificación de componentes en los adhesivos, así como la determinación de sus constantes de partición y difusión, para proporcionar los datos científicos para implementar modelos teóricos de predicción de migración.

Se ha trabajado con dos adhesivos termofusibles, uno basado en acetato de vinilo y etileno (EVA) y otro en poli-alfa-olefina amorfa (APAO). Los adhesivos se estudiaron de forma individual, para la identificación de compuestos volátiles. También junto con los soportes sobre los que se aplican para formar laminados, que se emplean en

materiales multicapa en envases alimentarios, para calcular sus concentraciones iniciales, así como sus constantes de partición y difusión.

El objetivo principal del trabajo fue determinar la composición de dichos adhesivos y el potencial de migración de los compuestos detectados en ellos, estimado a partir de sus coeficientes de partición y difusión.

Este trabajo estaba centrado especialmente en el estudio de compuestos volátiles presentes en los adhesivos, ya que estos compuestos son los que difunden más rápidamente a través del envase y logran más fácilmente alcanzar el alimento (Begley, et al., 2005; Canellas, et al., 2010a; Dole, et al., 2006; Gnanasekharan and Floros, 1997; Lau and Wong, 2000; Lopez, et al., 2008; Nerín and Asensio, 2004; Tehrany and Desobry, 2004). Actualmente la técnica más utilizada para la identificación de compuestos volátiles es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (Hoffmann and Stroobant, 2007; Scott, 2003a; Scott, 2003b).

Por otro lado, para trabajar con muestras complejas, los métodos basados en el análisis directo de espacio de cabeza de la muestra permiten una rápida identificación de los compuestos volátiles pero proporcionan baja sensibilidad. Sin embargo, el uso de la microextracción en fase sólida (SPME) mejora mucho la sensibilidad (Kataoka, et al., 2000; Nerin, et al., 2009b; Pawliszyn, 1997; Pawliszyn, 2009; Zhang, et al., 1994). Por estos motivos se ha utilizado esta técnica en muchas ocasiones para la identificación de compuestos volátiles (Félix, et al., 2011; Felix, et al., 2008; Nerin, et al., 2009a). Para ello, se seleccionó como técnica de estudio la microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (*HS-SPME-GC-MS*). Sin embargo, para la determinación de su concentración inicial y de los coeficientes de partición y difusión, se utilizó la extracción líquida, debido a la complejidad

inherente de cuantificar los componentes en las muestras sólidas (Ezquerro, et al., 2003a; Ezquerro, et al., 2003b; Ezquerro, et al., 2003c). (*LE-GC-MS*)

El resumen del trabajo desarrollado en este capítulo es el siguiente:

- I. Identificación de los compuestos presentes en los adhesivos. Para ello, se llevó a cabo una optimización de los parámetros más importantes en la *HS-SPME-GC-MS*. Seleccionando la fibra más adecuada tiempo de adsorción, temperatura de adsorción y tiempo de desorción. Para ello se utilizó el programa de diseño experimental Modde v.6 software (Umetrics AB).
Los compuestos identificados se clasificaron según su toxicidad con el software Toxtree v1.51 (Ideconsult Ltd.) basado en las Reglas de Cramer.
- II. La determinación de la concentración inicial de los compuestos en los adhesivos C_{p0} . Se realizaron tres extracciones con diclorometano (procedimiento previamente optimizado) y se analizó por inyección directa en *GC-MS*. La cuantificación se realizó por calibración externa.
- III. El estudio de los coeficientes de partición de los compuestos en los laminados, mediante la determinación de las concentraciones de equilibrio en los correspondientes soportes y adhesivos utilizados en estos laminados.
- IV. El estudio de la difusión de los compuestos en los correspondientes soportes, mediante la determinación de las concentraciones en los soportes, usados en los laminados.

Tanto los ensayos de partición como los de difusión se realizaron según el método de Moisan. Los ensayos se analizaron por extracción

líquida (LE) con diclorometano e inyección directa por GC-MS y con calibración externa.

La Figura 1.1 muestra un esquema del desarrollo del trabajo realizado en este capítulo.

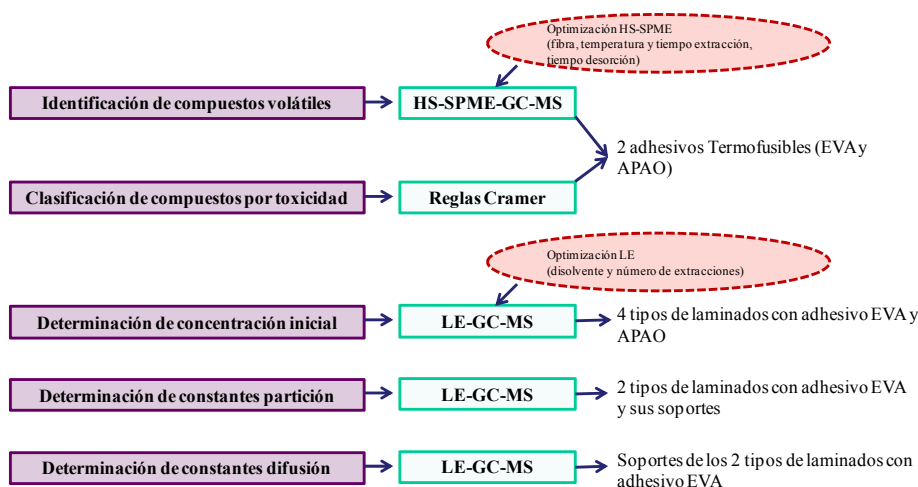


Figura 1.1: Esquema de trabajo realizado en el capítulo 1

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. REACTIVOS

2,6-di-tert-butil-1,4-benzoquinona (CAS 719-22-2); 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (CAS 128-37-0); hexadecano (CAS 544-76-3); eicosano (CAS 112-95-8); antraceno 9,10-dihidro (CAS 613-31-0); reteno (CAS 483-65-8); octadecano (CAS 593-45-3); docosano (CAS 629-97-0); tetracosano (CAS

646-31-1); 4-tert-butilfenol (CAS: 98-54-4) suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España). Diclorometano, metanol y hexano fueron suministrados por Scharlau Chemie S.A (Sentmenat, España), todos ellos con calidad HPLC.

Se utilizó:

- Una disolución (Disolución A) de 4-tert-butilfenol de 1000 µg/g en diclorometano como estándar interno.

2.1.2. FIBRAS DE SPME

Se emplearon: Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espesor, fibra de poliacrilato (PA) de 85 µm de espesor, fibra de Divinilbenzeno / carboxen / polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 µm, fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 µm de espesor. Todas ellas suministradas por Supelco (Bellefonte, EE.UU)

2.1.3. MUESTRAS DE ADHESIVOS Y LAMINADOS

Se estudiaron dos adhesivos termofusibles “hotmelt” suministrados por la misma empresa fabricante de adhesivos. El primer adhesivo llamado T_01, se trataba de un adhesivo termofusible convencional de base EVA (copolímero acetato de vinilo y etileno), véase Figura 1.2, y el otro, T_02, se trataba de un adhesivo termofusible no reactivo que contenía de base un polímero poliolefínico y rico en propeno, véase Figura 1.3.

Ambos adhesivos contenían otras sustancias como taquificantes, antioxidantes...pero no se disponía de más información sobre su formulación, por razones de confidencialidad de la empresa.



Figura 1.2: Adhesivo T_01



Figura 1.3: Adhesivo T_02

Ambos adhesivos se estudiaron individualmente (para la identificación de sus compuestos), así como formando el laminado cuya estructura era [sustrato1-adhesivo-sustrato2], para el resto de estudios. Este laminado era la forma habitual de encontrarlos en el envase alimentario para darle forma geométrica de cajas o estuches.

El adhesivo se aplica normalmente sobre cartón mediante inyectores, y este puede estar cubierto con polipropileno, polietileno o acetato de celulosa, en el exterior del envase, en el interior o en ambos lados.

Los laminados se prepararon en el laboratorio, con las instrucciones suministradas por la empresa. Estos estaban constituidos por dos sustratos del mismo material unidos por un determinado gramaje de adhesivo. Los sustratos utilizados para preparar los laminados fueron:

- Cartón (C) de 380 μm de espesor
- Cartón con una lámina plástica de polipropileno (CPP) de 30 μm de espesor, siendo el total del laminado de 410 μm de espesor

Para elaborar los laminados en el laboratorio, el primer paso fue calentar el adhesivo, para fundirlo, entre una temperatura de 160-180°C. Una vez que el adhesivo estaba fundido, se aplicaba sobre el sustrato previamente cortado con unas dimensiones de 1x1 dm (Figura 1.4) y seguidamente se extendía sobre el sustrato dejando una capa uniforme (Figura 1.5). Para ello, se empleaba una pieza de metal con tres orificios para añadir el adhesivo, cuya base tenía un desnivel que permitía depositar una capa uniforme de adhesivo de aproximadamente 100 µm. Posteriormente se colocaba el otro sustrato encima para formar el laminado (Figura 1.6). Tras esta etapa, se ponía peso encima para que se pegaran adecuadamente los sustratos y se almacenaba a 23 °C. La cantidad de adhesivo en cada laminado se controlaba por pesada una vez seco y correspondía aproximadamente a $31,2 \pm 2,5 \text{ g}_{\text{adhesivo}}/\text{m}^2_{\text{laminado}}$



Figura 1.4: Aplicación del adhesivo fundido



Figura 1.5: Extensión del adhesivo con capa uniforme



Figura 1.6: Formación del laminado

Las láminas fabricadas fueron las siguientes:

- Laminado 1 [C-T_01-C]
- Laminado 2 [CPP-T_01-CPP]
- Laminado 3 [C-T_02-C]
- Laminado 4 [CPP-T_02-CPP]

2.2. INSTRUMENTAL

2.2.1. CROMATÓGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para el análisis de la muestras se trabajó en un inyector automático CTC Combipal suministrado por Agilent Technologies (Madrid, España). El sistema cromatográfico de gases era un 6890 Series conectado a un detector selectivo de masas, 5973 Series. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) de Agilent Technologies (Madrid, España). El resto de parámetros utilizados, se muestran en la siguiente Tabla 1.1

Tabla 1.1: Parámetros utilizados para los análisis por extracción por HS-SPME y LE acoplada a GG-MS

Instrumentación			
CombiPal HS-SPME (Para identificación)	Tiempo de preincubación (min)	2	
	Tiempo extracción (min)	25	
	Temperatura de extracción (°C)	80	
	Tiempo de desorción (min)	1	
	Temperatura de desorción	250	
CombiPal inyección directa (Para C_{p0} , constantes partición y difusión)	Volumen inyectado (μ L)	1	
	Inyector	250°C Split (1:20)	
	Condiciones GC	Flujo de Helio (mL/min)	1
	Inyector		250°C Splitless (2min)
		Rampa temperatura del horno	40°C (2min) 15 °C/min 165°C 10 °C/min 300°C (2min)
	Condiciones masas (EI)	Rango de masas (m/z)	45-450
		Temperatura fuente (°C)	230
		Temperatura cuadrupolo (°C)	150
		Energía electrones (eV)	70

2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CONDICIONES DE HS-SPME

2.3.1. VARIABLES A ESTUDIO

Las variables más importantes que influyen en el proceso de microextracción en fase sólida por espacio de cabeza para muestras sólidas son las siguientes (Kataoka, et al., 2000; Nerin, et al., 2009a; Nerin, et al., 2009b; Pawliszyn, 1997; Pawliszyn, 2009; Zhang, et al., 1994):

- Tipo de fibra
- Temperatura de extracción (Text)
- Tiempo de extracción (text)
- Tiempo de desorción (t_{des})

Tipo de fibra

La eficiencia del proceso de extracción depende de la constante de distribución K_{fa} entre la fibra y el analito, y está determinada por las propiedades del recubrimiento de la fibra así como por la afinidad del compuesto respecto a los componentes de la matriz. Por tanto, el primer paso era seleccionar la fibra que tuviera un recubrimiento que mejorara las propiedades de extracción entre la fibra y los distintos compuestos que forman los adhesivos.

Existen en el mercado varios tipos de fibras que se diferencian en el grosor y la polaridad de sus fases estacionarias. También se diferencian en como estén inmovilizadas las capas de la fase estacionaria sobre la fibra de sílice fundida; encontramos fases ligadas, no ligadas, parcialmente entrecruzadas o fuertemente entrecruzadas, véase la Figura 1.7 . Las fases

no ligadas son estables en algunos disolventes orgánicos miscibles con el agua. Por su parte, las fases ligadas son estables con todos los disolventes polares a excepción de algunos apolares. Y en cuanto a las fases entrecruzadas, son estables en la mayoría de disolventes orgánicos miscibles con el agua, además de en algunos apolares (Kataoka, et al., 2000).

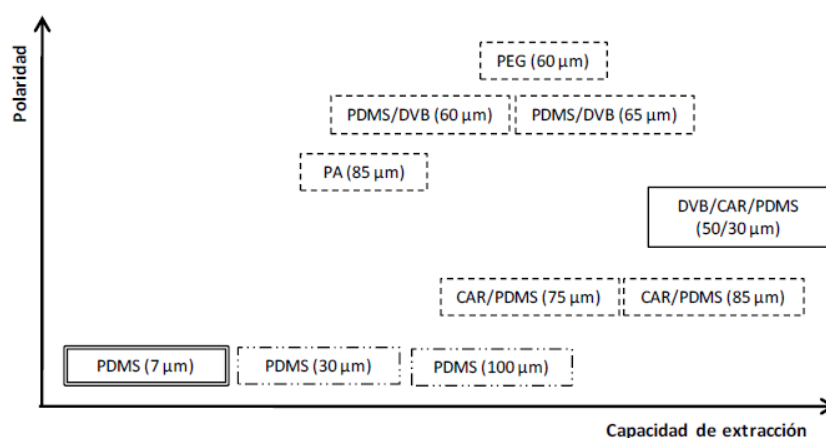


Figura 1.7: Propiedades de la fibras de SPME comerciales: PDMS: Polidimetilsiloxano, DVB: divinilbenceno, PEG: carbowax-polietilenglicol, PA: poliacrilato, CAR:carboxen.

Fases ligadas, no ligadas, parcialmente y fuertemente entrecruzadas

Las fibras apolares de PDMS están recomendadas para la extracción de compuestos volátiles apolares, mientras que las fibras polares de PA son más apropiadas para la extracción de compuestos polares. En las fibras con mezclas de fases estacionarias los efectos de adsorción se ven potenciados, por lo que se incrementa la capacidad de extracción (Kataoka, et al., 2000; Zhang, et al., 1994).

La fibra DVB/CAR/PDMS presenta una estructura de microporos, por esa razón extrae los compuestos de bajo peso molecular y por el contrario la fibra PDMS/DVB presenta una estructura de macroporos que presenta mayor sensibilidad para compuestos de mayor peso molecular.

En cuanto al grosor de la fase estacionaria, se ha comprobado que los recubrimientos más gruesos favorecen la extracción de los compuestos más volátiles y las fases más finas a los compuestos semivolátiles. Además las más gruesas presentan mayor sensibilidad al poder extraer más cantidad de compuesto. Sin embargo necesitan tiempos de extracción más largo para alcanzar el equilibrio (Pawliszyn, 1997).

Entre las fibras comerciales que se utilizaron para la optimización, con distinta polaridad y distinto espesor, fueron:

- Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm de espesor
- Fibra de poliacrilato (PA) de 85 μm de espesor
- Fibra de Divinilbenzeno / carboxen / polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 μm
- Fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 μm de espesor.

El criterio de selección de la fibra se basó en dos parámetros:

- Número de picos detectados.
- Intensidad de la señal de los picos detectados.

Una vez seleccionada la fibra para la identificación de los compuestos, se procedió con la optimización de los parámetros de extracción:

Temperatura de extracción

Es la temperatura a la cual tiene lugar la extracción de los compuestos volátiles. La temperatura es un parámetro muy importante en la optimización de la SPME, ya que afecta a la cinética de extracción, y por tanto, a la sensibilidad y selectividad del proceso. La temperatura tiene dos

efectos contrarios; por un lado, al incrementarse la temperatura de extracción se favorece la difusión de los compuestos provocando la disociación de estos desde las matrices y así, se favorece la transferencia al espacio de cabeza y su extracción. Sin embargo, por otro lado la extracción en la fibra es un proceso exotérmico, favorecido a bajas temperaturas, por lo tanto, el óptimo supone una solución de compromiso. El rango de estudio elegido fue entre 40 y 80 °C.

Tiempo de extracción

Es el tiempo que la fibra está extrayendo los compuestos evaporados en el espacio de cabeza. El número de puntos en los que la adsorción/absorción tiene lugar es limitado. Cuando todos esos puntos han sido ocupados, no se puede adsorber más compuesto, teniendo en ese instante la cantidad máxima de compuestos y por tanto, el tiempo óptimo. El rango de estudio de esta variable fue entre 10 y 30 min.

Tiempo de desorción

Es el tiempo necesario para desorber en el inyector los compuestos retenidos por la fibra. El rango de estudio de esta variable fue entre 1 y 5 minutos.

Temperatura de desorción

Es la temperatura a la cual se desorben en el inyector los compuestos. Esta se fijó en 250 °C, punto medio del intervalo de temperaturas recomendado por el fabricante.

2.3.2. OPTIMIZACIÓN

El procedimiento de optimización se llevó a cabo mediante un diseño experimental. La idea básica era estudiar las variables relevantes nombradas anteriormente dentro del rango establecido. Para ello se diseña una serie de experimentos y se ajusta la respuesta según un modelo matemático, determinando las condiciones óptimas de cada variable, así como, si estas variables influyen o no y de que manera en la respuesta.

Por tanto el objetivo de este punto, era optimizar las condiciones de extracción para que la respuesta para todos los compuestos fuera máxima.

Para ello se aplicó un modelo de superficie de respuesta (*RSM*), del diseño **Compuesto Centrado en las Caras (CCF)**, que fue el elegido. Y el programa que se utilizó fue el MODDE v.6 software (Umetrics AB).

El diseño de experimentos centrado en las caras ajusta la respuesta a un modelo matemático cuadrático:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_1x_2 + b_5x_1x_3 + b_6x_2x_3 + b_7x_1^2 + b_8x_2^2 + b_9x_3^2$$

Con un número de experimentos igual a $2f + 2f + n$, siendo f el número de factores a considerar y n el número de centros.

2.4. IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS ADHESIVOS TERMOFUSIBLES

La identificación se llevo a cabo comparando el tiempo de retención y el espectro de masas de los compuestos detectados con los estándares puros y con la ayuda inicial de las librerías NIST y WILEY.

La toxicidad de los compuestos se evaluó a partir de las Reglas de Cramer con el software Toxtree v1.51(Ideaconsult Ltd.).

Estas reglas clasifican los compuestos en tres niveles de toxicidad dependiendo de la estructura molecular y proponen su máxima ingesta diaria en mg/persona/día es:

- 1,8 para los compuestos de grado de toxicidad I.
- 0,54 para los compuestos de grado de toxicidad II.
- 0,09 para los compuestos de grado de toxicidad III

Para clasificar los compuestos utiliza un árbol de decisión en el que formula preguntas acerca de su estructura química. En función de la respuesta (SI o NO) el compuesto es directamente clasificado en uno de los grupos de toxicidad o es necesario responder a otra pregunta adicional. La Figura 1.8 muestra un ejemplo de árbol de decisión para el compuesto retero.

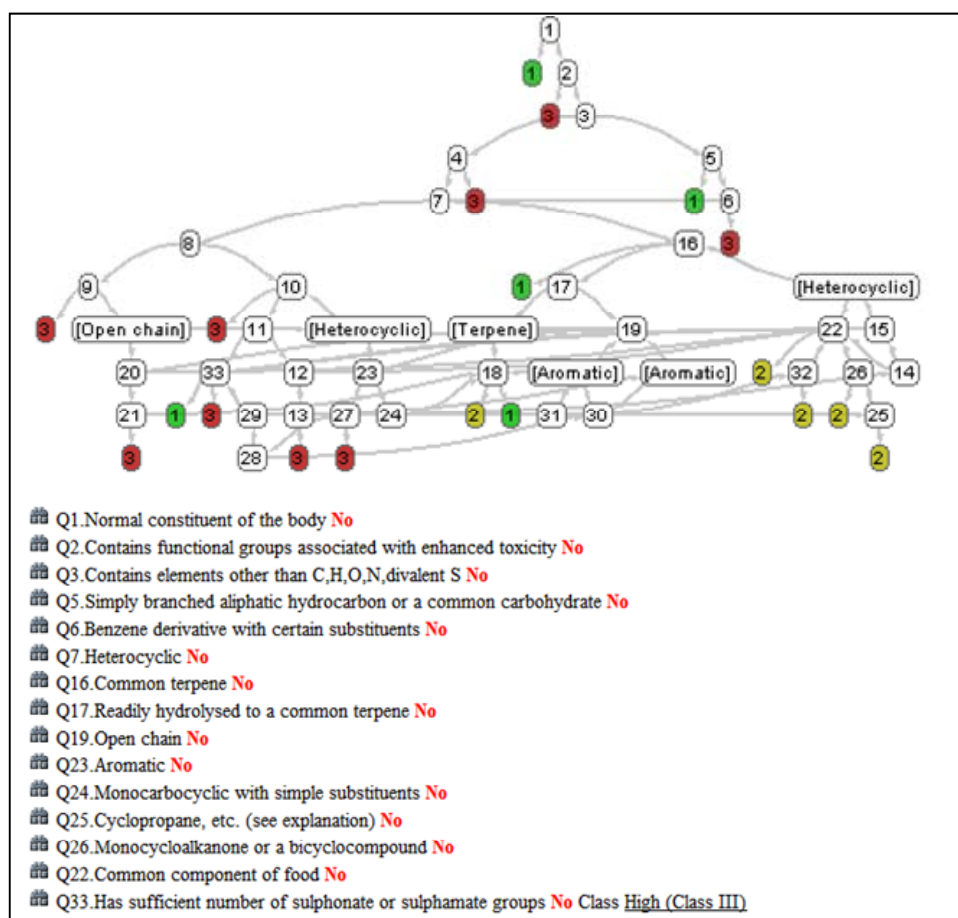


Figura 1.8: Árbol de decisión utilizado por el programa Toxtree para la clasificación del compuesto reteno.

Cada círculo representa una pregunta, según la respuesta a ella, el compuesto sigue una ruta diferente. Si el círculo tiene color verde es que se ha clasificado directamente en la Clase I, si es amarillo como clase II y si es rojo como Clase III.

Por ejemplo la Pregunta 1 es si la sustancia es un constituyente normal del cuerpo, si la respuesta es SI: el compuesto es clasificado de Clase I, si la respuesta es NO: pasar a la siguiente pregunta 2 que pregunta si tiene grupos

funcionales que aumenten la toxicidad, si la respuesta es SI: compuesto clasificado clase III y si es NO: pasar a la pregunta 3 y así sucesivamente.

Tras la evaluación con el árbol de decisión, nos muestra la clasificación del compuesto que se busca, según su toxicidad, véase Figura 1.9.

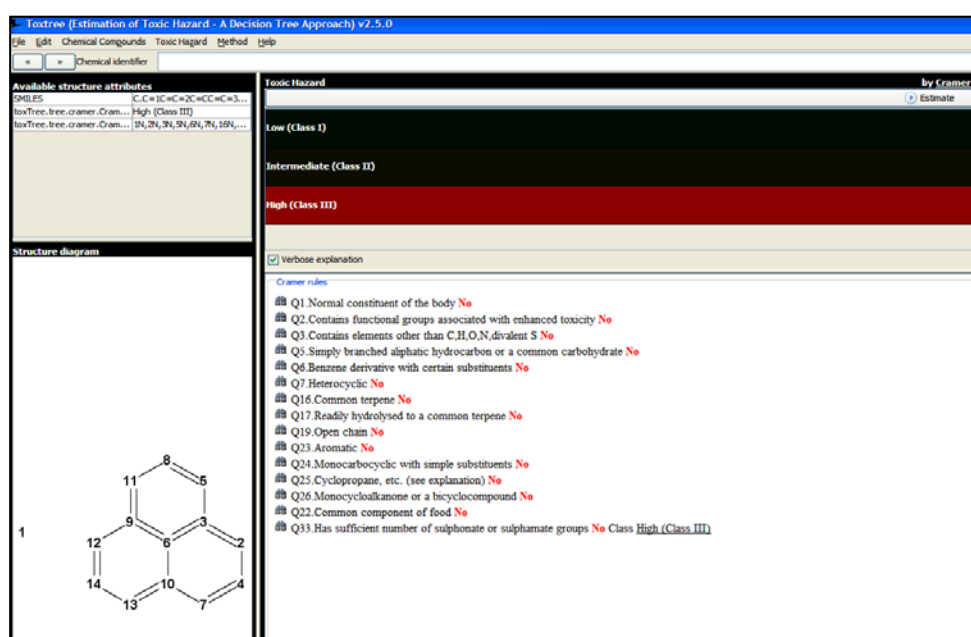


Figura 1.9: Resultado de la clasificación del compuesto reteno en el programa Toxtree

2.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL EN EL ADHESIVO

Para determinar la concentración inicial en el adhesivo (C_{p0}) se llevó a cabo una extracción líquida (LE) de las láminas, con diferentes disolventes, de distinta polaridad: diclorometano, metanol y hexano. Se seleccionó el disolvente que extrajera mayor número de compuestos y en mayor cantidad.

Para llevar a cabo la extracción, se cortaron las láminas en pequeños trozos y 0,5 gramos se extrajeron una, dos, tres y cuatro veces consecutivas con 2,5 mL del disolvente seleccionado, para optimizar el número de extracciones necesarias. Cada extracto se extrajo durante 24 horas en un horno a una temperatura de 40°C. Los extractos procedentes de las extracciones secuenciales se juntaron y se evaporaron posteriormente hasta obtener el mismo peso de extracto final en cada caso. De esta forma, se comparó la eficiencia de la extracción y se optimizó el número de extracciones necesarias. Se seleccionó el número de extracciones necesarias para extraer más del 90% de todos los compuestos identificados previamente.

Una vez seleccionadas las condiciones de extracción, se extrajeron las láminas (laminado 1, 2, 3 y 4) y se les añadió 10 µL de disolución A como estándar interno. Se concentraron mediante una corriente de N₂ hasta 200 µL. Finalmente, los extractos se analizaron por GC-MS (tres réplicas de cada laminado).

Para completar el estudio, se extrajeron los sustratos del laminado (C y CPP) sin los adhesivos con el mismo método optimizado, para comprobar y determinar la concentración de los compuestos comunes en estos con el adhesivo.

Para construir las rectas de calibrado, se prepararon disoluciones de los compuestos identificados a distintas concentraciones en diclorometano y se analizaron por GC-MS. Se analizaron tres réplicas de cada concentración.

2.6. DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN

Los ensayos de partición se realizaron para determinar las constantes de partición de los compuestos entre el adhesivo y los sustratos correspondientes.

La constante de partición adhesivo-sustrato ($K_{A,S}$) se define como el cociente entre la concentración del compuesto en el adhesivo y la concentración de este en el sustrato tras alcanzar el equilibrio. Esta se calcula según la Ecuación 1 (Sección 1, apartado 5.1.1) donde las fases 1 y 2 corresponden al adhesivo $C_{eq(A)}$ y a los sustratos $C_{eq(S)}$ respectivamente. Es decir, véase Ecuación 1.1

$$K_{A,S} = \frac{C_{eq(A)}}{C_{eq(S)}} \quad \text{(Ecuación 1.1)}$$

Para conocer estas concentraciones, sería necesario separar la capa de sustrato y la de adhesivo una vez alcanzado el equilibrio, cosa que es muy difícil al estar totalmente adheridos. Por tanto se propuso la siguiente metodología (Canellas, et al., 2010a; Dole, et al., 2006):

Se colocaron dos láminas iguales de ambos sustratos de 1 dm x 1 dm a cada lado del laminado de las mismas dimensiones y a dicho sistema se le denominó, sándwich, véase Figura 1.10

- C-[C-T_01-C]-C
- CPP- [CPP-T_01-CPP]-CPP

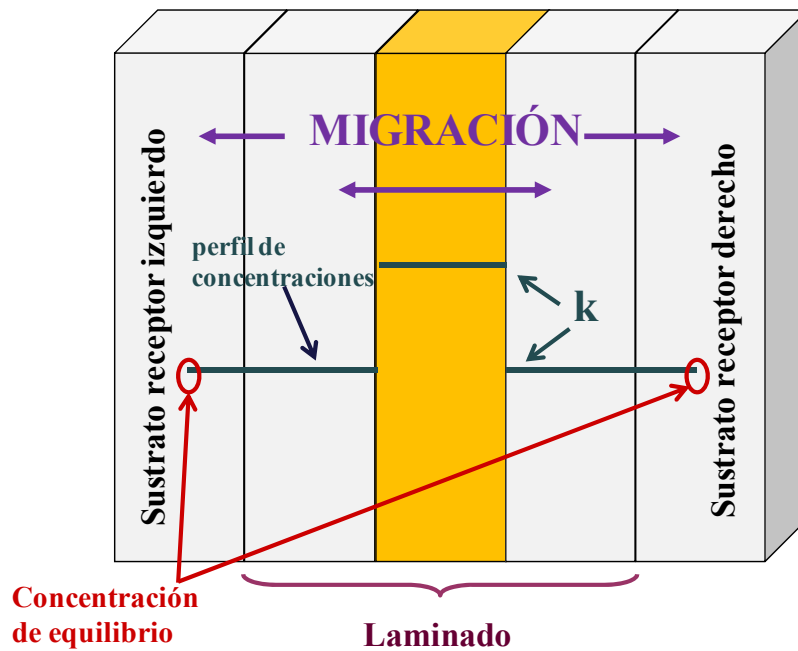


Figura 1.10: Ensayo de partición

Estas dos láminas de sustrato añadidas a cada lado del laminado, permitieron calcular la concentración del compuesto en el sustrato, ya que, al estar en equilibrio el sistema, los sustratos que forman parte del laminado $C_{eq(S)}$ y los añadidos al sándwich $C_{eq(S)}^*$, tendrán la misma concentración, es decir, $C_{eq(S)} = C_{eq(S)}^*$

Este sistema se colocó en una celda de migración propuesta por Dole y col. (Dole, et al., 2006) y Moisan y col. (Moisan, 1980), véase Figura 1.11. Dicha celda, consistía en dos placas de aluminio de $1,5 \times 1,5 \text{ dm}^2$ de superficie donde se le aplicaba un par de $0,8 \text{ Nm}$ al apretar cuatro tornillos con una llave dinamométrica, véase Figura 1.12.

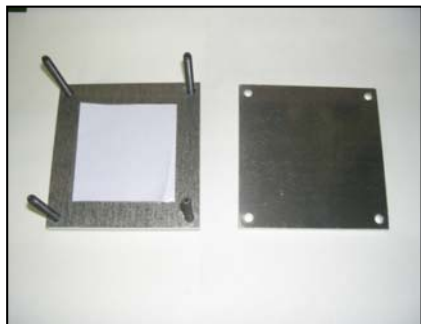


Figura 1.11: Celda de migración con el sándwich objeto estudio



Figura 1.12: Celda de migración cerrada por la llave dinamométrica

Tras preparar la celda de migración con los ensayos de partición, se introdujeron en una estufa a unas temperaturas de 40 y 60 °C (para cada sándwich se estudiaron dos réplicas a dos temperaturas) durante 30 días para asegurarse que el sistema alcanzaba el equilibrio y así, poder calcular las constantes de partición de los compuestos para ambos sustratos.

Tras este periodo, se cortó la parte central de los sustratos añadidos en el sándwich, se extrajeron y se analizaron según la metodología descrita en el apartado 2.5.

Al realizar este ensayo, se están asumiendo dos suposiciones:

- El tiempo de migración de 30 días a 40 °C y 60 °C se considera un tiempo lo suficientemente largo para que todos los compuestos migrantes alcancen el equilibrio a través de las capas de los sustratos que forman el sándwich (Canellas, et al., 2010a; Mercea, et al., 2009). Para confirmar esta suposición, se colocan dos sustratos idénticos de espesor d_s , donde uno contiene un compuesto perfectamente distribuido uniformemente, de concentración $C_{po(S)}$, y el otro sustrato no contiene nada de este compuesto.

Uniendo los sustratos en las condiciones de estricto contacto, según la metodología anterior, el tiempo t necesario para que el sistema alcance el equilibrio (la misma concentración en ambos sustratos), se obtiene mediante la Ecuación 1.2:

$$t \sim 7.5 \frac{d_s^2}{D_s} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

Donde d_s es el espesor del sustrato y D_s es la difusión en dicho sustrato.

Si los espesores de los sustratos estudiados correspondían a 380 y 410 μm y suponiendo una difusión de $1 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Mercea, et al., 2009) \rightarrow daría $t=20$ días, por tanto 30 días es más que suficiente.

- Debido a un contacto perfecto entre el laminado y las láminas de sustrato añadidas, se considera que no existe partición entre la interfase del laminado-sustratos que forman el sándwich. Por tanto, la concentración en ambos casos, en los sustratos que forman el laminado, $C_{\text{eq}(S)}$, y en los sustratos añadidos a ambos lados el laminado, $C_{\text{eq}(S)}^*$, es la misma.

Esta consideración no puede comprobarse directamente, ya que al final del experimento de partición no es posible determinar la migración local en los sustratos que forman el laminado. Además, trabajos previos (Mercea, et al., 2009) demuestran que con una constante de par de fuerzas de 0.8 Nm aplicada a una superficie de $10 \times 10 \text{ cm}^2$, es suficiente para comprimir el sándwich de tal forma que no haya resistencia en la interfase laminado-sustrato para los compuestos migrantes.

Por tanto, si $C_{\text{eq}(S)} = C_{\text{eq}(S)}^*$, se puede calcular mediante el siguiente balance de materia (véase Ecuación 1.3) la concentración en equilibrio en el

adhesivo, $C_{eq(A)}$, para calcular las constantes de partición, ya que $C_{eq(S)}$ * y $C_{po(A)}$ pueden ser calculadas fácilmente, según:

$$C_{po(A)}d_A\rho_A = 4C_{eq(S)}d_S\rho_S + C_{eq(A)}d_A\rho_A \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

Donde:

- $C_{po(A)}$ es la concentración inicial del migrante en el adhesivo (calculada previamente)
- $C_{eq(S)}$ es la concentración de equilibrio del migrante en los sustratos
- $C_{eq(A)}$ es la concentración de equilibrio del migrante en el adhesivo (la incognita)
- d_A y d_S es el espesor del adhesivo y de los sustratos
- ρ_A y ρ_S es la densidad del adhesivo y de los sustratos

La densidad tanto del adhesivo curado, como la de los sustratos, se calculó pesando un determinado volumen de ambos.

Conocida la concentración de adhesivo en equilibrio, se pudo calcular la constante de partición, $K_{A,S}$, según la Ecuación 1.1.

2.7. DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE DIFUSIÓN

Para determinar los coeficientes de difusión de los compuestos migrantes tanto en el adhesivo como en los sustratos, se realizó un ensayo similar al de la partición, pero sustituyendo un sustrato a cada lado del laminado, por 10 sustratos idénticos como se muestra en la Figura 1.13.

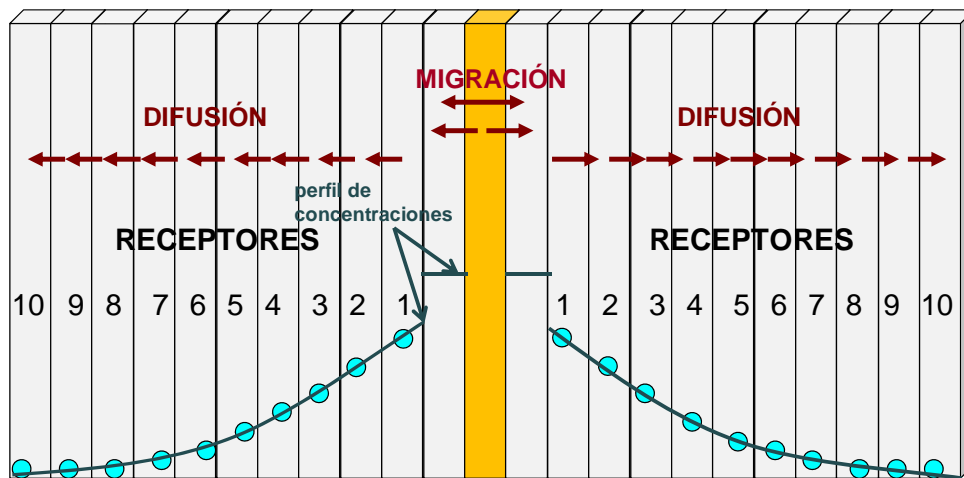


Figura 1.13: Experimentos de difusión

Este sistema se introdujo en la celda de migración antes mencionada, en las mismas condiciones que el ensayo previo de partición, para una temperatura de 40 y 60 °C (dos réplicas por cada sustrato) durante 24, 48 y 72 horas.

Tras este periodo de tiempo, se cortó la parte central de cada sustrato, un total 2x10 sustratos para cada ensayo, y se llevó a cabo la extracción según la metodología del apartado 2.5, para así, calcular la concentración de los migrantes en todo el sistema, es decir, la concentración del migrante en cada sustrato $C'(S)$. Así se pudo conocer la concentración en el adhesivo $C'(A)$ para un determinado tiempo t , obteniéndose un perfil de concentración del migrante dependiente del tiempo.

Para el cálculo de las constantes de difusión, se requería la ecuación de Fick (Crank and Gupta, 1975) (Ecuación 3, sección I, introducción), donde para resolverla, se utilizaron métodos numéricos de diferencias finitas de una dimensión (Tosa, et al., 2008; Tosa and Mercea, 2008). Este trabajo se llevó a cabo dentro del Proyecto MIGRESIVES en colaboración de Dr.

Peter Mercea de la empresa FABES. Para el cálculo era necesario que se cumplieran las siguientes consideraciones:

- Todas las capas del sistema laminado-sustratos eran homogéneas y constantes respecto a su espesor.
- Se realizaba a una determinada temperatura para que los coeficientes de partición y difusión fueran constantes
- No había pérdida de sustancia migrante en el sistema, por ejemplo por degradación o por otros procesos.
- Al igual que ocurría en la partición, se suponía que no existía partición entre la interfase del laminado-sustratos añadidos

Este algoritmo permitía ajustar los valores de concentración obtenidos experimentalmente $C_{(S)}$ y $C_{(A)}$ a un perfil de concentración calculado matemáticamente a partir de unos supuestos valores de difusión, conociendo la concentración inicial del compuesto en el adhesivo $C_{po(A)}$, los parámetros geométricos como los espesores tanto del adhesivo y el sustrato (d_A y d_S) y densidad de ambos (ρ_A y ρ_S) así como las constantes de partición calculadas anteriormente. Para un mejor ajuste se necesitaba que los compuestos migrantes difundieran hasta la última capa.

Para comenzar con el ajuste, el valor de entrada de $K_{A,S}$ era el calculado en los experimentos de partición y un valor de coeficiente de difusión en el sustrato D_S y del adhesivo D_A que podían ser tomados por similitud con los trabajos anteriores (Mercea and Piringer, 2008; Mercea, et al., 2009; Tosa, et al., 2008; Tosa and Mercea, 2008). Con estos valores se obtenía una curva de concentración calculada con el algoritmo numérico y se comparaba con la calculada experimentalmente ($C_{(S)}$), calculando la desviación de ambos datos \sum_1 .

Si los datos de la curva de concentración calculados matemáticamente eran considerablemente superiores o inferiores a la curva experimental, se ajustaba el valor de los coeficientes de $K_{A,S}$ aumentando o disminuyendo en consecuencia. Pero si las diferencias son más pronunciadas se ajusta D_S , y se calcula una segunda desviación Σ_2 . Si $\Sigma_2 < \Sigma_1$, se ha mejorado la calidad del ajuste y por tanto se continua con el ajuste hasta un mínimo valor de Σ , proporcionando el valor de D_S y un valor de matemático de $K_{A,S}$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES HS-SPME

El primer objetivo del trabajo fue la identificación de los compuestos volátiles presentes en los dos adhesivos termofusibles mediante la técnica HS-SPME-CG-MS debido a su alta sensibilidad.

El primer paso, era elegir la fibra más apropiada para cada adhesivo, es decir, la fibra que extrajera el mayor número de compuestos y con una mayor sensibilidad. Para este propósito, las fibras estudiadas se han especificado en el apartado 2.1.2. Para completar el trabajo, se realizó el ensayo tanto para los adhesivos crudos como curados, para comparar las diferencias entre ambos.

La Tabla 1.2, muestra los compuestos identificados en cada adhesivo para las 4 fibras estudiadas.

Tabla 1.2: Compuestos identificados en los adhesivos termofusibles (T) analizados por HS-SPME-GC-MS con las fibras (A: fibra PDMS, B: fibra PDMS/DVB, C: fibra CAR/PDMS/DVB, D: fibra PA) y su nivel de toxicidad (Tox) por las Reglas de Cramer.

	Compuestos (n° CAS)	T	Fibra	Tox
1 ^a	Dodecano (112-40-3)	01	A, B, C	I
2 ^a	5-metiltridecano(25117-31-1)	01	A, B, C	I
3 ^a	3-metiltridecano, (6418-41-3)	01	A, B, C	I
4 ^a	Longiciclono (1137-12-8)	01	A, B, C	I
5 ^a	Tetradecano (629-59-4)	01	A, B, C	I
6 ^a	Longifoleno (475-20-7)	01	A, B, C	I
7 ^a	2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona (2460-77-7)	01	A, B, C, D	II
1 ^b	Trans-decahidronaftaleno(493-02-7)	02	A, B, C	I
8 ^a	2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (128-37-0)	01	A, B, C, D	II
9 ^a	5-metilpentadecano (25117-33-3)	01	A, B	I
10 ^a	3-metilpentadecano (2882-96-4)	01	A, B	I
11 ^a	Hexadecano (544-76-3)	01	A, B	I
2 ^b	Cis-decahidronaftaleno(493-01-6)	02	A, B, C	I
12 ^a	9,10-dihidroantraceno (613-31-0)	01	A, B, C, D	III
13 ^a	Octadecano (593-45-3)	01	A, B	I
14 ^a	Eicosano (112-95-8)	01	A, B	I
15 ^a	4b,8-dimetil-2-isopropilfenantreno (1000197-14-1)	01	A, B	II
16 ^a	10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno (32624-67-2)	01	A, B	II
17 ^a	1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno (1000293-16-9)	01	A, B	II
18 ^a	Docosano (629-97-0)	01	A, B	I
19 ^a	Reteno (483-65-8)	01	A, B	III
20 ^a	Dehidroabietal (13601-88-2)	01	A, B, D	II
21 ^a	Dehidroabietato de metilo(1235-74-1)	01	A, B	II
22 ^a	Tetracosano (646-31-1)	01	A, B	I

^a picos en Figura 1.13, ^b picos en la Figura 1.14

Como muestra la Tabla 1.2, todos los compuestos se detectaron con la fibra de PDMS (estructura apolar), probablemente porque todos los compuestos detectados presentaban una baja polaridad. Con la fibra PA (fase polar) únicamente se detectaron los compuestos más polares (7^a, 8^a, 12^a and 20^a).

La fibra DVB/CAR/PDMS presenta una estructura de microporos, por esa razón extraía los compuestos de bajo peso molecular (hasta 9,10-dihidroantraceno) y por el contrario la fibra PDMS/DVB presenta una estructura de macroporos que presenta mayor sensibilidad para compuestos de mayor peso molecular.

Finalmente para el adhesivo T_01 la fibra seleccionada fue PDMS ya que representaba más ampliamente el perfil de compuestos presentes en el adhesivo (Figura 1.14). Para el adhesivo T_02 la máxima sensibilidad para los dos únicos compuestos detectados se obtuvo con la fibra PDMS/ DVB (Figura 1.15)

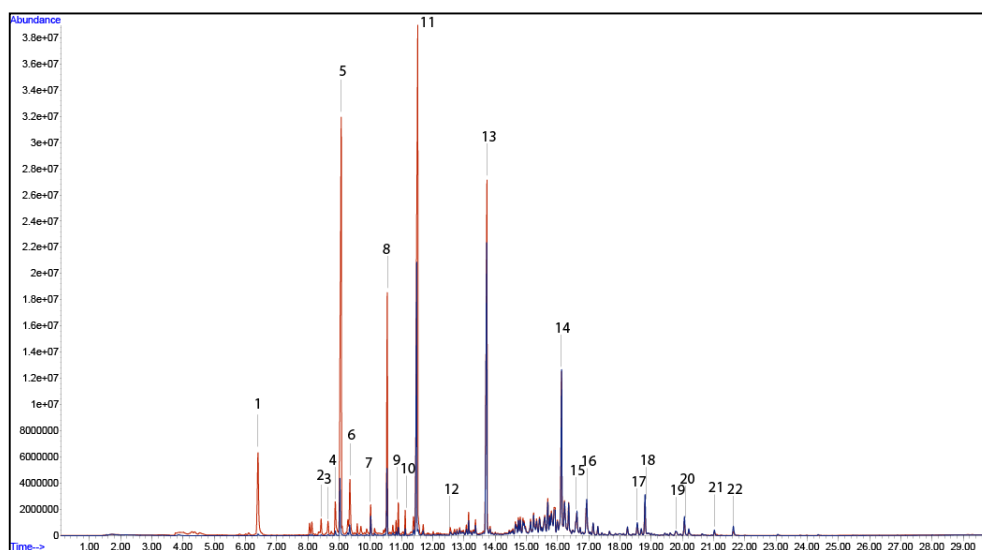


Figura 1.14: Cromatograma HS-SPME-GC-MS del adhesivo T_01 puro (trazo rojo) y curado (trazo azul) analizado con la fibra PDMS.

