



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de una metodología analítica para la
determinación de clorofenoles y cloroanisoles a
niveles traza en muestras de papel y cartón

Autor/es

Leo Sanjurjo Sebastián

Director/es

Esther Asensio Casas

Escuela Politécnica Superior de Huesca

2017

Agradecimientos

A Esther Asensio Casas, directora de este trabajo fin de grado, por su inestimable desempeño, colaboración, disponibilidad, atención y esfuerzo durante la realización de este proyecto.

A Cristina Nerín de la Puerta, directora del Grupo Universitario de Investigación Analítica (GUIA), del departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza, por haberme permitido realizar este proyecto en las instalaciones y con los equipos con los que cuenta el laboratorio que dirige.

Al Grupo de Análisis Químico de Aromas y Enología (LAE) por permitir el uso de sus equipos y por la inmejorable disposición de las personas que lo forman.

A Paula Vera, Sofía Manso y Magdalena Wrona, miembros del Grupo Universitario de Investigación Analítica, por su ayuda y facilitación de mi trabajo durante mi tiempo en el laboratorio del GUIA.

A Sara Úbeda y a Jazmín Osorio, estudiantes de doctorado en el Grupo Universitario de Investigación Analítica, por su importante ayuda, colaboración, paciencia y siempre buena disposición a echar una mano.

A Andrés Martí, por su apoyo emocional, por hacerme reflexionar y ver de lo que soy capaz siempre que he dudado de mí mismo.

Por último, a mis padres, por su inestimable apoyo en incontables aspectos, por recordarme quién soy y qué quiero hacer, y por motivarme y hacer todo lo que ha estado en su mano para que llegara hasta donde estoy. Os lo debo todo.

Índice

Resumen	9
Abstract	11
I. Introducción	13
I. 1. La industria papelera	13
I.1.1. Breve historia del papel.....	13
I.1.2. Fabricación del papel.....	15
I.1.3. El papel y cartón en la sociedad actual y el Análisis del Ciclo de Vida (ACV)	19
I.2. Legislación relativa al papel y cartón para su uso en la industria alimentaria.....	21
I.3. Compuestos organoclorados presentes en el papel y cartón	23
I.3.1. Clorofenoles y cloroanisolos	24
I.3.2. Características medioambientales significativas clorofenoles y cloroanisolos	27
I.4. Metodología analítica determinación clorofenoles y cloroanisolos en papel y cartón	30
I.4.1. Procedimientos de extracción y preconcentración	31
II. Objetivos.....	37
III. Experimental.....	39
III.1. Reactivos y equipos.....	39
III.1.1. Reactivos	39
III.1.2. Equipos.....	39
III.2. Matriz y muestras.....	39
III.3. Selección del método de preconcentración.....	41
III.3.1. Microextracción fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) con análisis GC-MS.....	41
III.3.1.1. Elección del solvente más adecuado para la HF-LPME	42
III.3.1.2. Cálculo límites de detección y cuantificación análisis mediante GC-MS.....	44
III.3.1.3. Extracción de los compuestos organoclorados de la matriz del cartón.....	47
III.3.1.4. Aplicación microextracción HF-LPME con análisis GC-MS y resultados	48
III.3.2. Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME/GC-MS).....	52
III.3.2.1. Optimización microextracción fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) .	55
III.3.2.2. Calibrado y cálculo límites de detección y cuantificación clorofenoles y cloroanisol mediante HS-SPME/GC-MS	58
III.3.2.4. Aplicación del procedimiento HS-SPME/GC-MS y resultados.....	61
III.3.2. Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a GC/MS de impacto electrónico negativo (NCI).....	67
IV. Conclusiones.....	71
V. Bibliografía	73