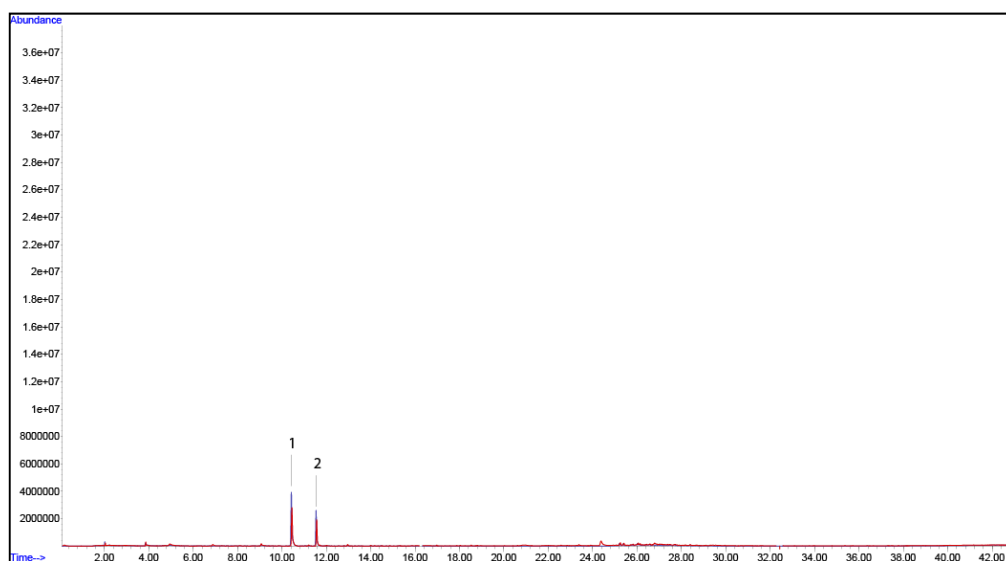


Figura 1.15: Cromatograma HS-SPME-GC-MS del adhesivo A2 puro (trazo rojo) y curado (trazo azul) analizado con la fibra PDMS/DVB.

Comparando el adhesivo crudo frente al curado (temperatura de curado entre 160-180°C) en ambos adhesivos, se observó que para el adhesivo T_01, la mayor parte de los compuestos se encontraron en ambos estados. No obstante, la concentración de los compuestos cambiaba durante el proceso de curado. Mientras algunos compuestos como el dehidroabietal y dehidroabietato de metilo incrementaron su señal, otros como el 9,10-dihidroantraceno y 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol la disminuyeron. El adhesivo T_02 presentaba una ligera variación en la señal cuando se curaba el adhesivo.

Una vez seleccionada la fibra, se continuó con la optimización de las condiciones de extracción para la identificación de los compuestos. Para ello se llevó a cabo un diseño de experimentos utilizando el programa MODDE v.6 (Umetrics AB) con el de modelo superficie de respuesta centrado en las caras.

Como las variables a estudiar eran tres (temperatura extracción, tiempo de extracción y tiempo de desorción), el número de experimentos fue 17 ($2f + 2f + n$, siendo f el número de factores a considerar y n el número de centros (que eran 3). El diseño de experimentos se muestra en la Tabla 1.3

Tabla 1.3: Diseño de experimentos

Nº	t _{des} (min)	t _{ext} (min)	Text (°C)
1	1	10	40
2	15	10	40
3	1	25	40
4	15	25	40
5	1	10	80
6	15	10	80
7	1	25	80
8	15	25	80
9	1	15	60
10	15	15	60
11	8	1	60
12	8	25	60
13	8	15	40
14	8	15	80
15	8	15	60
16	8	15	60
17	8	15	60

Una vez realizados los experimentos en el orden indicado se evaluó la validez del modelo. Para ello se estudiaron los siguientes parámetros:

- **R2:** mide la capacidad del modelo para interpretar las respuestas que se han obtenido.
- **Q2:** mide la capacidad del modelo para predecir respuestas dentro del rango estudiado.
- **Validez del modelo.** Es una medida del ajuste de los datos por el modelo y del error del mismo. Valores menores de 0,25 indican falta de ajuste y que el error del modelo es mayor que el error experimental asociado a la reproducibilidad. Un valor de 1 indica que el modelo es perfecto.

- **Reproducibilidad:** mide la reproducibilidad del modelo de acuerdo con la respuesta obtenida en los centros.

Estas variables pueden tener valores entre 0 y 1. Valores próximos a 1 indican que el modelo tiene alto poder predictivo y buena reproducibilidad.

Como se muestra en la Figura 1.16, se obtenían valores próximos a 1 tanto para la R2 como la Q2, sobre todo para los compuestos a partir de 5-metilpentadecano. La reproducibilidad del modelo era muy buena para todos los compuestos y la validez del modelo era entre 0,6-0,7, con un aumento considerable hasta 0,95 para reteno.

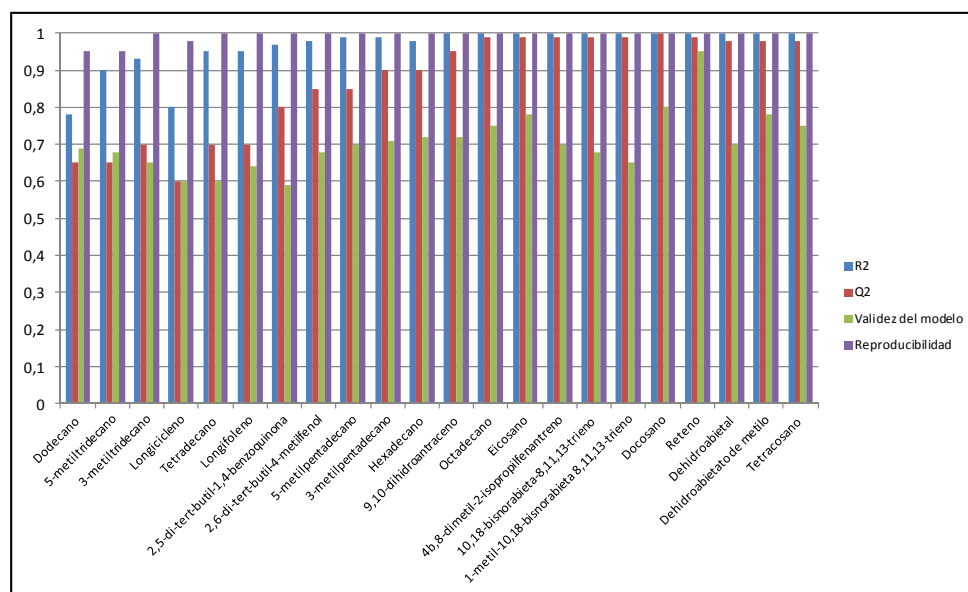


Figura 1.16: Validez del modelo de optimización para los compuestos identificados.

La respuesta de las variables más importantes en la extracción de los compuestos de los adhesivos, obtenida con el modelo se muestra en la siguiente Figura 1.17. Se representa la influencia por el incremento de las variables estudiadas en el área extraída de todos los compuestos. Las

variables son significativas cuando el intervalo de confianza no cruza el valor cero.

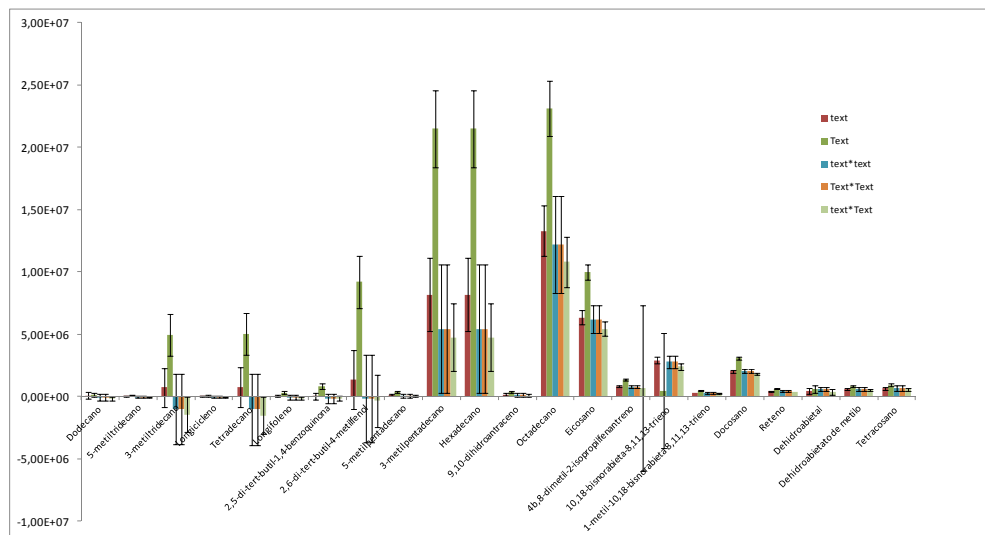


Figura1.17: Variables significativas en la extracción de los compuestos.

Como puede verse, el tiempo de desorción (no representado) no es una variable significativa, ya que sus intervalos de confianza cruzan el cero para todos los compuestos.

Se puede observar que al incrementar la temperatura de extracción (Text) y el tiempo (text) se incrementa también la extracción en la mayoría de los compuestos estudiados (el área).

Las variables cuadráticas indican la presencia de máximos cuando toman valores contrarios a la variable simple. Para los compuestos a partir del 5-metilpentadecano la variable Text*Text y text*text es significativa y observamos que es positiva, al igual que la variable simple Text y text, lo que indica que no existe ningún máximo dentro del rango estudiado.

Las variables cruzadas text*Text indican si se produce un aumento o disminución de la señal cuando aumentamos las dos variables a la vez. En este caso, cuando incrementamos las dos variables a la vez, para los compuestos como el 5-metilpentadecano se produce una disminución de señal. En cambio para el resto de compuestos, al incrementar ambas se produce un incremento de la señal. Por tanto, este hecho puede ser debido a que en los compuestos menos volátiles, al aumentar ambas variables se favorece el paso de los compuestos menos volátiles al espacio de cabeza del vial, se produce un desplazamiento en los centros activos de la fibra y en consecuencia los compuestos menos volátiles se extraen más.

Por tanto las condiciones óptimas suponen una solución de compromiso, ya que las condiciones buscadas son aquellas para las que se extraen el mayor número de compuestos y en mayor proporción, aunque para algunos compuestos las condiciones utilizadas no sean las mejores.

Finalmente las condiciones seleccionadas fueron:

- Temperatura de extracción: 80 °C.
- Tiempo de extracción: 25 minutos.
- Tiempo de desorción: 1 minuto, el menor, ya que, no era una variable significativa para los compuestos estudiados.

3.2. IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN SEGÚN LA TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS DETECTADOS EN LOS ADHESIVOS

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas, se llevó a cabo la identificación de los compuestos comparando el tiempo de retención y el espectro de masas con los estándares puros. La Tabla 1.2 muestra los compuestos identificados en ambos adhesivos así como su nivel de toxicidad según las reglas de Cramer (apartado 2.4).

En el adhesivo T_01 curado, se detectaron 22 compuestos. La mayoría de estos compuestos presentaban una toxicidad baja o moderada, sólo dos compuestos presentaban una toxicidad alta según las reglas de Cramer, el 9,10-dihidroantraceno y el reteno. Estos compuestos son derivados del ácido abiético que es el compuesto principal de las resinas ácidas utilizadas para la fabricación de este adhesivo. Este se utiliza como taquificante para aumentar la pegajosidad y así mejorar la adhesión con los sustratos (Petrie, 2000a; Petrie, 2000b). Cuando el adhesivo se calienta para ser curado, el ácido abiético experimenta una degradación térmica. Varios autores consideran que la degradación comienza con la deshidrogenación del ácido abiético a dehidroabietato de metilo (21^a), y este experimenta una descarboxilación para dar 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno (16^a) y posteriormente una aromatización a reteno (19^a). Los compuestos 15^a, 17^a y 20^a serían los compuestos intermedios de la degradación térmica del ácido abiético (Marchand-Geneste and Carpy, 2003; Rogge, et al., 1998; Simoneit, et al., 1993).

Los compuestos 4^a, 6^a son aceites esenciales de las resinas ácidas (Jeong-Ho, et al., 2008).

En el adhesivo T_02, únicamente se detectaron dos compuestos cis y trans-decahidronaftaleno y ninguno de estos tenía un nivel considerable de toxicidad según las reglas de Cramer. Según bibliografía, los adhesivos basados en poliolefinas están formados por compuestos puros con elevado peso molecular (Petrie, 2000b), por esta razón únicamente se detectaron dos compuestos volátiles por HS-SPME.

3.3. CONCENTRACIÓN INICIAL EN EL ADHESIVO

De los tres disolventes estudiados para la extracción de los compuestos presentes en el adhesivo, el disolvente que presentaba mejores resultados era el diclorometano frente al metanol y el hexano, debido a su alto poder de extracción de los compuestos del adhesivo. Con el metanol solo se detectaron los compuestos más polares como el 2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol y el 9,10-dihidroantraceno. El disolvente hexano extraía todos los compuestos, igual que el diclorometano, pero su poder de extracción era menor para otros compuestos, como por ejemplo los alcanos alifáticos.

Para extraer más del 98% de todos los compuestos del adhesivo, se necesitaron tres extracciones.

Las rectas de calibrado se prepararon a partir de disoluciones de distintas concentraciones de los distintos patrones en diclorometano y se analizaron por GC-MS. Los parámetros analíticos se muestran en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4: Parámetros analíticos del método GC-MS

Compuestos	Ecuación	R ²	Rango lineal (µg/g)	LOD (µg/g)	RSD (%)
2,6-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	$y = 0,066x - 0,004$	0,999	0,59-23,8	0,18	5,31
2,6-di-tert-butil-4-metilfenol	$y = 1,82x$	0,997	0,09-13,8	0,03	3,66
Hexadecano	$y = 0,570x - 0,093$	0,996	0,36-9,61	0,12	8,44
9,10-dihidroantraceno	$y = 1,42x$	0,999	0,13-4,78	0,04	4,42
Octadecano	$y = 0,580x - 0,093$	0,995	0,99-7,43	0,29	8,61
Eicosano	$y = 0,557x + 0,004$	0,999	1,55- 6,97	0,46	2,31
Docosano	$y = 0,241x - 0,004$	0,999	0,79-6,09	0,24	9,70
Reteno	$y = 0,641x - 0,012$	0,998	0,23-48,6	0,07	6,22
Tetracosano	$y = 0,311x - 0,003$	0,991	0,16-13,8	0,05	7,39

Todos los compuestos presentaban una RSD menor del 10%. Los límites de detección (LODs) estaban comprendidos entre 0,03 µg/g de 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol a 0,46 µg/g para eicosano.

La Tabla 1.5 muestra los valores de concentración inicial (C_{p0}) del adhesivo T_01, ya que para el adhesivo T_02, no se detectaron los dos compuestos para poder cuantificarlos en el laminado.

Por tanto únicamente se trabajó con los laminados 1 y 2.

Por otro lado, se cuantificó la concentración de los compuestos del adhesivo en ambos sustratos utilizados para formar el laminado 1 y 2.

Tabla 1.5: Concentración inicial en el adhesivo T_01 (CP_0) expresado en μg de compuesto por g de adhesivo curado y concentración de los compuestos en los sustratos expresados en μg de compuesto por dm^2 de sustrato.

Compuestos	CP_0 ($\mu\text{g/g}$)	Concentración en el sustrato C ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)	Concentración sustrato CPP ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	250±41		
2,6-di-tert-butil-4-metilfenol	220±36		1,63±0,13
Hexadecano	430±65	0,4±0,03	1,69±0,13
9,10-dihidroantraceno	15±4		
Octadecano	1000±150	1,85±0,15	4,42±0,35
Eicosano	1300±200	0,85±0,07	2,74±0,22
4b-8-dimetil-2- isopropilfenantreno	120±19		
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	630±79		
1-metil-10,18-bisnorabieta- 8,11,13-trieno	140±26		
Docosano	2300±63	8,6±0,69	7,41±0,59
Reteno	34±5		
Dehidroabietal	340±58	0,42±0,03	
Dehidroabietato de metilo	700±85	0,32±0,02	
Tetracosano	4000±540	14,82±1,19	14,23±1,14

Los compuestos 4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno, 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno, 1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno y dehidroabietal, dehidroabietato de metilo se cuantificaron con reteno como estándar, debido a su estructura química similar y a la dificultad de encontrar estos compuestos.

Los compuestos mayoritarios en el adhesivo T_01 eran los alcanos con una concentración desde 430±65 para el hexadecano hasta 4000±540 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{adhesivo}}$ para el tetracosano. Estos provenían de la parafina que se utiliza habitualmente como cera para reducir viscosidad, alterar la velocidad de fijación y reducir costos en los adhesivos termofusibles EVA (Petrie, 2000b). Los compuestos derivados del ácido abiético estaban también presentes en el adhesivo a alta concentración, como por ejemplo dehidroabietato de metilo, con una concentración de 700±85 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{adhesivo}}$.

De los compuestos presentes en ambos sustratos se encontraban los alcanos y algunos derivados del ácido abiético, ya que este compuesto proviene del ester de colofonia que forma parte de la resina de los pinos que se emplea para la fabricación de papel (Valto, et al., 2008).

3.4. COEFICIENTES DE PARTICIÓN

Los coeficientes de partición para los laminados 1 y 2, entre el adhesivo-sustrato ($K_{A,S}$), se calcularon según la Ecuación 1.1, que representa la relación entre la concentración en el adhesivo $C_{eq(A)}$ frente a el sustrato $C_{eq(S)}$ ambas en equilibrio.

Para calcular este coeficiente, tras permanecer los sándwich en la celda de migración, se analizaron 0,5 g de sustrato extrayendo 3 veces consecutivas con diclorometano según la metodología optimizada en el apartado 2.5 y determinando así la $C_{eq(S)}$. Posteriormente se calculó la $C_{eq(A)}$ a partir del balance de materia, ecuación 1.3, a partir de la C_{p0} calculada anteriormente.

La Tabla 1.6 muestra los coeficientes de partición entre el adhesivo T_01 y ambos sustratos C y CPP ($K_{T_01,C}$ y $K_{T_01,CPP}$) en los laminados 1 y 2.

Estos coeficientes se calcularon a dos temperaturas 40°C y 60°C.

Tabla 1.6: Coeficientes de partición entre al adhesivo-cartón ($K_{T_01/C}$) y adhesivo-cartón con polipropileno ($K_{T_01/PPP}$) a dos temperaturas

Compuestos	$K_{T_01/C}$		$K_{T_01/PPP}$	
	40°C	60°C	40°C	60°C
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	720	36	1130	110
2,6-di-tert-butil-4-metilfenol	20	28	140	80
Hexadecano	150	70	60	26
9,10-dihidroantraceno	15	0,5	220	190
Octadecano	110	67	53	20
Eicosano	90	64	110	50
4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno	110	35	820	370
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	170	45	2800	620
1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	380	80	930	430
Docosano	68	33	70	40
Reteno	30	9	150	45
Dehidroabietal	370	70	1700	750
Dehidroabietato de metilo	850	130	2700	540
Tetracosano	100	40	500	130

Como puede observarse, se obtuvieron un amplio rango de coeficientes de partición según el tipo de compuesto estudiado. Este hecho, se podría atribuir a la diferencia de solubilidad de los compuestos tanto en el adhesivo como en los sustratos.

Esta solubilidad, llamada solubilidad Hildebrand (∂), es un parámetro numérico que indica la relativa afinidad de un compuesto en un medio determinado. Dos materiales son solubles cuando sus fuerzas intermoleculares son similares, y por tanto tienen similares valores de ∂ . Es decir un pequeño valor de diferencia de solubilidad $\Delta\partial$ ($\Delta\partial = |\partial_1 - \partial_2|$) entre dos sustancias 1 y 2 indica una buena solubilidad entre ambos (AIC, 1984; Durkee, 2004a; Durkee, 2004b; Tehrany and Desobry, 2004; Wisniewski, et al., 1995). Por tanto, se puede definir la solubilidad para el adhesivo ∂_A , y para el compuesto migrante ∂_m . Si la diferencia entre ambos valores es pequeña ($\Delta\partial_{Am} = |\partial_A - \partial_m|$) indicará una buena solubilidad del migrante en el adhesivo. Por el mismo razonamiento, se puede definir $\Delta\partial_{Sm} = |\partial_S - \partial_m|$ donde ∂_S corresponde a la solubilidad del sustrato.

En general, como todos los valores de partición entre el adhesivo y el sustrato, $K_{A,S}$ son muy superiores a la unidad, esto indica que la solubilidad de los compuestos era mucho mayor en los adhesivos que en los sustratos utilizados para la fabricación de los laminados y por tanto, $\Delta\delta_{Am} < \Delta\delta_{Sm}$, con lo que los compuestos van a presentar una gran tendencia a permanecer en el adhesivo.

De acuerdo con la literatura, el valor de solubilidad de Hildebrand para el polímero EVA (δ_A) corresponde aproximadamente a $17,5 \text{ MPa}^{1/2}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Barton, 1990b). Y para los migrantes (δ_m) como el hexadecano corresponde a $16,3 \text{ MPa}^{1/2}$, $20,3 \text{ MPa}^{1/2}$ para el 9,10-dihidroantraceno, $16,4 \text{ MPa}^{1/2}$ para el octadecano, $16,5 \text{ MPa}^{1/2}$ para el eicosano, $20,2 \text{ MPa}^{1/2}$ para el reteno (Barton, 1991) y $24,1$ para el 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (AIC, 1984). Para el resto de compuestos estudiados no se encontraron datos de solubilidad bibliográfica.

Se observa en la Tabla 1.6, que los coeficientes de partición entre el adhesivo y el cartón C ($K_{T_{01,C}}$) eran mayores para los compuestos con valores más bajos de $\Delta\delta_{Am}$ como el hexadecano ($\Delta\delta_{Am}=1,2$), el octadecano ($\Delta\delta_{Am}=1,1$) y el eicosano ($\Delta\delta_{Am}=1,0$), que los compuestos con valores superiores de $\Delta\delta_{Am}$ como el 9,10-dihidroantraceno ($\Delta\delta_{Am}=4,3$), reteno ($\Delta\delta_{Am}=2,7$) y 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol ($\Delta\delta_{Am}=6,6$), en los cuales se obtenían valores inferiores de $K_{T_{01,C}}$. Esto indica que la solubilidad de los compuestos en el adhesivo juega un papel muy importante en el valor de $K_{T_{01,C}}$.

Para el laminado 2, fabricado con el sustrato de cartón laminado con polipropileno, se observaron dos tendencias claras en las constantes de partición $K_{T_{01,PP}}$. Por un lado, todos los compuestos presentaban mayores valores de constantes de partición en este laminado que en el laminado

fabricado únicamente con cartón, exceptuando tres compuestos. Esto indicaba que la solubilidad de la mayoría de compuestos en la lámina de polipropileno, CPP, era menor que para el sustrato formado únicamente de cartón C, y por tanto, tendrían más tendencia a permanecer en el adhesivo, con lo que la cantidad de estos compuestos en el sustrato de CPP en equilibrio sería más pequeña ($K_{T_01,CPP}$ mayores).

Por otro lado, los tres compuestos que presentaban menores constantes de partición $K_{A,CPP}$ eran el hexadecano, octadecano y eicosano. Según los valores de solubilidad señalados anteriormente y el valor de solubilidad de Hildenbrand para el polímero de polipropileno, δ_S , 16 MPa^{1/2} (Barton, 1990c), la diferencia de solubilidad $\Delta\delta_{Sm}$ entre los compuestos hexadecano, octadecano y eicosano con el polipropileno son menores que con el adhesivo $\Delta\delta_{Am}$ (0,3, 0,4 y 0,5 frente a 1,2, 1,1 y 1,0 respectivamente), por tanto implica una mejor solubilidad en el polipropileno que en el adhesivo. Este hecho se refleja en una disminución de las constantes de partición $K_{T_01,CPP}$ frente a $K_{T_01,C}$, para estos tres compuestos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, para el resto de compuestos no se encontraron sus valores de solubilidad de Hildebrand en bibliografía. Pero esta se puede explicar mediante la ecuación de Hansen, Ecuación 1.4, la cual expresa una versión actualizada de la solubilidad de Hildebrand, donde depende de tres tipos de interacciones: fuerzas de dispersión (δ_D), fuerzas de atracción entre compuestos polares (δ_P) y fuerzas debidas a puentes de hidrógeno (δ_H) (AIC, 1984; Tehrany and Desobry, 2004; Wisniewski, et al., 1995), y corresponde a:

$$\delta = \sqrt{\delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2} \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

Para los compuestos aromáticos el principal parámetro que influye en la solubilidad de Hildebrand son las fuerzas de dispersión, las cuales son más importantes en los hidrocarburos aromáticos que en los alifáticos. Cuanto mayor sea el número de anillos aromáticos en un compuesto, mayor serán estas fuerzas de dispersión y por tanto, será más difícil que se disuelvan en el adhesivo (un hidrocarburo alifático). Esto podía explicar por qué el reteno (3 anillos aromáticos) y el 9,10-dihidroantraceno (2 anillos aromáticos) tenían coeficientes de partición más bajos (Chen, et al., 2005).

Además de todo lo explicado anteriormente, hay que tener en cuenta, que los coeficientes de partición estarán también influenciados por la afinidad de los compuestos por ser adsorbidos por el cartón. Esta afinidad depende principalmente de la polaridad y de la estructura de los compuestos migrantes ya que interaccionarán de forma distinta con la pulpa según el cartón (Chen, et al., 2005; Nerín and Asensio, 2004).

Para estudiar la influencia de la temperatura en las constantes de partición, la Tabla 1.6 muestra que todos los compuestos, excepto el 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (que podría ser debido a fluctuaciones experimentales), presentaban valores de constantes de partición $K_{T_{01,C}}$ o $K_{T_{01,CPP}}$ inferiores al incrementar la temperatura desde 40 a 60 °C. Esto significa un incremento de la concentración de los compuestos en los sustratos.

Este resultado se puede explicar según la ecuación de Arrhenius (Tehrany and Desobry, 2004), Ecuación 1.5, que expresa la dependencia de la solubilidad de un compuesto en un polímero con la temperatura:

$$K_{A,S} = K_{A,S}^0 \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT}\right) \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

Donde $K_{A,S}^0$ es el coeficiente de partición a temperaturas muy altas $T \rightarrow \infty$, ΔH es la diferencia de entalpias de la disolución (KJ mol) del adhesivo H_A en el sustrato H_S , $\Delta H = H_A - H_S$ y R es la constante universal de los gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$).

La Tabla 1.7 muestra los parámetros para la ecuación de Arrhenius calculados a partir de las constantes de partición para el laminado 1, $K_{T_{01/C}}$. Estos valores se obtuvieron dentro del proyecto MIGRESIVES en colaboración con el Dr. Peter Mercea de la empresa FABES, a partir de las constantes de partición antes calculadas a 40 y 60°C, con datos experimentales previos del Dr Peter Mercea a temperatura ambiente, por regresión lineal, véase Figura 1.17.

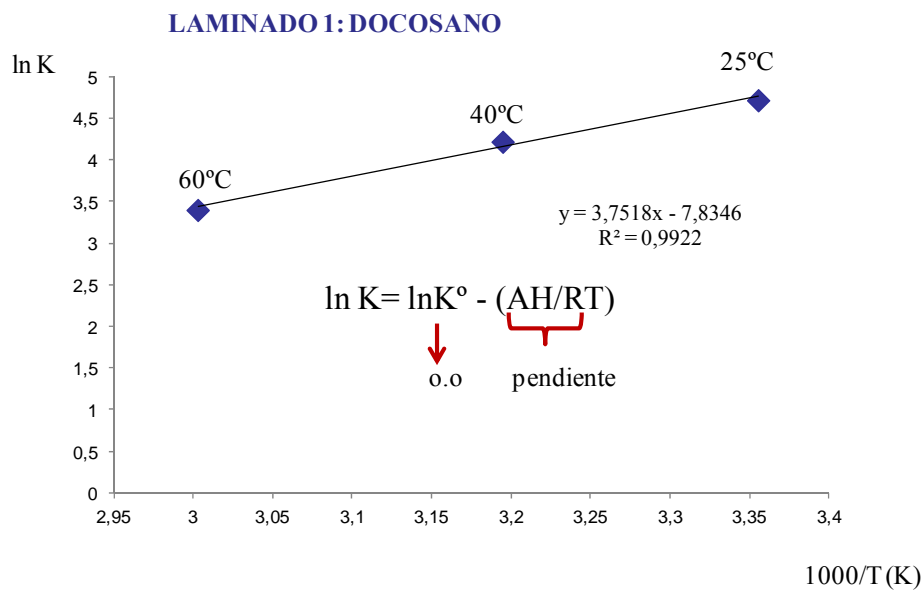


Figura 1.18: Constates de partición a distintas temperaturas para el docosano, Laminado 1

Tabla 1.7: Parámetros de la ecuación de Arrhenius, K° y $-\Delta H$, para el laminado 1.

Compounds	Parámetros de la ecuación de Arrhenius	
	$K^{\circ}_{A1,C}$	$-\Delta H$ (KJ/mol)
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	1,53E-19	129,88
2,6-di-tert-butil-4-metilfenol	5,43E+03	-14,59
Hexadecano	4,60E-04	33,05
9,10-dihidroantraceno	3,72E-24	147,50
Octadecano	2,85E-02	21,50
Eicosano	3,07E-01	14,78
4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno	5,72E-07	49,66
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	4,12E-08	57,64
1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	2,03E-09	65,67
Docosano	4,00E-04	31,35
Reteno	5,85E-08	52,21
Dehidroabietal	3,33E-10	71,21
Dehidroabietato de metilo	2,22E-11	81,43
Tetracosano	2,35E-05	39,74

En general, para una disolución endotérmica de un compuesto en un material, la entalpía $\Delta H > 0$, por tanto, según la Ecuación 1.5, al incrementar la temperatura, el término “exp $(-\Delta H/RT)$ ” se incrementaría al igual que la constante de partición, por tanto, los compuestos presentarían una mayor tendencia en el equilibrio, a permanecer en el adhesivo. El hecho de que la $K_{A,S}$ generalmente disminuyera con la temperatura (Barton, 1990a; Durkee, 2004b; Tehrany and Desobry, 2004), en los experimentos desarrollados, indicaba todo lo contrario, es decir, que la concentración del compuesto en equilibrio en los sustratos incrementaba más rápidamente que en el adhesivo al incrementar la temperatura, por tanto, se estaba representando una reacción exotérmica $\Delta H < 0$, $\Delta H = H_A - H_S$, donde $H_S > H_A$.

Los datos de entalpía ΔH que aparecen en la Tabla 1.7, muestran que la influencia de la temperatura no es la misma para todos los compuestos en el Laminado 1. Para algunos compuestos, la influencia de la temperatura tiene un mayor impacto en sus coeficientes de partición cuando $\Delta H > 100$ KJ/mol, por ejemplo, el 2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona donde su $K_{T,01/C}$

disminuía de 720 a 36 (Tabla 1.6) para 40°C y 60°C respectivamente o para el 9,10-dihidroantraceno de 15 a 0,5 (Tabla 1.6) para 40°C y 60°C respectivamente. En cambio, para otros compuestos con $\Delta H < 50$ KJ/mol, como la serie de alcanos, el impacto sobre la constante es menor, por ejemplo el eicosano cuya $K_{T_{01/C}}$ disminuía de 90 a 64 (Tabla 1.6) para 40°C y 60°C respectivamente o octadecano de 110 a 67 (Tabla 1.6) para 40°C y 60°C respectivamente.

3.5. COEFICIENTES DE DIFUSIÓN

Los experimentos de difusión, se obtuvieron para el laminado 1 y 2, ya que, al igual que en el experimento anterior para el laminado 3 y 4, fabricados con el adhesivo APAO, no se detectó ningún compuesto.

Los experimentos se realizaron tal y como se indica en el apartado 2.7. Los coeficientes de difusión se calcularon dentro del proyecto MIGRESIVES en colaboración con el Dr. Peter Mercea de la empresa FABES, una de cuyas actividades principales es el desarrollo de modelos matemáticos de difusión para la estimación teórica de la migración.

Para la obtención de las curvas de difusión de los compuestos por los distintos sustratos (10 sustratos a cada lado del laminado), se necesitaron distintos tiempos de contacto que, dependiendo del compuesto y de los sustratos, estaban comprendidas entre 24, 48 y 72 horas.

La Figura 1.19, muestra un ejemplo de la difusión del compuesto 2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona a 60 °C. En esta figura se representa el espesor de los 10 sustratos que se pusieron en contacto con el laminado para el experimento de difusión (eje x) frente a la concentración del migrante (eje

y). Los puntos rosas son las concentraciones de los compuestos en los 10 sustratos de cartón a cada lado del laminado (receptor izquierdo y derecho) encontrados experimentalmente, y la curva, es el ajuste del perfil de concentración obtenido con el algoritmo de diferencias finitas a los datos experimentales.

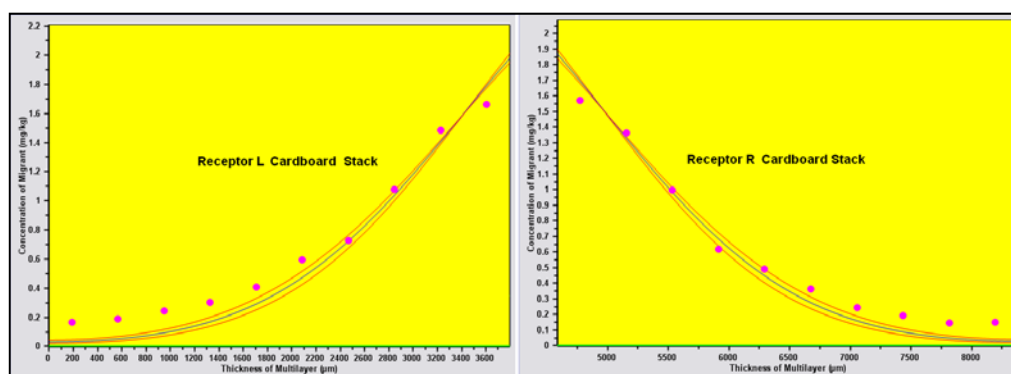


Figura 1.19: Resultados experimentales (puntos) y los calculados a partir del algoritmo (líneas) del perfil de concentración del 2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona en los experimentos de difusión, formados por un sándwich de 10 sustratos de cartón C (380 µm) a cada lado del laminado 1 para 24 horas y 60°C

Se encontraron resultados similares para la mayoría de los compuestos en el laminado 1 a 40 y 60 °C. Sin embargo para algunos compuestos a partir del 1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno, no se obtuvieron datos experimentales de difusión, ya que dichos compuestos no difundían hasta la última capa en las condiciones del experimento y por tanto no era posible obtener el perfil de concentraciones, ni por tanto la curva de ajuste según el modelo de diferencias finitas.

Lo mismo ocurría en el laminado 2, donde el polipropileno de los sustratos formados por cartón con polipropileno laminado, impedía la penetración/difusión de los compuestos migrantes y después de 72 horas, no se detectaron estos compuestos en las capas del sándwich. Este hecho

impedía un buen ajuste del modelo para obtener los valores de las constantes de difusión.

Un incremento del tiempo de ensayo (más de 72 horas) con el objetivo de dar tiempo a que los compuestos migraran, no habría resuelto necesariamente todos los problemas. Ya que el hecho de que los sustratos añadidos estuvieran formados por una película de polipropileno recubierta con un cartón, significaba que el sándwich estaba formado por 2x10 capas de PP en contacto con 2x10 capas de cartón a cada lado. Por tanto, no se estaba hablando de un material homogéneo, donde a una temperatura dada, la solubilidad de los compuestos en estos dos materiales era la misma. Además, existía una partición entre el polipropileno y el cartón en cada interface $K_{PP,C}$ que proporcionaría una dificultad añadida a la hora de interpretar la Ecuación 3 de Fick's, para el diseño de la curva de ajuste del modelo de diferencias finitas. Este hecho, impedía el cálculo de las constantes de difusión D_{CPP} .

La Tabla 1.8 muestra los resultados de los coeficientes de difusión para el adhesivo T_01, D_{T_01} , y en el sustrato de cartón, D_C , ambos a temperaturas de 40 y 60 °C, calculados a partir del algoritmo de diferencias finitas.

Tabla 1.8: Coeficientes de difusión para el adhesivo T_01 (D_{T_01}) y para el cartón (D_C) expresados en cm^2/s , así como el peso molecular (PM) de los compuestos migrantes.

Compuestos	PM (g/mol)	D_{T_01} (cm^2/s)		D_C (cm^2/s)	
		40°C	60°C	40°C	60°C
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	220,3	1,0E-08	8,7E-08	2,4E-08	1,6E-07
2,6-di-tert-butil-4-metilfenol	220,3	8,0E-09	4,8E-08	1,2E-08	7,2E-08
Hexadecano	226,5	1,1E-08	7,4E-08	1,6E-07	5,6E-07
9,10-dihidroantraceno	180,3	1,0E-08	5,5E-08	1,9E-08	6,0E-08
Octadecano	254,6	8,2E-09	4,4E-08	4,4E-08	2,0E-07
Eicosano	282,6	5,3E-09	2,9E-08	1,2E-09	7,0E-08
4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno	256,5	7,5E-09	4,3E-08	4,6E-09	3,0E-08
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	242,4	7,1E-09	4,3E-08	1,2E-08	4,6E-08
Docosano	310,7	5,8E-09	3,4E-08	8,8E-09	4,0E-08

Se observa una gran variedad de valores de difusión dependiendo de la naturaleza del compuesto migrante, la matriz donde se encuentra este (adhesivo o el sustrato) y la temperatura.

Según bibliografía, los principales parámetros que afectan a los coeficientes de difusión son el peso molecular del compuesto, el grado de cristalinidad del polímero y la temperatura a la cual se produce la difusión (Crank and Park, 1968; Fieldson and Barbari, 1993; Gajdos, et al., 2001). Otros parámetros como la geometría, la polaridad del compuesto o la interacción entre el compuesto-polímero también están relacionados, pero son de menor importancia (Dole, et al., 2006; Fieldson and Barbari, 1995). Es conocido que los coeficientes de difusión son mayores para moléculas más pequeñas y para polímeros con un grado de cristalinidad bajo o con menor espesor (Escobal, et al., 1999; Limam, et al., 2005).

La Tabla 1.8 muestra que los coeficientes de difusión para el adhesivo a 40°C, D_{T_01} , eran más bajos para los compuestos con mayor peso molecular como el docosano, 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno, 4b-8-

dimetil-2-isopropilfenantreno y octadecano que para los compuestos de menor peso molecular. Los valores obtenidos para los compuestos de menor peso molecular como el hexadecano, 2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona y 9,10-dihidroantraceno presentaban un coeficiente de difusión similar a trabajos bibliográficos en un polímero EVA (Dole, et al., 2006). La misma tendencia se encontró para los coeficientes de difusión de los compuestos en el sustrato de cartón D_C .

La temperatura también tenía una gran influencia en la difusión de las moléculas. La Tabla 1.8 muestra que los coeficientes de difusión se incrementaban en función de la temperatura. Los coeficientes de difusión para el adhesivo y el sustrato eran significativamente superiores a 60°C que a 40°C ($p < 0.01$) y ($p < 0.05$) respectivamente.

Según bibliografía la difusión en polímeros elásticos (por tanto en el adhesivo) es un proceso térmicamente activo según la ecuación de Arrhenius (Crank and Park, 1968; Gajdos, et al., 2001; Klopffer and Flaconnèche, 2001), Ecuación 1.6:

$$D(T) = D_0 \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right) \quad (\text{Ecuación 1.6})$$

Donde D_0 es el coeficiente de difusión para temperaturas muy altas. $T \rightarrow \infty$ y E_D es la energía de activación para la difusión de un compuesto. Ambos parámetros dependen de la morfología del polímero, de su tamaño, que afecta a la capacidad de penetración, y también están influenciados por la temperatura (Crank and Park, 1968; Gajdos, et al., 2001; Klopffer and Flaconnèche, 2001).

Al incrementar los coeficientes de difusión con la temperatura, según la Tabla 1.8, significaba que E_D era positiva tanto para el adhesivo como para el sustrato. Como consecuencia, D es una función que se incrementa al

aumentar la temperatura, como un volumen libre directamente relacionado con la expansión de las cadenas de los compuestos que forman el polímero, permitiendo más fácilmente la difusión de las moléculas (Gnanasekharan and Floros, 1997; Klopffer and Flaconnèche, 2001).

Dado que no se encontró literatura sobre difusión en cartón, la discusión sobre los resultados obtenidos se basó en las propiedades del papel o cartón. El papel es una red de fibras de celulosa naturales formadas por microfibras porosas las cuales están compuestas de cadenas largas higroscópicas en un estado cristalino, con regiones amorfas. Las propiedades del transporte en este medio poroso dependerán principalmente de su porosidad, tortuosidad y su permeabilidad (Dury-Brun, et al., 2006; Eggleston and Peirce, 1995; Horgan, 1999; Kacem, et al., 2009; Moldrup, et al., 1998; Triantafyllou, et al., 2005). Para la mayoría de los compuestos la difusión en el cartón fue mayor que en el adhesivo.

Se puede reducir en una determinada aplicación, el efecto de la porosidad y higroscopicidad de papel y cartón cubriéndolos con un material no poroso (por ejemplo una película polimérica de los laminados 3 y 4). Este recubrimiento puede disminuir considerablemente el transporte de compuestos a través del papel o sustrato de cartón. Esta es probablemente la razón por la cual no se obtuvieron resultados en los experimentos de difusión llevados a cabo en el sándwich formado por láminas de CPP.

Según la ecuación de Arrhenius, Ecuación 1.6, la constante de difusión depende de las constantes D_0 y E_D . Al igual que en el estudio de partición, estos valores se podían calcular por una regresión lineal de los valores de difusión obtenidos para estas dos temperaturas junto con valores de difusión a temperatura ambiente de trabajos previos del Dr Peter Mercea de la empresa FABES. La Figura 1.20 muestra un ejemplo de la regresión

lineal de los valores de difusión experimentales obtenidos, tanto para el adhesivo como para el cartón, para el compuesto del octadecano.

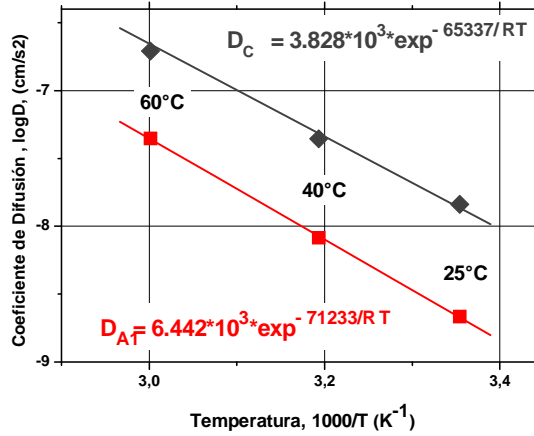


Figura 1.20: Dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura para el octadecano, resultados experimentales (puntos negros para la difusión en el cartón y puntos rojos para la difusión en el adhesivo) y regresión lineal calculada por Peter Mercea.

En la siguiente tabla, Tabla 1.9, se muestran los parámetros D_0 y E_D para cada compuesto en el adhesivo T_01 y en el cartón C calculados a partir de estas regresiones lineales.

Tabla 1.9: Parámetros de la ecuación de Arrhenius, D_0 y E_D , para el laminado 1.

Compuestos	Parámetros de la ecuación de Arrhenius para T 01		Parámetros de la ecuación de Arrhenius para C	
	$D_0(T_{01})$ (cm^2/s)	$E_D(T_{01})$ (kJ/mol)	$D_0(C)$ (cm^2/s)	$E_D(C)$ (kJ/mol)
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	8,4E+05	82,99	7,5E+04	74,64
2,6-di-tert-butil-4-metilfenol	5,5E+04	83,16	3,7E+03	68,50
Hexadecano	6,6E+06	88,86	9,6E+06	83,79
9,10-dihidroantraceno	7,4E+04	77,24	12	52,84
Octadecano	6,4E+03	71,23	3,8E+03	65,34
Eicosano	8,9E+03	73,26	1,2E+04	71,79
4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno	2,1E+05	80,82	2,1E+03	69,84
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	1,8E+05	80,44	26	55,90
Docosano	2,4E+06	88,12	64	58,83

Al igual que ocurría en la partición, la naturaleza del compuesto migrante va a depender principalmente de los parámetros que afectan a la difusión con un cambio de temperatura.

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método HS-SPME-GC-MS para identificar los compuestos presentes en dos adhesivos termofusibles ampliamente utilizados para envase alimentario multicapa. La formulación de ambos era muy diferente dependiendo del polímero base. Mientras que para el adhesivo base EVA se detectaron un total de 22 compuestos, para el adhesivo base APAO únicamente se detectaron dos compuestos, resultado muy interesante para la industria alimentaria. De los compuestos procedentes del adhesivo base EVA muchos eran derivados del ácido abiético, un compuesto utilizado como promotor de adhesión en el proceso

de fabricación de dicho adhesivo. Dos de estos compuestos presentaban una toxicidad alta según el modelo teórico de Cramer, 9,10-dihidroantraceno y reteno.

También se ha desarrollado un método de LE-GC-MS para determinar sus concentraciones iniciales en el adhesivo, así como sus coeficientes de partición y difusión en los diferentes materiales utilizados para la fabricación del laminado, formados con sustratos de cartón y cartón con polipropileno. Estos datos proporcionaban una herramienta muy útil para evaluar su potencial de migración al alimento.

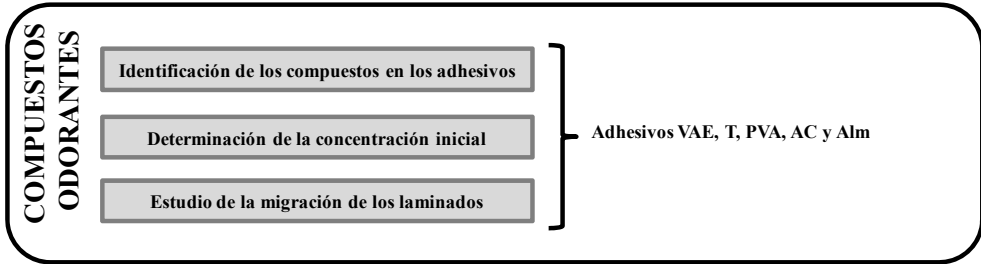
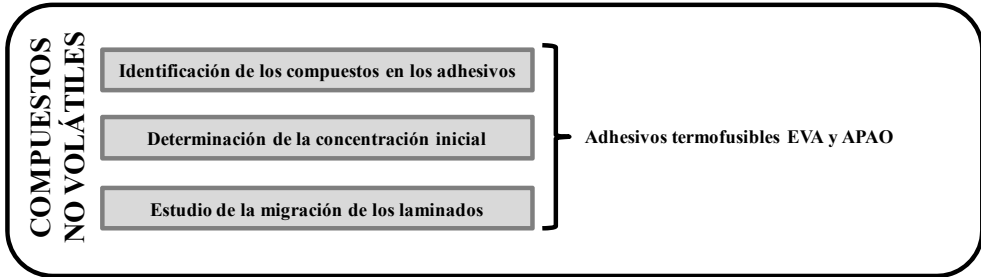
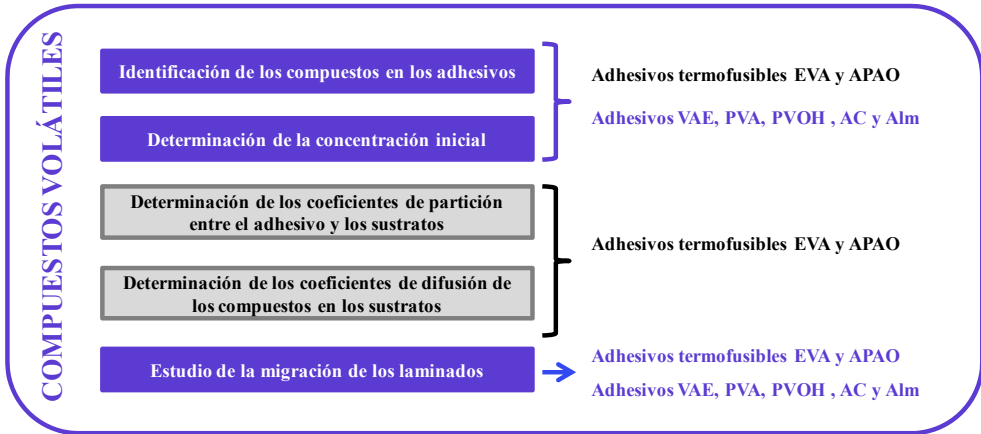
Los resultados mostraban que los sustratos utilizados para la fabricación de dichos laminados jugaban un papel importante en los coeficientes de partición y difusión de los compuestos ya que el uso de cartón recubierto con una lámina de polipropileno, reducía la migración de la mayoría de estos compuestos.

Por otro lado, los coeficientes de partición dependían principalmente de la solubilidad de los compuestos, tanto en el adhesivo como en el sustrato, y de la facilidad de dichos compuestos para ser absorbidos por el cartón. Y los coeficientes de difusión dependían de la naturaleza del compuesto migrante, de la matriz del adhesivo y del sustrato.

Otro factor importante que afectaba a estas constantes era la temperatura, mostrando efectos contrarios. Cuando esta se incrementaba, todos los coeficientes de difusión aumentaban, al contrario de los coeficientes de partición que disminuían, lo cual significaba que su incremento favorecía la migración de los compuestos, como cabía esperar.

CAPÍTULO 2:

*ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LOS
ADHESIVOS EN EL ENVASE MULTICAPA
PARA ENVASAR ALIMENTOS*



ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LOS ADHESIVOS EN EL ENVASE MULTICAPA PARA ENVASAR ALIMENTOS.

1. INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO

Como se ha comentado en el capítulo anterior, los adhesivos están presentes en la mayoría de los envases alimentarios. Sin embargo, no existe una legislación vigente específica acerca de la migración de estos. Todos los materiales para contacto alimentario deben de cumplir con el Reglamento Marco 1935/2004/CE. En ausencia de legislación específica, europea y nacional, debería aplicarse el Reglamento 10/2011/EU relativo a los materiales y artículos plásticos, y la legislación española, Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, así como, el principio de barrera funcional, que establece que se pueden utilizar sustancias que no estén en listas positivas de las anteriores legislaciones, siempre que su migración este por debajo de 10 µg/Kg de alimento o que dicho compuesto no haya sido clasificado como mutagénico, carcinogénico o tóxico para la reproducción en la directiva 67/548/EEC.

Para estudiar si dichos adhesivos estaban cumpliendo la normativa anteriormente descrita, se llevaron a cabo ensayos de migración con treinta muestras de mercado suministradas por distintas compañías de adhesivos dentro del paquete de trabajo IV del proyecto MIGRESIVES. Estas estaban formadas por la estructura de laminado [sustrato-adhesivo-sustrato], en la que los sustratos, en todos los casos, eran algún tipo de cartón o papel. Se

aplicaron las condiciones de ensayo, según la normativa vigente para la determinación de la migración para papel y cartón UNE-EN 14338 que establece, que la migración desde materiales formados con papel y cartón debe de realizarse con Tenax ® como simulante alimentario para alimentos secos. Este, es un polímero blanco de poli(óxido de 2,6-difenil-p-fenileno), en forma de polvo fino.

Otro de los objetivos de este capítulo, tras la realización de los ensayos de migración, era validar el modelo matemático de migración Migratest ® desarrollado en el proyecto MIGRESIVES, como una herramienta que permitiera a las empresas evaluar la migración de los componentes de forma sencilla, barata y rápida. Para validar dicho modelo se compararon los resultados experimentales de migración obtenidos en este capítulo con los valores predichos por el modelo matemático (desarrollado con los datos de partición y difusión calculados en el capítulo anterior).

Como los laminados estudiados estaban formados por distintos tipos de adhesivos, era imprescindible identificar los compuestos presentes en dichos adhesivos que serían los migrantes potenciales, y posteriormente realizar los ensayos de migración para determinar su concentración en los simulantes o alimentos. Previo a este último apartado, fue necesario optimizar las condiciones de análisis para el trabajo con el Tenax ®.

Tras el ensayo de migración, se compararon todos los resultados de migración con los obtenidos por el modelo matemático Migratest ®, con el fin de validar dicho modelo.

Una vez realizados los ensayos de migración, los valores obtenidos para los laminados formados con el adhesivo termofusible T_01, lam_29 y

30, se compararon para ver como estaban influenciados con las constantes de partición y difusión antes estudiadas en el capítulo 1.

La Figura 2.1 muestra un esquema del desarrollo del trabajo realizado en este capítulo.

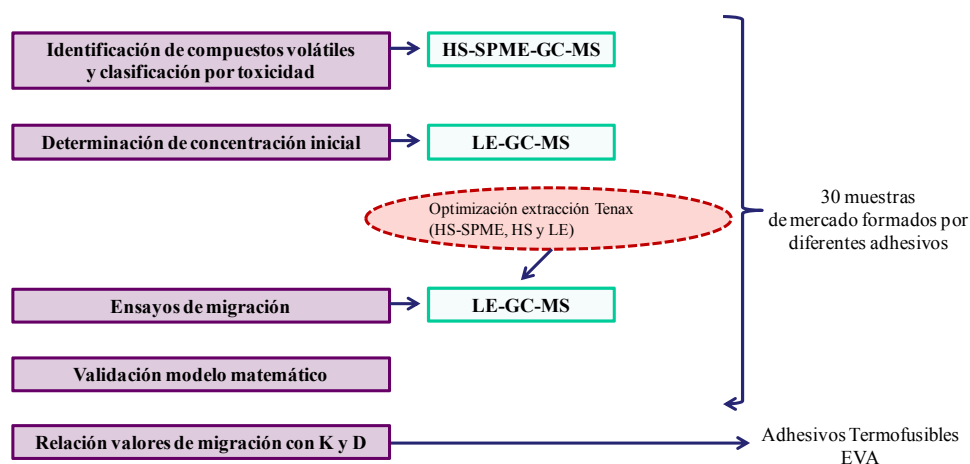


Figura 2.1: Esquema trabajo desarrollado en el capítulo 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. REACTIVOS

Decametilciclopentasiloxano (CAS 541-02-6), triacetato de glicerol (CAS 102-76-1), 2-(2-butoxi) etanol (CAS 112-34-5), [2-(2-butoxi)etilo] acetato (CAS 124-17-4), bifenilo (CAS 92-52-4), 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol-diisobutirato (CAS 6846-50-0), di-n-butilo ftalato (CAS 84-74-2), bis-(2-etilhexil) adipato (CAS 103-23-1), mono-etil-hexil

ftalato (CAS 4376-20-9), decahidronaftaleno (CAS 91-17-8), 2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona (CAS 719-22-2), 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (CAS 128-37-0), hexadecano (CAS 544-76-3), octadecano (CAS 593-45-3), eicosano (CAS 112-95-8), docosano (CAS 629-97-0), tetracosano (CAS 646-31-1) antraceno 9,10-dihidro (CAS 613-31-0), reteno (CAS 483-65-8), 4-tert-butilfenol (CAS: 98-54-4) suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España). Todos estos compuestos tenían calidades analíticas. Acetona, metanol y diclorometano suministrados por Scharlau Chemie S.A (Sentmenat, España), todos ellos con calidad HPLC. Tenax ® TA 80/100 fue suministrado por Supelco (Bellefonte, estados unidos).

Se empleó:

- Una disolución A que contenía de 4-tert-butilfenol de 1000 µg/g en diclorometano como estándar interno.
- Una disolución B de 4-tert-butilfenol de 1000 µg/g en metanol (disolución B) como estándar interno.
- Una disolución C de 4-tert-butilfenol de 1000 µg/g en acetona como estándar interno.
- Una disolución D que contenía nueve estándares (2,6-di-tert-butil-1,4-benzoquinona, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol, hexadecano, octadecano, eicosano, docosano, reteno and tetracosano) de 75 ug/g en diclorometano para la optimización del Tenax ®.

2.1.2. FIBRAS DE SPME

Se utilizó: Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espesor, suministrada por Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU)

2.1.3. LAMINADOS Y ADHESIVOS

Se seleccionaron treinta muestras destinadas a envase alimentario, dentro del proyecto MIGRESIVES, para el estudio de la migración de los compuestos volátiles presentes en los adhesivos. Para dicha selección, se escogieron muestras de mercado que dispusieran de una estructura de laminado, es decir, [sustrato-adhesivo-sustrato]. En este trabajo, se estudiaron los laminados en los que el sustrato que estuviera en contacto con el adhesivo fuera algún tipo de cartón o papel.

Los adhesivos que formaban estos laminados eran 5 adhesivos con una base formada de copolímero de acetato vinilo y etileno (VAE), 5 de acetato de polivinilo (PVA), 1 de polivinilalcohol (PVOH), 1 de almidón (Alm), 2 de acrílicos (AC), 1 de una mezcla de vinílico mas almidón (V+Alm) y 2 adhesivos termofusibles con base de acetato vinilo y etileno (EVA)

Los sustratos que formaban los laminados eran diferentes tipos de cartón (C), papel (P), papel corrugado (PC), cartón corrugado (CC) y cartón laminado con polipropileno (CPP) o con polietileno (CPE). Se diferenciaban en su gramaje y espesor.

La siguiente Tabla 2.1 muestra las características de los laminados estudiados, así como su factor de dilución (d_F) que corresponde a la relación entre el volumen total del envase (dm^3) y la superficie que ocupa el adhesivo (dm^2).

Tabla 2.1: Laminados, tipo de adhesivo así con los sustratos que lo forman, su factor de dilución (d_F) expresado en dm y el gramaje del adhesivo en el laminado g_{adh}/m^2 laminado

Código muestra	Sustratos	Tipo de adhesivo	Código del adhesivo	d_F (dm)	g_{adh}/m^2 laminado
lam_01	C/C	VAE	VAE_01	52,3	31,8
lam_02	C/C	VAE	VAE_01	52,3	31,8
lam_03	C/C	VAE	VAE_01	52,3	31,8
lam_04	C/C	VAE	VAE_02	57,6	25,3
lam_05	C/C	VAE	VAE_02	30,7	25,3
lam_06	C/C	VAE	VAE_02	18,5	25,3
lam_07	C/C	VAE	VAE_03	37,1	28,5
lam_08	C/C	VAE	VAE_04	63,9	49,1
lam_09	C/C	VAE	VAE_04	34,1	49,1
lam_10	C/CPE	VAE	VAE_04	70	49,1
lam_11	C/C	VAE	VAE_05	96,7	30,7
lam_12	C/C	PVA	PVA_01	52,3	101,5
lam_13	C/C	PVA	PVA_01	52,3	101,5
lam_14	C/C	PVA	PVA_01	52,3	101,5
lam_15	C/P/C	PVA	PVA_02	1,6	nd
lam_16	C/P/C	PVA	PVA_03	1,6	nd
lam_17	C/P/C	PVA	PVA_04	1,6	nd
lam_18	P / P	PVOH	PVOH_01	223,3	38,9
lam_19	P/P	PVOH	PVOH_01	74,5	38,9
lam_20	P/P	PVOH	PVOH_01	185,6	38,9
lam_21	P/P	Alm	Alm_01	97,8	38,9
lam_22	P/P	Alm	Alm_01	398,5	38,9
lam_23	P/PP	AC	AC_01	2604	38,9
lam_24	P/PP	AC	AC_02	300,5	38,9
lam_25	P/PC/P	V+Alm	V+Alm_01	0,17	nd
lam_26	P/PC/P	V+Alm	V+Alm_01	0,17	nd
lam_27	P/PC/P	V+Alm	V+Alm_01	0,17	nd
lam_28	C/C	EVA	T_03	8,5	68,2
lam_29	C/C	EVA	T_01	17,1	31,28
lam_30	CPP/PP	EVA	T_01	17,1	31,28
lam_31	C/C	APAO	T_02	17,1	31,28
lam_32	CPP/PP	APAO	T_02	17,1	31,28

nd: datos no disponibles; C: cartón; P: papel; CPE: cartón laminado con polietileno; PC: papel corrugado; CC: cartón corrugado; CPP: cartón laminado con polipropileno VAE: acetato vinilo y etileno; PVA: acetato de polivinilo; PVOH: Polivinilalcohol; Alm: Almidón; AC: Acrílico; V: vinílico

Los laminados lam_29 y lam_30 corresponderían a los laminados 1 y 2 estudiados en el capítulo anterior. Los laminados lam_31 y lam_32 que corresponderían a los laminados 3 y 4 también del capítulo anterior, fabricados con el adhesivo APAO, no se estudiaron en este capítulo, ya que, en el apartado anterior no se detectó en ellos ningún compuesto volátil.

Estos laminados, se utilizan habitualmente en el mercado para envasar alimentos secos como pan, harina, sal, azúcar, polvos de gelatina, de leche, de sopa, de puré de patata, pasta... También cajas para almacenar chocolate o bombones... La Figura 2.2 muestra algunas fotos de los distintos envases estudiados.



Figura 2.2: Envases de mercado analizados, con estructura de laminado formados por distintos adhesivos

2.2. INSTRUMENTAL

2.2.1. CROMATÓGRAFO DE GASES ESPECTROMETRÍA MASAS

Para el análisis de las muestras se utilizó autoinyector CTC de Agilent Technologies (Madrid, España), equipado para SPME, HS e inyección de líquido. El equipo cromatográfico de gases era un 6890 Series conectado a

un detector selectivo de masas, 5973 Series. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) de Agilent Technologies (Madrid, España). El resto de parámetros utilizados, se muestran en la siguiente Tabla 2.2

Tabla 2.2: Parámetros utilizados para los análisis por extracción por HS-SPME, HS y LE acoplada a GG-MS

Instrumentación		
CombiPal HS-SPME (Para identificación y optimización Tenax ®)	Tipo de fibra	PDMS/100 μ m
	Tiempo de preincubación (min)	2
	Tiempo extracción (min)	25
	Temperatura de extracción (°C)	80
	Tiempo de desorción (min)	1
CombiPal HS (Optimización Tenax ®)	Temperatura de extracción (°C)	150
	Tiempo extracción (min)	10
	Volumen de extracción (mL)	1
CombiPal inyección directa (Optimización Tenax ®, cálculo Cp ₀ , migración)	Volumen inyectado (μ L)	1
	Inyector	250
Condiciones GC	Flujo de Helio (mL/min)	1
	Inyector	250°C Splitless (2min)
	Rampa temperatura del horno	40°C (2min)
		10 °C/min 300°C (2min)
Condiciones masas (EI)	Rango de masas (m/z)	45-450
	Temperatura fuente (°C)	230
	Temperatura cuadrupolo (°C)	150
	Energía electrones (eV)	70

2.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS LAMINADOS.

El primer objetivo del trabajo, era la identificación de los compuestos presentes en el adhesivo como posibles migrantes potenciales desde el laminado a la comida que se encuentra envasada. Los compuestos presentes

en los laminados lam_29 y lam_30, formados por el adhesivo termoplástico T_01, ya habían sido identificados en el capítulo 1.

Para este propósito, se prepararon muestras de 3 cm x 0,5cm de laminado que contuvieran en el interior adhesivo y de 2 sustratos sin adhesivo, y se analizaron mediante HS-SPME-GC-MS, para conocer los compuestos que provenían inequívocamente del adhesivo comparando dichos extractos. Para confirmarlo, también se analizaron 1 gramo de los adhesivos, cuando se dispusiera, y así se pudo corroborar el origen de los compuestos detectados. Las condiciones de ensayo (HS-SPME) se realizaron según las condiciones optimizadas en el capítulo anterior (Vera, et al., 2011), y presentadas en la Tabla 2.2.

La identificación de estos compuestos se llevó a cabo utilizando la librería NIST y WILEY para la búsqueda de espectros de masas y se corroboró la identificación, comparando el tiempo de retención y el espectro de masas de estos compuestos con sus estándares puros. También se determinó la toxicidad de estos compuestos según las reglas de Cramer, con el software Toxtree v1.51 (Ideaconult Ltd.).

2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL EN LOS ADHESIVOS CP₀.

Para determinar la concentración inicial en el adhesivo (Cp₀) se llevó a cabo una extracción de las láminas. Los laminados que estuvieran formados por el mismo adhesivo, sólo se extrajo un laminado y se seleccionó el primero de ellos según la Tabla 2.1. Por ejemplo, el adhesivo VAE_01 se encuentra en los lam_01, lam_02 y lam_03, y por tanto se extrajo el lam_01.

Esta extracción se realizó según la metodología optimizada en estudios previos del capítulo 1 (Vera, et al., 2011): Donde, se cortaron las láminas en pequeños trozos y 0,5 gramos de estos se extrajeron tres veces con 2,5 mL de diclorometano consecutivamente, durante 24 horas cada extracción, en un horno a una temperatura de 40°C. Una vez extraída la lámina se unieron los tres extractos y se añadió al extracto 10 µL de estándar interno (disolución A) y se concentró mediante una corriente de N₂ hasta 200 µL. Finalmente, el extracto se analizó por GC-MS. Se analizaron tres réplicas de cada laminado.

Para construir las rectas de calibrado, se prepararon disoluciones de los patrones a distintas concentraciones en diclorometano y se analizaron por GC-MS. Se analizaron tres réplicas de cada concentración.

2.5. OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS CON TENAX

Para realizar los ensayos de migración de materiales de envase formados por papel o cartón, estos se deben realizar con Tenax ® como simulante alimentario (Nerin and Acosta, 2002; Nerin and Asensio, 2007; Nerin, et al., 1998). Este simulante se emplea en migraciones específicas de alimentos secos.

Inicialmente para utilizar el Tenax ® se limpió previamente en un Soxhlet con acetona durante 6 h como describe la norma UNE- EN 14338.

Antes de realizar los ensayos de migración, se seleccionó previamente la técnica apropiada para extraer los compuestos presentes en el Tenax ® que habían migrado desde el adhesivo.

Para este propósito, 0,34 g de Tenax ® se doparon con 100 µL de una disolución D. La concentración final correspondía a $20 \mu\text{g}_{\text{compuesto}}/\text{g}_{\text{Tenax}}$. Tras la evaporación del disolvente hasta sequedad, el Tenax ® dopado se extrajo por tres metodologías diferentes, HS-GC-MS, HS-SPME-GC-MS e inyección líquida, LE-GC-MS, tras la extracción del Tenax ® con dos tipos de disolventes de distintas polaridades (metanol y acetona)

- Para HS-SPME-GC-MS y HS-GC-MS, se llevaron a cabo dos ensayos diferentes. En un ensayo se añadieron 100 µL de acetona al Tenax ® para facilitar el paso de los compuestos al espacio de cabeza (Barro, et al., 2005; Regueiro, et al., 2009) y en el otro, el Tenax ® se analizó sin añadir acetona.
- Para la inyección líquida (LE), también se llevaron a cabo dos ensayos diferentes, ya que el Tenax ® se extrajo con dos disolventes de distintas polaridades; metanol y acetona, optimizando también el número de extracciones (> 98% de recuperación).

Para este propósito, 0,34 gramos del Tenax ® dopado, se extrajo hasta tres veces consecutivas con 3,4 mL de los disolventes (metanol y acetona). Se juntaron los extractos y posteriormente, se añadieron 10 µL de estándar, disolución B y C respectivamente, y se concentraron hasta 200 µL con una corriente de N₂. Finalmente se analizaron por GC-MS.

Se realizaron dos réplicas de cada ensayo.

El protocolo final de extracción optimizado fue el siguiente: se realizaron 2 extracciones consecutivas del Tenax ® con 3,4 mL de acetona agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. Se juntaron los dos extractos y se añadieron 10 µL de disolución C como estándar interno. Se

concentraron hasta 200 μL bajo una corriente de nitrógeno. Y los extractos se analizaron por GC-MS

2.6. ENSAYOS DE MIGRACIÓN

El ensayo de migración para los laminados fabricados con distintos tipos de cartón y papel, se llevó a cabo con Tenax [®] como simulante alimentario.

Para ello, 1 x 8,5 cm de los laminados (donde el 100% de su superficie contenía adhesivo en su interior), se cubrieron con 0,34 gramos de Tenax [®] ($4 \text{ g}_{\text{Tenax}}/\text{dm}^2$, según la norma UNE-EN 14338) formando una capa uniforme, aplicada en el lado del laminado que se pondría en contacto con los alimentos. A continuación se colocaron en el interior de una placa Petri y se taparon, véase Figura 2.3. Posteriormente, se colocaron en el horno a una temperatura de 40 °C durante 10 días.

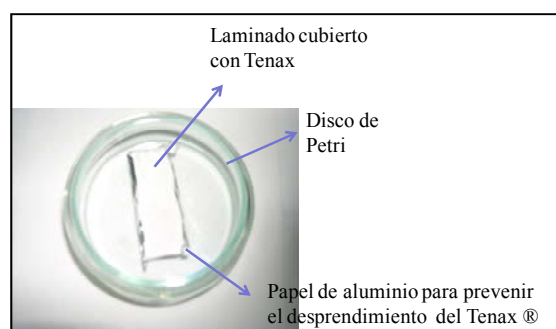


Figura 2.3: Laminado Lam_03 en la placa Petri con el Tenax [®] aplicado

Una vez transcurrido este periodo, se extrajo el Tenax [®] según la metodología optimizada en el apartado 2.5; donde, 0.34 g de Tenax [®] se extrajo dos veces consecutivas con 3,4 mL de acetona y se añadieron 10 μL

de estándar interno (disolución C). Posteriormente se concentró el extracto hasta 200 μL con una corriente de N_2 y dichos extractos se analizaron en GC-MS. Se estudiaron tres réplicas de cada laminado.

Para construir las curvas de calibrado, se prepararon disoluciones de los compuestos encontrados en la migración, a distintas concentraciones en acetona y se analizaron por GC-MS. Se analizaron tres réplicas de cada concentración.

2.7. VALIDACIÓN DEL MODELO DE PREDICCIÓN DE LA MIGRACIÓN

Como se ha descrito anteriormente, uno de los objetivos del proyecto MIGRESIVES en el que se enmarca esta tesis, era desarrollar una herramienta, que permitiera a las empresas predecir la migración de los componentes del adhesivo. Esta herramienta era un modelo matemático para la predicción de la migración de los componentes presentes en los adhesivos que forman parte del envase alimentario y estaba basado en modelos de predicción ya existentes (Begley, et al., 2005) para plásticos.

Este modelo lleva por nombre MIGRATEST[®] y ha sido desarrollado por P. Mercea y V. Tosa en la empresa FABES (Munich, Alemania). Ha sido desarrollado utilizando numerosos datos de concentración inicial, partición y difusión obtenidos experimentalmente en dicho proyecto, así como los pesos moleculares del compuesto, materiales y las características de los sustratos (espesor y gramaje), tipo de adhesivo y sus densidades.

Para validar dicho modelo, se han comparado los resultados de migración experimental obtenidos, con los predichos por el modelo matemático.

2.8. RELACIÓN DE VALORES DE MIGRACIÓN CON LAS CONSTANTES DE PARTICIÓN Y DIFUSIÓN

Una vez realizados los ensayos de migración, los valores de migración obtenidos para los laminados lam_29 y lam_30 formados con el adhesivo termofusible T_01, se analizaron, para ver como estaban influenciados con las constantes de partición y difusión antes estudiadas en el capítulo 1 para estos laminados.

Para complementar el trabajo, también se calculó la constante de partición entre los sustratos y el Tenax ®. Para ello, 1 x 8,5 cm de los sustratos de los lam_29 y 30 es decir, C y CPP, se doparon con 200 µL de la disolución D y se almacenaron durante 24 h. Después de este tiempo, se realizaron los experimentos de migración, con la misma metodología que en el apartado 2.6.

Los extractos de migración de ambos sustratos dopados se analizaron, calculando las concentraciones tanto en el Tenax ® como en los sustratos. Posteriormente, se calculó el coeficiente de partición entre el Tenax ® y ambos sustratos según la Ecuación 2.1

$$K_{Tenax/S} = \frac{C_{eq(Tenax)}}{C_{eq(S)}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. IDENTIFICACIÓN Y CP₀ DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS ADHESIVOS

Como se ha mencionado anteriormente, para identificar los compuestos que provenían del adhesivo y estaban presentes en las muestras de laminado, se analizaron 3cm x 0,5cm de estos y se comparó el cromatograma con el mismo ensayo pero únicamente con muestra de sustrato.

En algunos casos se disponía de adhesivo que también se analizó, para confirmar que dichos compuestos detectados estuvieran presentes en el adhesivo de partida o se hubieran formado tras el proceso de laminación.

La figura siguiente, Figura 2.4, muestra un ejemplo de los ensayos realizados, para el adhesivo VAE_01 (trazo rojo) y laminado lam_03 (trazo azul) junto con el sustrato de cartón que forma el laminado (trazo negro). Se seleccionaron dos compuestos, ya que aparecían tanto en el adhesivo, como en el laminado y no en el sustrato.

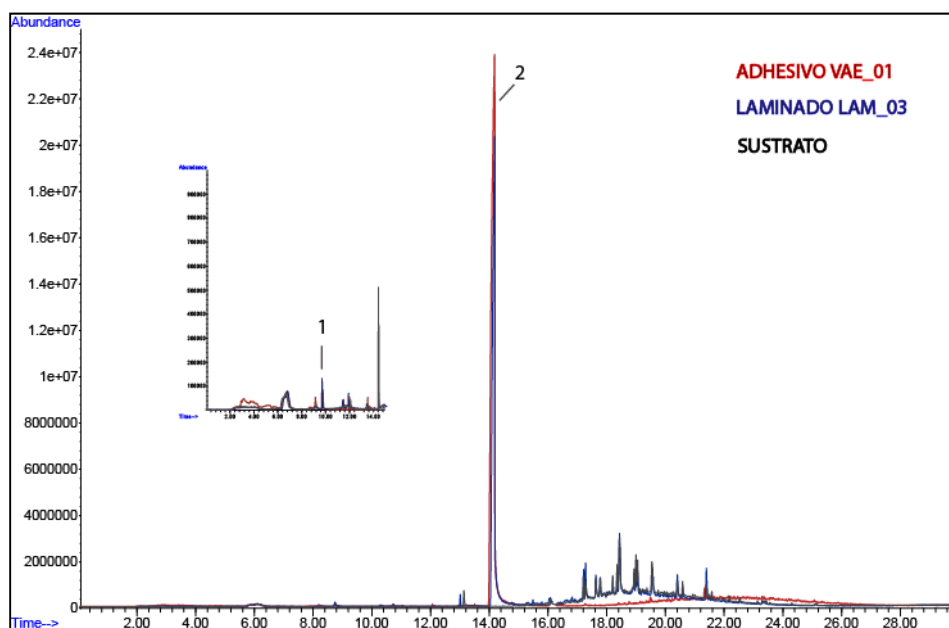


Figura 2.4: Cromatograma del laminado lam_03 (trazo azul), adhesivo VAE_01 (trazo rojo) y el sustrato de cartón (trazo negro).

Una vez detectados los compuestos del adhesivo, y por tanto posibles migrantes, se llevó a cabo su identificación utilizando la librería NIST y WILEY para la búsqueda de espectros de masas y se corroboró la identificación, comparando el tiempo de retención y el espectro de masas de estos compuestos con sus estándares puros.

Posteriormente, se calculó su C_{p0} a partir de una extracción de los distintos laminados con diclorometano y un análisis por GC-MS de los extractos.

La Tabla 2.3 muestra los parámetros analíticos de las rectas de calibrado en acetona de dichos compuestos.

Tabla 2.3: Parámetros analíticos del método de GC-MS.

Compuestos	Ecuación	R ²	Rango lineal(ug/g)	LOQ(ng/g)	LOD(ng/g)	RSD (%)
Decametilciclopentasiloxano	y = 1,018x	0,999	0,01-95,2	12,4	3,72	3,3
Triacetato de glicerol	y = 0,209x	0,999	1,27-728	1270	382	0,3
2-(2-butoxiatoxi) etanol	y = 0,249x	0,99	1,12-96,4	1120	335	8,4
[2-(2-butoxiatoxi)-etilo] acetato	y = 0,411x	0,998	0,45-93,9	453	136	1,1
Bifenilo	y = 1,447x	0,999	0,02-98,5	16,8	5,03	3,3
2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiolisobutirato	y = 0,009x	0,999	0,04-539	45,5	13,6	2,9
Di-n-butilo ftalato	y = 2,398x	0,996	0,06-25,0	64,2	19,3	3,3
Bis-(2-etilhexil) adipato	y = 0,620x	0,996	0,002-96,3	1,77	0,53	7,7
Mono-etil-hexil ftalato	y = 0,051x	0,998	0,16-555	158	47,4	3,3
Decahidronaftaleno	y = 0,195x	0,993	0,05-239	46,1	13,8	1
2,6-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	y = 0,188x	0,998	2,12-456	2120	636	1,8
2,6-di-tert-butil-4-metilfenol	y = 1,835x	0,995	0,11-65,2	107	32,2	0,6
Hexadecano	y = 0,749x	0,995	0,91-473	907	272	1
9,10-dihidroantraceno	y = 1,369x	0,994	1,25-59,2	1250	374	0,6
Octadecano	y = 0,721x	0,994	3,13-358	3130	938	1,3
Eicosano	y = 0,668x	0,993	0,43-465	428	128	2,2
Docosano	y = 0,624x	0,998	0,21-440	212	63,6	3,8
Reteno	y = 0,756x	0,993	0,34-69,3	342	103	1,8
Tetracosano	y = 0,769x	0,996	0,34-74,8	341	102	2,8

Todos los compuestos presentaban una RSD menor del 10% y se obtuvieron buenos límites de detección (LOD), en el rango de ppb, con valores entre 0,53 ng/g (bis-(2-etilhexil) adipato) y 938 ng/g (octadecano).

Las tablas siguientes, Tabla 2.4, y Tabla 2.5 muestran los compuestos identificados para todos los adhesivos junto con su toxicidad según las reglas de Cramer (Tox), sus concentraciones iniciales en el adhesivo, C_{p0} , y sus límites de detección (LOD) expresados en ng/dm^2 de laminado.

Debido a la dificultad de encontrar los estándares de algunos compuestos (*), estos se cuantificaron usando otros estándares con estructura similar.

Tabla 2.4: Concentración inicial en los adhesivos VAE, expresado μg de compuesto por dm^2 de laminado, su toxicidad (Tox), LOD (ng/dm^2) y sus iones característicos (M^+).

Compuestos (Tox)	M^+	LOD (ng/dm^2)	Cp ₀ adhesivos VAE $\mu\text{g}/\text{dm}^2$				
			VAE_01	VAE_02	VAE_03	VAE_04	VAE_05
Decametilciclopentasiloxano(III)	355	8,71	1,6 \pm 0,1	1,3 \pm 0,08	1,4 \pm 0,11		
Triacetato de glicerol (I)	103	900	6200 \pm 430	3300 \pm 260	12000 \pm 8900	550 \pm 33	4400 \pm 260
Bifenilo (II)	154	11,8				1,4 \pm 0,1	
Iso-butil-nonil ftalato* (I)	149					110 \pm 6,6	12 \pm 0,8
Di-nbutilo ftalato (I)	149	45,3				41 \pm 3,3	2,9 \pm 0,2
Docosano (I)	57	150				25 \pm 1,3	4,9 \pm 0,1
Tricosano ** (I)	57					43 \pm 3,8	6,3 \pm 0,3
Tetracosano (I)	57	240				180 \pm 13	160 \pm 8,1
Bis-(2-etilhexil) adipato (I)	147	1,25				61 \pm 6,3	16 \pm 0,9
Pentacosano ** (I)	57					65 \pm 4,5	6,3 \pm 0,5
Dibenzoato de dietilenglicol*** (I)	105					14900 \pm 7500	38000 \pm 19000
Mono-etil-hexil ftalato (I)	149	112				13000 \pm 630	30000 \pm 12000

3 compuestos desconocidos en los adhesivos VAE_04, 05

*Cuantificados con di-n-butilo ftalato como estándar **Cuantificados con tetracosano como estándar y ***Cuantificados con mono-etil-hexil ftalato como estándar

Tabla 2.5: Concentración inicial en los adhesivos PVA y PVOH, expresado μg de compuesto por dm^2 de laminado, su toxicidad (Tox), LOD (ng/dm^2) y los (M^+).

Compuestos (Tox)	M^+	LOD (ng/dm^2)	Cp ₀ adhesivos PVA y PVOH $\mu\text{g}/\text{dm}^2$					
			PVA _01	PVA _02	PVA _03	PVA _04	PVOH _01	
Decametilciclopentasiloxano(III)	355	8,76	1,2±0,1					
Triacetato de glicerol (I)	103	900	10000±500	42±3,3	18000±900	26±2,1		
2-(2-butoxi) etanol (I)	57	789		450±32	530±42	320±26		
[2-(2-butoxi) etilo] acetato (I)	87	320	3000±210		3100±250	2300±200		
Bifenilo (II)	154	11,8		0,9±0,05	0,8±0,1	0,8±0,2		
TXIB (I)	111	32,1		11±0,7	18±1,4	21000±2000		
Iso-butyl-nonyl ftalato* (I)	149			610±50	620±51	650±52	2,7±0,2	
Di-n-butilo ftalato (I)	149	45,3		66±3,9	70±3,5	64±5,2	0,5±0,04	
Docosano (I)	57	150		58±3,5	83±7,4	73±5,3		
Tricosano ** (I)	57			160±13	160±16	140±13		
Tetracosano (I)	57	240		240±12	200±14	170±15		
Bis-(2-etilhexil) adipato (I)	147	1,25					6,9±0,5	
Pentacosano ** (I)	57			300±27	240±18	200±18		
Dibenzoato de dietilenglicol*** (I)	105			8100±480	9400±842	5400±380		
Mono-etil-hexil ftalato (I)	149	112		11000±650	12000±820	8000±720	110±9,2	

3 compuestos desconocidos en los adhesivos PVA_02, 03, 04

*Cuantificados con di-n-butilo ftalato como estándar **Cuantificados con tetracosano como estándar y ***Cuantificados con mono-etil-hexil ftalato como estándar

Tabla 2.6: Concentración inicial en los adhesivos Alm, AC, V+Alm y T (μg de compuesto por dm^2) de laminado, su toxicidad (Tox), LOD (ng/dm^2) y sus iones característicos (M^+).

Compuestos (Tox)	M^+	LOD (ng/dm^2)	Cp ₀ adhesivos Alm, AC, V+Alm y T $\mu\text{g}/\text{dm}^2$				
			Alm _01	AC _01	AC _02	V+Alm _01	T _03
Bifenilo (II)	154	11,8				1,5±0,1	
1,2,3,4 ^a ,b,8,9,12,12 ^a -decahidro-1,4-metanobenzociclodeceno* (I)	134			37±2,6	390±31		
Decahidronaftaleno (I)	257	32,6		59±5,3			
16-kaureno* (I)	257			4,2±0,4			
Di-n-butilo ftalato (I)	149	45,3	2,0±0,1				
Mono-etil-hexil ftalato (I)	149	112	4,4±0,4				
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona (II)	220	1490					33±1,9
Hexadecano (I)	57	640					18±1,6
Octadecano (I)	57	2210					97±7,6
Eicosano (I)	57	302					35±3,1
4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno * (II)	241						5,1±0,4
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno * (II)	227						9,3±0,8
Docosano (I)	57	150					59±5,3
1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno * (II)	241						2,0±0,2
Reteno (III)	219	241					1,1±0,1
Dehidroabieta * (II)	269						7,5±0,6
Dehidroabieta de metilo * (II)	239						44±6,6
Tetracosano (I)	57	240					140±15

6 compuestos desconocidos en los adhesivos AC_01 and AC_02 y 2 compuestos desconocidos en el adhesivo V+Alm_01

*Cuantificados con reteno como estándar

Se detectaron un gran número de compuestos en los distintos adhesivos, un total de 41 compuestos, de los cuales; En 9 compuestos no era posible determinar su estructura química y sólo 2 compuestos tenían toxicidad alta según las reglas de Cramer; decametilciclopentasiloxano y reteno.

En los adhesivos vinílicos.

Las Tablas 2.4, 2.5 muestran los compuestos detectados en los adhesivos vinílicos (VAE, PVA, PVOH) y su concentración inicial C_{p0} .

Estos adhesivos presentaban compuestos comunes, probablemente porque todos ellos tenían un grupo vinílico ($-\text{CH}_2=\text{CH}_2-$) en su estructura.

Todos los compuestos detectados en los adhesivos VAE y PVOH, se encontraron también en los adhesivos PVA, como; iso-butil-nonil ftalato, di-n-butilo ftalato y mono-etil-hexil-ftalato. Este último presentaba las mayores concentraciones comprendidas entre $110 \pm 9,2 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ (PVOH_01) a $300000 \pm 12000 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ (VAE_05). El triacetato de glicerol conocido comúnmente como triacetina se encontró en todos los adhesivos PVA y VAE, con un rango de concentraciones desde $26 \pm 2,1$ (PVA_04) a $18000 \pm 900 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ (PVA_03). Este compuesto se utiliza en la industria química como plastificante, para proporcionar flexibilidad y elongación al adhesivo, de forma que separa las cadenas del polímero, permitiendo su elongación (Petrie, 2000a). Otros plastificantes encontrados en estos adhesivos eran TXIB que corresponde a 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol-diisobutirato y dibenzoato de dietilenglicol (CAS:2011-08-22)

Se identificó un compuesto con alta y media toxicidad según las reglas de Cramer, decametilciclopentasiloxano y bifenilo respectivamente. Los

compuestos metilsiloxanos se utilizan como disolventes y el compuesto bifenilo, se utiliza habitualmente como agente emulsificador para esta clase de adhesivos (Petrie, 2000a).

Otros adhesivos

La Tabla 2.6 muestra los compuestos identificados con su Cp_0 en el resto de adhesivos estudiados que no son vinílicos.

Los compuestos identificados en el adhesivo termoplástico T_03 eran similares a los encontrados en el adhesivo T_01 en el capítulo anterior. La mayoría de compuestos eran derivados del ácido abiético y su rango de concentración, estaba comprendido entre $1,1 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ (reteno) y $44 \pm 6,6 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ (dehidroabietato de metilo). Como se ha mencionado anteriormente, el ácido abiético se utiliza habitualmente como promotor de adhesión en los adhesivos termoplásticos para reducir la viscosidad y así mejorar la adhesión con los sustratos (Petrie, 2000a; Petrie, 2000b). Este compuesto sufre una degradación térmica cuando se calienta la mezcla para curar el adhesivo, formando compuestos intermedios como el 4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno, 10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno, 1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno, Dehidroabietal, Dehidroabietato de metilo (Marchand-Geneste and Carpy, 2003; Rogge, et al., 1998; Simoneit, et al., 1993). También se encontró 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol, cuya función es como antioxidante en los adhesivos.

En el adhesivo de almidón, sólo se identificaron dos compuestos, que correspondían a dos ftalatos, y uno en el adhesivo vinílico más almidón. Este compuesto era el bifenilo, que también se detectó en el grupo anterior (adhesivos vinílicos).

En los adhesivos acrílicos, se identificaron tres compuestos, uno era el naftaleno con alta concentración, cuya utilidad es como base para la síntesis de los ftalatos, también 1,2,3,4^a,b,8,9,12,12^a-decahidro-1,4-metanobenzociclododeceno y 16-karueno como productos derivados de la emulsión de la resina utilizada para la formulación de estos adhesivos acrílicos.

3.2. MIGRACIÓN

Una vez llevado a cabo el ensayo de migración y calculados sus valores de migración expresados en μg de compuesto por dm^2 de laminado, se estudiaron los posibles riesgos. Para ello, inicialmente estos valores se transformaron a μg de compuesto/ Kg de alimento o simulante alimentario. Con este fin, se dividieron por el factor de dilución d_F de la Tabla 2.1 (asumiendo una densidad de comida de $1 \text{ Kg}/\text{dm}^3$)

Estos valores se compararon con los límites de migración específica (SML) encontrados en las listas positivas de las legislaciones de plásticos europea 10/2011/EU y española Real Decreto 847/201. Cuando estos compuestos no aparecieran en estas listas positivas, sus valores de migración deberían estar por debajo de $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ de alimento (principio de barrera funcional, legislación 10/2011/EU)

También se calculó la ingesta diaria estimada (EDI) (FDA, 1995), según la siguiente Ecuación 2.2:

$$EDI \left(\frac{\text{mg}}{\text{pers} \cdot \text{día}} \right) = Mig \left(\frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right) * 3\text{Kg} * CF \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Donde Mig es el valor de migración, 3Kg es la ingesta diaria por persona y día, y CF es la fracción de la dieta diaria correspondiente a un material específico que forma parte de los materiales de contacto alimentario (denominado factor de consumo), en el caso del adhesivo corresponde a 0,14.

Por último, se compararon estos valores con los recomendados por Cramer según la toxicidad del compuesto.

Las tablas siguientes Tablas 2.7, 2.8 y 2.9 muestran los resultados de migración expresados en μg de compuesto/ dm^2 de laminado. También se realizó el ensayo para el adhesivo termoplástico T_01, (Lam_29 y Lam_30) estudiado en el capítulo anterior.

Tabla 2.7: Migración de los laminados fabricados con adhesivos VAE.

Compuestos	Migración adhesivos VAE µg/dm ²										
	Lam _01	Lam _02	Lam _03	Lam _04	Lam _05	Lam _06	Lam _07	Lam _08	Lam _09	Lam _10	Lam _11
Decametilclopentasi loxano	0,6±0,05	<LOD	1,3±0,09	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Triacetato de glicerol	1100±70	230±70	1000±80	100±9,8	97±7,8	700±64	1200±85	120±13	4,0±0,4	0,2±0,01	390±32
Bifenilo								0,3±0,03	<LOD	<LOD	<LOD
Iso-butil-nonil ftalato*								42±3,3	72±6,5	<LOD	5,5±0,4
Di-n-butilo ftalato								14±1,2	12±1,0	<LOD	1,8±0,1
Docosano								<LOD	9,9±0,8	<LOD	<LOD
Tricosano**								21±1,7	15±1,0	<LOD	<LOD
Tetracosano								22±1,7	4,2±0,4	<LOD	<LOD
Bis-(2-etilhexil) adipato								33±2,2	2,0±0,2	<LOD	<LOD
Pentacosano*								2,7±0,2	28±2,5	8,9±0,4	<LOD
Dibenzoato dietilenglicol***								2400±210	1500±120	300±21	280±20
Mono-etil-hexil ftalato								<LOD	1300±100	<LOD	<LOD

*cuantificados con di-butilo-ftalato como estándar, ** cuantificados con tetracosano como estándar y *** cuantificados con mono-etil-hexil ftalato.

Tabla 2.8: Migración de los laminados fabricados con adhesivos PVA y PVOH.