Índice de figuras

Figura 1. Esquema simplificado del proceso industrial de fabricación del papel.....	19
Figura 2. Estructuras químicas del 2-clorofenol.....	25
Figura 3. Estructura química del 2,4,6-tricloroanisol.....	26
Figura 4. Esquema funcionamiento microextracción líquido-líquido por dispersión.....	32
Figura 5. Esquema del funcionamiento HF-LPME.....	33
Figura 6. Cartuchos para la extracción en fase sólida.....	34
Figura 7. Ejemplos de fibras utilizadas para SPME.....	35
Figura 8. Sistema de preconcentración mediante HS-SPME.....	36
Figura 9. Muestras de cartón exterior e interior.....	40
Figura 10. Sistema Aladdin AL-8000 semi-automático para HF-LPME).....	41
Figura 11. Cromatograma obtenido del análisis de la disolución multipatrón en tolueno mediante GC-MS con adquisición en modo SCAN.....	43
Figura 12. Cromatograma obtenido del análisis de la disolución multipatrón en tolueno mediante GC-MS con adquisición en modo SIM.....	44
Figura 13. Cromatograma obtenido del análisis de la disolución multipatrón en MTBE mediante GC-MS con adquisición en modo SIM.....	44
Figura 14. Muestra de cartón sometida a extracción 24 h con solución EtOH/H ₂ O (3:1).48	
Figura 15. Cromatograma del análisis GC-MS de un extracto de cartón interior sometido a microextracción HF-LPME.....	49
Figura 16. Cromatograma del análisis GC-MS de un extracto de cartón exterior sometido a microextracción HF-LPME.....	49
Figura 17. Comparación cromatogramas disolución multipatrón (negro) y blanco dopado (azul) en la misma concentración.....	51
Figura 18. Cromatograma del análisis mediante GC-MS de un extracto de cartón interior sometido a microextracción HS-SPME.....	53
Figura 19. Cromatograma del análisis mediante GC-MS de un extracto de cartón exterior sometido a microextracción HS-SPME.....	53
Figura 20. Cromatograma separado por masas seleccionadas de una disolución multipatrón de TCA, TCP y TeCP.....	55
Figura 21. Comparación resultados obtenidos para el tricloroanisol con un tiempo de incubación de 70 y 80°C.....	56
Figura 22. Comparación resultados obtenidos para el triclorofenol con un tiempo de incubación de 70 y 80°C.....	57
Figura 23. Comparación resultados obtenidos para el tetraclorofenol con un tiempo de incubación de 70 y 80°C.....	57

Figura 24. Cromatograma correspondiente a un punto de la recta de calibrado.....	60
Figura 25. Rectas de calibrado obtenidas para el análisis mediante HS-SPME/GC-MS de TCA, TCP y TeCP.	60
Figura 26. Cromatograma de una muestra de cartón exterior extraída según procedimiento (a).....	63
Figura 27. Cromatograma de una muestra de cartón interior extraída según el procedimiento (b).....	63
Figura 28. Cromatograma de una muestra de cartón exterior extraída según el procedimiento (c).....	63
Figura 29. Cromatograma de una muestra de cartón interior extraída según el procedimiento (d).....	64
Figura 30. Cromatograma extracto dopado cartón interior extraído con 75% EtOH durante 24 h.	66

Índice de tablas

Tabla 1. Grado de toxicidad clorofenoles y cloroanisolos.	29
Tabla 2. Resultados integración disoluciones multipatrón en tolueno y MTBE para el cálculo de los límites de detección y cuantificación.....	45
Tabla 3. Límites de detección y cuantificación de los patrones organoclorados en tolueno y MTBE según análisis mediante GC-MS en modo SCAN y SIM.....	46
Tabla 4. Resultados integración, límites de detección y cuantificación de la disolución multipatrón en MTBE analizada mediante GC-MS con adquisición en modo SIM.....	47
Tabla 5. Resultados recuperación compuestos organoclorados con microextracción HF-LPME, y posterior análisis GC-MS.....	50
Tabla 6. Concentraciones de TCA, TCP y TeCP en las rectas de calibrados preparadas en etanol al 12,5%.	59
Tabla 7. Rectas de calibrado obtenidas para el tricloroanisol, triclorofenol y tetraclorofenol.	60
Tabla 8. Resultados integración, límites de detección y cuantificación de la disolución multipatrón en etanol 12,5% analizada mediante HS-SPME/GC-MS.	61
Tabla 9. Resultados dopados extractos de catón interior y exterior sometidos a análisis mediante HS-SPME/GC-MS.	65
Tabla 10. Recta de calibrado y límites de detección y cuantificación mediante análisis HS-SPME/GC-MS (NCI).	70
Tabla 11. Resultados análisis cartón interior y exterior con HS-SPME/GC-MS (NCI).....	70

Resumen

El uso de la madera acompaña al ser humano desde el comienzo de sus tiempos. Entre uno de sus múltiples usos se encuentra la fabricación de papel. El papel fue un invento revolucionario que permitió la transmisión de información y cuyo auge tuvo lugar con la invención de la imprenta en el siglo XV. Desde entonces, el papel, y por extensión el cartón, han ido cobrando importancia en la vida del hombre hasta nuestros días, en los que se usa para una gran variedad de tareas.