Compuestos	Migración adhesivos PVA ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)						Migración adhesivos PVOH ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)			
	Lam _12	Lam _13	Lam _14	Lam _15	Lam _16	Lam _17	Lam _18	Lam _19	Lam _20	
Decametileclopentasiloxano	0,9 \pm 0,07	<LOD	<LOD							
Triacetato de glicerol	260 \pm 18	170 \pm 12	120 \pm 9,5	2,0 \pm 0,1	150 \pm 13	3,8 \pm 0,2				
2-(2-butoxi)etanol				<LOD	<LOD	<LOD				
[2-(2-butoxi)etoxi]-etilo] acetato				18 \pm 0,9	30 \pm 2,4	43 \pm 3,4				
Bifenilo				0,03 \pm 0,005	0,03 \pm 0,005	0,07 \pm 0,005				
TXIB				5,0 \pm 0,4	7,0 \pm 0,3	350 \pm 31				
Iso-butiril-nonil ftalato*				120 \pm 11	300 \pm 28	110 \pm 6,8	<LOD	2,1 \pm 0,2	<LOD	
Di-n-butilo ftalato				8,3 \pm 0,8	9,6 \pm 0,7	10 \pm 0,8	<LOD	0,3 \pm 0,02	<LOD	
Docosano				58 \pm 5,2	81 \pm 7,3	60 \pm 5,4				
Tricosano**				85 \pm 6,8	85 \pm 5,1	91 \pm 6,4				
Tetracosano				44 \pm 3,5	43 \pm 3,4	36 \pm 2,5				
Bi-(2-etilhexil) adipato							<LOD	2,8 \pm 0,2	<LOD	
Pentacosano*				51 \pm 3,5	44 \pm 3,9	46 \pm 4,1				
Dibenzoato dietilenglicol***				110 \pm 9,0	96 \pm 7,6	120 \pm 8,2				
Mono-etil-hexil ftalato				400 \pm 28	390 \pm 35	440 \pm 37	<LOD	95 \pm 9,2	<LOD	

*cuantificados con di-butilo-ftalato como estándar, ** cuantificados con tetracosano como estándar y *** cuantificados con mono-etil-hexil ftalato como estándar.

Tabla 2.9: Migración de los laminados fabricados con adhesivos de almidón (Alm), acrílicos (AC), vinílicos +almidón (V+Alm) y termofusibles (T).

Compuestos	Mig Alm (µg/dm ²)		Migración AC (µg/dm ²)		Migración adhesivo V+Al (µg/dm ²)		Migración adhesivo T (µg/dm ²)									
	Lam	_21,22	Lam	_23	Lam	_24	Lam	_25,26	Lam	_27	Lam	_28	Lam	_29	Lam	_30
Bifenilo																
1,2,3,4 ^a ,8,9,12,12 ^a -decahidro-1,4-metanobenzociclodeceno*				18±1,3		170±14				0,9±0,06						
Decahidronaftaleno				32±3,5												
16-kaureno*				2,0±0,2												
Di-n-butilo ftalato		<LOD														
Mono-etil-hexil ftalato		<LOD														
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona												7,2±0,6		32±2,9		20±1,6
2,6-di-tert-butil-4metilfenol												0,2±0,01		24±2,6		3,0±0,3
Hexadecano												18±1,4		25±2,6		160±13
9,10-dihidroantraceno														2,3±0,2		0,3±0,03
Octadecano														100±9,3		320±26
Eicosano														200±14		170±14
4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno *														22±1,2		170±14
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno *														2,5±0,2		3,8±0,3
Docosano														4,9±0,3		6,9±0,5
1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno *														1,14		98±6,8
Reteno														0,9±0,05		3,9±0,4
Dehidroabieta *														0,3±0,04		<LOD
Dehidroabietao de metilo *														0,8±0,05		6,7±0,5
Tetracosano														11±1,0		14±1,3
														<LOD		38±3,0

*compuestos cuantificados con reteno como estándar.

Como muestran las tablas, había una gran variedad de valores de migración, en función del tipo de adhesivo, del perfil de concentración inicial y del tipo de sustrato. Pero también hay que tener en cuenta que la migración, como se ha comentado en el capítulo anterior, va a depender de otros factores tales como los coeficientes de partición entre el adhesivo y el sustrato y los coeficientes de difusión en las dos matrices.

Un 78.7 % de los compuestos identificados inicialmente migraron al Tenax ®, lo cual significa que a pesar de que los adhesivos no están en contacto directo con los alimentos, la migración de estos es un hecho real y por tanto, su identificación y cuantificación es necesaria e importante.

Para los laminados fabricados con adhesivos de PVA, un 89% de compuestos migraban respecto a los identificados en el adhesivo (40 de 45) y en el caso de los adhesivos termoplásticos T_01 y T_03 un 92 % (12 de 13 compuestos identificados) y un 100 % para V+Alm y AC (5 de 5 identificados para ambos adhesivos).

Migración desde los adhesivos vinílicos.

Los resultados de migración desde los adhesivos vinílicos, se muestra en la Tabla 2.7 y 2.8.

La migración de los adhesivos VAE corresponde a los laminados lam_01 hasta lam_11 (Tabla 2.7). En estos laminados, el compuesto migrante mayoritario era el triacetato de glicerol, con un rango de concentración desde $0,2\pm 0,01$ (lam_10) hasta 1200 ± 85 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ de laminado (lam_07). Estos valores dependían de la concentración inicial en el adhesivo, por ejemplo, el laminado lam_07, presentó el valor más alto de migración, así como la concentración de este compuesto inicial en el

VAE_03 adhesivo $12000 \pm 8900 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ (Tabla 2.4). Por el contrario, los valores de la migración para los laminados lam_08, 09,10 fueron los más bajos, así como su concentración inicial que correspondía al adhesivo VAE_04 a $550 \pm 33 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ (Tabla 2.4). En general la migración en el lam_08 > lam_09 > lam_10, al tener la misma concentración inicial, los valores de migración estarán influenciados por el tipo de sustrato utilizado para la fabricación del laminado. En este caso, el laminado lam_10 estaba constituido por un lado con PE, que es un material no poroso, al contrario de los laminados lam_08 y 09, que estaban constituidos por cartón en ambos lados.

Para estudiar los posibles riesgos de los migrantes, los valores de migración expresados en μg de compuesto/ dm^2 de laminado, se expresaron en μg de compuesto/Kg de simulante (dividieron por sus d_f y suponiendo 1Kg de alimento/ 1 dm^3). Véase Tabla 2.10

Estos valores se compararon con las listas positivas de la legislación de plásticos; Europea, 10/2011/EU y la española de adhesivos, siliconas y tintas de impresión, Real Decreto 847/2011.

Sólo el di-n-butilo ftalato y bis (2-etilhexil) adipato aparecían en las listas positivas con unos valores de SML que correspondían a 0,3 y 1,5 mg/Kg respectivamente. Y cuyos valores en el lam_08, 09 y 11 estaban por debajo (Tabla 2.10) de sus valores de SML de acuerdo con el Reglamento 10/2011/EU.

Para el resto de compuestos, al no aparecer en la lista positiva, su valor de migración debería de estar por debajo de los $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$. Comprobando con la Tabla 2.10 los valores remarcados en rojo estarían por encima de este valor de $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$.

Tabla 2.10: Migración de compuestos expresados como µg de compuestos por Kg de alimento en los adhesivos VAE.

Compuestos	Migración adhesivos VAE (µg/Kg)										
	Lam_01	Lam_02	Lam_03	Lam_04	Lam_05	Lam_06	Lam_07	Lam_08	Lam_09	Lam_10	Lam_11
Decametilciclopentasiloxano	0,01	<LOD	0,03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Triacetato de glicerol	22	4,5	20	1,9	3,2	38	33	1,8	1,3	0,00	4,0
Bifenilo							0,01	<LOD	<LOD	<LOD	
Iso-butil-nonil ftalato*							0,7	2,1	<LOD	<LOD	0,06
Di-n-butilo ftalato							0,2	0,4	<LOD	<LOD	0,02
Docosano							<LOD	0,3	<LOD	<LOD	<LOD
Tricosano**							0,3	0,4	<LOD	<LOD	<LOD
Tetracosano							0,4	0,1	<LOD	<LOD	<LOD
Bis-(2-etilhexil) adipato							0,5	0,06	<LOD	<LOD	<LOD
Pentacosano*							0,04	0,8	0,1	<LOD	<LOD
Dibenzoato dietilenglicol***							38	45	4,2	3,0	
Mono-etil-hexil ftalato							<LOD	37	<LOD	<LOD	<LOD

*compuestos cuantificados con di-butilo-ftalato como estándar, ** compuestos cuantificados con tetracosano como estándar y *** compuestos cuantificados con mono-etil-hexil ftalato como estándar.

Entre los compuestos que migraron, sólo el compuesto con toxicidad de clase III, según las reglas de Cramer, decametilciclopentasiloxano se detectó en lam_01 y 03 con una concentración de $0,6 \pm 0,05$ y $1,3 \pm 0,09$ en el $\mu\text{g}/\text{dm}^2$, respectivamente (Tabla 2.7). Este compuesto no aparecía en las listas positivas de las legislaciones de plásticos y se calculó sus valores de EDI que correspondían a 0,005 y 0,009 $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$ para el lam_01 y 03 respectivamente. Estos valores estaban muy por debajo de los valores de exposición recomendados por Cramer de 0,09 $\text{mg}/\text{persona}/\text{día}$.

El compuesto bifenilo, de toxicidad de clase II, se encontró en el laminado lam_08 con una concentración de $0,3 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (Tabla 2.7), cuyo EDI corresponde a 0,002 $\text{mg}/\text{persona}/\text{día}$ y también estaba muy por debajo del valor recomendado por Cramer (0,54 $\text{mg}/\text{persona}/\text{día}$).

En la migración de los adhesivos PVA correspondientes al lam_12 hasta lam_17 (Tabla 2.8). Los compuestos di-n-butilo ftalato y TXIB migraban en los laminados lam_15,16 y 17, pero sus valores de migración (Tabla 2.11) estaban muy por debajo de su SML correspondientes a 0,3 y 5 mg/Kg respectivamente, según los límites establecidos por el Reglamento 10/2011/EU relativo a los materiales y artículos plásticos. El resto de compuestos no se encontraban en dicho reglamento, por tanto, sus concentraciones deberían estar por debajo de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Los compuestos remarcados en rojo (Tabla 2.11) estarían por encima de dicho valor. Los compuestos más tóxicos según las reglas de Cramer como decametilpentacilosiloxano y bifenilo, también migraban pero sus valores de EDI también estaban muy por debajo de los valores recomendados por Cramer.

En los laminados correspondientes al adhesivo de PVOH, del laminado lam_18 al 20 (Tabla 2.8), sólo cuatro compuestos migraron desde

el lam_19 y todos ellos con una baja toxicidad según las reglas de Cramer. Además, todos se encontraban también por debajo de los 10 µg/Kg (Tabla 2.11)

Tabla 2.11: Migración de compuestos expresados como µg de compuestos por Kg de alimento en los adhesivos PVA y PVOH.

Compuestos	Migración adhesivos PVA (µg/Kg)						Migración adhesivos PVOH (µg/Kg)					
	Lam_12	Lam_13	Lam_14	Lam_15	Lam_16	Lam_17	Lam_18	Lam_19	Lam_20	Lam_18	Lam_19	Lam_20
Decametilciclopentasiloxano	0,02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Triacetato de glicerol	4,9	3,2	2,3	1,3	96	2,4						
2-(2-butoxi)etanol				<LOD	<LOD	<LOD						
[2-(2-butoxi)etilo] acetato				11	19	27						
Bifenilo				0,02	0,03	0,04						
TXIB				3,1	4,4	220						
Iso-butil-nonil ftalato*				75	190	71	<LOD	0,03	<LOD			
Di-n-butilo ftalato				5,3	6,0	6,4	<LOD	0,01	<LOD			
Docosano				36	50	37						
Tricosano**				53	53	57						
Tetracosano				28	27	23						
Bi-(2-etilhexil) adipato							<LOD	0,04	<LOD			
Pentacosano*				32	27	29						
Dibenzoato dietilenglicol***				71	60	73						
Mono-etil-hexil ftalato				250	240	280	<LOD	1,3	<LOD			

*compuestos cuantificados con di-butilo-ftalato como estándar, ** compuestos cuantificados con tetraicosano como estándar y *** compuestos cuantificados con mono-etil-hexil ftalato como estándar.

Migración desde otros adhesivos.

En los laminados fabricados con adhesivo de almidón (lam_21 y 22) ningún compuesto migrante se detectó (Tabla 2.9) y en los laminados (lam_25, 26, 27) de almidón más vinílicos (V+Alm), sólo el bifenilo se detectó, y su máximo valor de EDI (0,002 mg/persona/día) estaba por debajo del valor recomendado por Cramer (0,09 mg/persona/día).

En los laminados lam_28, lam_29 y lam_30, fabricados con los adhesivos termoplásticos T_01 y T_03 (Tabla 2.9), un gran número de compuestos migraron al Tenax ®. La mayoría de compuestos eran alcanos o derivados del ácido abiético.

Sólo 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol tenía SML según el Reglamento de plásticos 10/2011/EU (3 mg/Kg). Para estos laminados el valor de migración correspondía a $0,2 \pm 0,01$, $24 \pm 2,6$ y $3,0 \pm 0,3$ $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (Tabla 2.9) respectivamente, correspondiente a 0,02, 1,4 y 0,2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Tabla 2.12) de alimento respectivamente, valores muy por debajo de su valor de SML.

Para el resto de los compuestos que no se encontraban en las listas positivas de las legislaciones, se calculó su EDI y para todos los compuestos este valor estaba por debajo de los valores de exposición recomendados por Cramer, aunque para algunos de ellos (remarcados en color rojo), su concentración migrante estaba por encima de los 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, véase Tabla 2.12

Tabla 2.12: Migración de compuestos expresados como µg de compuestos por Kg alimento en los adhesivos de almidón (Alm), acrílicos (AC), vinílicos +almidón (V+Alm) y termofusibles (T).

Compuestos	Mig Alm (µg/Kg)		Migración AC (µg/Kg)		Migración adhesivos V+Alm (µg/Kg)			Migración adhesivos T (µg/Kg)										
	Lam	_21,22	Lam	_23	Lam	_24	Lam	_25	Lam	_26	Lam	_27	Lam	_28	Lam	_29	Lam	_30
Bifenilo					5,4		5,4		4,1									
1,2,3,4 ^a ,8,9,12,12 ^a -decahidro-1,4-metanobenzociclodeceno*			0,01			0,6												
Decahidronaftaleno			0,01															
16-kaureno*			0,01															
Di-n-butilo ftalato		<LOD																
Mono-etil-hexil ftalato		<LOD																
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona													0,4		1,9			1,2
2,6-di-tert-butil-4metilfenol													0,02		1,4			0,2
Hexadecano													2,1		1,4			9,3
9,10-dihidroantraceno													8,1		0,1			0,02
Octadecano													2,6		6,1			19
Eicosano													0,3		12			10
4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno *													0,6		0,7			0,2
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno *													0,6		3,3			0,4
Docosano													0,1		12			5,7
1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno *													0,1		0,4			0,2
Reteno													0,03		0,05			<LOD
Dehidroabietal *													0,1		0,8			0,4
Dehidroabietato de metilo *													1,2		1,7			0,9
Tetracosano													<LOD		3,7			2,2

*compuestos cuantificados con reteno como estándar.

3.3. VALIDACIÓN

La validación se llevó a cabo comparando los resultados de migración experimentales con los valores de migración predichos por el modelo diseñado MIGRATEST ®. Este permite predecir la migración de un compuesto a los alimentos a partir de la concentración inicial de dicho compuesto en el adhesivo y de algunas propiedades del laminado como el espesor, las diferentes capas (tanto del adhesivo como del sustrato), gramos de adhesivo por dm^2 de laminado y el factor de dilución d_F .

Para dicho fin, se llevó a cabo una correlación de Pearson, (Véase Figura 2.5), entre los valores reales y los predichos por el modelo, obteniendo un factor de correlación de 0,94 ($p < 0,05$). Además se observó que en un 97 % de los casos el valor experimental superaba al valor predicho. Este hecho era positivo, ya que dicho modelo sobreestima el potencial de migración de un compuesto y por tanto supone una garantía de seguridad alimentaria

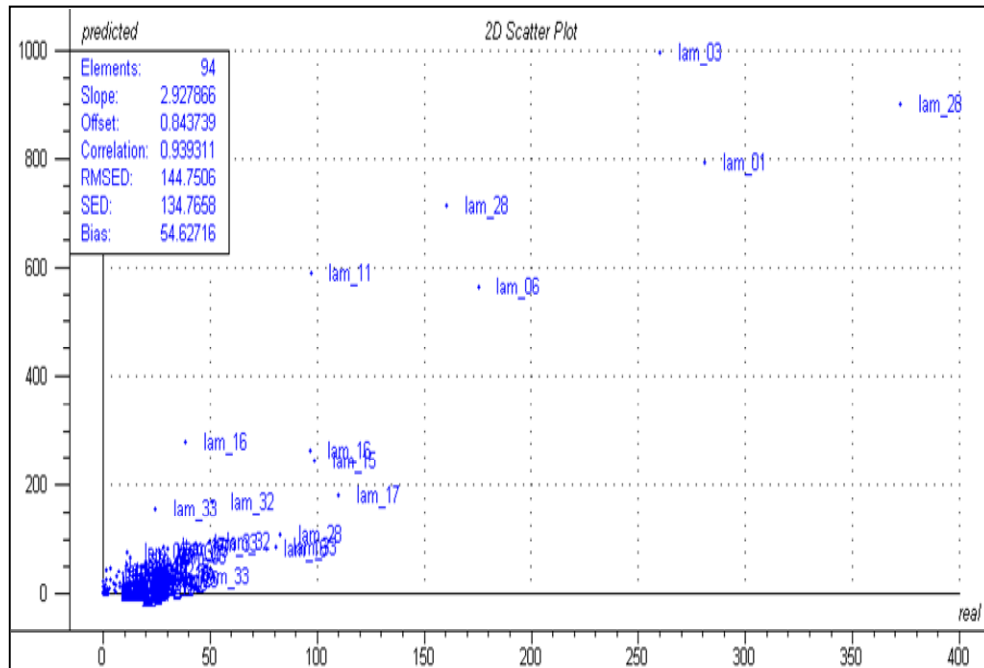


Figura 2.5: Valores de migración experimentales de los compuestos desde los laminados al Tenax ® (eje x: real) frente a valores predichos por el modelo para los mismos (eje y predichos)

3.4. RELACIÓN DE VALORES DE MIGRACIÓN CON LAS CONSTANTES DE PARTICIÓN Y DIFUSIÓN

La comparación de los valores de migración del adhesivo T_01 para los laminados lam_29 y 30 con las constantes de partición calculadas en el capítulo 1, se muestra en la Tabla 2.13. En ella se muestra los resultados de migración del adhesivo para los laminados lam_29 y lam_30 al Tenax®, expresados como μg de compuesto por dm^2 de laminado y también como porcentaje de compuesto que migra respecto a la cantidad inicial del laminado, calculado a partir de la C_{p0} de la Tabla 1.5 del capítulo 1.

Tabla 2.13: Migración de compuestos del el adhesivo T_01 en los laminado lam_29 y lam_30 expresados en $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ y en porcentaje respecto a la concentración inicial (%). Coeficientes de partición entre el Tenax y ambos sustratos ($K_{\text{Tenax/C}}$) y ($K_{\text{Tenax/ CPP}}$) y el limite de detección LOD expresado en μg de compuesto por dm^2 de laminado

Compuestos	LOD $\mu\text{g}/\text{dm}^2$	Migración lam_29 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (%)	$K_{\text{Tenax/C}}$	Migración lam_30 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (%)	$K_{\text{Tenax/ CPP}}$
2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	1,49	32±2,6 (40,7%)	130	20±1,6 (25,4%)	59
2,6-di-tert-butil-4-metilfenol	0,075	24±1,7 (81,8%)	98	3,0±0,2 (10,3%)	17
Hexadecano	0,64	25±1,8 (12,4%)	32	160±11 (80,3%)	11
9,10-dihidroantraceno	0,88	2,3±0,2 (71,0%)	49	0,3±0,03 (10,3%)	11
Octadecano	2,21	100±8,3 (23,2%)	170	320±23 (71,7%)	13
Eicosano	0,30	200±30 (33,9%)	200	170±16 (29,7%)	4,3
4b-8-dimetil-2-isopropilfenantreno	nc	12±0,8 (31,2%)	nc	3,8±0,3 (9,84%)	nc
10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	nc	56±5,1 (28,5%)	nc	6,9±0,5 (3,25%)	nc
1-metil-10,18-bisnorabieta-8,11,13-trieno	nc	7,3±0,5 (16,3%)	nc	3,9±0,3 (8,71%)	nc
Docosano	0,15	200±18 (41,0%)	25	98±11 (19,5%)	1,1
Reteno	0,24	0,9±0,06 (8,21%)	13	< LOD	0,6
Dehidroabietal	nc	13±1,2 (12,3%)	nc	6,7±0,5 (6,24%)	nc
Dehidroabietato de metilo	nc	29 ±2,6 (3,33%)	nc	15±1,3 (1,67%)	nc
Tetracosano	0,24	64±5,7 (29,3%)	18	38±3,4 (17,2%)	0,3

nc: no calculado debido a la ausencia de patrón

Los alcanos (octadecano, eicosano y docosano) en general, mostraron los valores más altos de migración en ambos laminados. Estos valores

oscilan entre 98 ± 11 (docosano, lam_30) y 320 ± 23 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (octadecano, lam_30).

Como cabía esperar, los compuestos con menor coeficiente de partición ($K_{T_{01/C}}$) de la Tabla 1.6 del capítulo 1, como el 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol y el 9,10-dihidroantraceno, con 20 y 15 respectivamente (a temperatura de 40°C), presentaban un mayor porcentaje de migración para el lam_29. Sin embargo, como la CP_0 del 9,10-dihidroantraceno era muy baja (Tabla 1.5 del Capítulo 1) 15 ± 4 $\mu\text{g}/\text{g}$, el valor de migración era el más bajo de todos ($2,3 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{dm}^2$).

Por otro lado, los compuestos con un mayor coeficiente de partición a 40°C (Tabla 1.6 del capítulo 1) como dehidroabietato de metilo ($K_{T_{01/C}} = 850$) o dehidroabietato de metilo ($K_{T_{01/C}} = 380$), presentaban un menor porcentaje de migración 3,33% o 16,3%, respectivamente para el lam_29.

Otro factor a tener en cuenta, es que el Tenax $\text{\textcircled{R}}$ presentará cierta sensibilidad a absorber determinados compuestos debido a su naturaleza química, por tanto, este hecho afectará también al valor de migración. Por ejemplo, 2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona presentaba un valor elevado de constante de partición $K_{T_{\text{Tenax/C}}}$, 130 (Tabla 2.13) y por tanto, presentará una gran tendencia a migrar al Tenax $\text{\textcircled{R}}$ respecto a otros compuestos con valores más bajos de $K_{T_{\text{Tenax/C}}}$.

Este hecho podría explicar por qué este compuesto, teniendo un alto valor de $K_{T_{01/C}}$ de 720 (Tabla 1.6 del capítulo 1), presentaba un alto porcentaje de migración del 40,7 % (Tabla 2.13). Para el reteno ocurría lo contrario, que presentaba una baja $K_{T_{01/C}}$ de 30 (Tabla 1.6 del capítulo 1), por tanto cabría esperar una alta migración, pero presentaba un bajo porcentaje 8,21 % (Tabla 2.13).

Si se comparan los resultados de migración entre el lam_29 y 30, se cumple que para la mayoría de compuestos, los valores de migración eran mayores para el lam_29 que para el 30. Como se ha comentado, parece que la presencia de polipropileno en el cartón reduce los procesos de migración. Sólo el hexadecano y el octadecano mostraban valores de migración mayores en el lam_30. Este resultado estaba de acuerdo con los resultados de partición que mostraban que, para estos compuestos, $K_{T_01/PPP}$ (60 y 53 respectivamente a 40°C) eran menores que $K_{T_01/C}$ (150 y 110 respectivamente a 40°C), (Tabla 1.6 del capítulo 1).

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método LE-GC-MS determinar la migración de compuestos presentes en distintos tipos de adhesivos (VAE, PVA, PVOH, acrílico, almidón, termofusibles) que forman parte del envase alimentario empleando Tenax ® como simulante alimentario. Para dicha determinación, inicialmente se identificaron y cuantificaron los compuestos presentes en dichos adhesivos, encontrando un total de 41 compuestos, entre los que se encontraban diferentes ftalatos, promotores de adhesión como derivados del ácido abiético y plastificantes como la triacetina o el TXIB. De ellos; en 9 compuestos no era posible determinar su estructura química y sólo 2 compuestos tenían toxicidad alta según las reglas de Cramer; decametilciclopentasiloxano y reteno.

Un 78,7 % de los compuestos identificados inicialmente migraron al Tenax ®, lo cual significaba que la migración de estos es un hecho real e importante que requiere su estudio. Algunos de los compuestos que

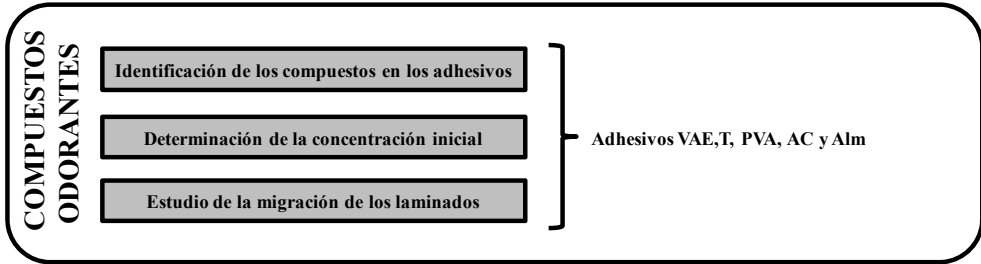
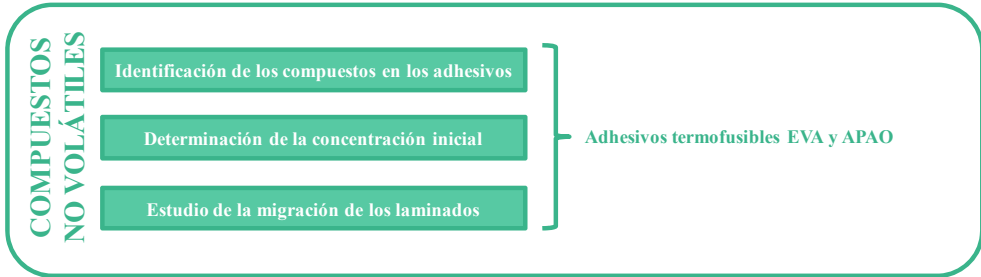
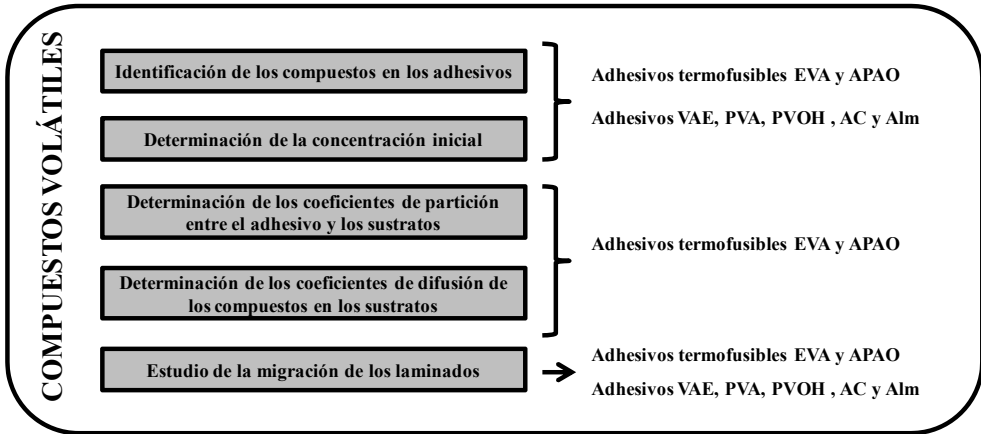
migraban se encontraban en las listas positivas de las legislaciones de plásticos Europea 10/2011/EU y el Real Decreto 847/2011. Y todos estos estaban por debajo de los límites de migración específica (SML). A falta de legislación, algunos compuestos estaban por encima de los 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para barrera funcional que impone dichas normas, aunque todos sus valores de migración estaban muy por debajo de los valores recomendados por Cramer según sus toxicidades.

Además se validó el modelo MIGRATEST © para la predicción de la migración. Se encontró una buena correlación entre los valores experimentales y predichos y se observó en general que los valores predichos eran mayores que los calculados experimentalmente. Por lo que se puede concluir que el modelo sobreestima los valores de migración, hecho positivo para la seguridad alimentaria.

Por otro lado, se ratificó la relación, como cabía esperar, entre los resultados de migración experimental del adhesivo termofusible con las constantes de partición y difusión anteriormente calculadas en el capítulo 1.

CAPÍTULO 3

*IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN
DE LA MIGRACIÓN DE COMPUESTOS NO
VOLÁTILES EN DOS ADHESIVOS
TERMOFUSIBLES*



IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES DE DOS ADHESIVOS TERMOFUSIBLES.

1. INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO

Como se ha descrito en los capítulos anteriores, el primer paso en el estudio del comportamiento de los adhesivos utilizados en la fabricación de envases alimentarios es la determinación de su composición, que permitirá conocer las sustancias que podrían migrar desde el envase alimentario.

Aunque los compuestos más volátiles son los que mayor movilidad tienen y por tanto tendrán un mayor potencial de migración (Athenstadt, et al., 2012; Aznar, et al., 2011; Canellas, et al., 2010a; Nerin, et al., 2012), es necesario también conocer aquellos compuestos menos volátiles que podrían llegar a migrar (Athenstadt, et al., 2012; Canellas, et al., 2010b; Sendon, et al., 2012).

La identificación de los compuestos no volátiles supone un reto muy importante desde el punto de vista analítico, ya que necesita técnicas de detección muy potentes. Para poder llevar a cabo esta tarea son necesarias técnicas analíticas basadas en la separación de compuestos por cromatografía de líquidos acopladas a detectores de espectrometría de masas.

Cuando se trabaja con muestras complejas, las técnicas de detección más habituales por espectrometría de masas como cuadrupolos o trampas de iones como analizadores, no proporcionan suficiente sensibilidad cuando se adquiere en modo barrido o full scan. Sin embargo, los analizadores de masas por tiempo de vuelo (TOF) proporcionan una sensibilidad hasta 100 veces mayor y una selectividad necesaria para llevar a cabo una identificación eficiente de muestras complejas como sería el caso de los adhesivos. Estos analizadores combinan una alta sensibilidad en modo full scan con una alta resolución en la medida de masas exactas, que permite asignar composiciones elementales de los iones determinados. Por tanto, aporta mucha información para la posterior identificación de compuestos desconocidos (Botitsi, et al., 2011; Canellas, et al., 2010b; Krauss, et al., 2010; Pico and Barcelo, 2008; Zheng, et al., 2009).

En este estudio, se trabajó con un detector formado por la combinación de un cuadruplo unido a un analizador de tiempo de vuelo (QTOF), mostrado en la siguiente Figura 3.1. Este analizador, como se explicará posteriormente, permite obtener los espectros con masa exacta de los iones principales así como de los fragmentos de estos iones (Lacorte and Fernandez-Albaz, 2006). Esta técnica se ha utilizado en numerosas ocasiones para análisis de compuestos desconocidos para seguridad alimentaria y medio ambiente (Bobeldijk, et al., 2001; Canellas, et al., 2012; Hernandez, et al., 2008; Martinez Bueno, et al., 2012; Pico and Barcelo, 2008; Pico, et al., 2007; Pico, et al., 2008; Zweigenbaum, 2011).



Figura 3.1: Analizador QTOF

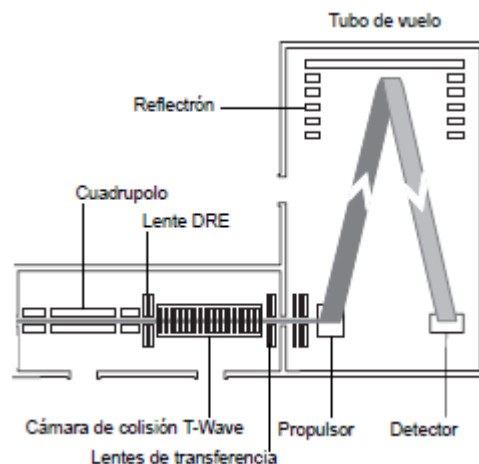


Figura 3.2: Esquema del cuádrupolo unido a un analizador de tiempo de vuelo (QTOF)

La ventaja que presenta un cuádrupolo antes del analizador TOF, es que este permite filtrar un ion específico al TOF cuando se trabaja en modo (MS/MS) o filtrar todos los iones (MS), como sería el caso de este trabajo, para posteriormente enviarlos a una segunda cámara "cámara de colisión T-wave"(Figura 3.2), en la que se aplica un voltaje y se fragmentan los iones procedentes del cuádrupolo, por la colisión con el gas argón. Finalmente, los fragmentos de los iones pasan después al analizador de tiempo de vuelo (TOF), donde un pulso de voltaje alto, acelera ortogonalmente los iones por el tubo de vuelo y un reflectrón, los refleja de nuevo hacia el detector. Los iones con diferentes relaciones masa/carga llegan al detector en momentos diferentes, permitiendo la creación de un espectro de masas con alta resolución.

Otra ventaja de este sistema, es que permite trabajar en modo MS^E. Este es un método novedoso de adquisición de datos que registra la masa exacta del ión principal así como la información de los iones fragmentados en la

misma prueba (Figura 3.3). Este alterna en el tiempo entre dos funciones: la función 1, la adquisición en baja energía (no se aplica voltaje en la celda de colisión) donde se obtiene el espectro de masa exacta del ión sin fragmentar y función 2 adquiriendo en elevado contenido energético (energía de colisión) donde se obtiene el espectro de los fragmentos con masas exactas del ión fragmentado. Esta forma de adquisición permite obtener gran información estructural de la molécula desconocida para una identificación posterior.

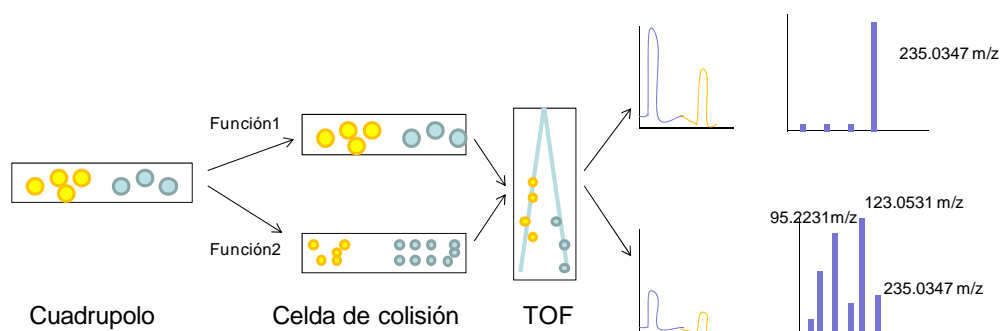


Figura 3.3: Esquema ilustrativo del modo de adquisición MS^E

La identificación de compuestos no volátiles es un trabajo muy tedioso y complejo. En este capítulo se realizó primero el trabajo cualitativo de migración tanto para los laminados como para los sustratos y, comparando ambas muestras, se determinaron los compuestos migrantes procedentes del adhesivo.

Posteriormente se llevó a cabo su identificación y se calculó la concentración inicial de estos compuestos en el adhesivo directamente. Finalmente, se realizaron los ensayos cuantitativos de migración en los laminados, para corroborar si dichos compuestos migrantes cumplían la legislación vigente y no suponían ningún riesgo para la salud.

La Figura 3.4 muestra un esquema del desarrollo del trabajo realizado en este capítulo.

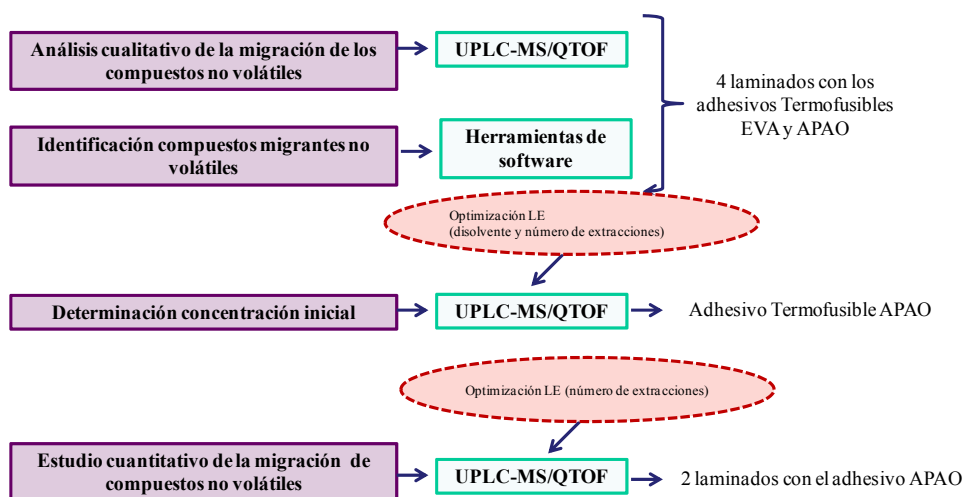


Figura 3.4: Esquema trabajo desarrollado en el capítulo 3

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. REACTIVOS

Tetradecanamida (638-58-4), hexadecanamida (629-54-9), 9-Octadecenamida, (9Z) (301-02-0), 3,5-di-tert-butil-4-hidroxibenzaldehído (1620-98-0), hexamida (628-02-4), 2,6-di-tert-butil-4-(1-metilpropil)-fenol (17540-75-9) y ácido fórmico suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España). Todos fueron de calidad analítica. Diclorometano, metanol y agua suministrados por Scharlau Chemie S.A (Sentmenat,

España), todos ellos con calidad HPLC. Tenax ® TA 80/100 fue suministrado por Supelco (Bellefonte, Estados Unidos)

Se utilizó:

- Una disolución A de hexamida de 200 µg/g en metanol como estándar interno para modo ESI (+)
- Una disolución B de 2,6-di-tert-butil-4-(1-metilpropil)-fenol de 200 µg/g en metanol como estándar interno para modo ESI (-).
- Una disolución C que contenía cuatro estándares (tetradecanamida, hexadecanamida, Octadecenamida, (9Z), 3,5-di-tert-butil-4-hidroxibenzaldehido) a 20 µg/g en metanol para la optimización de la extracción del Tenax ®.

2.1.2. LAMINADOS Y ADHESIVOS

En este capítulo, se trabajó con los adhesivos y los laminados previamente estudiados en el capítulo 1, es decir, con 2 adhesivos termofusibles (T_01 y T_02) uno de base EVA (acetato de vinilo y etileno) y el otro de APAO (alfa-poliiolefina amorfa). Y con sus respectivos laminados, formados con sustratos de cartón (C) y con cartón con polipropileno (CPP) y fabricados en el laboratorio.

- Laminado 1 [C-T_01-C]
- Laminado 2 [CPP-T_01-CPP]
- Laminado 3 [C-T_02-C]
- Laminado 4 [CPP-T_02-CPP]

2.2. INSTRUMENTAL

2.2.1. CROMATÓGRAFÍA LÍQUIDA ULTRA ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) Acquity de Waters (Milford, MA, EE.UU). Se utilizó una columna cromatográfica UPLC BEH C18 de 1,7 μm de tamaño de partícula, 2,1mm de diámetro interno y 100 mm de longitud de Waters (Milford, MA, EE.UU). Se seleccionó esta columna debido a su versatilidad, que permite la separación cromatográfica de compuestos con un amplio rango de polaridades. El resto de parámetros utilizados, se muestran en la siguiente Tabla 3.1

2.2.2. DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se utilizó un espectrómetro formado por la combinación de un cuadrupolo a un tiempo de vuelo (QTOF), Xevo G2 de Waters (Milford, MA, USA).

Con la fuente de ionización de electrospray (ESI) en modo positivo ESI (+) y negativo ESI (-) y el analizador en modo sensibilidad. El resto de parámetros utilizados, se muestran en la siguiente Tabla 3.1

Tabla 3.1: Parámetros utilizados para los análisis por UPLC acoplado a MS/QTOF

Instrumentación		
Condiciones UPLC	Fase móvil (Agua –metanol con 0,1 % ácido fórmico) de gradiente 5 al 95% metanol al 0,1% en ácido fórmico (min)	0-24
	Flujo fase móvil (mL/min)	0,3
	Tª de columna (°C)	35
	Volumen inyectado (µL)	5
	Condiciones masas (QTOF)	Rango de masas (Da)
	Voltaje del cono (V)	20-50 (30 óptimo)
	Voltaje de corona, ESI+ (kV)	2,5
	Voltaje de corona, ESI- (kV)	0,5
	Temperatura de la fuente (°C)	150
	Temperatura de desolvatación (°C)	450
	Flujo del gas de desolvatación (L/h)	650
	MS ^E modo (V)	5-40

Además, se utilizaron los programas de software MassLynx v.4.1 y Cromalynx (Waters, Milford MA, USA) para el análisis de muestras.

2.3. ANÁLISIS CUALITATIVO DE MIGRACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MIGRANTES EN LOS ADHESIVOS

Como ya se ha comentado en la introducción, el objetivo principal de este capítulo era identificar los compuestos no volátiles que migraban desde los adhesivos, que forman parte de los laminados para contacto alimentario. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de migración cualitativo, donde se utilizó Tenax ® como simulante alimentario, en contacto con los cuatro laminados y también con sus sustratos.

El ensayo se realizó según el capítulo 2 (Vera, et al., 2011), donde 5x5 cm de laminado (donde el 100% de superficie contenía adhesivo en su

interior) y 2 láminas de sustrato, también de 5x5 cm (donde no había adhesivo) se cubrieron con 1g de Tenax ® ($4g_{\text{Tenax}}/\text{dm}^2$, según norma UNE-EN 14338) formando una capa uniforme y se colocaron en el interior de una placa Petri, para posteriormente introducirlas en el horno a 40°C durante 10 días. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, se extrajo el Tenax dos veces consecutivas con 3,4 mL de metanol (cada extracto se mantuvo una hora agitando) y se juntaron ambos extractos y se concentraron hasta 200 μL con una corriente de N_2 . Finalmente, los extractos se analizaron en UPLC-MS/QTOF utilizando el modo de electrospray en ESI (+) y ESI (-).

Una vez realizado el ensayo de migración, se procedió a la identificación de los compuestos migrantes. Este estudio, se llevó a cabo en diferentes pasos que podían ser posibles gracias a la utilización de potentes herramientas de software para la elucidación estructural y por tanto, para ayudar con la identificación de los compuestos desconocidos. Estas herramientas eran: Chromalynx XS, Elemental composition y Mass Fragment TM

Para el uso de estas herramientas, es necesario trabajar en el modo de MS^E antes mencionado, donde la adquisición de datos registra la masa exacta del ión principal (función 1) así como la masa exacta de los iones fragmentados (función 2).

Los pasos llevados a cabo para la identificación de los compuestos migrantes fueron los siguientes, véase Figura 3.5:

- I. En primer lugar, para determinar los compuestos migrantes procedentes del adhesivo, se compararon los cromatogramas de migración de cada laminado con sus respectivos sustratos. Para ello, se utilizó la herramienta de software Chromalynx XS en modo

“untarget”. La cual lleva a cabo una deconvolución de todos los picos en los cromatogramas adquiridos en la función 1. Para después, comparar automáticamente dos cromatogramas entre si de dos muestras distintas y así obtener un listado de todos los picos diferentes.

Tras la deconvolución de los cromatogramas resultantes del estudio de migración de los 4 laminados y de los sustratos, se llevó a cabo una comparación de cada laminado con su respectivo sustrato, obteniendo un listado de los picos diferentes con sus tiempos de retención, su masa exacta y su abundancia. Estos correspondían a los compuestos migrantes de los adhesivos utilizados para la fabricación de cada laminado.

- II. Una vez encontrados los picos y por tanto los iones procedentes del adhesivo, se determinó su fórmula molecular con la herramienta de software llamada Elemental Composition dentro de MassLynx 4.1. Esta herramienta proporciona la fórmula molecular del ion en estudio basándose en la masa exacta medida, así como las de sus isótopos. También muestra el error de masa (Δm), como la diferencia entre la masa medida y la masa de la fórmula propuesta.

En este paso se consideró que el compuesto desconocido estaba formado con los elementos más comunes como (C, H, O, N, Cl, S) y Na, que está presente en la fase móvil, y a menudo, las moléculas forman aductos con él

- III. Una vez definidas las distintas fórmulas moleculares para cada ión, se buscaron las estructuras moleculares en las bases de datos: chemspider [www.chemspider.com] o Scifinder [www.scifinder.cas.org] obteniendo una serie de estructuras moleculares candidatas.

Como en algunos casos, la cantidad de moléculas propuestas para cada fórmula molecular eran cuantiosas, estas se ordenaron de mayor a menor en función de las referencias bibliográficas. Y se seleccionaron las 6 primeras estructuras moleculares más encontradas en bibliografía para cada fórmula molecular.

- IV. Con el listado de las estructuras moleculares más probables para cada ión, se utilizó el modo MS^E de alta energía (función 2), con la herramienta del software Mass Fragment, la cual fragmenta la estructura molecular.

Las fragmentaciones de las moléculas propuestas se compararon con la fragmentación del compuesto desconocido (optimizando los voltajes de colisión, para la máxima ruptura del mismo), obteniendo los candidatos más probables para cada ión.

- V. Finalmente, de estos candidatos propuestos, se analizaron los estándares puros, llevando a cabo la identificación de los compuestos migrantes.



Figura 3.5: Esquema de los pasos realizados para la identificación

2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL (CP₀) DE LOS COMPUESTOS MIGRANTES EN LOS ADHESIVOS

Este ensayo sólo se realizó para el adhesivo T_02 (APAO), ya que, para el otro adhesivo, no se detectó ningún compuesto no volátil en el Tenax® tras el ensayo de migración.

Este estudio se realizó directamente en el adhesivo, por lo tanto, inicialmente se curó para que tuviera las mismas propiedades que el adhesivo cuando se aplica en el laminado. Para ello, se calentó el adhesivo T_02 a una temperatura entre 160-180°C, hasta que este se derritió y se

extendió sobre una superficie de papel siliconado (evitando la absorción de este) y formando una capa fina. Una vez frío y por tanto duro, se cortó un trozos pequeños para su posterior extracción.

Previamente se optimizó la extracción, seleccionando el disolvente apropiado (metanol y diclorometano) así como el número de extracciones. Para ello, 0,5 g de adhesivo T_02 previamente curado, se extrajeron con 2,5 mL de ambos disolventes, en consecutivas extracciones (hasta 4 extractos) a 40°C durante 24 horas. En el caso del diclorometano, al llevar a cabo la segunda extracción, se produjo una disolución completa del adhesivo, por tanto, se seleccionó el diclorometano en este apartado.

El método final de extracción fue: 0,5 g de T_02 se extrajo dos veces consecutivas con diclorometano durante 24 horas a 40°C hasta la disolución total del mismo. Se juntaron ambos extractos y se diluyeron 1/80 en metanol, precipitando el polímero. Se añadió 10 µL de disolución A y B como estándares y se filtró. Finalmente se analizó por UPLC-MS/QTOF, en ESI (+) y ESI (-). Se analizaron tres réplicas de adhesivo T_02.

Para construir la recta de calibrado, se prepararon distintas disoluciones de los compuestos a distintas concentraciones en metanol, donde se añadió 10 µL de las disoluciones A y B como estándares a cada una. Se analizaron tres réplicas de cada concentración por UPLC-MS/QTOF, en ESI (+) y ESI (-).

2.5. ENSAYO CUANTITATIVO DE MIGRACIÓN

Una vez conocidos los compuestos migrantes así como sus concentraciones iniciales, se determinaron sus valores de migración.

Para ello, se llevó a cabo el ensayo de migración optimizado en el capítulo 2, pero al tratarse de compuestos más pesados, previamente se determinó el número de extracciones necesarias para extraer un 90 % de estos compuestos en el Tenax. Para ello, dos muestras con 1g de Tenax® se doparon con 100 µL de disolución C, formada con cuatro estándares de compuestos que se habían identificado previamente, y se extrajeron hasta 3 veces consecutivas con 3.4 mL metanol (agitando durante 1 hora). Cada extracto se analizó por separado en UPLC-MS/QTOF, determinando el número de extracciones necesarias para obtener una recuperación superior al 90%.

Una vez optimizado el número de extracciones se realizó el ensayo de migración para los laminados 3 y 4 según el apartado 2.3.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE MIGRACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LOS ADHESIVOS

El análisis cualitativo de migración y la determinación de los compuestos migrantes procedentes de los adhesivos, se llevó a cabo

encontrando los iones diferentes comparando los cromatogramas de los laminados con sus respectivos sustratos tras el ensayo de migración. Este, se realizó con el software Chromalynx XS, cuyos parámetros escogidos para dicho análisis eran: tipo de análisis non targeted, tolerancia en masa de ± 20 mDa y un tiempo de retención de $x \pm 0,2$ min.

Se obtuvo una lista con las masas diferentes, con sus tiempos de retención y se seleccionaron los picos cuya abundancia estuviera por encima de 1000 ua.

Para la migración de los laminados 1 y 2 formados con el adhesivo T_01 (EVA), no se encontró ningún ión diferente al comparar los cromatogramas de dichos laminados con los de sus respectivos sustratos. Por tanto, no migraba ningún compuesto procedente de dicho adhesivo.

Sin embargo, para los laminados 3 y 4 formados con el adhesivo T_02 (APAO) se encontraron los mismos iones en ambos laminados procedentes del adhesivo, que correspondían para ESI (+) a 5 iones y para ESI (-) a 2 iones.

La Figura 3.6 muestra los cromatogramas de la migración del laminado 3 perteneciente al adhesivo T_02 comparado con el sustrato de cartón para ESI (+) y ESI (-)

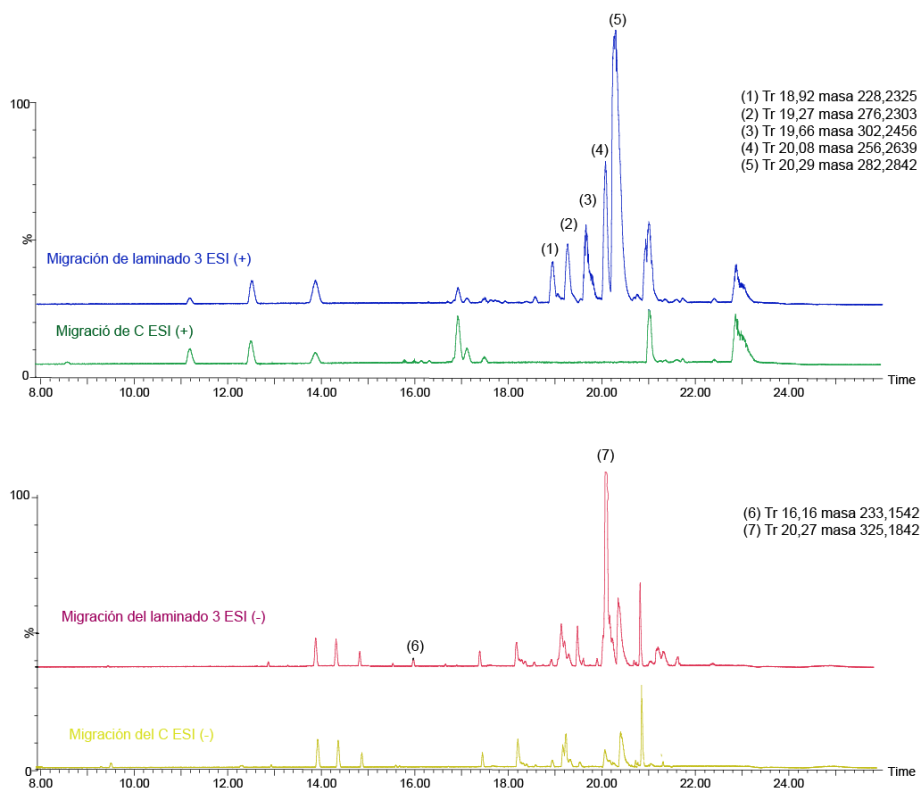


Figura 3.6: Cromatogramas de la migración del laminado 3 y del cartón C, analizadas por UPLC-MS/QTOF con ESI + (en la parte superior) y con ESI – (en la parte inferior).

Una vez conocidos los iones pertenecientes al adhesivo T_02, se determinaron sus fórmulas moleculares a través del software Elemental Composition de MassLynx 4.1 y se seleccionaron en los casos que hubiera propuesta más de una fórmula molecular, las de mayores i-fit (ajuste isotópico). Figura 3.7 muestra un ejemplo del software Elemental Composition para el ión 302,2456.

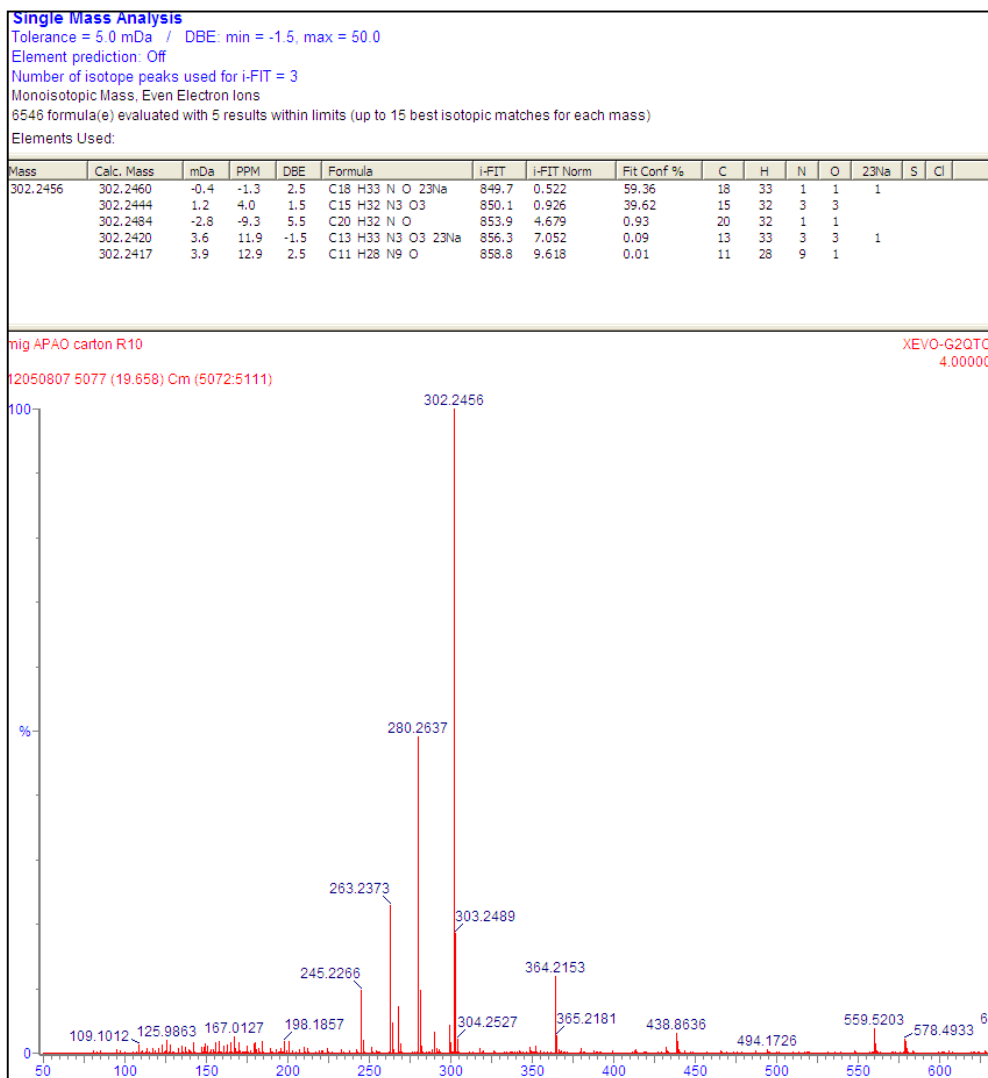


Figura 3.7: Fórmulas moleculares propuestas para el ión 302,2456 con el software Elemental Composition.

La Tabla 3.2 muestra la masa exacta medida de los iones encontrados, con sus tiempos de retención, las fórmulas moleculares propuestas con su masa teórica, su Δm (diferencia entre masa exacta medida y la masa teórica de la fórmula molecular propuesta) y sus iFit (%).

Tabla 3:2: Número de pico en el cromatograma, tiempo de retención (Tr), ión encontrado, fórmula propuesta y con su masa teórica, Δm, iFit (%), energía de colisión optimizada para la función 2, y compuesto identificado tras el análisis por UPLC-MS/QTOF.

N	Tr	Ion	Adh	Masa medida (Da)	Fórmula propuesta	Masa teórica (Da)	Δm (Da)	iFit (%)	Energía colisión (V)	Compuesto identificado
1	18,92	[M+H] ⁺	T_02	228,2325	C14H30NO	228,2307	-0,2	100	30-40	Tetradecanamida
2	19,27	[M+Na] ⁺	T_02	276,2303	C16H31NONa	276,2303	0,0	78,53	15-30	No identificado C16H31NO
		[M+H] ⁺						15,91		
3	19,66	[M+Na] ⁺	T_02	302,2456	C18H33NONa	302,2460	-0,4	59,36	20	9,12- Octadecadienamida, (9Z,12Z)
		[M+H] ⁺						39,62		
4	20,08	[M+H] ⁺	T_02	256,2639	C16H34NO	256,2640	-0,1	100	30-40	Hexadecanamida
5	20,29	[M+H] ⁺	T_02	282,2804	C18H36NO	282,2797	0,7	100	15-30	9-Octadecenamida, (9Z)
6	16,15	[M-H] ⁻	T_02	233,1542	C15H21O2	233,1542	0,0	100	15-30	3,5-di-tert-butil-4- hidroxibenzaldehído
7	20,27	[M-H] ⁻	T_02	325,1849	C14H29O8	325,1862	-1,3	100	15-30	No identificado

Una vez, seleccionadas las fórmulas moleculares con los valores de iFit (%) mayores, se buscaron los estructuras moleculares en las bases de datos Chemspider [www.chemspider.com] y SciFinder [www.scifinder.cas.org], mostrando las moléculas que tenían dicha fórmula molecular. La Figura 3.8 muestra las estructuras moleculares propuestas para la fórmula molecular C₁₈H₃₃NO ordenadas en orden descendiente de referencias bibliográficas para SciFinder.

The screenshot shows the SciFinder search results for the molecular formula C₁₈H₃₃NO. The interface includes a navigation bar with 'Explore References', 'Explore Substances', and 'Explore Reactions'. Below the search bar, there are options to 'Get References', 'Get Reactions', 'Tools', and 'Send to SciPlanner'. The results are sorted by 'Number of References' and show 274 substances. Six substance details are displayed in a grid:

- 1. Substance Detail 3999-01-7: 9,12-Octadecadienamide, (9Z,12Z)-
- 2. Substance Detail 13891-73-1: 2,4-Tetradecadienamide, N-(2-methylpropyl)-, (2E,4E)-
- 3. Substance Detail 13231-74-8: 8-Heptadecene, 1-isocyanato-
- 4. Substance Detail 3061-17-4
- 5. Substance Detail 3072-13-7
- 6. Substance Detail 7418-02-2

A search box in the top right of the substance details area shows '61 substance(s) in current answer'.

Figura 3.8: Estructuras moleculares propuestas para la fórmula C₁₈H₃₃NO del ión 302,2456 con el la base de datos SciFinder.

Para el compuesto número 1, C₁₄H₂₉NO, aparecían 890 candidatos, en el compuesto 2 (para la primera fórmula molecular propuesta, C₁₆H₃₁NO, se encontraban 890 candidatos y para la segunda, C₁₃H₂₉N₃O₃, únicamente 1 candidato), para el tercer compuesto (en la primera fórmula molecular, C₁₈H₃₃NO, aparecían 274 y 134 para la segunda C₁₈H₃₁N₃O₃) y para el resto de fórmulas propuestas 714, 302, 6674 y 19 candidatos respectivamente. Posteriormente, se ordenaron estos

compuestos por orden decreciente según las referencias bibliográficas y se seleccionaron los seis candidatos más referenciados.

Una vez escogidos los seis candidatos para cada fórmula molecular, se llevó a cabo su fragmentación utilizando el software MassFragment en la (función 2), obteniendo los fragmentos con su masa exacta. Estos, se compararon con los fragmentos del ión en estudio (donde previamente se había optimizado el voltaje de colisión, para que su fragmentación fuera máxima, véase Tabla 3.2.). Si ambos espectros de fragmentación (función 2) coincidían, el compuesto estaba prácticamente identificado.

La Figura 3.9, muestra un ejemplo del ión 282,2804 correspondiente al (9-Octadecenamida, (9Z)), fragmentado con la función 2 en modo MS^E.

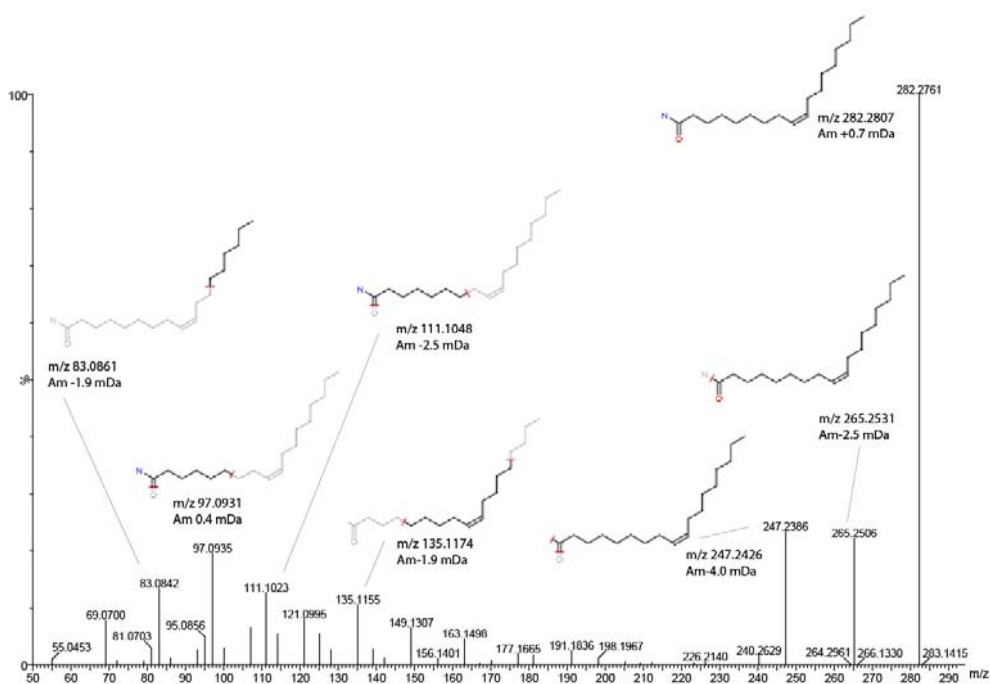


Figura 3.9: Espectro de la fragmentación del ión 282,2804 (9-Octadecenamida, (9Z)), obtenido por la función de alta energía de colisión MS^E, mostrando también las estructuras propuestas para cada fragmento por el software MassFragment.

Para confirmar dicha identificación su tiempo de retención, su masa molecular y los iones fragmentados tenían que coincidir con el patrón.

La Tabla 3.2 muestra los compuestos identificados.

Para el compuesto 2, la fórmula molecular $C_{13}H_{29}N_3O_3$ se descartó, ya que, el espectro del compuesto buscado con el espectro de las estructuras moleculares propuestas no coincidía. Por tanto, se seleccionó la fórmula molecular $C_{16}H_{31}NO$. Para esta fórmula un compuesto presentaba una similar fragmentación que el compuesto desconocido, este era el 2-pirrolidinona, 1-dodecil- (CAS 2687-96-9).

Para el compuesto séptimo, el candidato con mayor número de referencias era el heptaetilen glicol (CAS 5617-32-3), pero se confirmó que el compuesto desconocido, no correspondía a este.

De los compuestos identificados en el adhesivo T_02, se encontraron varias amidas (Tetradecanamida, 9,12-Octadecadienamida (9Z,12Z), Hexadecanamida y 9-Octadecenamida, (9Z) conocida como oleamida) las cuales según bibliografía, se utilizan como aditivo en películas de poliolefina para facilitar el deslizamiento y reducir la resistencia a la fricción (Chen, 1997; Maltby, 1999; Maltby and Read, 1999; Swanson, et al., 1993; Zahedi, et al., 2006). El compuesto identificado para ESI (-), 3,5-di-tert-butil-4-hidroxibenzaldehído, podría utilizarse como antioxidante en los adhesivos en base de poliolefina.

3.2. CONCENTRACIÓN INICIAL DE LOS COMPUESTOS MIGRANTES EN EL ADHESIVO

La concentración inicial de los compuestos migrantes en el adhesivo, se determinó por una extracción con diclorometano del adhesivo previamente curado y dilución 1/80 en metanol.

Para realizar la recta de calibrado, se prepararon disoluciones de los compuestos a distintas concentraciones en metanol. En la Tabla 3.3 se muestra los parámetros analíticos para UPLC-MS/QTOF, mostrando buenos resultados en términos de límites de detección (LOD) entre 0,004 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (9-Octadecenamida, (9Z)) y 0,23 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (Hexadecanamida). Y valores de RSD por debajo 6.32 %.

También en la Tabla 3.3 se muestra los valores de concentración inicial en el adhesivo. El compuesto más abundante es el 9-Octadecenamida, (9Z) con una concentración por encima de 7000 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ de laminado. El compuesto 9,12-Octadecadienamida (9Z,12Z) se cuantificó con el estándar 9-Octadecenamida, (9Z).

Tabla 3.3: Parámetros analíticos del UPLC-MS/QTOF. Concentración inicial (C_{p_0}) y resultados de migración expresados en $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ de laminado

Compuestos	Ecuación	R^2	Rango lineal ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)	RSD (%)	C_{p_0} ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)	Migración Laminado 3 ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)	Migración Laminado 4 ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)
Tetradecanamida	$y=3,7539x+0,0667$	0,9989	0,15-22,9	0,05	0,15	4,21	346 ± 21	$6,67\pm 0,07$	$8,7\pm 1,1$
9,12-Octadecadienamida, (9Z,12Z)							460 ± 110	$28,5\pm 1,4$	$37\pm 3,7$
Hexadecanamida	$y=3,5933x+0,1099$	0,9999	0,79-23,1	0,23	0,79	3,14	1670 ± 240	$29,7\pm 2,3$	$40\pm 4,2$
9-Octadecenamida, (9Z)	$y=3,7162x+0,0689$	0,9985	0,01-21,8	0,004	0,01	6,32	7350 ± 910	$243\pm 1,9$	$260\pm 4,1$
3,5-di-tert-butil-4-hidroxibenzaldehido	$y=2,1922x-0,0101$	0,9994	0,27-5,55	0,08	0,27	1,87	$14,0\pm 2,9$	$0,60\pm 0,1$	$0,50\pm 0,1$

3.3. MIGRACIÓN DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES

Previo al cálculo de los valores de migración, se optimizó el número de extracciones necesarias para extraer los compuestos migrantes del Tenax®. Resultando que dos extracciones eran suficientes para obtener más del 90% de recuperación, al igual que ocurría en el capítulo 2 con los compuestos migrantes volátiles.

Los valores de migración, para ambos laminados 3 y 4, se muestran en la Tabla 3.3. Como se presenta en dicha tabla, los valores de migración para el laminado 4 eran ligeramente superiores que para el laminado 3. Este suceso no era el esperado, ya que el laminado 4 está formado por el mismo tipo de cartón y lo que lo diferencia es una película de polipropileno que lo cubre por una cara. En las industrias de envasado, el papel se recubre con estas películas de material polimérico para reducir la porosidad y por tanto, disminuir la migración de compuestos volátiles (Limam, et al., 2005). Por tanto, cabría esperar que al tratarse de un material menos poroso que el papel, como es el polipropileno, este impidiera la difusión de compuestos no volátiles, reduciendo la migración en el laminado 4, al igual que ocurría en el capítulo 2 con los compuestos volátiles. Sin embargo ocurría lo contrario.

La migración es un fenómeno de transferencia de masa, consecuencia de la tendencia al equilibrio de todo sistema químico, y esta controlada por los mecanismos de difusión y partición (Canellas, et al., 2010a; Dole, et al., 2006; Tehrany and Desobry, 2004; Vera, et al., 2011). Para que los compuestos volátiles difundan más lentamente en el papel, este se reviste de polipropileno (Aznar, et al., 2011; Eggleston and Peirce, 1995; Horgan, 1999; Moldrup, et al., 1998; Vera, et al., 2011), pero no se ha encontrado en

bibliografía como afecta este revestimiento a la difusión de compuestos de mayor peso molecular. Cuando se trata de compuestos volátiles, estos difunden a través de los poros del papel, entre el aire ocluido en el mismo, de forma que la difusión global es rápida. Sin embargo, cuando se trata de compuestos no volátiles, la difusión implica la disolución en las partículas de pulpa de papel y en el caso del recubrimiento de polipropileno, en el polímero.

Por otro lado, los coeficientes de partición podrían verse favorecidos mediante el recubrimiento de PP, incrementando la migración hacia el sustrato.

El coeficiente de partición, como se ha mencionado anteriormente, dependen del parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ). Este es un valor numérico que indica la afinidad de un compuesto específico en un material determinado. Esta solubilidad es posible solamente cuando sus fuerzas de atracción intermoleculares son similares, y por lo tanto, los valores de δ son similares (Durkee, 2004a; Durkee, 2004b; Tehrany and Desobry, 2004). El valor de solubilidad δ del sustrato de PP es $16,5 \text{ MPA}^{1/2}$ según bibliografía (AIC, 1984; Barton, 1990b) y la solubilidad de los compuestos cuyo grupo funcional son las amidas son $\delta > 25 \text{ MPA}^{1/2}$ (AIC, 1984). Por lo tanto, al ser tan diferentes los valores de solubilidad, estas no tendrían tendencia a migrar al sustrato formado con PP.

Sin embargo, la solubilidad del adhesivo APAO no se conoce, pero es un polímero fabricado por polimerización de una alfa-olefina, resultando ser una estructura similar al polipropileno, y por tanto, tendrá una solubilidad muy parecida a este. Si los compuestos, debido a la tendencia de todo sistema a alcanzar el equilibrio, se distribuyeran de manera uniforme tanto

en el adhesivo como en el sustrato, se incrementaría la migración en el laminado 4. Esta podría ser la razón de este aumento de compuestos encontrados cuando se utiliza el papel recubierto con PP como sustrato.

Por otra parte, con el fin de estudiar los posibles riesgos en los humanos, se realizaron búsquedas en la legislación de plásticos para estos compuestos: Reglamento 10/2011/EU y Real Decreto 847/2011. Sólo el compuesto 9-octadecenamida, (9Z) apareció, pero no tenía ningún límite de migración específica SML.

Para el resto de los compuestos, se calculó la ingesta diaria estimada (EDI), establecido por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) según la Ecuación 2.2. Y se comparó con los valores máximos recomendados de exposición humana por Cramer para cada clase de toxicidad (I, II y III son 1,8, 0,54 y 0,09 mg por persona por día).

Las amidas pertenecían a la clase I y 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldehído era de clase II, de acuerdo con las reglas de Cramer y mediante el Software v1.5.1 (Ideaconsult Ltd.).

Ningún valor de migración excedió de los valores recomendados por Cramer de exposición y también todos los valores de migración estaban por debajo de los 10 µg/Kg para barrera funcional que impone dichas normas.

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método UPLC-MS/QTOF para identificar y cuantificar los compuestos no volátiles que migraban desde dos tipos de adhesivos termofusibles, cuya formulación era distinta dependiendo del polímero base, y que formaban parte del envase alimentario.

Las técnicas utilizadas en dicho estudio junto con los programas informáticos, han demostrado ser unas potentes herramientas para la identificación de compuestos no volátiles en muestras complejas como son los adhesivos. La posibilidad de poder adquirir espectros en modo full-scan con alta sensibilidad y selectividad, además de la posibilidad de fragmentar los iones y conocer la masa exacta, proporcionan una cantidad de información que, después de ser analizada con estos programas informáticos llevó a la identificación de estos compuestos migrantes. Se identificaron cinco compuestos, de los siete que migraron para el adhesivo de base APAO, de los cuales se encontraban varias amidas y un compuesto de clase de toxicidad II según las reglas de Cramer (3,5-di-tert-butil-4-hidroxibenzaldehído). En el adhesivo de base EVA, sin embargo, no se detectó ningún compuesto migrante.

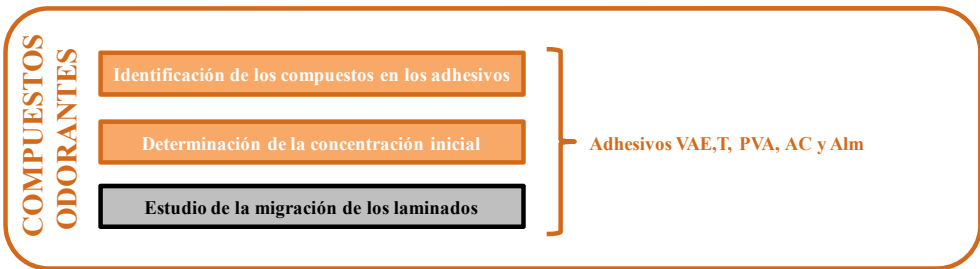
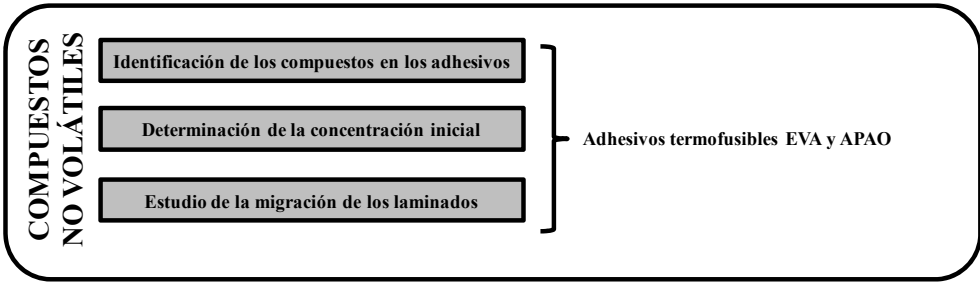
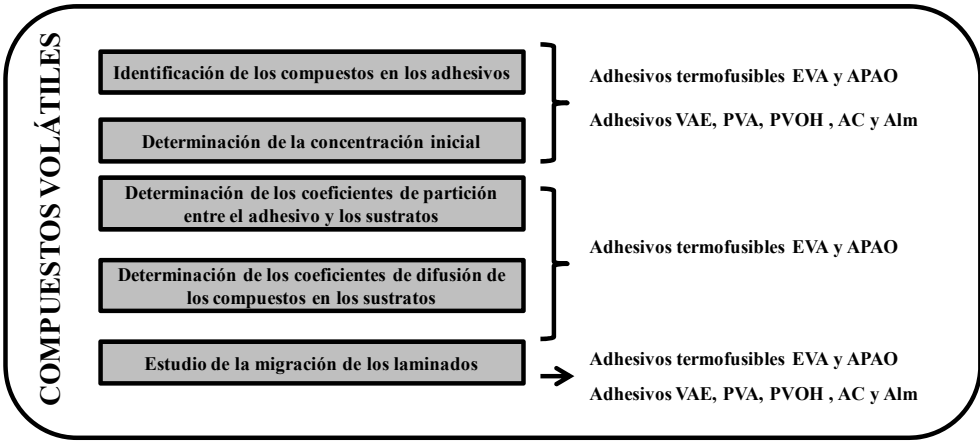
Por otro lado, se ha demostrado que los compuestos no volátiles también pueden migrar a través de las capas de los laminados y alcanzar el alimento, lo cual significa que la migración de estos, es un hecho real e importante que requiere su estudio.

Sólo el compuesto 9-Octadecenamida, (9Z) de los que migraban se encuentra en las listas positivas de las legislaciones de plásticos europea 10/2011/EU y el Real Decreto 847/2011 sin límite de migración específica

(SML). A falta de legislación, todos los compuestos estaban por debajo de los 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ que impone dichas normas para barrera funcional y muy por debajo de los valores recomendados por Cramer según sus toxicidades.

CAPÍTULO 4

*IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN
DE COMPUESTOS ODORANTES
PRESENTES EN LOS ADHESIVOS EN EL
ENVASE ALIMENTARIO*



IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ODORANTES PRESENTES EN LOS ADHESIVOS EN EL ENVASE ALIMENTARIO.

1. INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO

El objetivo de este capítulo era identificar los compuestos odorantes presentes en distintos tipos de adhesivos utilizados para envase alimentario, de los que previamente se había estudiado su migración dentro del Proyecto Europeo MIGRESIVES. En este proyecto, no se hacía mención a los compuestos odorantes, aunque se consideraban, tras los trabajos realizados, muy importantes, al comprobar que existía migración desde el adhesivo, difundiendo a través de la estructura multicapa hasta el alimento. Por tanto, si estos también migraban, producirían un cambio en las propiedades organolépticas de los alimentos.

En consecuencia el objetivo de este capítulo, fue identificar los compuestos odorantes presentes en los adhesivos, para posteriormente estudiar su migración.

Se disponía de un amplio rango de muestras de mercado, concretamente 30 laminados, pertenecientes al WP (paquete de trabajo) IV del proyecto MIGRESIVES. Se seleccionaron previamente los laminados formados por distintos tipos de adhesivos: acetato de vinilo y etileno (VAE), termofusible (T) acetato de polivinilo (PVA), almidón (Alm) y acrílico

(AC). Además, se tuvo en cuenta, que se dispusiera de laminado, adhesivo y sustratos por separado, para identificar los componentes que provenían del adhesivo y llevar a cabo un análisis sensorial y así poder seleccionar el adhesivo más odorante dentro de cada tipo, a través de un test triangular.

Posteriormente se llevó a cabo la identificación de los compuestos odorantes de los distintos tipos de adhesivos (5 adhesivos en total) mediante GC-O-MS. Previamente se extrajeron los compuestos odorantes por dos técnicas complementarias de extracción, de modo que se obtuviera un mayor listado de compuestos odorantes: HS-SPE y HS-SPME. Para el uso de HS-SPE se utilizó un procedimiento ya optimizado para el análisis de vinos en el laboratorio de análisis de aroma y enología, LAAE, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. Para el análisis por HS-SPME, se optimizó previamente una técnica novedosa y rápida, como fue la cromatografía de gases directa y olfatometría, D-GC-O.

Tras este paso, los extractos se analizaron por GC-O-MS por seis catadores que detectaban los compuestos odorantes, evaluando su intensidad y su olor para su posterior identificación.

Finalmente, se calcularon sus concentraciones iniciales en el adhesivo por HS-SPME-GC-O-MS.

Parte de este trabajo se realizó en el laboratorio de análisis de aroma y enología, LAAE, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, que son especialistas en análisis de aromas del vino. Durante una estancia de 2 meses aproximadamente, se adquirieron los conocimientos suficientes para la realización de estos ensayos y el manejo de la nueva técnica instrumental GC-O-MS.

La figura siguiente, Figura 4.1, muestra un esquema del trabajo.

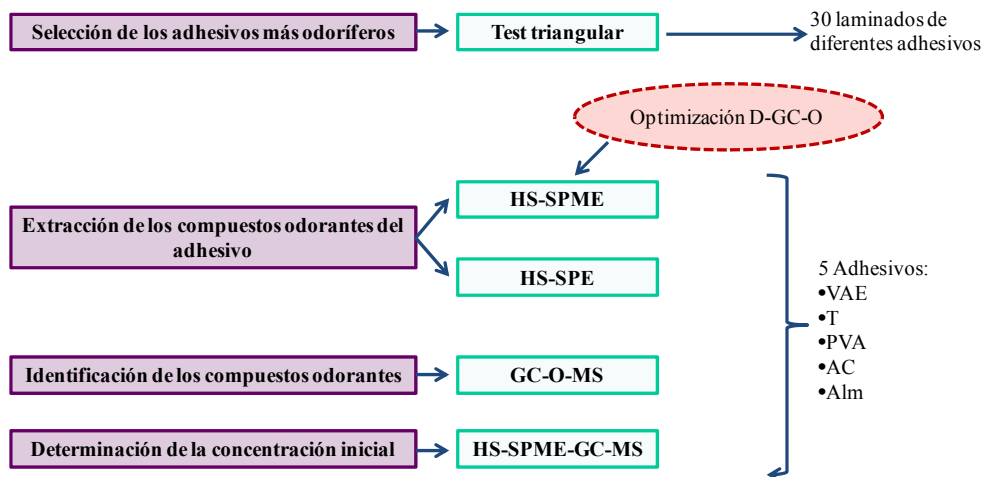


Figura 4.1: Esquema trabajo desarrollado en el capítulo 4

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. REACTIVOS

Acetato de etilo (141-78-6), 2-metil-2-propenoato de metilo.(80-62-2), tolueno (108-88-3), hexanal (66-25-1), 2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano (123-63-7), p-dimetilbenceno (106-42-3), propanoato de butilo (590-01-2), 1-butanol (71-36-3), 2-propenoato de butilo (141-32-2), estireno (100-42-5), p-isopropiltolueno (99-87-6), 2-octanona (111-13-6), hexanol (111-27-3), acetato de 2-etilhexilo (103-09-3), nonanal (124-19-6), ciclohexanol (108-93-0), 2-etil-1-hexanol (104-76-7), alcanfor (76-22-2), ácido propanoico (79-09-4), benzaldehido (100-52-7), octanol (111-87-5), ácido butírico

(107-92-6), benzoato de metilo (93-58-3), naftaleno (91-20-3), benzoato de 2-propenilo (583-04-0), 4-tert-butilfenol (98-54-4) fueron suministrados por Aldrich Química S.A (Madrid, España). Diclorometano, metanol y ácido acético fueron suministrados por Chemie S.A (Sentmenat, España).

Se utilizó:

- Una disolución A que contenía 4-tert-butilfenol de 1000 µg/g en agua como estándar interno.
- Una disolución B que contenía 5 estándares (1-butanol, p-cimeno, nonanal, ácido acético y naftaleno) de 10000 µg/g en metanol (disolución madre).
- Una disolución C que contenía 4-tert-butilfenol de 1000 µg/g en metanol como estándar interno.

2.1.2. FIBRAS DE SPME

Se emplearon: Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espesor, fibra de poliacrilato (PA) de 85 µm de espesor, fibra de Divinilbenzeno / carboxen / polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 µm, fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 µm de espesor. Todas ellas suministradas por Supelco (Bellefonte, EE.UU)

2.1.3. LAMINADOS Y ADHESIVOS

En los adhesivos que forman los laminados estudiados previamente en los ensayos de migración del capítulo 2, mostrados en la Tabla 4.1, se llevó a cabo una determinación de los compuestos odorantes.

Tabla 4.1: Muestras de laminado y adhesivo.

Tipo de adhesivo	Código del adhesivo	Código muestra	Sustratos
VAE	VAE_01	lam_01	C/C
VAE	VAE_01	lam_02	C/C
VAE	VAE_01	lam_03	C/C
VAE	VAE_02	lam_04	C/C
VAE	VAE_02	lam_05	C/C
VAE	VAE_02	lam_06	C/C
VAE	VAE_03	lam_07	C/C
VAE	VAE_04	lam_08	C/C
VAE	VAE_04	lam_09	C/C
VAE	VAE_04	lam_10	C/CPE
VAE	VAE_05	lam_11	C/C
PVA	PVA_01	lam_12	C/C
PVA	PVA_01	lam_13	C/C
PVA	PVA_01	lam_14	C/C
PVA	PVA_02	lam_15	C/P/C
PVA	PVA_03	lam_16	C/P/C
PVA	PVA_04	lam_17	C/P/C
PVOH	PVOH_01	lam_18	P/P
PVOH	PVOH_01	lam_19	P/P
PVOH	PVOH_01	lam_20	P/P
Alm	Alm_01	lam_21	P/P
Alm	Alm_01	lam_22	P/P
AC	AC_01	lam_23	P/PP
AC	AC_02	lam_24	P/PP
V+Alm	V+Alm_01	lam_25	P/PC/P
V+Alm	V+Alm_01	lam_26	P/PC/P
V+Alm	V+Alm_01	lam_27	P/PC/P
EVA	T_03	lam_28	C/C
EVA	T_01	lam_29	C/C
EVA	T_01	lam_30	CPP/PP
APAO	T_02	lam_31	C/C
APAO	T_02	lam_32	CPP/PP

C: cartón; P: papel; CPE: cartón laminado con polietileno; PC: papel corrugado; CC: cartón corrugado; CPP: cartón laminado con polipropileno VAE: acetato vinilo y etileno; PVA: acetato de polivinilo; PVOH: Polivinilalcohol; Alm: Almidón; AC: Acrílico; V: vinílico

Se decidió estudiar uno de cada tipo, ya que se disponía de un número extenso de muestras y dicho estudio sería muy laborioso.

Para comenzar con el trabajo, se seleccionaron aquellos laminados que estuvieran formados por distintos tipos de adhesivos y que además, se dispusiera del adhesivo así como de los sustratos por separado, para posteriormente determinar los compuestos odorantes procedentes únicamente de los adhesivos de forma inequívoca. Estos se resaltan en negrita en la tabla anterior

De los laminados formados por los adhesivos VAE, se disponía de tres adhesivos VAE_01, 04 y 05 que se encontraban separados del laminado.

De los adhesivos termofusibles, se disponían de todos los adhesivos por separado, T_01 y T_03 con una base de acetato de vinilo y etileno (EVA), así como el T_02 con una base de poliolefina amorfa (APAO)

De los laminados formados por los adhesivos PVA, sólo se suministró un adhesivo por separado, que era el adhesivo PVA_01 que formaba los laminados los lam_12,13,14. Al igual que el adhesivo de almidón, Alm_01 y cuyos laminados correspondían al lam_21 y 22

De los adhesivos AC estudiados en el capítulo 2, AC_01 y AC_02 (Tabla 4.1) ninguno de estos se encontraba por separado del laminado, por lo que la empresa que suministraba los adhesivos termofusibles estudiados previamente, nos cedió un adhesivo acrílico para su estudio, denominado AC_03, del cual no se precisaba mayor información. Este se utilizaba unido a los sustratos de cartón con polipropileno CPP y cartón sólo C.

Por tanto de los adhesivos PVA, Alm, AC sólo se disponía de uno de cada tipo por separado, PVA_01, Alm_01 y AC_03 respectivamente. Sin embargo de los adhesivos de VAE y termofusibles, se disponía de tres de cada tipo. Este hecho hizo que se llevara a cabo una selección del adhesivo

más odorífero, dentro de cada tipo, mediante un test triangular que se explicará en el siguiente apartado.

2.2. SELECCIÓN DEL ADHESIVO MÁS ODORÍFERO Y ANÁLISIS SENSORIAL

Para llevar a cabo la identificación de los compuestos odorantes de los adhesivos, previamente, se seleccionó el adhesivo más odorífero dentro del grupo de adhesivos en el que se dispusiera de más de uno (VAE y termofusible).

Para ello se realizó un test triangular, que de manera general, consiste en presentar al catador simultáneamente tres muestras, dos de ellas iguales y una diferente, y este debe señalar la muestra diferente.

En este caso, el catador debía de encontrar las diferencias de olor entre el laminado multicapa (sustratos más adhesivos) y los sustratos individuales, mostrados en la siguiente Tabla 4.2. Con lo que la diferencia de olor entre estas muestras, provendría del olor del adhesivo utilizado para la fabricación de dichos laminados. Por tanto, cuanto más odorífero fuera el adhesivo, más fácilmente se encontrarían las diferencias entre el laminado y el sustrato.

Tabla 4.2: Laminados estudiados para el test triangular formados con adhesivos VAE y T

Tipo de adhesivo	Código del adhesivo y gramaje en el laminado (g_{adh}/dm^2_{lam})	Código del laminado	Sustratos (gramaje y espesor)
VAE	VAE_01 (31,8 g_{adh}/m^2_{lam})	(Lam_01)	Cartón (350g/m ² y 502 μ m)
VAE	VAE_04 (49,1 g_{adh}/m^2_{lam})	(Lam_08)	Cartón (350g/m ² y 479 μ m)
VAE	VAE_05 (30,7 g_{adh}/m^2_{lam})	(Lam_11)	Cartón (350g/m ² y 485 μ m)
T	T_03 (68,2 g_{adh}/m^2_{lam})	(Lam_28)	Cartón (350g/m ² y 570 μ m)
T	T_01 (31,3 g_{adh}/m^2_{lam})	(Lam_29)	Cartón (350g/m ² y 380 μ m)
T	T_02 (31,3 g_{adh}/m^2_{lam})	(Lam_31)	Cartón (350g/m ² y 380 μ m)

El ensayo se realizó entre los laminados descritos anteriormente (Lam_01, Lam_08, Lam_11, Lam_29, Lam_30 y Lam_31) y los diferentes sustratos utilizados para fabricar dichos laminados.

El test triangular consistía en encontrar las diferencias de olor entre tres viales incoloros, dos o uno de ellos contenían , 1*5cm² de laminado cortados en trozos pequeños, frente a uno o dos de ellos que contenían 1*10 cm² de sustrato (Figura 4.2). Esta diferencia dependería de la capacidad odorante de dicho adhesivo.



Figura 4.2: Test triangular realizado con viales incoloros que contenían el laminado o el sustrato.

Veinte catadores (previamente familiarizados con el olor de los adhesivos), debían encontrar estas diferencias de olor entre estos viales a temperatura ambiente y a 40 °C (viales inmersos en un baño a dicha temperatura).

Una vez realizado el ensayo, se contaba el número de aciertos permitiendo conocer si había diferencias significativas entre el laminado y el sustrato (tablas estadísticas para el test triangular (Meilgaard, et al., 1999)). Por tanto, el adhesivo que tuviera un mayor número de aciertos, se seleccionaba como el adhesivo más odorífero dentro de cada grupo de adhesivos.

Una vez seleccionados los dos adhesivos más odoríferos de cada grupo, se llevó a cabo un análisis sensorial descriptivo de los cinco adhesivos (VAE_04, T_01, Alm_01, PVA_01, AC_03) donde un equipo de 6 catadores, que previamente habían participado en el test triangular, debía describir el olor de 0,5 gramos de estos.

2.3. INSTRUMENTAL

2.3.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES DIRECTA CON OLFATOMETRÍA ESPECTROMETRÍA DE MASAS (D-GC-O)

El método D-GC-O (Landy, et al., 2004; Rega, et al., 2003) se desarrolló para llevar a cabo un test de representatividad del olor global de diferentes extractos de HS-SPME comparándolos con el adhesivo puro. Además, permitió seleccionar las mejores condiciones de extracción.