Durante la fabricación de papel y cartón, la madera se enfrenta a una serie de procesos que la alteran hasta llegar a su acabado final. Uno de ellos es el blanqueo, que ocurre especialmente en la fabricación de papel. Durante el proceso de blanqueo se trabaja con derivados del cloro que, al reaccionar con materia orgánica de la madera, pueden dar lugar a compuestos organoclorados peligrosos para la salud y para el medio ambiente como son los clorofenoles y los cloroanisoles.

En este proyecto se ha llevado a cabo la optimización de un procedimiento para detectar y cuantificar dichos compuestos, en concreto, el 2,4,6-tricloroanisol (TCA), 2,4,6-triclorofenol (TCP) y 2,3,4,6-tetraclorofenol (TeCP). En una primera etapa, las muestras de cartón se extraen con solución hidroalcohólica y agitación. Después, sobre el extracto debe llevarse a cabo un proceso de preconcentración antes de analizarse. Se han sometido los extractos a un procedimiento de microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) con posterior análisis mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS). Se ha tratado de optimizar el procedimiento, pero no se ha conseguido la suficiente eficacia y reproducibilidad necesaria para el análisis de los compuestos de interés. Así que se ha optado por la utilización de otra técnica de preconcentración: la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza acoplada a cromatografía de gases con espectrometría de masas (HS-SPME/GC-MS).

Para este segundo procedimiento se han conseguido optimizar las condiciones de trabajo más adecuadas para la determinación del TCA, TCP y TeCP, así como se han calculado los correspondientes límites de detección y cuantificación. Además, se han probado diferentes tratamientos de extracción variando el porcentaje de etanol de la solución hidroalcohólica, uso de baño de ultrasonidos, agitación mecánica y tiempo de extracción. Las muestras de cartón sometidas a estudio no han dado señal alguna de los tres compuestos organoclorados, por lo que se puede decir que las concentraciones de los mismos, en caso de haber, se encuentran por debajo de los límites de detección y cuantificación establecidos para este procedimiento analítico.

Palabras clave: clorofenol, cloroanisol, HF-LPME, HS-SPME.

Abstract

Lumber use accompanies humankind since the beginning of its own existence. Among its multiple uses the manufacturing of paper and cardboard stands out. Paper was a revolutionary invention which allowed the transmission of information and its use started to grow dramatically with the invention of the press in the XV century. Since then, paper and by extension cardboard has been gaining importance in the everyday man until our days, in which it is used in a great variety of manners.

When being transformed into paper or cardboard, lumber undergoes a series of processes which alter it until the product is considered finished. One of them is bleaching, which especially occurs in paper manufacturing. During bleaching, compounds derived and containing chlorine are used. Those compounds may react with the organic molecules in lumber to form organochlorines, which are hazardous for human health and for the environment, like the chlorophenols and chloroanisoles.

In this project, an optimization for a procedure has been developed in order to detect and quantify those compounds. More specifically, 2,4,6-trichlorophenol (TCP), 2,4,6-trichloroanisole (TCA) and 2,3,4,6,-tetrachlorophenol (TeCP). On a first approach, cardboard samples are extracted with a hidroalcoholic solution and stir. After that, a preconcentration process is performed over the samples before the actual analysis. Extracts obtained after the hidroalcoholic extraction undergo Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME), with a posterior analysis by using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). The attempt was to optimize the procedure, but not enough efficiency or reproducibility has been achieved so that the analysis of the compounds could be carried out. With that in mind, another preconcentration technique was chosen: Head Space Solid Phase Microextraction coupled with a Gas Chromatograph with Mass Spectrometer (HS-SPME/GC-MS).

In this second technique, the most adequate working conditions were achieved in order to determinate TCP, TCA and TeCP. Knowing those conditions, detection limit and quantification limit have been calculated. Furthermore, different extraction treatments have been attempted. The parameters differed in ethanol percentage of the hidroalcoholic solution, the use of ultrasounds, mechanic stir and extraction time. Cardboard samples that underwent the studies did not report any signal of any of the three compounds of interest, so it is right to say that their concentration, if there is any, has a value below both detection and quantification limits established for this analytical procedure.

Palabras clave: chlorophenol, chloroanisole, HF-LPME, HS-SPME.

I. Introducción

I. 1. La industria papelera

I.1.1. Breve historia del papel

La industria maderera es un sector cuya demanda por parte del ser humano es incuestionable. La sociedad actual emplea para numerosas tareas diarias la madera, ya sea directamente como en el caso de la construcción o la artesanía, o bien transformada por distintas actividades industriales en hojas de papel, contenedores/envases de productos alimenticios o productos de embalaje y transporte son un ejemplo de las muchas transformaciones posibles. De toda la madera que el ser humano extrae del medioambiente, aproximadamente el 42% se emplea en la producción de papel y cartón, lo que lleva tras de sí una gran industria que “acompaña” al hombre desde el surgimiento de la imprenta y que, probablemente siga siéndolo, pese a los actuales avances en tecnología y la tendencia a disminuir el uso del papel en favor del formato electrónico (Risbrudt, 2005; Kinsella et al., 2007).

La importancia que han tenido los bosques a lo largo de la historia del hombre ha sido innegable. Esto es debido a la gran variedad de recursos que se han podido obtener de ellos, pero si hay uno que haya sido más trascendente que el resto, es sin duda la madera. Uno de los mayores descubrimientos que contribuyó a la evolución del ser humano fue el dominio del fuego, el cual se debió a un uso añadido de la madera, que además se podía emplear para cocinar y calentar. De hecho, hay evidencias que prueban el posible uso, por parte de los homínidos más primitivos, de la madera para cocinar desde hace al menos 1,5 millones de años (Clark & Harris, 1985), y otras que prueban fehacientemente su uso desde hace 400.000 años (Sauer, 1962).

Desde entonces, y a través de las diferentes etapas históricas que ha vivido la humanidad el uso que se le ha dado a la madera ha ido variando, estando siempre presente en formas diferentes, y con muchas y diversas utilidades. La madera se ha empleado como material de construcción de los refugios más primitivos del hombre, como material para la fabricación de herramientas agrícolas, para construir puentes y caminos, barcos y botes, armas de caza, ruedas o incluso ropa. En la sociedad actual, sin embargo, algunos materiales como el plástico, algunas aleaciones de metales o los materiales de construcción actuales han sustituido a la madera para los usos en los que ésta se empleaba, al tener mejores cualidades: mayor resistencia, ligereza, maleabilidad u otras características. Actualmente, una de las aplicaciones más comunes es la

elaboración de papel y cartón con diversos usos posteriores (envases, contenedores, embalajes...) (Kinsella et al., 2007).

Desde que el hombre es hombre, la necesidad de transmitir la información ha estado patente como herramienta para que las generaciones siguientes comenzaran conociendo lo que las anteriores habían descubierto, haciendo que poco a poco, el ser humano prosperara intelectualmente. La escritura, entendida en un principio de una manera diferente para cada civilización, era la representación más completa de esa necesidad, abriendo una importantísima vía de comunicación que no era fugaz como la comunicación oral y permitía preservar la información en el tiempo. Tan importante ha sido la escritura en la historia del hombre que, a partir de ella, se diferencian los dos periodos históricos más marcados del ser humano: la prehistoria y la historia. Siendo la historia aquella que es “narrada” o “grabada” a través de la escritura. Obviamente, la matriz en la que la información era escrita ha influido en lo que se refiere al alcance de dicha información. Por tanto, hasta la invención del papel el ser humano escribía en muchos lugares diferentes, dependiendo del propósito y de la finalidad del escrito, como losas, muros, vasijas, plantas, papiros, pergaminos, iconos e incluso animales (Daniels & Bright, 1996; Haarmann, 2002).