El método consiste en conectar una columna capilar vacía, no tratada (sin fase estacionaria) entre el inyector y el portal olfatométrico de un cromatógrafo de gases. De esta forma no hay separación cromatográfica y por tanto todos los compuestos odorantes llegan simultáneamente al portal olfatométrico y se percibe el olor global de los compuestos extraídos.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases CP-3800 Varian equipado con un portal olfatométrico ODO I de SGE (Ringwood, Australia) y una columna capilar de sílice fundida (20 cm x 0,32 mm i.d) vacía. El resto de parámetros utilizados, se muestran en la siguiente Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Parámetros utilizados para los análisis por extracción por HS-SPME y D-GG-O

Instrumentación para D-GC-O		
HS-SPME (Selección de la fibra y condiciones de extracción)	Tiempo de preincubación (min)	2
	Tiempo extracción (min)	1, 5, 15, 25
	Temperatura de extracción (°C)	40
	Tiempo de desorción (min)	1
	Temperatura de desorción	250
Condiciones GC	Flujo de Helio (mL/min)	1
	Inyector	250°C Splitless (2min)
	Temperatura del horno	100°C

Para este ensayo, se extrajeron 5 gramos de los diferentes adhesivos (VAE_04, Alm_01, PVA_01, AC_03y T_01) en viales de 20 mL con diferentes fibras y a diferentes tiempos de extracción. Estos extractos, se introdujeron sucesivamente en el portal del GC-O, donde los compuestos eran desorbidos térmicamente, llegando simultáneamente al portal de olfacción (sniffing). Allí un catador comparaba y evaluaba el olor global resultante de dichos extractos con el adhesivo de partida y seleccionaba el extracto que mejor lo reprodujera. Este estudio se repitió 6 veces con distintos catadores. Del extracto que reprodujera mejor el olor global del

adhesivo, se escogieron las condiciones de extracción (fibra y tiempo) para cada adhesivo.

2.3.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS. (GC-O-MS)

Identificación

Para la identificación individual de los compuestos odorantes, se extrajeron los adhesivos por dos metodologías: extracción en fase sólida por espacio de cabeza HS-SPE (mediante un procedimiento ya optimizado para el análisis de vinos en el laboratorio de análisis de aroma y enología, LAAE, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza) y microextracción en fase sólida por espacio de cabeza HS-SPME (condiciones previamente optimizadas por D-GC-O).

Posteriormente, se analizaron ambos extractos por GC-O-MS, separando los compuestos en la columna cromatográfica y posteriormente, dividiendo el flujo en dos partes: una parte se dirigió al portal olfatómico, donde un catador evaluaba los compuestos odorantes (tiempo de retención, olor e intensidad) y la otra parte, se dirigió al detector de masas.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases CP-3800 Varian (Madrid, España) conectado a un espectrómetro de masas Saturn 2000 series (Madrid, España), equipado con un detector de trampa iónica y un portal de olfatometría antes descrito. La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna BP-20 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) de SGE analytical science (Madrid, España). El resto de parámetros utilizados, se muestran en la siguiente Tabla 4.4.

Tabla 4.4: Parámetros utilizados para los análisis por extracción por HS-SPME y HS-SPE acoplada a GG-O-MS

Instrumentación			
HS-SPME (Para identificación y cuantificación)	Tiempo de preincubación (min)	2	
	Tiempo extracción (min)	15	
	Temperatura de extracción (°C)	40	
	Tiempo de desorción (min)	1	
	Temperatura de desorción	250	
HS-SPE (Para identificación)	Volumen inyectado (µL)	1	
	Inyector	30°C(0,15min) 200°C/min 250 (2min) Pulso presión 25psi	
	Condiciones GC	Flujo de Helio (mL/min)	1
		Inyector (extracto HS-SPME)	250°C Splitless (2min)
	Rampa temperatura del horno	40°C (5min) 10 °C/min 220 (10min)	
Condiciones masas (EI)	Rango de masas (m/z)	45-350	
	Temperatura trampa (°C)	220	
	Voltaje electromultiplicador (V)	1600	

Para los extractos de microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) se utilizaron 5 gramos de los adhesivos (VAE_04, T_01, Alm_01, PVA_01 y AC_03) colocados en un vial de 20 mL con las condiciones de extracción mostradas en la Tabla 4.4. Se utilizó la fibra DVB/CAR/PDMS para la extracción de los adhesivos VAE_04, Alm_01, PVA_01 y AC_03 y la fibra de PDMS para el adhesivo T_01

Cuantificación.

Para la cuantificación de los compuestos odorantes, se analizaron los adhesivos (VAE_04, T_01, Alm_01, PVA_01 y AC_03) así como las rectas de calibrado con HS-SPME (condiciones antes descritas) acoplado a GC-O-

MS. La extracción se llevó a cabo con la fibra de PDMS para el adhesivo T_01 y la fibra DVB/CAR/PDMS para el resto de los adhesivos. Dicho estudio se llevó a cabo en el cromatógrafo de gases CP-3800 Varian (Madrid, España) conectado a un espectrómetro de masas Saturn 2000 series (Madrid, España) con las condiciones descritas anteriormente en la Tabla 4.1. La única diferencia fue que la adquisición se llevó a cabo en modo SIM, con los iones característicos que se muestran en la Tabla 4.9 y 4.10

2.4. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DESDE EL ADHESIVO

Las técnicas seleccionadas para extraer los compuestos que aportan olor a los adhesivos fueron la extracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPE) y la microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME).

2.4.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN MODO ESPACIO DE CABEZA (HS-SPE)

Esta técnica consiste en hacer pasar una corriente de nitrógeno por un recipiente donde se encuentra el adhesivo, arrastrando los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza, quedando estos retenidos en una resina. Posteriormente se eluyen con un disolvente apropiado para poder analizarlos mediante un cromatógrafo de gases. Se trata en realidad de una concentración de los compuestos en una fase sólida (SPE), mediante purga continua con nitrógeno.

La metodología utilizada para dicha extracción, es un procedimiento ya optimizado para el análisis de vinos en el laboratorio de análisis de aroma y enología, LA AE, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza (Culleré, et al., 2009; Escudero, et al., 2007; San-Juan, et al., 2010) y consiste en los siguientes pasos.

- I. Inicialmente se preparó la resina añadiendo 400 mg de resina Lichrolut EN en un reservorio de 0,8 cm de diámetro interno y 3 ml de volumen interno con un frit tanto arriba como abajo para evitar su pérdida. Posteriormente, se lavó con 20 ml de diclorometano mediante succión a vacío.
- II. Una vez preparada la resina, se añadieron 50 mL de muestra (54.85 gramos del adhesivo VAE_04, 55.50 gramos de adhesivo de almidón, 60.05 gramos de adhesivo PVA_01, 61.60 gramos de adhesivo AC y 68.0 gramos de T_01 después de ser curado y cortado a trozos) en un recipiente llamado “boca”, Figura 4.3.

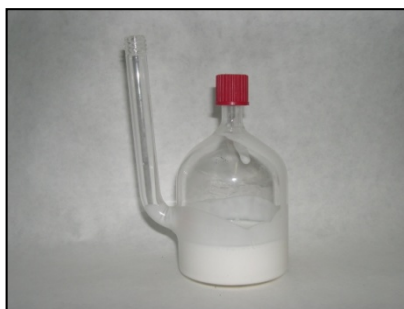


Figura 4.3: Recipiente llamado “boca” relleno con 50 mL de adhesivo PVA

- III. Posteriormente, el reservorio con la resina se situó en la parte superior de la boca y por la otra apertura, se colocó un conducto por donde circulaba una corriente de nitrógeno con un caudal de 500 ml/min. Una vez montado el sistema se colocó en un baño a 40 °C, durante 140 min.



Figura 4.4: Montaje para la extracción HS-SPE

- IV. Una vez transcurrido dicho tiempo, se pasó una corriente de nitrógeno a través del cartucho, para eliminar el agua retenida en dicha resina.
- V. Finalmente, se separaron los compuestos retenidos en la resina mediante la elución con 3,2 mL de diclorometano al 5% en metanol. El extracto obtenido, se concentró con una corriente de nitrógeno hasta 500 μ L para su posterior análisis.

2.4.2. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN MODO ESPACIO DE CABEZA (HS-SPME)

Para realizar dicha extracción, previamente, se desarrolló una técnica rápida y simple para evaluar la calidad sensorial de los extractos de HS-SPME a través de la cromatografía de gases directa con olfatometría D-GC-O, antes descrita. Esta técnica se llevó a cabo para optimizar las condiciones de extracción, tanto la selección de la fibra apropiada, como el tiempo de extracción para la posterior HS-SPME.

Los extractos estaban formados por 1 g de los diferentes adhesivos colocados en distintos viales a 40°C donde se extraían los compuestos volátiles del espacio de cabeza con diferentes fibras de SPME (con distintas características de polaridad y porosidad, ver apartado 2.1.2) y a diferentes tiempos de extracción. Los ensayos llevados a cabo fueron los siguientes:

Selección de la fibra adecuada.

Se estudiaron cuatro fibras con distintos recubrimientos y espesores (igual que en los capítulos anteriores):

- Fibra de Divinilbenzeno / carboxen / polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 μm .
- Fibra de Polidimetilsiloxano / divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 μm
- Fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm .
- Fibra de Poliacrilato (PA) de 85 μm .

Dicha selección se llevó a cabo por la técnica de cromatografía de gases directa con detector olfatométrico (D-GC-O) (Landy, et al., 2004; Rega, et al., 2003) antes descrita. A diferencia de la cromatografía tradicional, no se produce separación cromatográfica de los compuestos, ya que, se sustituye la columna cromatográfica con la fase estacionaria por una columna sin fase. Por tanto, los compuestos no quedan retenidos en la columna, sino que llegan todos al mismo tiempo al detector obteniendo un olor global de la extracción.

Para llevar a cabo este estudio, se extrajeron los distintos tipos de adhesivos con las cuatro fibras mencionadas anteriormente (a una temperatura de extracción de 40°C y 15 minutos de extracción), y se introdujeron sucesivamente en el portal de inyección GC-O. Un catador

comparaba el olor obtenido en el portal de olfacción con el del adhesivo sin extraer (referencia), que se encontraba en un vial incoloro.

Para ello, el catador olía inicialmente dicho adhesivo, lo memorizaba y posteriormente olía el extracto del portal de olfacción. Comparaba dichos olores y evaluaba el extracto en una escala entre 0 y 10, donde 10 correspondía a un olor parecido al de referencia y 0 a un olor distinto al de referencia. Este proceso se repetía para los distintos extractos y distintos adhesivos y para 6 catadores en total.

Se seleccionó aquella fibra que tras ser evaluada presentara un mayor valor de similitud.

Selección del tiempo de extracción adecuado.

Una vez seleccionada la fibra más adecuada para extraer los compuestos odorantes de la muestra de adhesivo, se seleccionó el tiempo de extracción apropiado.

En este paso, los adhesivos se extrajeron con la fibra seleccionada anteriormente pero con distintos tiempos de extracción que antes. Seis catadores evaluaron el grado de similitud entre 0 y 10, entre el olor del adhesivo y de los distintos extractos.

El tiempo de extracción que representaba un mayor valor de similitud se estableció como valor óptimo de extracción.

Una vez seleccionadas las condiciones de extracción para cada adhesivo (tipo de fibra y tiempo de extracción), se extrajo cada adhesivo (5

extractos en total) con dichas condiciones optimizadas y se analizaron por GC-O-MS.

A diferencia de la extracción anterior, esta técnica está libre de disolvente por tanto, nos permitirá determinar compuestos con igual a menor volatilidad que el disolvente. Ya que, con la otra técnica sería imposible, porque los compuestos más volátiles se encontrarían enmascarados por este.

2.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ODORANTES DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS ANTERIORMENTE POR HS-SPE Y HS-SPME

Para determinar los compuestos que presentaban características odorantes en los diferentes tipos de adhesivos, se analizó 1 μL de los extractos de HS-SPE y las fibras para los extractos de HS-SPME en el portal de inyección de GC-O-MS. Dicha técnica, permitía detectar simultáneamente los compuestos con dos detectores; la nariz humana y el espectrómetro de masas como detector “químico”.

En el portal de olfacción, seis catadores debían detectar los compuestos odorantes, ya separados, provenientes de la elución de la columna cromatográfica, anotando el tiempo al cual se detectaban, para poder conocer en el cromatograma a que compuesto se refería. (Figura 4.5).



Figura 4.5: Foto de un catador en el portal de olfacción.

Además, se debía describir su olor y cuantificar su intensidad mediante una escala del 1 al 3, donde 1 correspondía a olor suave (baja intensidad), 2 olor fuerte (intensidad media) y 3 a olor extremo (alta intensidad). Los valores intermedios también se permitían. Estos datos se anotaban en una tabla tal y como muestra la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Tabla a rellenar por los seis catadores para el análisis GC-O-MS, donde se anotaba el tiempo al cual era percibido el olor, su intensidad y su descripción.

Compuesto detectado	Tiempo	Intensidad	Descripción del olor
1			
2			
...			

Tras repetir el ensayo por los seis catadores y los distintos adhesivos, se calculó la frecuencia modificada MF(%), teniendo en cuenta todas las percepciones encontradas, para priorizar los olores más importantes encontrados.

Dicha frecuencia se calculó con la siguiente ecuación (Dravnieks, 1985):

$$MF(\%) = [F(\%) \times I(\%)]^{0.5} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Donde:

F(%) es el porcentaje de catadores que detectaron el olor, e I(%) es el porcentaje de intensidad calculado a partir de la media de los valores de intensidad obtenida por los distintos catadores que detectaron el olor, dividido por el máximo valor de intensidad posible, es decir, entre tres.

Una vez calculadas las frecuencias modificadas para las distintas percepciones detectadas, se seleccionaron aquellos compuestos cuya MF(%) fuera mayor que 50 y también aquellos que estaban presentes en más de un adhesivo.

Una vez seleccionados las percepciones más importantes que aportan olor a cada adhesivo, se llevaron a cabo los siguientes pasos para su identificación.

- I. Se calcularon los índices de retención (Retention index, RI) conociendo el tiempo al cual se detectaba el olor e inyectando una muestra patrón de alcanos, Ecuación 4.2

$$RI = 100xn + \left[100x \frac{t_r(\text{desconocido}) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right] \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Donde:

N y n: Número de carbonos del alcano mayor y menor respectivamente entre los que se encuentra el compuesto desconocido.
 t_r : tiempo retención encontrado para (N) alcano mayor, (n) alcano menor y el compuesto desconocido.

- II. Búsqueda en la librería de espectros de masas (NIST y WYLEY) de los candidatos ofrecidos por la misma, según los espectros de dichos compuestos.

III. Búsqueda en bibliografía (Barron, et al., 2005; Czerny and Buettner, 2009; Choi, 2004; Jirovetz, et al., 2002; Jurado, et al., 2007; Landy, et al., 2004; Lecanu, et al., 2002; Maggi, et al., 2010; Perez-Cacho, et al., 2007; Rega, et al., 2003; Tyapkova, et al., 2009) de posibles candidatos y en la página web de flavornet [www.flavornet.org] (en cuya página aparecen compuestos odorantes ordenados por sus RI según las distintas columnas y sus características de olor), (Figura 4.6).

OV101	DB5	OV17	C20M	Odorant	Odor
[512]	[529]	[429]	811	dimethylamine	fish
[483]	500	[591]	696	methanethiol	sulfur, gasoline, garlic
700	700	700	700	heptane	alkane
418	427	[518]	714	ethanal	pungent, ether
527	505	[596]	716	dimethyl sulfide	cabbage, sulfur, gasoline
800	800	800	800	octane	alkane
789	662	[753]	821	isobutyraldehyde	pungent, malt, green
662	596	[687]	832	butanal	pungent, green
530	[547]	[591]	848	ethyl formate	pungent
[717]	734	[825]	900	diethyl acetal	fruit, cream
900	900	900	900	nonane	alkane
602	628	[719]	907	ethyl acetate	pineapple
641	650	728	910	methylbutanal	malt
639	641	729	912	methylbutanal	cocoa, almond
[668]	685	744	927	methyl methylpropanoate	flower
649	668	[759]	929	ethanol	sweet
791	732	767	935	pentanal	almond, malt, pungent
[580]	597	[688]	[945]	methyl ethyl ketone	ether
[696]	713	765	951	ethyl propionate	fruit
767	756	808	955	ethyl isobutyrate	sweet, rubber

Figura 4.6. Pagina web de flavornet

Se seleccionaron aquellos candidatos que presentaban un índice de retención y un olor similar al compuesto desconocido.

IV. Inyección de los estándares puros de todos los candidatos

V. Confirmación de cada uno de ellos según su coincidencia tanto en el índice de retención, como en el espectro y olor del patrón con el compuesto desconocido.

La siguiente Figura 4.7 muestra el protocolo seguido en forma de esquema para llevar a cabo la identificación.

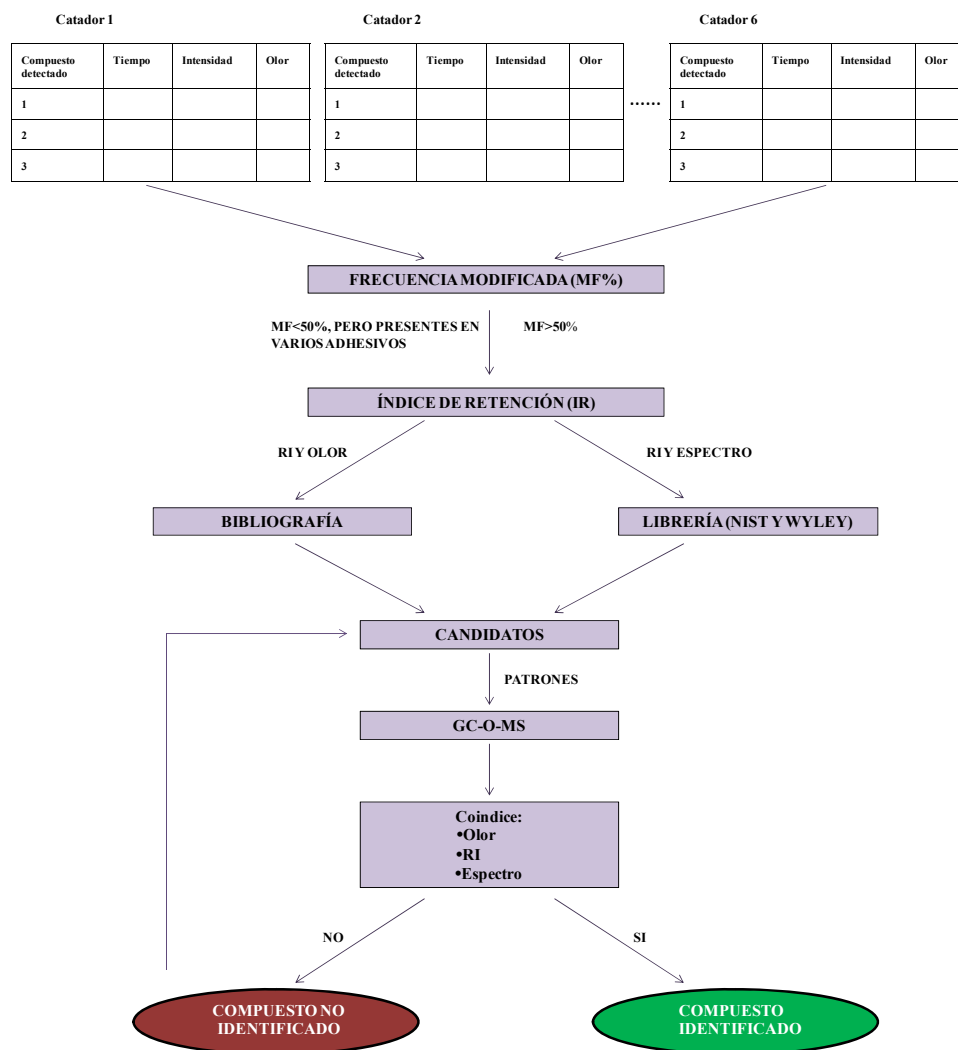


Figura 4.7: Protocolo para la identificación de compuestos odorantes.

2.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE LOS COMPUESTOS ODORANTES EN LOS ADHESIVOS

Los compuestos odorantes extraídos por ambas técnicas de extracción se analizaron cuantitativamente por la técnica HS-SPME-GC-O-MS debido a su alta sensibilidad y por ser una técnica libre de disolventes.

Para ello, los adhesivos (VAE_04, T_01, Alm_01, PVA_01 y AC_03) se analizaron por HS-SPME acoplados a GC-O-MS (15 minutos de extracción con la fibra PDMS para el adhesivo T_01 y con la fibra DVB/CAR/PDMS para el resto de adhesivos).

Previa a la cuantificación, se llevó a cabo un estudio para evitar el posible efecto matriz de los adhesivos en el espacio de cabeza. Para ello, los adhesivos en base agua, VAE_01, Alm_01, PVA_01 y AC_03 se diluyeron con la misma cantidad de adhesivo y con diferentes porciones en agua expresado en masa/masa (1, 5, 50, 100, 200, 500). Una alícuota de 5 gramos de cada una de estas disoluciones se dopó con los compuestos identificados previamente para obtener una concentración final de estos de 1 µg/g. Posteriormente se analizaron por HS-SPME-GC-O-MS dos réplicas de cada muestra.

La señal obtenida con los adhesivos diluidos y dopados se comparó con la señal obtenida cuando los adhesivos se diluyeron a las mismas proporciones pero sin dopar. Este incremento de señal, se comparó con la señal obtenida con el mismo ensayo con los patrones a la misma concentración de 1 µg/g, pero preparados con 100% de agua.

Se seleccionó el factor de dilución que obtuviera un mínimo efecto matriz y una máxima sensibilidad para alcanzar unas recuperaciones superiores al 90% para todos los compuestos.

Una vez conocido el factor de dilución óptimo, se procedió al cálculo de la concentración inicial de los compuestos odorantes en los adhesivos base agua (VAE_01, Alm_01, PVA_01 y AC_03).

Para construir las rectas de calibrado, se prepararon alícuotas de 5 gramos con diferentes concentraciones en agua y se añadieron 10 μL de disolución A como estándar interno. Se analizaron tres réplicas para cada concentración mediante HS-SPME-GC-MS con la fibra DVB/CAR/PDMS.

La concentración inicial del adhesivo termofusible, como es un adhesivo sólido a temperatura ambiente, se determinó a través de la adición estándar. Para ello se prepararon 5 gramos de adhesivo puro en distintos viales y se calentaron a 160°C (proceso de curado) y una vez fundidos se añadieron 10 μL de disolución B a diferentes concentraciones de los compuestos identificados, así como 10 μL de disolución C como estándar interno.

Se analizaron tres réplicas de cada muestra por HS-SPME-GC-MS con la fibra de PDMS.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. SELECCIÓN DEL ADHESIVO MÁS ODORÍFERO DE CADA TIPO Y ANÁLISIS SENSORIAL PARA CADA UNO DE ELLOS

De los laminados utilizados en el capítulo 2 para el estudio de la migración, se seleccionaron aquellos laminados que estuvieran formados por distintos tipos de adhesivos y que además, se dispusiera del adhesivo y sus sustratos por separado, para posteriormente determinar de forma individual los compuestos odorantes procedentes de los adhesivos. Para los adhesivos de almidón, acetatos de polivinilo y acrílicos, se seleccionaron los adhesivos Alm_01, PVA_01 y AC_03 respectivamente. Sin embargo para los adhesivos de acetato de vinilo y etileno (VAE) y termofusibles, se disponía de más de uno, por tanto, se seleccionó el más odorífero a través de un test triangular.

En el caso del adhesivo VAE, se disponía de tres adhesivos distintos (VAE_01, VAE_04 y VAE_05) con sus respectivos laminados (lam_1, lam_8 y lam_11) y sus sustratos de cartón. Se realizó el test a temperatura ambiente, sin obtener diferencias significativas entre el laminado y el sustrato, y a 40 °C, donde se encontraron diferencias para el VAE_01 ($p < 0,4$), para VAE_03 ($p < 0,01$) y para el VAE_05 ($p < 0,01$). Véase Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Resultados del test triangular (diferencias entre los laminados y los sustratos) para los adhesivos VAE y los termofusibles a temperatura ambiente y 40°C

Laminado (adhesivo)	Nº aciertos Tamb	Diferencia significativa (p)	Nº aciertos T40°C	Diferencia significativa (p)
Lam_1 (VAE_01)	5	NO	8	SI (0,4)
Lam_8 (VAE_04)	7	NO	13	SI (0,01)
Lam_11(VAE_05)	3	NO	12	SI (0,01)
Lam_28 (T_03)	9	SI (0,2)	10	SI(0,1)
Lam_29 (T_01)	11	SI (0,05)	16	SI (0,001)
Lam_31 (T_02)	7	NO	7	NO

Por tanto, se seleccionó el adhesivo VAE_04 ya que el número de aciertos en el test triangular tanto a temperatura ambiente como a 40°C era mayor.

Como muestra la Tabla 4.6, en los adhesivos termofusibles se encontraron diferencias significativas a temperatura ambiente y a 40°C. El mayor número de aciertos se encontró para el adhesivo T_01 donde a temperatura ambiente existían diferencias significativas entre el lam_29 y los sustratos con una ($p < 0,05$) y a 40°C con una ($p < 0,001$).

Una vez seleccionados los adhesivos más odoríferos (VAE_04, T_01), se realizó un análisis descriptivo de los mismos junto con los otros adhesivos de otros tipos (Alm_01, PVA_01 y AC_03).

Los atributos descritos por los catadores se muestran en la siguiente Tabla 4.7:

Tabla 4.7: Atributos descritos por los catadores para los distintos adhesivos

Adhesivo	Atributos descritos
VAE_04	Olor a pegamento blanco, plástico, punzante y humedad.
T_01	Olor a madera, leñoso, cera depilatoria, fenólico, cuero y neumático.
Alm_01	Olor a rancio, fermentación, pegamento blanco y humedad pero menos intenso que el VAE_04.
PVA_01	Olor punzante, vinagre.
AC_03	Olor a humedad, musgo y alcanfor.

3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA POR ESPACIO DE CABEZA (HS-SPME)

Para la extracción con HS-SPME, se llevó a cabo la optimización, seleccionando el tipo de fibra así como el tiempo de extracción.

Selección de la fibra más adecuada

La siguiente Figura 4.8, muestra los resultados de similitud, (media de los seis catadores) respecto al olor global obtenido por D-GC-O, entre la muestra de adhesivo y los cuatro extractos obtenidos para las distintas fibras de SPME.

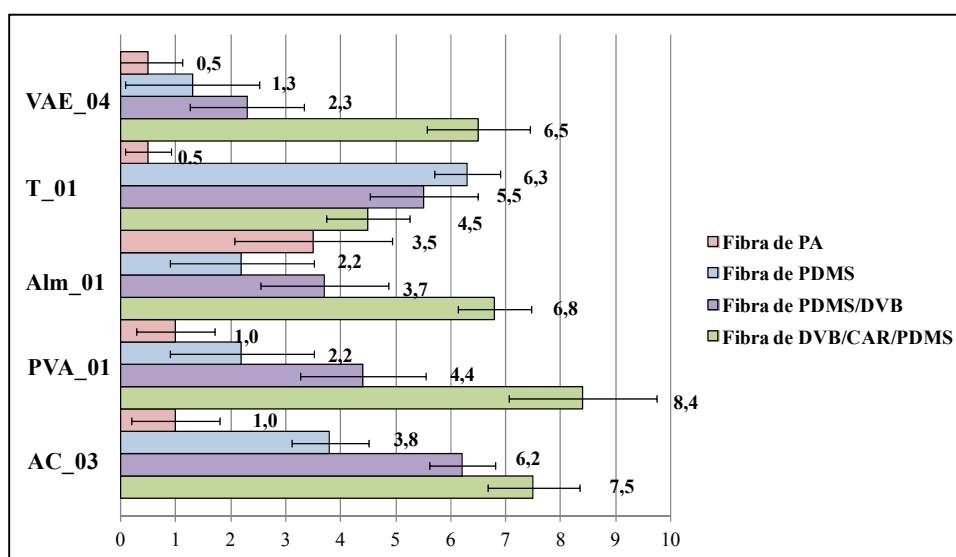


Figura 4.8: Rangos de similitud desde 0 (distinto al de referencia) a 10 (similar al de referencia) entre los extractos con las distintas fibras de SPME y la muestra de adhesivo.

Como muestra la figura, los máximos valores de similitud obtenidos corresponden a valores comprendidos entre 6,3 y 8,4.

Para el adhesivo VAE_04, el mayor valor medio de similitud fue 6,5 para la fibra de DVB/CAR/PDMS, valor significativamente mayor que para el resto de fibras, cuyos valores medios estaban por debajo de 2,3.

La misma tendencia presentaron los adhesivos PVA_01 y Alm_01 cuyos valores de similitud correspondían con valores de 6,8 y 8,4 respectivamente para la fibra DVB/CAR/PDMS. Sin embargo para el adhesivo acrílico AC_03, los extractos más representativos se obtuvieron para las fibras PDMS y DVB/CAR/PDMS, aunque esta última se seleccionó también, ya que el valor medio fue más alto (7,5 frente a 6,2)

La fibra de DVB/CAR/PDMS es una fibra con una estructura de microporos por tanto sólo extrae compuestos de bajo peso molecular, presenta una polaridad media y posee gran capacidad de extracción (Kataoka, et al., 2000). (Véase la Figura 1.7 del capítulo 1).

Para el adhesivo T_01 los extractos más representativos fueron los obtenidos por las fibras de PDMS, PDMS/DVB y DVB/CAR/PDMS (medias de 6,3, 5,5 y 4,5 respectivamente). Al contrario, la fibra PA presentó el extracto con un valor medio de similitud significativamente más bajo. De las tres fibras anteriores, se seleccionó la fibra de PDMS por tener el valor más alto de la media de similitud y además, por ser la fibra utilizada para los estudios previos de la identificación de los compuestos volátiles en este adhesivo en el capítulo 1 (Vera, et al., 2011).

La fibra de PDMS es una fibra apolar con capacidad de extracción media (Kataoka, et al., 2000). Probablemente la mayoría de los compuestos odorantes encontrados en este tipo de adhesivo serán de poca polaridad, igual que ocurrió en los estudios previos descritos en el capítulo 1 (Vera, et al., 2011).

Selección del tiempo de extracción.

Una vez seleccionada la fibra para cada adhesivo, se continuó con la optimización del tiempo de extracción. La Figura 4.9 muestra la media de los valores de similitud para los distintos tiempos de extracción.

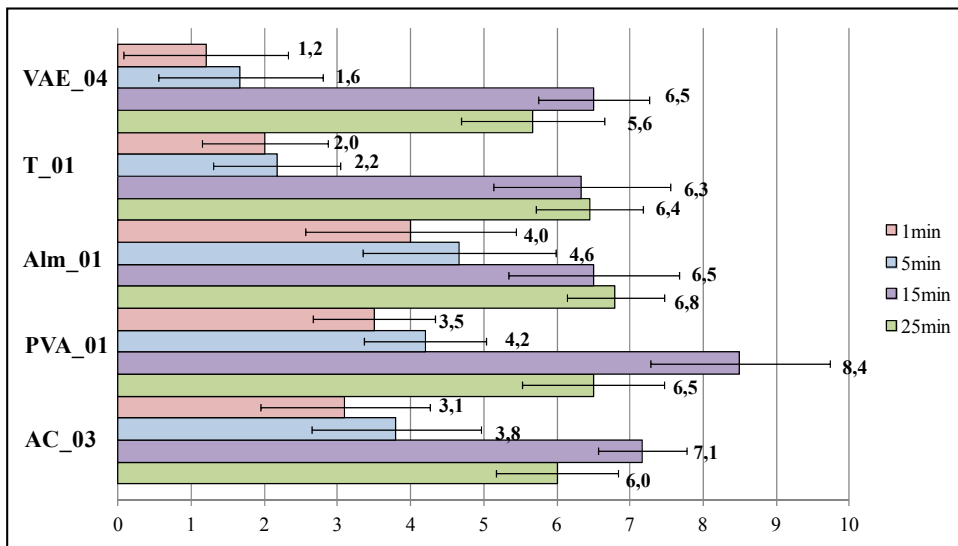


Figura 4.9: Rangos de similitud obtenidos para distintos tiempos de extracción en un panel de 6 catadores; los rangos de la escala desde 0 (distinto al de referencia) a 10 (similar al de referencia)

La mayoría de adhesivos mostraron diferencias significativas entre 1 y 5 minutos (rangos medios de similitud entre 1,2 y 4,6) con respecto a 15 y 25 min (rangos entre 5,6 y 8,5). Para los tiempos superiores de extracción se consiguieron rangos de similitud mayores y al no existir diferencias significativas entre 15 y 25 minutos, se seleccionó el menor tiempo de extracción, es decir, 15 minutos.

3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ODORANTES DE LOS EXTRACTOS DEL ADHESIVO MEDIANTE HS-SPE-GC-MS Y HS-SPME-GC-MS

Las Figuras 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 y 4.14 muestran los cromatogramas de los extractos de VAE_04, T_01, Alm_01, PVA_01 y AC_03 respectivamente, analizados por HS-SPE-GC-MS y HS-SPME-GC-MS.

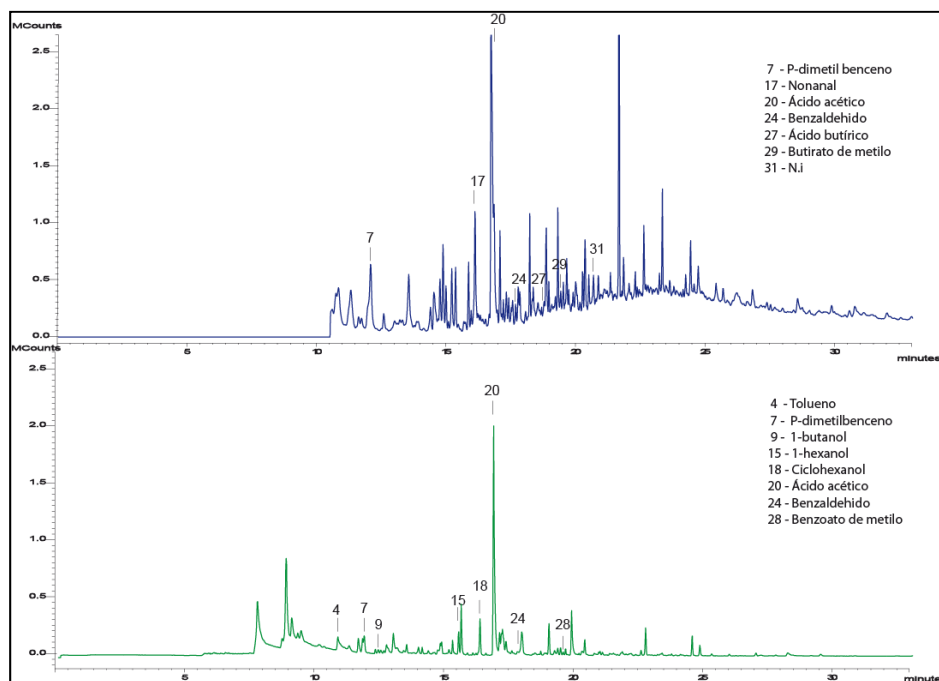


Figura 4.10: Cromatograma del adhesivo VAE_04 analizado por HS-SPE-GC-MS (parte superior) y HS-SPME-GC-MS con la fibra DVB/CAR/PDMS (parte inferior)

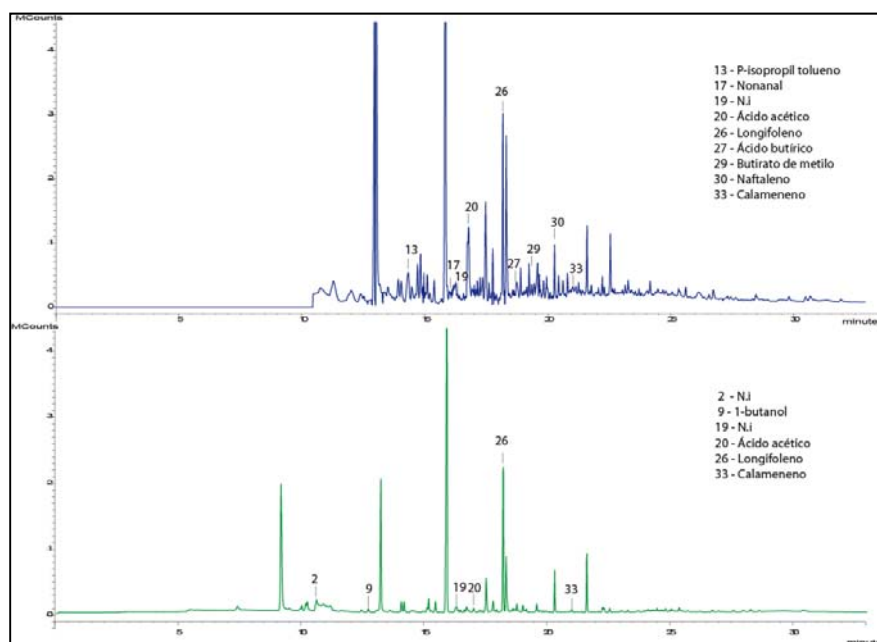


Figura 4.11: Cromatograma del adhesivo T_01 analizado por HS-SPE-GC-MS (parte superior) y HS-SPME-GC-MS con la fibra de PDMS (parte inferior)

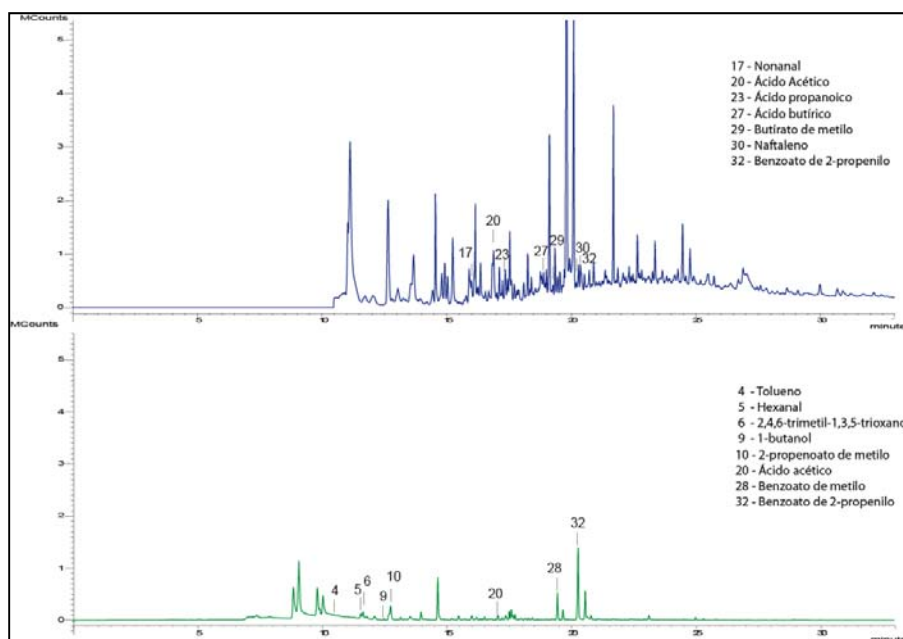


Figura 4.12: Cromatograma del adhesivo Alm_01 analizado por HS-SPE-GC-MS (parte superior) y HS-SPME-GC-MS con la fibra DVB/CAR/PDMS (parte inferior)

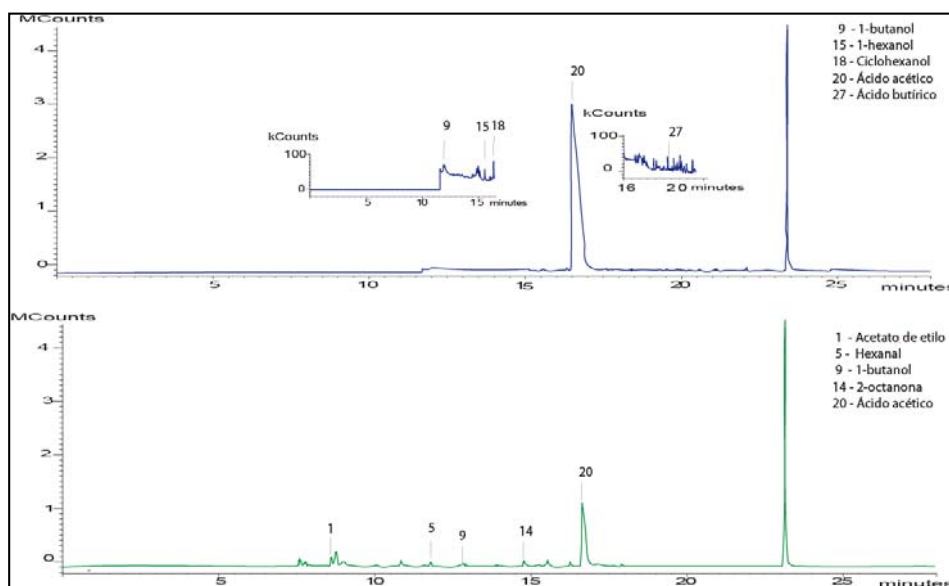


Figura 4.13: Cromatograma del adhesivo PVA_01 analizado por HS-SPE-GC-MS (parte superior) y HS-SPME-GC-MS con la fibra de DVB/CAR/PDMS (parte inferior)

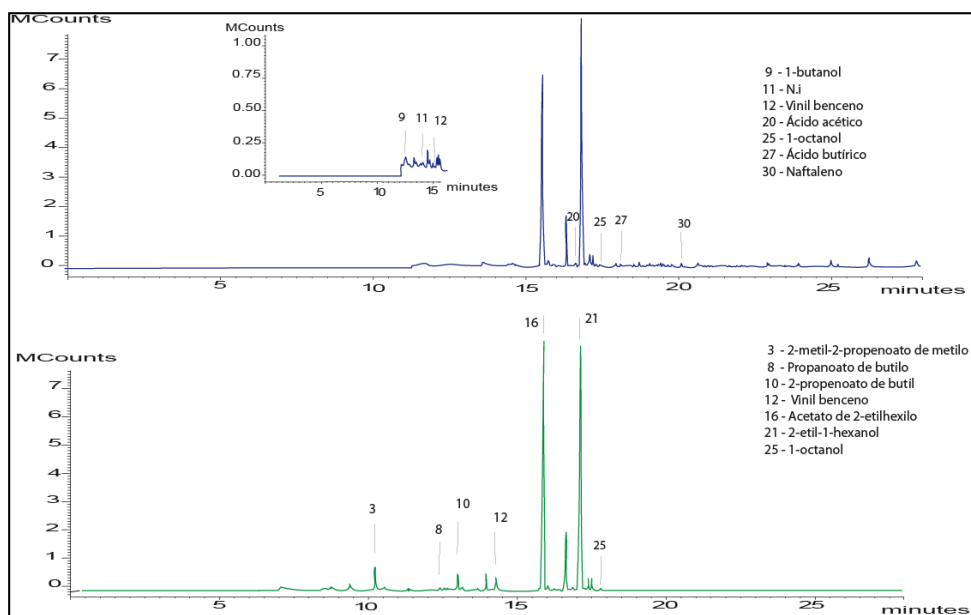


Figura 4.14: Cromatograma del adhesivo AC_03 analizado por HS-SPE-GC-MS (parte superior) y HS-SPME-GC-MS con la fibra de DVB/CAR/PDMS (parte inferior)

Como muestran las figuras, se detectaron treinta y tres compuestos en los adhesivos, ordenados por sus índices de retención (RI).

La Tabla 4.8 muestra los compuestos identificados para cada adhesivo, de forma ordenada según sus índices de retención. También se muestran los olores descritos por los catadores, así como sus MF(%) calculadas según la técnica de extracción.

Tabla 4.8: Compuestos odorantes identificados con IR y sus atributos de olor percibidos por los catadores y sus MF (%) según las técnicas de extracción HS-SPE y HS-SPME

N	RI	Compuesto	Descripción del olor	MF(VAE_04)		MF(T_01)		MF(Alm_01)		MF(PVA_01)		MF(AC_03)	
				SPE	SPME	SPE	SPME	SPE	SPME	SPE	SPME	SPE	SPME
1	907	Acetato de etilo	Frutal, dulce							54,4			
2	1005	No identificado (N.I)	Punzante			50,3							
3	1022	2-metil-2-propenoato metilo	Frutal										81,6
4	1035	Tolueno	Pintura, humedad		68,3								
5	1077	Hexanal	Hierba, grasa					13,6					
6	1092	2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano	Punzante, desagradable					51,8					
7	1098	P-dimetilbenceno	Dulce		65,3	50,3		53,6					
8	1120	Propanoato de butilo	Tierra, dulce										64,5
9	1168	1-butanol	Medicina		16,3		9,2	28,9	54,9	100	57,7		
10	1170	Acrilato de butilo	Punzante, frutal					50,9					100
11	1216	No identificado	Champañón									84,7	
12	1241	Estireno	Gasolina, balsámico									52,7	59,7
13	1280	P-cimeno	Gasolina, disolvente			52,6							
14	1285	2-octanona	Hierba, resina										
15	1359	1-hexanol	Resina, verde		54					83,3			
16	1382	Acetato de 2-etilhexil	Punzante										76,42
17	1400	Nonanal	Fresco, verde		44,7		58,3	33,2					
18	1411	Ciclohexanol	Alcanfor		51					57,7			
19	1427	No identificado	Desagradable, madera				50,9	78,3					
20	1466	Ácido acético	Vinagre, agrio		76,1	79,1	62,4	68,9	65	69,3	100	100	79,9
21	1487	2-etil-1-hexanol	Verde										100
22	1491	Alcanfor	Alcanfor										64,5
23	1536	Ácido propanoico	Rancio					50,2					
24	1539	Benzaldehido	Azúcar quemado		53,8	51,5							
25	1553	1-octanol	Musgo, champañón										
26	1570	Longifoleno	Madera, pino				54	50					
27	1626	Ácido butírico	Rancio, queso		65,3		45,3			40,8			60,9
28	1627	Benzoato de metilo	Aromático, dulce										
29	1689	Butirato de metilo	Queso		38,2		37,4			43			
30	1785	Naftaleno	Bolas de polillas				47,3						52,7
31	1797	No identificado	Plástico pegamento		50								
32	1823	Benzoato de alilo	Dulce, floral									50,2	59,1
33	1835	Calameneno	Picante, herbal				55,3	51,1					

Se detectaron un 33% de los compuestos por ambas técnicas de extracción: el p-dimetilbenceno, 1-butanol, estireno, 1-hexanol, ciclohexanol, ácido acético, benzaldehído, 1-octanol, longifoleno, benzoato de alilo y calameneno. Aunque algunos de ellos presentaron distintas MF (%), por ejemplo el p-dimetilbenceno encontrado en el adhesivo VAE_04 con mayor valor de MF(%) para la extracción por HS-SPE que para la extracción HS-SPME (un 65,3% frente a un 50,3% respectivamente). Lo contrario ocurrió con el 1-octanol, encontrado en el adhesivo AC_03 con un 72,7% frente a un 85,0% con HS-SPE y HS-SPME respectivamente.