Siendo consciente la humanidad de la poca practicidad de los lienzos donde se escribía, las civilizaciones comenzaron a investigar sobre matrices que pudieran albergar información, donde fuera sencillo escribir y que, tras ser plasmada, pudiera ser almacenada y transportada con facilidad. La civilización china fue pionera en la creación del papel. En la dinastía Han, entre los años 202 a.C. y 220 d.C., se encuentra el primer registro de la producción de papel a partir de fibras vegetales, empleando un método similar al que las abejas y las avispas utilizan para construir sus nidos. A partir de esta primera “elaboración” de papel, la técnica fue mejorando a lo largo de los siglos y transmitida a las civilizaciones adyacentes, llegando a Europa en el siglo XI a través de la península ibérica con el avance de la cultura islámica. Hasta entonces, los papiros y pergaminos empleados en los países mediterráneos, hechos de pieles de distintos animales sometidas a procesos de secado y blanqueado rudimentarios, cumplían las condiciones de sencillez de escritura y transporte aunque su elaboración resultaba tediosa. Debido a eso, los nuevos procesos de elaboración de papel se adoptaron rápidamente, en los siguientes siglos, a lo largo y ancho de Europa donde se comenzó a fabricar mediante el uso de molinos de papel (Daniels & Bright, 1996; Meggs, 1998; Barrett, 2008).

No fue hasta 1440 cuando Johannes Gutenberg, inventó la imprenta mediante la adaptación de procesos tecnológicos ya existentes de la época enfocados hacia la idea

de la impresión. Gutenberg con sus conocimientos sobre los metales (era trabajador de una mina de oro), elaboró un sistema de moldes que permitía crear y comercializar las piezas necesarias para la impresión de letras en papel en grandes cantidades, lo que supuso una difusión rápida de la tecnología y la capacidad de producir textos en papel de manera masiva por toda Europa. Hacia el año 1500 las imprentas de la Europa más occidental habían producido y registrado más de veinte millones de volúmenes, y en el siglo XVI se estima que la cantidad de volúmenes impresos era ya de unos 200 millones (Febvre & Martin, 1976).

Los cambios, que la fácil transmisión de la información produjo de la mano de la imprenta fueron notorios en la sociedad de toda Europa, lo que sumado a la necesidad de conocer que “nacía” en Europa de la mano del renacimiento, provocaría una necesidad del consumo de la información que acabaría repercutiendo en, a su vez, una necesidad de satisfacer esa demanda con materias primas como el papel. Esa necesidad ha ido creciendo consecutivamente siglo tras siglo hasta la sociedad moderna que consiguió, a lo largo del siglo XIX, industrializar la producción de papel a una manera más eficiente mediante el empleo de fibra y pulpa de la madera (Febvre & Martin, 1976; Burger, 2007).

I.1.2. Fabricación del papel

El papel se fabrica a partir de las fibras de celulosa que forman la madera o, por extensión, a partir de las fibras de celulosa presentes en el papel ya fabricado. De entre los distintos tipos de árboles que pueden servir para obtener esa celulosa, los óptimos son las coníferas, en especial los pinos y los abetos, ya que la celulosa en ellos forma estructuras largas y resistentes. Además, a partir del papel ya utilizado se puede fabricar papel nuevo, sobre todo en zonas de alta densidad de población y desarrolladas, donde el consumo de papel es elevado, ya que es ahí donde se nota el impacto positivo que tiene el reciclaje tanto económica como medioambientalmente.

Atendiendo a la generación de papel a partir de madera, la industria papelera emplea generalmente los materiales sobrantes que no pasan la criba de la industria maderera. Dicha madera posee dos partes bien diferenciadas: la externa o corteza, que no interesa a la industria pues solo reduce la calidad del papel, y la interna, que tiene celulosa de gran calidad. Así pues, el primer tratamiento que se aplica sobre la madera es la extracción de la corteza que luego puede tener usos posteriores como biocombustible. Tras la eliminación de la corteza, la madera puede seguir diferentes rutas dependiendo del producto final que se quiera obtener, entrando en la primera fase del proceso productivo: la obtención de la pasta del papel.

Etapa 1. Elaboración de la pasta de papel

Para ello, se pueden seguir tres procedimientos:

(1) Proceso mecánico: se obtiene una pasta rudimentaria con una alta opacidad. Es el proceso más antiguo, inventado a mediados del siglo XIX, y en él se presionan los troncos contra una serie de muelas giratorias para separar las fibras de celulosa. El producto de la molienda pasa a través de unos filtros que sólo permiten pasar las fibras de celulosa. Además, durante todo el proceso se añade agua tanto para facilitar la creación de la pasta como para refrigerar las muelas, que se calientan con la fricción del proceso.