El resto de compuestos únicamente se identificaron con una $MF(\%) > 50$ para una de las dos técnicas de extracción (HS-SPME o HS-SPE). Para la otra técnica, o bien su $MF(\%)$ era menor que 50 o simplemente no fueron detectados por los catadores en el portal de olfacción. Esto resalta la importancia del uso de estas dos técnicas de extracción, que se comportan como complementarias para este trabajo, incrementando la lista de compuestos odorantes detectados para su posterior identificación. Consecuentemente también se incrementó la lista de los posibles compuestos migrantes para estudios posteriores.

Por ejemplo, los compuestos con un índice de retención menor que 1092 (donde se detectaba el disolvente), sólo se detectaron al extraerlos por HS-SPME. Esto se produce porque esta técnica es libre de disolvente, y por tanto, permitía que los catadores oliaran en el tiempo en el que para la otra técnica salía el disolvente, enmascarando los compuestos odorantes.

Entre los compuestos identificados se encontraron varios ácidos como acético, propanoico y butírico que proporcionan características organolépticas comunes a los adhesivos como punzante, agrio, rancio y queso. También varios ésteres, como butirato de metilo, con olor a queso y

benzoato de metilo y alilo, con olor dulce. También compuestos del grupo de los aldehídos como el hexanal y nonanal con olor a grasa rancia y verde respectivamente, así como compuestos del grupo de los alcoholes, como ciclohexanol y 1-butanol, con olor a alcanfor y medicina respectivamente.

Para el adhesivo VAE_04, se detectaron cinco compuestos que no se encontraron en los otros adhesivos no vinílicos; p-dimetilbenceno (dulce), 1-hexanol (verde), ciclohexanol (alcanfor), benzaldehído (azúcar quemado) y un compuesto no identificado con olor a plástico, el cual podría ser el responsable del olor a plástico encontrado en el análisis sensorial descriptivo. Otros dos atributos definidos en dicho análisis, como cola blanca y punzante, podrían venir del ácido acético. El tolueno podría ser el responsable del atributo definido como humedad.

Para el adhesivo T_01 se encontraron los compuestos calameneno y longifoleno con olores a pino, leña, hierba y madera producidos por dichos compuestos. Según la bibliografía encontrada (Jeong-Ho, et al., 2008), estos compuestos suelen estar presentes en los aceites esenciales que provienen de la resina utilizada para la obtención de esta clase de adhesivos. Algunos de los atributos sensoriales encontrados en el análisis sensorial previo eran cera depilatoria, madera, leñoso, que podrían venir de estos compuestos.

En el adhesivo de almidón Alm_01, se identificaron cuatro compuestos que no aparecían en el resto de adhesivos (2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano, acrilato de butilo, ácido propanoico y benzoato de alilo). Ácido propanoico y ácido butírico (cuya MF(%) era mayor para este adhesivo) podrían ser los responsables del olor rancio encontrado para este adhesivo en el análisis sensorial descriptivo. Y los olores a cola blanca y humedad encontrados podrían venir del ácido acético y tolueno respectivamente.

Para el adhesivo PVA_01 se describieron en el análisis sensorial los atributos de olor a vinagre y muy punzante, que podrían venir del ácido acético encontrado en este adhesivo, con el mayor valor de MF (%) correspondiente al 100% para ambas técnicas.

En el adhesivo acrílico AC_03 se encontraron los compuestos alcanfor, 1-octanol (musgo y champiñón) y un compuesto desconocido con un RI de 1216, con un olor a champiñón que no se encontraron en los otros tipos. Estos compuestos podrían ser los responsables de los olores a alcanfor, musgo y humedad descritos por los catadores en el análisis descriptivo sensorial realizado.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ODORANTES POR HS-SPME-GC-O-MS

Tras identificar los compuestos odorantes, se procedió al cálculo de la concentración inicial de estos en todos los adhesivos mediante HS-SPME-GC-O-MS.

Previamente, se calculó el factor de dilución, que minimizara el efecto matriz que se produce al pasar los compuestos odorantes al espacio de cabeza. Este estudio se realizó con los adhesivos base agua (VAE_04, Alm_01, PVA_01 y AC_03). Se eligió el mínimo factor de dilución que proporcionara una mayor sensibilidad, con recuperaciones superiores al 90% para todos los compuestos odorantes. Este factor fue de 1/200 masa/masa para todos los adhesivos.

La Tabla 4.9 muestra la recta de calibrado de los compuestos identificados en los adhesivos base agua.

Tabla 4.9: Parámetros analíticos, método HS-SPME-GC-O-MS (fibra DVB/CAR/PDMS)

Compuestos	M ⁺	Ecuación	R ²	R. lineal(ng/g)	LOD(ng/g)	LOQ(ng/g)	RSD(%)
Acetato de etilo	43	y=0,017x+0,049	0,991	450-49600	135	450	8,35
2-metil-2-propenoato de metilo	69	y=1,928x+0,005	0,999	5,69-1070	1,71	5,69	6,57
Tolueno	91	y=70,06x+0,228	0,999	0,06-106	0,05	0,06	5,17
Hexanal	44	y=5,566x+0,034	0,994	4,87-111	1,46	4,87	11,3
2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano	45	y=0,101x+0,019	0,998	27,8-1920	8,35	27,8	7,38
P-dimetilbenceno	91	y=451,1x+0,124	0,997	0,26-99,3	0,07	0,26	2,03
Propanoato de butilo	57	y=65,53x+0,224	0,998	2,31-1140	0,71	2,31	13,9
1-butanol	56	y=0,002x+0,015	0,997	8810-95600	2640	8810	9,74
Acrilato de butilo	55	y=92,22x+0,037	0,998	0,88-88,1	0,26	0,88	14,6
Estireno	104	y=459,2x+0,103	0,999	0,36-86,3	0,11	0,36	7,46
P-cimeno	119	y=4,268x-0,305	0,994	0,58-4250	0,17	0,58	5,56
2-octanona	43	y=59,56x-0,031	0,999	0,37-87,2	0,11	0,37	8,89
1-hexanol	56	y=0,643x-0,009	0,991	93,8-24500	28,2	93,8	5,33
Acetato de 2-etilhexil	43	y=208,3x-0,029	0,999	0,29-89,7	0,09	0,29	4,33
Nonanal	57	y=37,02x-0,008	0,994	2,12-193	0,64	2,12	13,6
Ciclohexanol	57	y=0,087x+0,002	0,997	91,7-1080	27,5	91,7	15,1
Ácido acético	43	y=0,041x+0,012	0,997	130-9320	38,8	130	14,6
2-etil-1-hexanol	57	y=6,680x+0,259	0,999	9,93-894	2,98	9,93	14,6
Alcanfor	95	y=0,698x-0,052	0,991	2,98-1030	0,99	2,98	6,99
Ácido propanoico	74	y=0,007x+0,014	0,984	2410-95900	724	2410	3,53
Benzaldehido	106	y=4,927x-0,054	0,999	31,2-1020	9,35	31,2	13,2
1-octanol	56	y=3,141x-0,026	0,999	19,1-954	5,75	19,1	9,06
Ácido butírico	60	y=0,041-0,147	0,996	16700-99100	5020	16700	12,1
Benzoato de metilo	105	y=17,06x-0,119	0,997	9,85-1150	2,96	9,85	2,85
Naftaleno	128	y=410,6x+0,046	0,998	0,10-98,5	0,03	0,11	12,2
Benzoato de alilo	105	y=17,27x-0,396	0,997	2,67-1120	0,8	2,67	3,93

Para construir esta recta de calibrado, se prepararon alícuotas de estos compuestos en agua pura a distintas concentraciones. Los parámetros analíticos del método HS-SPME-GC-O-MS (fibra DVB/CAR/PDMS) así como los iones seleccionados se muestran en la tabla anterior.

Se encontraron buenos resultados en términos de linealidad, límites de detección y reproducibilidad. Los valores de límites de detección se calcularon entre 0,03 ng/g (naftaleno) y 5,02 µg/g (ácido butírico) y los valores de RSD estaban comprendidos entre 2,03 y 15,1%.

Para cuantificar los compuestos identificados en el adhesivo termofusible (1-butanol, p-cimeno, nonanal, ácido acético y naftaleno), se llevó a cabo una adición estándar de estos compuestos a distintas concentraciones en el adhesivo.

Los parámetros analíticos del método HS-SPME-GC-O-MS (fibra de PDMS) y los iones característicos (M^+) utilizados para estos compuestos añadidos sobre el adhesivo, se muestran en la siguiente Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Parámetros analíticos del método HS-SPME-GC-O-MS (con la fibra PDMS).

Compuestos	M^+	Ecuación	R^2	RSD (%)
1-butanol	56	$y=0,0008x+0,007$	0,998	8,77
P-cimeno	119	$y=0,0053x+0,1315$	0,989	8,77
Nonanal	57	$y=0,0217x+0,2714$	0,985	6,88
Ácido acético	43	$y=0.033x+0.0612$	0,989	12,3
Naftaleno	128	$y=0.6104x+1.7662$	0,985	4,30

Se obtuvieron buenos resultados en términos de linealidad así como RSD con valores entre 6,8 y 14,2 %.

Posteriormente, se muestra en la Tabla 4.11 la concentración de los compuestos odorantes identificados.

Tabla 4.11: Concentración inicial de los compuestos odorantes expresados en μg de compuesto por g de adhesivo.

Compuestos	M ⁺	VAE_04 $\mu\text{g/gadh}$	T_01 $\mu\text{g/gadh}$	Alm_01 $\mu\text{g/gadh}$	PVA_01 $\mu\text{g/gadh}$	AC_03 $\mu\text{g/gadh}$
Acetato de etilo	43				460 \pm 41	
2-metil-2-propenoato de metilo	69					56 \pm 4,5
Tolueno	91	0,3 \pm 0,02		0,00007 \pm 0,000001		
Hexanal	44			0,3 \pm 0,02	1,2 \pm 0,02	
2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano	45			0,2 \pm 0,01		
P-dimetilbenceno	91	0,4 \pm 0,03				
Propanoato de butilo	57					0,1 \pm 0,02
1-butanol	56	<LOQ	<LOQ	<LOQ	60 \pm 5,4	8,9 \pm 0,9
Acrilato de butilo	55			0,01 \pm 0,009		8,2 \pm 0,6
Estireno	104					0,4 \pm 0,02
P-cimeno	119		28 \pm 2,5			
2-octanona	43				0,3 \pm 0,02	
1-hexanol	56	7,5 \pm 0,8			11 \pm 0,9	
Acetato de 2-etilhexil	43					69 \pm 5,5
Nonanal	57	0,4 \pm 0,03	2,6 \pm 0,2	0,1 \pm 0,01		
Ciclohexanol	57	4,4 \pm 0,31			4,4 \pm 0,3	
Ácido acético	43	430 \pm 34	23 \pm 2,1	53 \pm 4,7	8900 \pm 790	73 \pm 6,50
2-etil-1-hexanol	57					510 \pm 41
Alcanfor	95					6,1 \pm 0,5
Ácido propanoico	74			<LOQ		
Benzaldehido	106	6,4 \pm 0,5				
1-octanol	56					1,4 \pm 0,1
Longifoleno ^a	161		1,4 \pm 0,1			
Ácido butírico	60	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Benzoato de metilo	105	1,8 \pm 0,2		6,9 \pm 0,7		
Butirato de metilo ^b	43	<LOQ	<LOQ	<LOQ		
Naftaleno	128		2,5 \pm 0,2	0,4 \pm 0,05		
Benzoato de alilo	105			4,1 \pm 0,4		
Calameneno ^a	159		1,3 \pm 0,1			

^a Cuantificado con naftaleno como estándar

^b Cuantificado con propanoato de butilo como estándar

Debido a la dificultad de encontrar algunos estándares: longifoleno y calameneno se cuantificaron con naftaleno y butirato de metilo con propanoato de butilo.

Como cabía esperar existe una relación clara para un determinado compuesto entre su MF(%) y su concentración, es decir, cuando la concentración del compuesto se incrementa, su MF(%) se ve incrementada, bien porque los catadores detectaban el olor con una mayor intensidad o bien porque lo detectaban un mayor número de estos. Por ejemplo, el tolueno cuya MF(%) se incrementó dependiendo del tipo de adhesivo, desde 13,6 en el adhesivo Alm_01 hasta 68,3 en el adhesivo VAE_04 mostrado en la Tabla 4.8, su concentración aumentó desde 0,00007 a $0,3 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$ respectivamente (Tabla 4.11). La misma tendencia se encontró para el compuesto 1-butanol identificado en todos los adhesivos, donde su MF(%) incrementaba de 9,2 a 100 (Tabla 4.8) dependiendo del tipo de adhesivo, aumentando su concentración desde $<8,8$ a $60 \pm 5,4$ μg de compuesto por g de adhesivo.

Por otro lado, comparando distintos compuestos con la misma MF(%), esta relación entre la concentración y la MF(%) desaparece, ya que compuestos con MF(%) similar tienen concentraciones totalmente distintas. Por ejemplo el ácido acético y el ácido butírico mostraban MF(%) similar en el adhesivo Alm_01 y en el adhesivo VAE_04 para el extracto HS-SPE (65,0 y 65,3 respectivamente mostrado en la Tabla 4.8) y sin embargo, sus concentraciones eran totalmente diferentes con valores de $53 \pm 4,7$ y $<16,7$ $\mu\text{g/g}$ respectivamente (Tabla 4.11). Este hecho, se puede explicar por su diferente umbral de olfacción encontrado en bibliografía, mientras el ácido acético tiene $0,363$ (mg/m^3) para Devos y col. o $0,145$ (mg/m^3) para SchiMFFan y col. (Schiffman, et al., 2001), el ácido butírico es $0,0145$

(mg/m³) para Devos y col. o 0,00389 (mg/m³) para SchiMFFan y col (Czerny, et al., 2008; Schiffman, et al., 2001). Esto significa que el ácido butírico será más perceptible en el portal de olfacción que el ácido acético porque su umbral de olfacción es más bajo, por tanto, con una MF(%) similar, la concentración de este será menor.

El compuesto odorante más abundante encontrado en todos los adhesivos fue el ácido acético y su concentración estaba comprendida entre 23±2,1 a 8900±790 µg/g dependiendo del tipo de adhesivo. El adhesivo PVA_01 presentó la mayor concentración, coincidiendo con los catadores que en el ensayo sensorial habían asignado a este adhesivo los atributos de punzante y vinagre. Otros compuestos con concentraciones altas fueron p-cimeno (28±2,5 µg/g) encontrado en el adhesivo T_01, acetato de etilo (460±41 µg/g) y 1-butanol (60±5,4 µg/g) para el adhesivo PVA_01 y 2-metil-2-propenoato de metilo (56±4,5 µg/g), acetato de 2-etilhexil (69±5,5 µg/g) y 2-etil-1-hexanol (510±41 µg/g) para el adhesivo AC_03.

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método GC-O-MS para identificar los compuestos odorantes presentes en cinco adhesivos (VAE, termofusible, almidón, PVA y acrílico) que formar parte del envase alimentario. Para ello, dichos adhesivos se extrajeron por dos metodologías complementarias HS-SPE y HS-SPME (optimizando previamente el tipo de fibra y el tiempo de extracción por una técnica novedosa D-GC-O). Estas resultaron ser unas herramientas muy útiles para identificar un gran número de compuestos odorantes en estos adhesivos. Se identificaron un total de 33 compuestos,

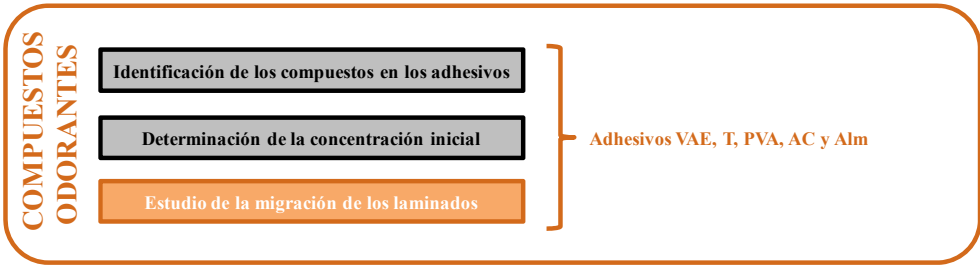
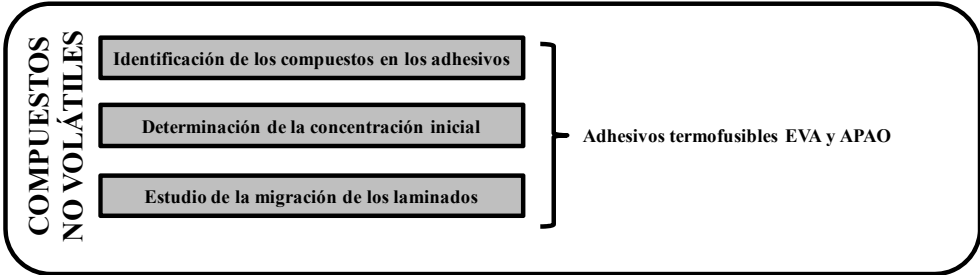
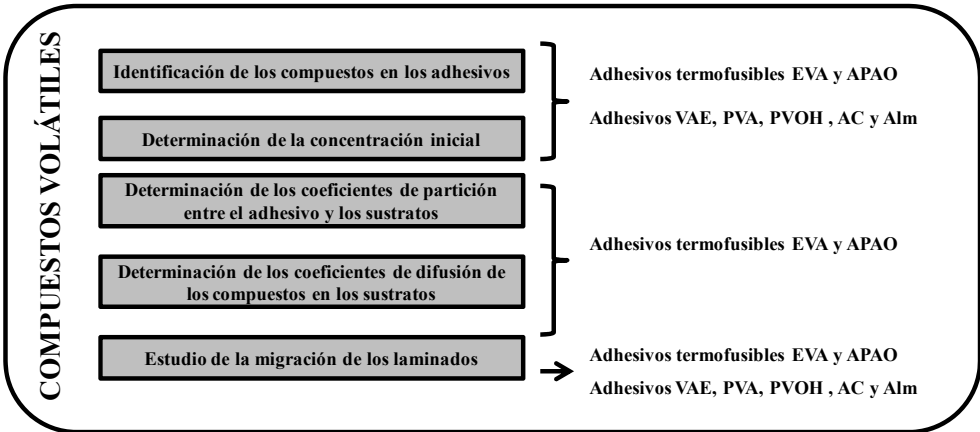
entre los que se encontraban, en todos los adhesivos, algunos ácidos como el acético y butírico con olor a vinagre y queso rancio, también el butirato de metilo, nonanal y 1-butanol.

Además de la identificación se llevó a cabo la cuantificación de la concentración inicial en el adhesivo, resultando el ácido acético el compuesto más abundante con un rango de concentración entre $23\pm 2,1$ y 8900 ± 790 $\mu\text{g/g}$

Este estudio resalta la importancia de determinar los compuestos odorantes responsables de los olores en los adhesivos, ya que es una gran ayuda para las compañías de adhesivos, para reformular o reemplazar estos compuestos odorantes por otros que no lo sean cumpliendo su misma función. Así, se evitaría, que la presencia de estos compuestos provoque cambios organolépticos en el alimento envasado, que se traducen en mala imagen de la empresa y lleva consigo costes elevados asociados a la pérdida de mercado.

CAPÍTULO 5

*ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LOS
COMPUESTOS ODORANTES PRESENTES
EN LOS ADHESIVOS UTILIZADOS EN EL
ENVASE MULTICAPA PARA ENVASAR
ALIMENTOS*



ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LOS COMPUESTOS ODORANTES PRESENTES EN LOS ADHESIVOS UTILIZADOS EN EL ENVASE MULTICAPA PARA ENVASAR ALIMENTOS

1. INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO

El objetivo de este capítulo fue determinar la migración de los compuestos odorantes identificados en los cinco adhesivos estudiados en el capítulo anterior. Para ello, se disponía de muestras de mercado para envasar alimentos, en las que los adhesivos formaban parte de los laminados [sustrato-adhesivo-sustrato] estudiados en el capítulo 2.

Se estudiaron dichos laminados, primero determinando la concentración de los compuestos odorantes en los propios laminados, y posteriormente determinando su migración. Estos estudios ya se han descrito en el capítulo 2, con la salvedad de que ahora se determinará la migración específica de compuestos odorantes que no habían sido identificados en el capítulo 2. Por tanto a diferencia del estudio anterior se requería la técnica GC-O-MS.

Una vez realizados los ensayos de migración, con igual metodología que los desarrollados en el capítulo 2, los simulantes se analizaron por GC-O-MS, con dos propósitos:

- I. Que el panel de catadores que antes había identificado los compuestos, realizara el mismo ensayo y detectara si los compuestos migrantes eran percibidos por el olfato, determinando sus intensidades.
- II. Se calculara su valor de migración, con el fin de comprobar si dichas concentraciones se encontraban por debajo de los límites establecidos como toxicológicos.

La Figura 5.1 muestra un esquema del desarrollo del trabajo realizado en este capítulo.

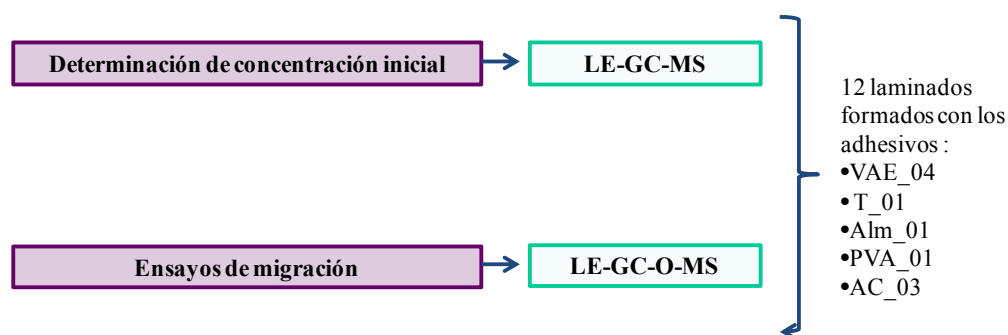


Figura 5.1: Esquema trabajo desarrollado en el capítulo 5

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. REACTIVOS

Acetato de etilo (141-78-6), 2-metil-2-propenoato de metilo.(80-62-2), tolueno (108-88-3), hexanal (66-25-1), 2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano (123-63-7), p-dimetilbenceno (106-42-3), propanoato de butilo (590-01-2), 1-

butanol (71-36-3), 2-propenoato de butilo (141-32-2), estireno (100-42-5), p-isopropiltolueno (99-87-6), 2-octanona (111-13-6), hexanol (111-27-3), acetato de 2-etilhexil (103-09-3), nonanal (124-19-6), ciclohexanol (108-93-0), 2-etil-1-hexanol (104-76-7), alcanfor (76-22-2), ácido propanoico (79-09-4), benzaldehido (100-52-7), octanol (111-87-5), ácido butírico (107-92-6), benzoato de metilo (93-58-3), naftaleno (91-20-3), benzoato de 2-propenilo (583-04-0), 4-tert-butilfenol (98-54-4) suministrados por Aldrich Química S.A (Madrid, España). Diclorometano, acetona y ácido acético (64-19-4) suministrados por Chemie S.A (Sentmenat, España). Todos los disolventes fueron de grado de HPLC.

Se utilizó:

- Disolución A de 4-tert-butilfenol a 1000 µg/g en diclorometano utilizada como estándar interno.
- Disolución B de 4-tert-butilfenol a 1000 µg/g en acetona utilizada también como estándar interno.

Tenax TA 80/100 suministrado por Supelco (Bellefonte, Estados Unidos)

2.1.2. LAMINADOS Y ADHESIVOS

De los laminados [sustrato-adhesivo-sustrato] suministrados por las distintas compañías Europeas en el PROYECTO MIGRESIVES, cuyos ensayos previos se han descrito en el capítulo 2, se escogieron los doce laminados que estuvieran formados con los adhesivos que se habían estudiado en el capítulo anterior es decir; VAE_04, T_01, Alm_01, PVA_01 y AC_03. En este capítulo se estudiará la migración de los compuestos

odorantes previamente identificados en estos adhesivos. La tabla 5.1 muestra las características de los laminados estudiados.

Tabla 5.1: Código de los laminados y de los adhesivos, los sustratos que forman el laminado con su gramaje (g/m^2) y espesor (μm), factor de dilución (d_F) expresado en (dm^3/dm^2) y los gramos de adhesivo por dm^2 de laminado

Código laminados	Código adhesivos	Substrato1/Substrato2 (Gramaje g/m^2 , espesor μm)	d_F (dm^3/dm^2)	$g_{\text{adh}}/\text{dm}^2_{\text{lam}}$
Lam_08	VAE_04	C/C (350 g/m^2 , 479 μm)	63,9	0,491
Lam_09	VAE_04	C/C (350 g/m^2 , 439 μm)	34,1	0,491
Lam_10	VAE_04	C/C (245 g/m^2 , 443 μm)	70	0,491
Lam_29	T_01	C/C (380 g/m^2 , 350 μm)	17,1	0,313
Lam_30	T_01	CPP/ CPP (410 g/m^2 , 510 μm)	17,1	0,313
Lam_21	Alm_01	P/P (38 g/m^2 , 43 μm)	97,8	0,389
Lam_22	Alm_01	P/P (35 g/m^2 , 45 μm)	398,5	0,389
Lam_12	PVA_01	C/C (350 g/m^2 , 502 μm)	52,3	1,02
Lam_13	PVA_01	C/C (290 g/m^2 , 428 μm)	52,3	1,02
Lam_14	PVA_01	C/C (300 g/m^2 , 390 μm)	52,3	1,02
Lam_33	AC_03	C/C (380 g/m^2 , 350 μm)	37	0,156
Lam_34	AC_03	CPP/ CPP (410 g/m^2 , 510 μm)	37	0,156

VAE: acetato de vinilo y etileno; Alm: Almidón; T: termofusible; PVA: acetato de polivinilo; AC: Acrílico; C: cartón; P: papel; CPP: cartón con polipropileno
 d_F factor de dilución

2.1. INSTRUMENTAL

2.1.1. CROMATÓGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA-ESPECTROMETRÍA MASAS (CG-O-MS)

El equipo utilizado era un cromatógrafo de gases CP-3800 Varian (Madrid, España) conectado a un espectrómetro de masas Saturn 2000 series (Madrid, España) con un detector de trampa iónica y un portal de olfatometría descrito antes. La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna BP-20 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) de SGE Analytical Science (Madrid, España). El resto de parámetros utilizados, se muestran en la siguiente Tabla 5.2

Tabla 5.2: Parámetros utilizados para los análisis por extracción por LE acoplada a GG-O-MS

Instrumentación		
Inyección directa (Para cuantificación del laminado y estudio migración)	Volumen inyectado (µL) Inyector	1 30°C(0,15min) 200°C/min 250 (2min) Pulso presión 25psi
Condiciones GC	Flujo de Helio (mL/min) Inyector Rampa temperatura del horno	1 Splitless (2min) 40°C (5min) 10 °C/min 220 (10min)
Condiciones masas (EI)	Rango de masas (m/z) Temperatura trampa (°C) Voltaje electromultiplicador (V)	SIM Tabla 5.3 220 1600

2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL (C_{p0}) DE LOS COMPUESTOS ODORANTES EN LOS LAMINADOS

Previa a la determinación de la migración, se calculó la concentración de los compuestos odorantes en los laminados (lam_08, lam_29, lam_21, lam_12 y lam_33). Para el resto de laminados, no se llevó a cabo su determinación, ya que tenían la misma cantidad de adhesivo por dm^2 y por tanto la misma concentración de estos compuestos odorantes.

Para su determinación, se extrajeron los laminados según el procedimiento optimizado (Vera, et al., 2011). Es decir, se cortó 1 gramo de cada uno de los distintos laminados en trozos pequeños y se extrajo tres veces consecutivas con 2,5 mL de diclorometano durante 24 horas a 40°C. Posteriormente se mezclaron los tres extractos y se añadió 10 µL de

disolución A como estándar interno. Posteriormente, se concentró la disolución con una corriente de nitrógeno hasta 200 μL y se analizó por GC-O-MS. Se analizaron tres réplicas de cada muestra.

Para construir las rectas de calibrado, se analizaron disoluciones de los diferentes compuestos a distintas concentraciones en diclorometano junto con 10 μL de disolución A con la misma metodología GC-O-MS, analizando tres réplicas de cada disolución.

2.4. ENSAYOS DE MIGRACIÓN

Los ensayos de migración igual que en el Capítulo 2, se llevaron a cabo con Tenax® como simulante alimentario, ya que los laminados están formados por cartón o papel, y los simulantes líquidos no pueden usarse con estos materiales. Además la mayoría de estos laminados son para envasar alimentos secos y se recomienda el Tenax® para estos ensayos, en el Reglamento 10/2011/EU.

El ensayo de migración se desarrolló según el procedimiento optimizado anteriormente (Vera, et al., 2011) en el capítulo 2. Es decir, trozos de laminado de 1 x 8.5 cm^2 se colocaron sobre placas Petri y se cubrieron con 0,34 gramos de Tenax formando una capa uniforme (4 g Tenax por dm^2 laminado según UNE-EN 14338). Además, el conjunto se recubrió con papel de aluminio para evitar que se desplomara el Tenax ®. Este sistema se mantuvo en el horno a 40°C durante 10 días (UNE-EN 14338). Después de este tiempo, se extrajo dos veces consecutivas con 3,4 mL de acetona y 1 hora de extracción agitando. Posteriormente, se juntaron

los extractos y se añadieron 10 µL de disolución B como estándar interno. Finalmente se concentró hasta 200 µL con una corriente de nitrógeno.

Se prepararon tres réplicas de cada laminado y se analizaron por GC-O-MS. Seis catadores olieron los extractos de migración eluidos de la columna cromatográfica, anotando el tiempo, el olor y la intensidad (desde 1 que significa olor suave, 2 olor intenso y 3 corresponde a un olor extremadamente fuerte). Posteriormente, igual que en el capítulo anterior, se calculó la frecuencia modificada MF(%), teniendo en cuenta el porcentaje de personas que detectaron el olor F (%) y el porcentaje de intensidad I (%) con la media de las intensidades entre 3, aplicando la siguiente Ecuación 5.1 (Dravnieks, 1985).

$$MF(\%) = [F(\%) \times I(\%)]^{0.5} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

Por otro lado, se calcularon las concentraciones de los compuestos que migraban a Tenax ®, en µg de compuesto por dm² de laminado en contacto con este.

Para determinar los posibles riesgos de los migrantes, los valores de migración expresados en µg de compuesto/dm² de laminado, se expresaron en µg de compuesto/Kg de simulante (dividiendo por sus d_F y suponiendo 1Kg de alimento/1 dm³). Véase Tabla 5.1. Estos valores se compararon con el límite de migración específico para cada compuesto de las legislaciones legislaciones de plásticos; Europea, Reglamento 10/2011/EU y española, Real Decreto 847/2011.

Además se calculó la ingesta diaria estimada (EDI) establecida por la FDA (Food and Drug Administration of United States) a partir de la Ecuación 2.2. Posteriormente, se compararon estos valores de EDI con los

máximos valores recomendados por Cramer según la toxicidad de los compuestos, correspondiente a 1,8, 0,54 and 0,09 mg por persona y día para clase de toxicidad I, II y III respectivamente. Por tanto, previamente se determinó la toxicidad teórica de dichos compuestos según las reglas de Cramer mediante el Software v1.5.1 (Ideaconsult Ltd.)).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL (C_{p0}) DE LOS COMPUESTOS ODORANTES EN LOS LAMINADOS

Previa a la determinación de la migración de los compuestos odorantes en los laminados, se determinó su concentración inicial en el laminado. Para ello se extrajeron dichos laminados (lam_08, lam_29, lam_21, lam_12 and lam_33) tres veces consecutivas con diclorometano y se analizaron por GC-O-MS. Los parámetros analíticos de dicho método se muestran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Parámetros analíticos de GC-O-MS

Compuestos	M ⁺	Ecuación	R ²	Rango lineal (µg/dm ²)	LOD (µg/dm ²)	LOQ (µg/dm ²)	RSD (%)
Acetato de etilo	43	y=0,4519x-0,6893	0,996	15,1-207	4,52	15,1	5,35
2-metil-2-propenoato de metilo	69	y=0,7854x-2,4924	0,993	0,33-20,4	0,09	0,33	4,57
Tolueno	91	y=2,9631x-6,8071	0,996	0,02-15,8	0,01	0,02	5,17
Hexanal	44	y=0,6518x-0,2329	0,994	0,27-20,3	0,08	0,27	9,31
2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano	45	y=1,1999x-0,0541	0,998	2,17-30,1	0,65	2,17	4,38
P-dimetilbenceno	91	y=2,1282x-0,6657	0,983	0,11-25,3	0,03	0,11	2,03
Propanoato de butilo	57	y=0,9859x+0,3714	0,994	0,22-10,3	0,07	0,22	3,19
1-butanol	56	y=0,431x+0,5377	0,997	0,23-102	0,07	0,23	9,74
Acrilato de butilo	55	y=2,0651x-3,126	0,989	0,98-23,7	0,29	0,98	8,61
Estireno	104	y=1,3898x+0,6425	0,983	0,07-4,73	0,02	0,07	5,46
P-cimeno	119	y=1,1056x-2,3972	0,984	1,46-31,4	0,44	1,46	5,42
2-octanona	43	y=0,4631x+0,086	0,997	0,09-12,3	0,03	0,09	8,89
1-hexanol	56	y=1,1205x-1,561	0,989	1,23-25,4	0,37	1,23	8,29
Acetato de 2-etilhexil	43	y=1,3717x-2,8737	0,995	0,26-40,4	0,08	0,26	4,23
Nonanal	57	y=0,3919x-0,6328	0,999	0,54-21,3	0,16	0,54	3,61
Ciclohexanol	57	y=1,5305x-1,0218	0,997	0,86-33,5	0,26	0,86	1,51
Ácido acético	43	y=0,067x+14,695	0,992	85,6-1050	25,7	85,6	2,83
2-etil-1-hexanol	57	y=1,3245x-0,034	0,991	5,93-186	1,78	5,93	4,61
Alcanfor	95	y=0,7745x+0,5557	0,997	0,24-19,7	0,07	0,24	5,99
Ácido propanoico	74	y=0,2688x-10,313	0,984	65,1-1170	19,5	65,1	3,53
Benzaldehido	106	y=0,6982x-1,2539	0,999	0,46-22,4	0,14	0,46	3,21
1-octanol	56	y=0,2232x+0,084	0,995	0,47-34,8	0,14	0,47	7,06
Ácido butírico	60	y=0,622x-1,6504	0,996	32,4-760	9,71	32,4	9,11
Benzoato de metilo	105	y=1,5326x-1,7061	0,999	0,36-46,5	0,11	0,36	2,85
Naftaleno	128	y=3,7331x-2,1625	0,989	0,03-13,7	0,01	0,03	1,32
Benzoato de alilo	105	y=1,3672x-3,5529	0,997	1,07-17,5	0,32	1,07	3,93

Se obtuvieron buenos resultados en términos de linealidad, límites de detección y límites de cuantificación y de RSD. Los límites de detección, estaban comprendidos entre 0,01 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (tolueno) y 25,7 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ (ácido acético). Y los valores de RSD estuvieron en todos los casos por debajo de 9.74 %.

La mayoría de compuestos odorantes identificados en el capítulo anterior eran de clase 1 según las reglas de Cramer (Tabla 5.4 y 5.5). Tres compuestos presentaban clase II de toxicidad como el ciclohexanol, benzoato de alilo y calameneno y tres compuestos presentaban toxicidad de clase III (alta); 2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano, alcanfor y naftaleno.

Las Tablas 5.4 y 5.5 muestran las concentraciones de los compuestos odorantes en los laminados fabricados con los adhesivos VAE_04, T_01 y Alm (Tabla 5.4) y PVA y AC (Tabla 5.5). Estas se expresan en μg de compuesto por dm^2 de laminado.

Debido a la dificultad de encontrar los estándares de longifoleno (M^+ 161) y calameneno (M^+ 159) estos se cuantificaron con naftaleno como estándar.

Tabla 5.4: Compuestos odorantes en el adhesivo VAE_04, con sus toxicidades (T), Cp₀ en los laminados y valores de migración expresados µg/dm² laminado y sus MF (%).

Compuestos (T)	Olor	Cp ₀ (µg/dm ²)				Mig (µg/dm ²) MF (%)	
		VAE_04	Lam_08	Lam_09	Lam_10		
Tolueno (I)	Pintura, humedad	0,09±0,01	0,02±0,002	0,02±0,002	0,02±0,002	0,02±0,002	
P-dimetilbenceno (I)	Dulce	0,1±0,02	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,1±0,009	
1-butanol (I)	Medicina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
1-hexanol (I)	Resina, verde	2,6±0,2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD (22%)	
Nonanal (I)	Fresco, verde	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
Ciclohexanol (II)	Alcanfor	1,9±0,3	<LOD (24%)	<LOQ (31%)	<LOQ (31%)	0,7±0,08 (51%)	
Ácido acético (I)	Vinagre, agrio	200±18	<LOD (32%)	<LOD (23%)	<LOD (23%)	<LOD (37%)	
Benzaldehido (I)	Azucar quemado	2,5±0,2	0,5±0,03 (28%)	0,5±0,04 (35%)	0,5±0,04 (35%)	0,6±0,04 (35%)	
Ácido butírico (I)	Rancio	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
Benzoato de metilo (I)	Aromático, dulce	0,6±0,07	<LOD (24%)	<LOD (26%)	<LOD (26%)	<LOD (38%)	
Butirato de metilo (I)	Queso	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	

Tabla 5.5: Compuestos odorantes en los adhesivos T_01 y Alm_01, sus toxicidades (T), Cp₀ en los laminados y valores de migración expresados µg/dm² laminado y sus MF (%).

Compuestos (T)	Olor	Cp ₀ (µg/dm ²)			Mig (µg/dm ²) MF(%)		
		T_01	Lam_29	Lam_30	Alm_01	Lam_21	Lam_22
Tolueno (I)	Pintura, humedad				<LOQ	<LOQ	<LOQ
Hexanal (I)	Hierba, grasa				<LOQ	<LOQ	<LOQ
2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano(III)	Punzante, desagradable				<LOQ	<LOD(28%)	<LOD (22%)
1-butanol (I)	Medicina	0,2±0,04	0,2±0,03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Acrilato de butilo(I)	Punzante, frutal				<LOD	<LOD	<LOD
P-cimeno (I)	Gasolina	7,9±1,2	7,3±1,0 (31%)	2,7±0,2			
Nonanal (I)	Fresco, verde	0,8±0,1	0,8±0,1 (41%)	0,6±0,08 (39%)	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido acético (I)	Vinagre, agrio	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD(22%)	<LOD (20%)
Ácido propanoico(I)	Rancio				<LOD	<LOD(33%)	<LOD (22%)
Longifoleno (I)	Madera , pino	0,4±0,06		<LOD			
Ácido butírico (I)	Rancio	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD(22%)	<LOD (20%)
Benzoato de metilo(I)	Aromático, dulce					1,3±0,09 (45%)	1,12±0,07 (43%)
Butirato de metilo(I)	Queso	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Naftaleno(III)	Bolas de polillas	0,4±0,05	0,2±0,03 (28%)	<LOQ	0,2±0,01	0,01±0,008 (20%)	0,030,008 (21%)
Benzoato de alilo (II)	dulce, floral				1,5±0,1	<LOQ	<LOQ
Calameneno (II)	Picante, herbal	0,4±0,07	0,4±0,06 (22%)	0,2±0,02 (20%)			

Tabla 5.6: Compuestos en PVA_01 y AC_03, (T), Cp₀ y migración (µg/dm²) y sus MF (%).

Compuestos (T)	Olor	Cp ₀ µg/dm ²		Mig (µg/dm ²) MF(%)		Mig (µg/dm ²) MF(%)	
		PVA_01	Lam_12	Lam_13	Lam_14	AC_03	Lam_33
Acetato de etilo (I)	Frutal, dulce	470±42	56±3,9	65±5,8	72±6,5		
2-metil-2-propenoato de metilo (I)	Frutal					8,7±0,8	4,0±0,4
Hexanal (I)	Hierba, grasa	1,2±0,1	0,8±0,07	1,2±0,1	1,2±0,1		
Propanoato de butilo(I)	Tierra, dulce					0,2±0,02	<LOD
1-butanol (I)	Medicina	57±6,8	41±3,7 (22%)	56±5,1 (27%)	44±3,5 (23%)	1,2±0,1	<LOD
Acrilato de butilo(I)	Punzante, frutal					1,2±0,1	1,1±0,1 (31%)
Estireno (I)	Gasolina					0,07±0,06	<LOD(20%)
2-octanona (I)	Hierba, resina	0,3±0,03	0,1±0,01 (33%)	0,2±0,01 (34%)	0,2±0,01 (33%)		
1-hexanol (I)	Verde	9,7±1,2	<LOD	<LOD	<LOD		
Acetato de 2-etilhexil(I)	Punzante					11±1,4	8,5±0,7 (52%)
Ciclohexanol (II)	Alcanfor	4,0±0,36	<LOD(27%)	<LOD(32%)	<LOD(31%)		
Ácido acético (I)	Vinagre	8500±680	<LOQ(33%)	<LOQ(39%)	<LOQ(39%)	<LOD	<LOD
2-etil-1-hexanol (I)	Verde					82±7,4	25±2,2 (73%)
Alcanfor (III)	Alcanfor					<LOD	<LOD(21%)
1-octanol (I)	Musgo					1,0±0,08	<LOD
Ácido butírico (I)	Rancio	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Para el adhesivo VAE_04, el compuesto con mayor concentración encontrado fue el ácido acético con $200 \pm 18 \mu\text{g}/\text{dm}^2$. Este ácido se utiliza habitualmente en la fabricación de esta clase de adhesivos, ya que para la producción del monómero, acetato de vinilo, se le añade ácido acético al etileno (Petrie, 2000a). Cuatro compuestos encontrados en el trabajo inicial del Capítulo 4 (Vera, et al., 2012) de identificación en los adhesivos, estuvieron por debajo de sus límites de detección en el laminado lam_08 (1-butanol, nonanal, ácido butírico y butirato de metilo).

Para el adhesivo T_01 en el lam_29 el compuesto más abundante fue el p-cimeno cuya concentración correspondía a $7,9 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{dm}^2$. Este compuesto es un constituyente de los aceites esenciales que provienen de la resina utilizada en la constitución de este adhesivo (Jeong-Ho, et al., 2008; Vera, et al., 2011). Igual que ocurría en el adhesivo VAE_04, tres compuestos encontrados en el trabajo inicial del capítulo, no aparecieron en el laminado (ácido acético, ácido butírico y butirato de metilo) ya que sus concentraciones estuvieron por debajo de los LOD o LOQ.

Para el adhesivo de almidón Alm_01 en el laminado lam_21, sólo se cuantificaron tres compuestos (benzoato de metilo, naftaleno y benzoato de alilo) ya que para el resto, sus composiciones estuvieron por debajo de sus LOD o LOQ. El benzoato de metilo se encontró en una concentración de $2,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ y el benzoato de alilo de $1,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{dm}^2$. Los ésteres de benzoatos son comúnmente utilizados como plastificantes (Petrie, 2000a).

Para el adhesivo PVA_01, el compuesto más abundante fue el ácido acético, con una concentración de $8500 \pm 680 \mu\text{g}/\text{dm}^2$. Como ya se ha comentado anteriormente, este se utiliza para la fabricación del monómero de acetato de vinilo. Otro compuesto identificado fue el acetato de etilo con una concentración de $470 \pm 42 \mu\text{g}/\text{dm}^2$. Este es un éster muy volátil, con una

amplia aplicación como disolvente para los plásticos protectores y adhesivos basados en acetato de polivinilo, etil celulosa, acetato butirato de celulosa y propionato de baja viscosidad de acetato de celulosa, polimetilmetacrilato, cauchos de polivinilo-butiral, poliestireno y sintéticos (Petrie, 2000a). El 1-butanol también se utiliza como disolvente y presentó una concentración de $57\pm 6,8 \mu\text{g}/\text{dm}^2$.

Para el adhesivo acrílico, el compuesto más abundante en el laminado lam_33 fue el 2-etil-1-hexanol ($82\pm 7,4 \mu\text{g}/\text{dm}^2$). Este, junto con el acetato de 2-etilhexil ($11\pm 1,4 \mu\text{g}/\text{dm}^2$) son impurezas del metacrilato de metilo utilizado para la fabricación de este tipo de adhesivos (Canellas, et al., 2010; Nerin, et al., 2009a).

3.2. ENSAYOS DE MIGRACIÓN

Los ensayos de migración se realizaron con Tenax® como simulante alimentario.

La Tabla 5.4 muestra las concentraciones de la migración para los laminados fabricados con los adhesivos VAE_04, la Tabla 5.5 los valores de migración para T_01 y Alm_01, y la Tabla 5.6 muestra la migración para los adhesivos PVA_01 y AC_03. Los valores de migración se expresaron en μg de compuesto por dm^2 de laminado utilizado para cada experimento y sólo se mostraron las MF (%) mayores de 20%.

El 66% de los compuestos detectados en los adhesivos, migraron a Tenax®.

Para el adhesivo VAE_04 (Tabla 5.4), sólo 4 compuestos migraron al Tenax® (tolueno, p-dimetilbenceno, ciclohexanol y benzaldehído) y los valores de migración fueron muy similares entre los laminados, siendo un poco mayores para el laminado lam_10. Este hecho se puede explicar por las características del cartón, ya que cuanto menor es el gramaje o el espesor, como es el caso de los sustratos de cartón que forman este laminado (Tabla 5.1), la difusión se incrementará y por tanto la migración (Dole, et al., 2006; Fieldson and Barbari, 1995; Escobal, et al., 1999; Limam, et al., 2005).

Tanto el ciclohexanol como el benzaldehído se detectaron por los catadores con un rango de MF entre 24 y 51 % (Tabla 5.4). Al contrario, algunos compuestos no se detectaron en los ensayos de migración ya que sus valores estaban por debajo de sus LOD o LOQ. Sin embargo, estos se detectaron por los catadores en un rango entre 24% y 38 % (Tabla 5.4) como el ácido acético y benzoato de metilo con olores de vinagre y dulce.

Para el adhesivo T_01 (Tabla 5.5), los compuestos que más migraron en ambos laminados (lam_29 and lam_30) fueron el p-cimeno y nonanal. Estos compuestos también se detectaron con una MF (%) de 31 al 41 % respectivamente por los catadores. Los valores de migración de todos los compuestos fueron mayores en el lam_29 que en el lam_30. Este hecho se puede explicar, ya que la migración es un fenómeno de transferencia de materia que está muy relacionado con los coeficientes de partición y de difusión, como se ha demostrado en el Capítulo 1. A su vez los coeficientes de partición entre el adhesivo y los sustratos C y CPP están muy relacionados con la solubilidad de ambos compuestos en ambos medios. Esta solubilidad se conoce como solubilidad de Hildebrand (δ), explicada ampliamente en el Capítulo 1 (AIC, 1984; Durkee, 2004a; Tehrany and

Desobry, 2004). Los compuestos con solubilidad parecida al polímero EVA permanecerán más unidos a este y por tanto la migración disminuirá en el lam_29. Por el contrario, los compuestos con solubilidad parecida al polímero PP tenderán a unirse a este y por tanto la migración se incrementará en el lam_30. La solubilidad de los compuestos encontrados presentará (Barton, 1990b; Barton, 1991) unos valores más cercanos al adhesivo EVA que al PP por tanto sus coeficientes de partición serán más bajos en el lam_29 que en el lam_30. Este hecho podría explicar que la migración sea mayor en el lam_29 que en el lam_30. Además la presencia de PP en el cartón reduce la porosidad del sustrato y por tanto su difusión, con lo cual reduce su migración (Dole, et al., 2006; Fieldson and Barbari, 1995; Escobal, et al., 1999; Limam, et al., 2005).

Para el adhesivo de almidón Alm_01 (Tabla 5.5) de los compuestos encontrados en el laminado (benzoato de metilo, naftaleno y benzoato de alilo) este último no migró al Tenax®. El compuesto que presentó una mayor migración fue el benzoato de metilo, con un valor de $1,3 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ en el lam_21 y MF(%) 45%. Algunos compuestos no detectados en el ensayo de migración, se detectaron con un rango de MF (%) comprendido entre 20 y 33 % por los catadores. Por ejemplo, el 2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano, ácido propanoico, acético, butírico, con olor a punzante, rancio, vinagre y queso respectivamente.

En los laminados que contienen el adhesivo PVA_01 (Tabla 5.6), los compuestos con mayor valor de migración fueron acetato de etilo y 1-butanol, ambos compuestos con una alta concentración inicial en el laminado. Aunque el ácido acético tenía una alta concentración en el laminado sus valores de migración, estuvieron por debajo de su LOQ ($85,6 \mu\text{g}/\text{dm}^2$, Tabla 5.3) pero tanto este compuesto, como el ciclohexanol se

detectaron por los catadores con unas MF(%) entre 27 y 39%. Sin embargo el acetato de etilo presentó un valor alto de migración, aunque los catadores no fueron capaces de detectarlo, ya que salía al mismo tiempo de retención que el disolvente.

De los laminados formados con el adhesivo AC_03 (lam_33 y lam_34), migraron cinco compuestos de los ocho encontrados en el laminado. El compuesto con mayor valor de migración fue 2-etil-1-hexanol con un valor de $25 \pm 2,2 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ para el lam_33 y $6,5 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ para el lam_34. También en estos casos, los catadores proporcionaron los valores más altos de MF (%) 73 y 52% respectivamente. Aunque el alcanfor no migró, este se detectó por los catadores con 21% de MF(%).

Una vez calculadas las MF(%) y las concentraciones de migración en μg de compuesto por dm^2 de laminado, para estudiar los posibles riesgos asociados a dichos compuestos, primero se convirtieron los datos en mg de compuesto por Kg de alimento (dividiendo por el factor de dilución de la Tabla 5.1 y asumiendo una densidad del alimento de $1 \text{ kg}/\text{dm}^3$) y se compararon con los límites de migración específicos SML. Únicamente el tolueno y 2-etil-1-hexanol tienen SML y corresponde a $1,2 \text{ mg}/\text{Kg}$ (según Real Decreto 847/2011) y $30 \text{ mg}/\text{Kg}$ (según Reglamento 10/2011/EU) respectivamente.

Para los laminados lam_08, 09 y 10, los valores de migración fueron $0,02 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{dm}^2$, que corresponden a $3,13 \text{ E-}7 \text{ mg}/\text{Kg}$, $5,87 \text{ E-}7 \text{ mg}/\text{Kg}$ and $2,86 \text{ E-}7 \text{ mg}/\text{kg}$ respectivamente (para d_f de 63,9, 34,1 y 70,1 dm^3/dm^2 respectivamente) y para 2-etil-1-hexanol en los laminados lam_33 y lam_34 fueron $25 \pm 2,2$ y $6,5 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ respectivamente, que corresponden a $6,7 \text{ E-}4 \text{ mg}/\text{Kg}$ and $1,76 \text{ E-}4 \text{ mg}/\text{Kg}$ (para d_f de $37 \text{ dm}^3/\text{dm}^2$ en ambos laminados). Todos estos valores de migración estuvieron por debajo de sus SML.

Para el resto de compuestos se calculó la ingesta diaria estimada (EDI), según la Ecuación 2.2 y se comparó con los valores recomendados por Cramer de ingesta diaria según su toxicidad, resultando que ningún compuesto superó estos valores.

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método GC-O-MS para determinar la migración de los compuestos odorantes presentes en doce de los laminados, formados por cinco adhesivos de diferentes tipos (VAE, termofusible, almidón, PVA y acrílico) que forman parte del envase alimentario. El método ha resultado una herramienta muy útil, no sólo para calcular la concentración de los migrantes y evaluar los posibles riesgos para la salud de la población, sino al mismo tiempo, para estudiar si esta migración puede producir cambios organolépticos en el alimento envasado.

Se ha encontrado un amplio rango de compuestos odorantes en los laminados, de los que previamente se habían identificado en los adhesivos, de los cuales un 66% migraban al Tenax ® empleado como simulante alimentario. Aunque sus concentraciones estaban en todos los casos por debajo de sus SML o de los valores recomendados por Cramer.

Algunos de los compuestos se encontraron por debajo de sus LOD o LOQ, sin embargo, estos fueron detectados por los catadores con una alta MF (%), por ejemplo, el ácido acético, butírico o ciclohexanol con olor a vinagre, rancio y alcanfor respectivamente.

Este estudio recalca la importancia de estudiar la migración no sólo de la forma tradicional con GC-MS, sino acoplada también a olfatometría, para poder analizar aquellos compuestos que se encuentran por debajo de los límites del detector de masas, pero que sin embargo tienen límites de percepción olfativa muy bajos. Estos son muy importantes, ya que podrían cambiar las propiedades organolépticas del producto envasado, provocando rechazos de los consumidores y por tanto costes relacionados con producción

SECCIÓN IV
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado en esta tesis se han obtenido las siguientes conclusiones:

- I. Se ha desarrollado un método HS-SPME-GC-MS para identificar los principales compuestos volátiles presentes en varios adhesivos termoplásticos (termoestables, vinílicos, acrílicos) y otro de almidón, los cuales se utilizan habitualmente para envase alimentario multicapa formado con diferentes tipos de sustratos de cartón o papel. Este método ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para el logro de este objetivo, ya que ha permitido identificar una gran cantidad de compuestos de forma rápida y con alta sensibilidad. Y por tanto ha demostrado que los adhesivos son muestras complejas donde se encuentran compuestos con distinta composición química, funcionalidad y con distinta toxicidad según el modelo teórico de Cramer.
- II. Se ha desarrollado un método LE-GC-MS para determinar las composiciones iniciales de todos estos adhesivos en los laminados. Por otro lado, este método ha permitido determinar los coeficientes de partición entre el adhesivo termofusible EVA y los distintos sustratos ($K_{A/S}$). Así como la difusión (D) en el adhesivo y en los diferentes materiales utilizados para la fabricación de los laminados formados con este adhesivo. Resultando ser datos muy importantes e influyentes para evaluar el potencial de migración de estos compuestos.

Los resultados han mostrado una gran variedad de coeficientes de partición ($K_{A/S}$) y difusión D , dependiendo del compuesto y del sustrato de cartón que formaba el laminado. Los parámetros más determinantes en la partición han sido la solubilidad del compuesto

tanto en el adhesivo como en el sustrato y la facilidad de dichos compuestos para ser absorbidos por el cartón. Los coeficientes de difusión dependen de la naturaleza del compuesto migrante, matriz del adhesivo y del sustrato. La temperatura es otro factor muy importante que afecta a ambos coeficientes de manera opuesta, mientras que al incrementarse, por un lado todos los coeficientes de partición disminuyen. Por el contrario, todos los coeficientes de difusión aumentan.

- III. Se ha estudiado la migración al simulante alimentario Tenax ® de los compuestos volátiles de treinta muestras de mercado fabricadas con estos adhesivos termoplásticos y el adhesivo de almidón. Para ello se ha optimizado un método de extracción para el Tenax y un método de análisis para el extracto de migración por LE-GC-MS

Los resultados de migración han demostrado que un 78,7% de los compuestos identificados inicialmente migraron al Tenax ®, demostrando que la migración de estos es un hecho real e importante que requiere su estudio. Aunque algunos compuestos que migraban se encontraban en las listas positivas de las legislaciones de plásticos 10/2011/EU y Real Decreto 847/2011, todos estaban por debajo de sus SML. A falta de legislación para algunos compuestos, estos se encontraban por encima de los 10 µg/Kg para barrera funcional aunque por debajo de los límites recomendados por Cramer para sus toxicidades.

Por otro lado, se validó el modelo el modelo MIGRATEST © para la predicción de la migración obteniendo una buena correlación entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. Observando en general, que los valores predichos eran mayores que los calculados

experimentalmente, por tanto el modelo sobreestima los valores de migración, hecho positivo para la seguridad alimentaria.

Finalmente, se ratificó la relación, como cabía esperar, entre los resultados de migración para los laminados fabricados con el adhesivo termofusible y las constantes de partición y difusión calculadas.

- IV. Para la identificación de los compuestos no volátiles que han migrado desde cuatro laminados formados con dos tipos de adhesivos termofusibles, se ha desarrollado un método analítico de LE-UPLC-MS/QTOF. Esta técnica ha sido de gran apoyo para la identificación, ya que ha permitido adquirir los espectros con alta sensibilidad y resolución, además de la posibilidad de fragmentar los iones y conocer la masa exacta del ión principal y sus fragmentos. Este hecho combinado con las herramientas informáticas, han permitido la identificación de la mayoría de compuestos no volátiles migrantes. De los dos adhesivos termofusibles el de base EVA, no migró ningún compuesto, sin embargo en el adhesivo APAO se identificaron varias amidas y un compuesto de clase II según Cramer. Por tanto, se ha demostrado que los compuestos no volátiles también pueden migrar a través de las capas de los laminados y alcanzar el alimento.

De los resultados obtenidos, al igual que ocurría para la migración de de los compuestos volátiles, los valores de migración estaban por debajo de sus SML pero por encima de los 10 µg/Kg para barrera funcional que impone dichas normas para compuestos que no aparecen en las listas positivas, aunque en todos los casos estuvieran por debajo de los valores recomendados por Cramer según sus toxicidades.

- V. Se ha desarrollado un método GC-O-MS para identificar los compuestos odorantes presentes en cinco tipos diferentes de adhesivos

antes estudiados (VAE, PVA, T, AC y Alm). Dichos adhesivos se han extraído por dos metodologías complementarias de extracción HS-SPE y HS-SPME, resultando ser unas herramientas muy útiles para identificar un total de treinta y tres compuestos odorantes, entre los que se encontraban varios ácidos, ésteres, alcoholes, etc., los cuales se caracterizaban por diferentes propiedades organolépticas. También se cuantificaron por HS-SPME-GC-O-MS.

- VI. Se han realizado ensayos de migración para dichos compuestos odorantes identificados para estos adhesivos, llevando a cabo el ensayo de migración para doce laminados formados con estos adhesivos hasta el Tenax ®. Los extractos de migración se han analizado por LE-GC-O-MS resultando una herramienta muy útil, no sólo para calcular los valores de migración y evaluar los posibles riesgos humanos, sino también, para estudiar si los catadores percibían los compuestos migrantes y por tanto, estos podrían producir cambios organolépticos en el alimento envasado. Este hecho resultó ser una herramienta muy interesante para las empresas de adhesivos que podrían remplazar estos compuestos por otros con la misma función pero que no fueran odorantes.

De los resultados obtenidos el 66% de los compuestos identificados migraban al Tenax ® y al igual que ocurría anteriormente, se encontraban por debajo de sus SML y de los valores recomendados por Cramer. Algunos de los compuestos migrantes se encontraban por debajo de sus LOD pero los catadores los detectaron. Por tanto, este estudio recalca la importancia de estudiar la migración no sólo de forma tradicional por GC-MS, sino acoplada a olfatometría.

SECCIÓN V
LEGISLACIÓN Y
BIBLIOGRAFÍA

LEGISLACIÓN

A Continuación se muestra la legislación, reglamentos y recomendaciones consultadas para la realización de esta Tesis.

1935/2004/EC Regulation (EC) N° 1935/2004 of the European Parliament and the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food.

2023/2006/EC. Regulation (EC) N° 2023/2006 of the Commission of 22 December 2006 on good manufacturing practice for materials and articles intended to come into contact with food

10/2011/EU. Commission Regulation (EU) N° 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and article intended to come into contact with food.

847/2011. Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos.

67/548/EEC. Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labeling of dangerous substance.

UNE-EN-14338 (2004), AENOR. Papel y cartón para contacto alimentario. Condiciones para la determinación de la migración desde el papel y cartón utilizando óxido de polifenileno modificado (MPPO) como simulante.

FDA (1995). Recommendations for chemistry data for indirect food additive petitions, Food and Drug Administration FDA

ILSI (2005). Threshold of toxicological concern (TTC). International Life Science Institute ILSI Europe concise monograph series.

BIBLIOGRAFÍA

A continuación se muestra la bibliografía consultada para la realización de esta Tesis Doctoral.

Acree, T.E., Barnard, J. and Cunningham, D.G., (1984). 'A Procedure for the Sensory Analysis of Gas-Chromatographic Effluents'. *Food Chemistry*, 14 (4):273-286.

AIC, (1984). The book and Paper Group ANNUAL: The American Institute for Conservation. Volume three.

Ashley, R.J., Cochran, M.A. and Allen, K.W., (1995). 'Adhesives in Packaging'. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 15 101-108.

Athenstadt, B., Funfrocken, M. and Schmidt, T.C., (2012). 'Migrating components in a polyurethane laminating adhesive identified using gas chromatography/mass spectrometry'. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26 (16):1810-1816.

Aznar, M., Vera, P., Canellas, E., Nerin, C., Mercea, P. and Stormer, A., (2011). 'Composition of the adhesives used in food packaging multilayer materials and migration studies from packaging to food'. *Journal of Materials Chemistry*, 21 (12):4358-4370.

Barnes, K.A., Sinclair, C.R. and Watson, D.H., (2007a). Chemical migration and food contact materials: Woodhead Publishing Limited, CRC Press. Chapter:14, p 320-331.

- Barnes, K.A., Sinclair, C.R. and Watson, D.H., (2007b). Chemical migration and food contact materials: Woodhead Publishing Limited, CRC Press. Chapter:3, p 43-63.
- Barro, R., Ares, S., Garcia-Jares, C., Llompart, M. and Cela, R., (2005). 'Sampling and analysis of polychlorinated biphenyls in indoor air by sorbent enrichment followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry'. *Journal of Chromatography A*, 1072 (1):99-106.
- Barron, L.J.R., Redondo, Y., Aramburu, M., Perez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Najera, A.I. and de Renobales, M., (2005). 'Variations in volatile compounds and flavour in Idiazabal cheese manufactured from ewe's milk in farmhouse and factory'. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (10):1660-1671.
- Barton, A.F.M., (1990a). Handbook of polymer-liquid interaction parameters and solubility parameters: CRC. PRESS.
- Barton, A.F.M., (1990b). Handbook of polymer-liquid interaction parameters and solubility parameters: CRC. PRESS. p.207
- Barton, A.F.M., (1990c). Handbook of polymer-liquid interaction parameters and solubility parameters: CRC. PRESS. p.284
- Barton, A.F.M., (1991). Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters: CRC PRESS.
- Begley, T., Castle, L., Feigenbaum, A., Franz, R., Hinrichs, K., Lickly, T., Mercea, P., Milana, M., O'Brien, A., Rebre, S., Rijk, R. and Piringger, O., (2005). 'Evaluation of migration models that might be used in

support of regulations for food-contact plastics'. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 22 (1):73-90.

Bentayeb, K., Rubio, C., Batlle, R. and Nerin, C., (2007). 'Direct determination of carnosic acid in a new active packaging based on natural extract of rosemary'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (6):1989-1996.

Bentayeb, K., Vera, P., Rubio, C. and Nerin, C., (2009). 'Adaptation of the ORAC assay to the common laboratory equipment and subsequent application to antioxidant plastic films'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394 (3):903-910.

Bobeldijk, I., Vissers, J.P.C., Kearney, G., Major, H. and van Leerdam, J.A., (2001). 'Screening and identification of unknown contaminants in water with liquid chromatography and quadrupole-orthogonal acceleration-time-of-flight tandem mass spectrometry'. *Journal of Chromatography A*, 929 (1-2):63-74.

Botitsi, H.V., Garbis, S.D., Economou, A. and Tsipi, D.F., (2011). 'Current Mass Spectrometry Strategies for the Analysis of Pesticides and Their Metabolites in Food and Water Matrices'. *Mass Spectrometry Reviews*, 30 (5):907-939.

Brede, C., Skjevrak, I. and Herikstad, H., (2003). 'Determination of primary aromatic amines in water food simulant using solid-phase analytical derivatization followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry'. *Journal of Chromatography A*, 983 (1-2):35-42.

- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A. and Cacho, J., (2005). 'Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (14):5682-5690.
- Canellas, E., Aznar, M., Nerin, C. and Mercea, P., (2010a). 'Partition and diffusion of volatile compounds from acrylic adhesives used for food packaging multilayers manufacturing'. *Journal of Materials Chemistry*, 20 (24):5100-5109.
- Canellas, E., Nerin, C., Moore, R. and Silcock, P., (2010b). 'New UPLC coupled to mass spectrometry approaches for screening of non-volatile compounds as potential migrants from adhesives used in food packaging materials'. *Analytica Chimica Acta*, 666 (1-2):62-69.
- Canellas, E., Vera, P., Domeno, C., Alfaro, A.P. and Nerin, C., (2012). 'Atmospheric pressure gas chromatography coupled to quadrupole-time of flight mass spectrometry as a powerful tool for identification of non intentionally added substances in acrylic adhesives used in food packaging materials'. *Journal of Chromatography A*, 1235:141-148.
- Catalá, R. and Gavara, R., (2002a). Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Chapter I. p 1-18
- Catalá, R. and Gavara, R., (2002b). Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Chapter VI. p 101-125

- Crank, J. and Gupta, R.S., (1975). 'Isotherm Migration Method in 2 Dimensions'. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 18 (9):1101-1107.
- Crank, J. and Park, G., (1968). *Diffusion in polymers*: Academic Press.
- Culleré, L., Escudero, A., Campo, E., Cacho, J. and Ferreira, V., (2009). 'Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods'. *Journal of Chromatography A*, 1216 (18):4040-4045.
- Czerny, M. and Buettner, A., (2009). 'Odor-Active Compounds in Cardboard'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (21):9979-9984.
- Czerny, M., Christlbauer, M., Christlbauer, M., Fischer, A., Granvogl, M., Hammer, M., Hartl, C., Hernandez, N. and Schieberle, P., (2008). 'Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions'. *European Food Research and Technology*, 228 (2):265-273.
- Chen, B.L., (1997). 'Surface properties of corona-treated polyethylene films containing N-(2-hydroxyethyl) erucamide as slip agent for enhanced adhesion of water-based ink'. *Polymers, Laminations, & Coating Conference*, Books 1 and 2. Atlanta: Tappi Press, 427-438.
- Chen, B.L., Johnson, E.J., Chefetz, B., Zhu, L.Z. and Xing, B.S., (2005). 'Sorption of polar and nonpolar aromatic organic contaminants by

- plant cuticular materials: Role of polarity and accessibility'. *Environmental Science and Technology*, 39 (16):6138-6146.
- Chen, J.L., Wu, J.H., Wang, Q., Deng, H. and Hu, X.S., (2006). 'Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Kuerle fragrant pear (*Pyrus serotina* Reld) during storage'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (23):8842-8847.
- Choi, H.S., (2004). 'Aroma evaluation of an aquatic herb, Changpo (*Acorus calamus* var. *angustatus* Bess), by AEDA and SPME'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26):8099-8104.
- Dasilva, M., Lundahl, D.S. and McDaniel, M.R., (1994). 'The Capability and Psychophysics of Osme - a New Gc-Olfactometry Technique'. *Trends in Flavour Research*. Amsterdam: Elsevier Science Publ B V, 191-209.
- Delahunty, C.M., Eyres, G. and Dufour, J.P., (2006). 'Gas chromatography-olfactometry'. *Journal of Separation Science*, 29 (14):2107-2125.
- Deschenes, L., Arbour, A., Brunet, F., Court, M.A., Doyon, G.J., Fortin, J. and Rodrigue, N., (1995). 'Irradiation of a Barrier Film - Analysis of Some Mass-Transfer Aspects'. *Radiation Physics and Chemistry*, 46 (4-6):805-808.
- Dole, P., Feigenbaum, A.E., De la Cruz, C., Pastorelli, S., Paseiro, P., Hankemeier, T., Voulzatis, Y., Aucejo, S., Saillard, P. and Paspapyrides, C., (2006). 'Typical diffusion behaviour in packaging polymers - application to functional barriers'. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 23 (2):202-211.

- Dravniek, A. and Odonnell, A., (1971). 'Principles and Some Techniques of High-Resolution Headspace Analysis'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19 (6):1049-&.
- Dravnieks, (1985). Atlas of odor character profiles: ed.; ASTM: Philadelphia, PA.
- Durkee, J.B., (2004a). 'Solubility parameters: Part I'. *Metal Finishing*, 102 (1):39-42.
- Durkee, J.B., (2004b). 'Solubility parameters: Part II'. *Metal Finishing*, 102 (4):42-50.
- Dury-Brun, C., Jury, V., Guillard, V., Desobry, S., Voilley, A. and Chalier, P., (2006). 'Water barrier properties of treated-papers and application to sponge cake storage'. *Food Research International*, 39 (9):1002-1011.
- Eggleston, J.R. and Peirce, J.J., (1995). 'Dynamic programming analysis of pore space'. *European Journal of Soil Science*, 46 (4):581-590.
- Escobal, A., Iriondo, C. and Katime, I., (1999). 'Organic solvents adsorbed in polymeric films used in food packaging: Determination by head-space gas chromatography'. *Polymer Testing*, 18 (4):249-255.
- Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J. and Ferreira, V., (2007). 'Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (11):4501-4510.

- Ezquerro, O., Pons, B. and Tena, M.T., (2002). 'Development of a headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the identification of odour-causing volatile compounds in packaging materials'. *Journal of Chromatography A*, 963 (1-2):381-392.
- Ezquerro, O., Pons, B. and Tena, M.T., (2003a). 'Evaluation of multiple solid-phase microextraction as a technique to remove the matrix effect in packaging analysis for determination of volatile organic compounds'. *Journal of Chromatography A*, 1020 (2):189-197.
- Ezquerro, O., Pons, B. and Tena, M.T., (2003b). 'Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry applied to quality control in multilayer-packaging manufacture'. *Journal of Chromatography A*, 1008 (1):123-128.
- Ezquerro, Ó., Pons, B. and Tena, M.T., (2003c). 'Multiple headspace solid-phase microextraction for the quantitative determination of volatile organic compounds in multilayer packagings'. *Journal of Chromatography A*, 999 (1-2):155-164.
- Félix, J.S., Isella, F., Bosetti, O. and Nerín, C., (2011). 'Analytical tools for identification of non-intentionally added substances (NIAS) coming from polyurethane adhesives in multilayer packaging materials and their migration into food simulants'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403:2869–2882.
- Felix, J.S., Monteiro, M., Manzoli, J.E., Padula, M., Pezo, D., Romero, J. and Nerin, C., (2008). 'Identification and migration of degradation compounds from irradiation of multilayer polyamide 6 films for meat

foodstuffs and cheese'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (3):847-857.

Fieldson, G.T. and Barbari, T.A., (1993). 'The Use of Ftir-Atr Spectroscopy to Characterize Penetrant Diffusion in Polymers'. *Polymer*, 34 (6):1146-1153.

Fieldson, G.T. and Barbari, T.A., (1995). 'Analysis of Diffusion in Polymers Using Evanescent Field Spectroscopy'. *Aiche Journal*, 41 (4):795-804.

Fuller, G., Steltenkamp, R. and Tisserand, G., (1964). *Add NY Acad Sci*:116-711.

Gajdos, J., Galic, K., Kurtanjek, Z. and Cikovic, N., (2001). 'Gas permeability and DSC characteristics of polymers used in food packaging'. *Polymer Testing*, 20 (1):49-57.

Gnanasekharan, V. and Floros, J.D., (1997). 'Migration and sorption phenomena in packaged foods'. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37 (6):519-559.

Goulas, A.E., Riganakos, K.A. and Kontominas, M.G., (2004). 'Effect of ionizing radiation on physicochemical and mechanical properties of commercial monolayer and multilayer semirigid plastics packaging materials'. *Radiation Physics and Chemistry*, 69 (5):411-417.

Hashizume, M., Gordon, M.H. and Mottram, D.S., (2007). 'Light-induced off-flavor development in cloudy apple juice'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (22):9177-9182.

- Hernandez, F., Sancho, J.V., Ibanez, M. and Grimalt, S., (2008). 'Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS'. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 27 (10):862-872.
- Hoffmann, E. and Stroobant, V., (2007). *Mass Spectrometry. Principles and Applications*: Wiley.
- Horgan, G.W., (1999). 'An investigation of the geometric influences on pore space diffusion'. *Geoderma*, 88 (1-2):55-71.
- Jacobsson, A., Nielsen, T. and Sjöholm, I., (2004). 'Influence of temperature, modified atmosphere packaging, and heat treatment on aroma compounds in broccoli'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (6):1607-1614.
- Jeong-Ho, L., Yang, H.Y., Lee, H.S. and Hong, S.K., (2008). 'Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from cones of *Pinus koraiensis*'. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 (3):497-502.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M.B. and Geissler, M., (2002). 'Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction-gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry'. *Journal of Chromatography A*, 976 (1-2):265-275.
- Jurado, J.M., Ballesteros, O., Alcazar, A., Pablos, F., Martin, M.J., Vilchez, J.L. and Navalon, A., (2007). 'Characterization of aniseed-flavoured spirit drinks by headspace solid-phase microextraction gas

chromatography-mass spectrometry and chemometrics'. *Talanta*, 72 (2):506-511.

Kacem, M., Salvador, S. and Quintard, M., (2009). 'Textural characterization of media composed of compacted pieces of cardboard and polyethylene using a gas tracer method'. *Waste Management*, 29 (2):660-667.

Kataoka, H., Lord, H.L. and Pawliszyn, J., (2000). 'Applications of solid-phase microextraction in food analysis'. *Journal of Chromatography A*, 880 (1-2):35-62.

Klopffer, M.H. and Flaconneche, B., (2001). 'Transport properties of gases in polymers: Bibliographic review'. *Oil & Gas Science and Technology-Revue De L Institut Francais Du Petrole*, 56 (3):223-244.

Kontominas, M.G., Goulas, A.E., Badeka, A.V. and Nerantzaki, A., (2006). 'Migration and sensory properties of plastics-based nets used as food-contacting materials under ambient and high temperature heating conditions'. *Food Additives and Contaminants*, 23 (6):634-641.

Krauss, M., Singer, H. and Hollender, J., (2010). 'LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (3):943-951.

Lacorte, S. and Fernandez-Albaz, A.R., (2006). 'Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food'. *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (6):866-880.

- Landy, P., Nicklaus, S., Semon, E., Mielle, P. and Guichard, E., (2004). 'Representativeness of extracts of offset paper packaging and analysis of the main odor-active compounds'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (8):2326-2334.
- Lau, O.W. and Wong, S.K., (2000). 'Contamination in food from packaging material'. *Journal of Chromatography A*, 882 (1-2):255-270.
- Lecanu, L., Ducruet, V., Jouquand, C., Gratadoux, J.J. and Feigenbaum, A., (2002). 'Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripened cheese'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (13):3810-3817.
- Limam, M., Tighzert, L., Fricoteaux, F. and Bureau, G., (2005). 'Sorption of organic solvents by packaging materials: polyethylene terephthalate and TOPAS®'. *Polymer Testing*, 24 (3):395-402.
- Linssen, J.P.H., Rijnen, L., Legger-Huijsman, A. and Roozen, J.P., (1998). 'Combined GC and sniffing port analysis of volatile compounds in rubber rings mounted on beer bottles'. *Food Additives and Contaminants*, 15 (1):79-83.
- Lopez, P., Batlle, R., Salafranca, J. and Nerin, C., (2008). 'Efficiency of whole and skimmed powdered milk for trapping volatile compounds released from plastic containers in high-temperature applications'. *Journal of Food Protection*, 71 (9):1889-1897.
- Lozano, P.R., Miracle, E.R., Krause, A.J., Drake, M. and Cadwallader, K.R., (2007). 'Effect of cold storage and packaging material on the major aroma components of sweet cream butter'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (19):7840-7846.

- Maggi, F., Papa, F., Cristalli, G., Sagratini, G. and Vittori, S., (2010). 'Characterisation of the mushroom-like flavour of *Melittis melissophyllum* L. subsp *melissophyllum* by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)'. *Food Chemistry*, 123 (4):983-992.
- Maltby, A., (1999a). 'The effects of polyolefin formulation and processing variables on slip agent performance (I)'. *Tappi Polymers, Laminations & Coatings Conference*, Vols 1 and 2. Atlanta: Tappi Press, 349-358.
- Maltby, A.J. and Read, M., (1999b). 'Effect of temperature on the slip and blocking of polyolefins containing various fatty acid amides'. *Tappi Polymers, Laminations & Coatings Conference*, Vols 1 and 2. Atlanta: Tappi Press, 1079-1087.
- Mannheim, C.H. and Passy, N., (1990). 'Interaction between packaging materials and foods'. *Packaging Technology and Science*, Volume 3, Issue 3, pages 127–132, .
- Marchand-Geneste, N. and Carpy, A., (2003). 'Theoretical study of the thermal degradation pathways of abietane skeleton diterpenoids: aromatization to retene'. *Journal of Molecular Structure*, 635 (1-3):55-82.
- Martinez Bueno, M.J., Ulaszewska, M.M., Gomez, M.J., Hernando, M.D. and Fernandez-Alba, A.R., (2012). 'Simultaneous measurement in mass and mass/mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water'. *Journal of Chromatography A*, 1256:80-88.

- Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T., (1999). *Sensory Evaluation Techniques*: CRC Press
- Mercea, P. and Piringer, O., (2008). *Plastic Packaging*. Wiley-VCH:499.
- Mercea, P., Zulch, A., Gruner, A., Canellas, E., Vera, P., Gaspar, J. and Tosa, V., (2009). 6th Plenary Meeting, Reims.
- Moisan, J.Y., (1980). 'Diffusion of Polyethylene Additives .1. Effect of Nature of Diffusion Agent'. *European Polymer Journal*, 16 (10):979-987.
- Moldrup, P., Poulsen, T.G., Schjonning, P., Olesen, T. and Yamaguchi, T., (1998). 'Gas permeability in undisturbed soils: Measurements and predictive models'. *Soil Science*, 163 (3):180-189.
- Nerin, C. and Acosta, D., (2002). 'Behavior of some solid food simulants in contact with several plastics used in microwave ovens'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (25):7488-7492.
- Nerin, C. and Asensio, E., (2007). 'Migration of organic compounds from a multilayer plastic-paper material intended for food packaging'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (2):589-596.
- Nerín, C. and Asensio, E., (2004). 'Behaviour of organic pollutants in paper and board samples intended to be in contact with food'. *Analytical Chimica Acta*, 508 (2):185-191.
- Nerin, C., Batlle, R. and Cacho, J., (1998). 'Design of a test for migration studies in the vapour phase'. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 15 (1):89-92.

- Nerin, C., Canellas, E., Aznar, M. and Silcock, P., (2009a). 'Analytical methods for the screening of potential volatile migrants from acrylic-base adhesives used in food-contact materials'. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 26 (12):1592-1601.
- Nerin, C., Gaspar, J., Vera, P., Canellas, E., Aznar, M. and Mercea, P., (2012). 'Determination of partition and diffusion coefficients of components of two rubber adhesives in different multilayer materials'. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 40 (0):56-63.
- Nerin, C., Salafranca, J., Aznar, M. and Batlle, R., (2009b). 'Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393 (3):809-833.
- Ozdemir, M. and Floros, J.D., (2004). 'Active food packaging technologies'. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (3):185-193.
- Pawliszyn, J., (1997). *Solid Phase Microextraction: theory and practice.* : Wiley-VCH.
- Pawliszyn, J., (2009). *Handbook of Solid Phase Microextraction: Chemical Industry Press.*
- Perez-Cacho, P.R., Mahattanatawee, K., Smoot, J.M. and Rouseff, R., (2007). 'Identification of sulfur volatiles in canned orange juices lacking orange flavor'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (14):5761-5767.
- Petrie, E.M., (2000a). *Handbook of adhesive and sealants: McGraw Hill.* Chapter 9, p. 319-341.

- Petrie, E.M., (2000b). Handbook of adhesive and sealants: McGraw Hill. Chapter 10, p. 343-414.
- Pico, Y. and Barcelo, D., (2008). 'The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants'. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 27 (10):821-835.
- Pico, Y., la Farre, M., Soler, C. and Barcelo, D., (2007). 'Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry imazalil as a case study of quantification'. *Journal of Chromatography A*, 1176 (1-2):123-134.
- Pico, Y., La Farre, M., Tokman, N. and Barcelo, D., (2008). 'Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and identification of its degradation products in fruits'. *Journal of Chromatography A*, 1203 (1):36-46.
- Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., MunozBox, R. and Chaintreau, A., (1997). 'Hyphenated headspace gas chromatography sniffing technique: Screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (7):2630-2637.
- Raj, B., Murthy, R.A.N., Vijayalakshmi, N.S., Indiramma, A.R., Balasubrahmanyam, N. and Veerraju, P., (1990). 'Migration Studies on Some Selected Commercial Plastics Packaging Materials for Food Contact Applications'. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 27 (6):323-327.

- Rega, B., Fournier, N. and Guichard, E., (2003). 'Solid phase microextraction (SPME) of orange juice flavor: Odor representativeness by direct gas chromatography olfactometry (D-GC-O)'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (24):7092-7099.
- Regueiro, J., Garcia-Jares, C., Llompарт, M., Lamas, J.P. and Cela, R., (2009). 'Development of a method based on sorbent trapping followed by solid-phase microextraction for the determination of synthetic musks in indoor air'. *Journal of Chromatography A*, 1216 (14):2805-2815.
- Reynier, A., Dole, P. and Feigenbaum, A., (2001a). 'Additive diffusion coefficients in polyolefins. II. Effect of swelling and temperature on the $D = f(M)$ correlation'. *Journal of Applied Polymer Science*, 82 (10):2434-2443.
- Reynier, A., Dole, P., Humbel, S. and Feigenbaum, A., (2001b). 'Diffusion coefficients of additives in polymers. I. Correlation with geometric parameters'. *Journal of Applied Polymer Science*, 82 (10):2422-2433.
- Risch, S.J., (2009). 'Food Packaging History and Innovations'. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57:8089–8092.
- Robertson, G.L., (2006). Food Packaging. Principles and Practice: CRC press.
- Rock, F., Barsan, N. and Weimar, U., (2008). 'Electronic nose: Current status and future trends'. *Chemical Reviews*, 108 (2):705-725.
- Rodriguez-Lafuente, A., Nerin de la Puerta, C. and Batlle, R., (2009). 'Determination of fifteen active compounds released from paraffin-

- based active packaging in tomato samples via microextraction techniques'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (1):203-211.
- Rogge, W.F., Hildemann, L.M., Mazurek, M.A., Cass, G.R. and Simoneit, B.R.T., (1998). 'Sources of fine organic aerosol. 9. Pine, oak and synthetic log combustion in residential fireplaces'. *Environmental Science and Technology*, 32 (1):13-22.
- San-Juan, F., Pet'ka, J., Cacho, J., Ferreira, V. and Escudero, A., (2010). 'Producing headspace extracts for the gas chromatography-olfactometric evaluation of wine aroma'. *Food Chemistry*, 123 (1):188-195.
- Scott, R.P.W., (2003a). Gas Chromatography. Chrom-Ed Book Series: Kindle Edition.
- Scott, R.P.W., (2003b). Gas Chromatography Detectors. Chrom-Ed Book Series: Kindle Edition.
- Schieberle, P. and Grosch, W., (1987). 'Evaluation of the Flavor of Wheat and Rye Bread Crusts by Aroma Extract Dilution Analysis'. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 185 (2):111-113.
- Schiffman, S.S., Bennett, J.L. and Raymer, J.H., (2001). 'Quantification of odors and odorants from swine operations in North Carolina'. *Agricultural and Forest Meteorology*, 108 (3):213-240.
- Sendon, R., Sanches-Silva, A., Bustos, J., Martin, P., Martinez, N. and Cirugeda, M.E., (2012). 'Detection of migration of phthalates from agglomerated cork stoppers using HPLC-MS/MS'. *Journal of Separation Science*, 35 (10-11):1319-1326.

- Simoneit, B.R.T., Rogge, W.F., Mazurek, M.A., Standley, L.J., Hildemann, L.M. and Cass, G.R., (1993). 'Lignin Pyrolysis Products, Lignans, and Resin Acids as Specific Tracers of Plant Classes in Emissions from Biomass Combustion'. *Environmental Science and Technology*, 27 (12):2533-2541.
- Spitzer, J. and Buettner, A., (2010) 'Characterization of aroma changes in human milk during storage at-19 degrees C'. *Food Chemistry*, 120 (1):240-246.
- Swanson, C.L., Burg, D.A. and Kleiman, R., (1993). 'Meadowfoam Monoenoic Fatty-Acid Amides as Slip and Antiblock Agents in Polyolefin Film'. *Journal of Applied Polymer Science*, 49 (9):1619-1624.
- Tehrany, E.A. and Desobry, S., (2004). 'Partition coefficients in food/packaging systems: a review'. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 21 (12):1186-1202.
- Tosa, V., Kovacs, K., Mercea, P. and Piringer, O., (2008). 'AIP Conference Proceedings'. AIP Conference Proceedings.
- Tosa, V. and Mercea, P., (2008). 'A finite difference method for modeling migration of multilayer systems'. *Plastic Packaging*, Wiley-VCH, Weinheim:247
- Triantafyllou, V.I., Akrida-Demertzi, K. and Demertzis, P.G., (2005). 'Determination of partition behavior of organic surrogates between paperboard packaging materials and air'. *Journal of Chromatography A*, 1077 (1):74-79.

- Tyapkova, O., Czerny, M. and Buettner, A., (2009). 'Characterisation of flavour compounds formed by gamma-irradiation of polypropylene'. *Polymer Degradation and Stability*, 94 (5):757-769.
- Ullrich, F. and Grosch, W., (1987). 'Identification of the Most Intense Volatile Flavor Compounds Formed During Autoxidation of Linoleic-Acid'. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 184 (4):277-282.
- Ureta, E., (1996). *Polímeros. Estructura, Propiedades y Aplicaciones*: Editorial Limusa.
- Valto, P., Knuutinen, J. and Alen, R., (2008). 'Fast analysis of relative levels of dehydroabietic acid in papermaking process waters by on-line sample enrichment followed by atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry (APCI-MS)'. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 88 (13):969-978.
- van Ruth, S.M., (2001). 'Methods for gas chromatography-olfactometry: a review'. *Biomolecular Engineering*, 17 (4-5):121-128.
- Vera, P., Aznar, M., Mercea, P. and Nerin, C., (2011). 'Study of hotmelt adhesives used in food packaging multilayer laminates. Evaluation of the main factors affecting migration to food'. *Journal of Materials Chemistry*, 21 (2):420-431.
- Vera, P., Uliaque, B., Canellas, E., Escudero, A. and Nerin, C., (2012). 'Identification and quantification of odorous compounds from adhesives used in food packaging materials by headspace solid phase extraction and headspace solid phase microextraction coupled to gas

chromatography-olfactometry-mass spectrometry'. *Analytical Chimica Acta*, 745C:53-63.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N. and Debevere, J., (1999). 'Developments in the active packaging of foods'. *Trends Food Science and Technology*, 10 (3):77-86.

Wan, J.A.L., Chatwin, P.C. and Katan, L.L., (1995). 'Migration from Plastic Packages into Their Contents .1. the Role of Mathematical-Models'. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 350 (1694):379-406.

Welle, F., Mauer, A. and Franz, R., (2002). 'Migration and sensory changes of packaging materials caused by ionising radiation'. *Radiation Physics and Chemistry*, 63 (3-6):841-844.

Wisniewski, R., Smieszek, E. and Kaminska, E., (1995). 'Three-dimensional solubility parameters: simple and effective determination of compatibility regions'. *Progress in Organic Coatings* 26 (2-4):265-274.

Zahedi, A.R., Ranji, A. and Asiaban, S., (2006). 'Optimizing COF, blocking force, and printability of low density polyethylene'. *Journal of Plastic Film & Sheeting*, 22 (3):163-176.

Zhang, Z.Y., Yang, M.J. and Pawliszyn, J., (1994). 'Solid-Phase Microextraction'. *Analytical Chemistry*, 66 (17):A844-A853.

Zheng, M.M., Ruan, G.D. and Feng, Y.Q., (2009). 'Evaluating polymer monolith in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid

chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of quinolone antibacterials in edible animal food'. *Journal of Chromatography A*, 1216 (44):7510-7519.

Zweigenbaum, J., (2011). 'Contaminants in our food? How to detect untargeted compounds and determine their identity'. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 22 (5):4-6.

www.chemspider.com.

www.flavornet.org

www.scifinder.cas.org.

SECCIÓN VI
PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

La realización de esta tesis presentada en esta memoria ha dado como fruto las siguientes publicaciones científicas:

- ✓ **Vera, P.** Aznar, M. Mercea, P. y Nerin, C. “Study of hotmelt adhesives used in food packaging multilayer laminates. Evaluation of the main factors affecting migration to food” *Journal of Materials. Chemistry*, 2011, 21, 420-431.
- ✓ Aznar, M. **Vera, P.** Canellas, E. Nerin, C. Mercea, P. y Stomer, A. “Composition of the adhesives used in food packaging multilayer materials and migration studies from packaging to food” *Journal of Materials. Chemistry*, 2011, 21, 4358-4370.
- ✓ **Vera, P.** Uliaque, B. Canellas, E. Escudero, A. y Nerin, C. “Identification and quantification of odorous compounds from adhesives used in food packaging materials by headspace solid phase extraction and headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry” *Analytical Chimica Acta*, 2012, 745C, 53-63.
- ✓ **Vera, P.** Canellas, E. y Nerin, C. “Migration of non intentionally added substance from adhesives used in food packaging materials by ultra-performance liquid chromatography couple to quadrupole time-of-flight mass spectrometer” Enviado.
- ✓ **Vera, P.** Canellas, E. y Nerin, C. “Migration of odorous compounds from adhesives used in market samples of food packaging materials by chromatography olfactometry and mass spectrometry (GC-O-MS)”. Enviado.