(2) Proceso termomecánico: la madera se corta primero en astillas y, tras someterse a limpieza para eliminar restos de materiales que podrían dañar la maquinaria, se calienta usando vapor de agua para ablandarlas. Tras ello, se introducen a presión en el refinador, que es un sistema que cuenta con dos discos que giran en sentidos opuestos. Estos discos tienen una serie de canales que van desde el centro hasta el borde exterior del disco y se van estrechando conforme se acercan a éste. La utilidad de los canales reside en que las astillas reblandecidas, al introducirlas por el centro de las dos ruedas y gracias a la acción motora de las mismas, se desplazan hacia el borde de las ruedas por ellos, pasando únicamente las fibras de celulosa individualmente separadas. El resto de material y de fibras no desprendidas individualmente se desechan.

(3) Proceso químico: se emplea sulfato de sodio para obtener la denominada “pasta Kraft”. En este procedimiento también se astilla la madera y se hierve, pero en un digestor donde se añaden sustancias químicas para digerir la lignina, la proteína que une las distintas fibras de celulosa, y se calienta a unos 200°C. Después de la digestión, se realiza una criba donde todas las fibras que no se han separado vuelven, junto a las sustancias químicas restantes utilizadas al proceso productivo, donde se reaprovechan.

Tras cualquiera de los tres procesos anteriores, el papel, si se pretende obtener de alta calidad, se somete una segunda fase del proceso productivo: el blanqueo, ya que si no presenta un color pardo. Se trata de un proceso imprescindible si se quiere obtener papel donde se van a imprimir colores que se quieran ver con calidad.

Etapa 2. Blanqueo de la pasta de papel

En el blanqueo, durante muchos años se ha empleado principalmente cloro gas y dióxido de cloro, ya que son muy eficaces en el blanqueamiento de la pasta de papel. Sin embargo, las consecuencias medioambientales de su empleo, especialmente graves sobre los ecosistemas acuáticos, han hecho que poco a poco se vayan dejando de

utilizar en favor de otros compuestos blanqueantes como es el caso del ozono, el oxígeno o el peróxido de hidrógeno, que no tienen ese impacto tan grande sobre el medioambiente. Si bien se ha reducido el uso de sustancias con cloro, por poca cantidad que se utilice, va a ser complicado eliminar sus restos y sobre todo sus productos de reacción con otras sustancias presentes en la madera, en la planta de tratamiento de aguas de la fábrica de papel. Por lo que, el impacto medioambiental debido a la formación de sustancias organocloradas, como dioxinas o clorofenoles, siempre puede tener lugar y va a ser necesario controlar, en la medida de lo posible. Por ello, hoy en día se han desarrollado tecnologías que permiten la elaboración de algunos tipos de papel que se denominan “libres de cloro totalmente” TCF (*total chlorine free*), ya que se blanquean sin el empleo de las sustancias cloradas mencionadas anteriormente.

Etapa 3. Caja de admisión y secado

En la tercera fase del proceso de producción, tras darle al papel la blancura deseada, se puede agregar a la pasta algún tipo de colorante para obtener el tono exacto deseado, además de otras sustancias que se quieran añadir con algún propósito específico. Tras ello, se adiciona una gran cantidad de agua antes de pasar a la denominada “caja de admisión”, donde el material de entrada es 99% agua y 1% pasta blanqueada. Esta enorme cantidad de agua es requerida para que las fibras de celulosa no se aglutinen entre ellas, evitando que el papel se genere defectuoso. Además, para evitar la floculación, la caja de admisión tiene unos sistemas que revuelven el material en su interior, y controla la cantidad de pasta que pasa a la siguiente parte del proceso productivo.

El contenido que sale de la caja de admisión se coloca, según sale, en una doble cinta transportadora hecha de tela. La tela es una malla porosa que permite dejar salir el agua que contiene la pasta. De esta manera, la pasta va saliendo y va formando un tapiz entretejido de fibras de celulosa, mientras el agua que contenía va filtrándose por los poros de la tela que hace la función de cinta transportadora. La razón por la que se emplea una doble tela, una por debajo de la pasta y otra por encima, es porque si sólo se empleara la gravedad como herramienta de secado, es decir, sólo una tela, la cara de la pasta del papel que estuviera en contacto con la tela diferiría mucho de la que no, creando un papel con dos caras diferentes. Colocando una segunda tela por encima se evita este problema. Dado que como por la cara superior no sale el agua como lo hace por la inferior, se añaden mecanismos de secado como cajas de aspiración, de tal manera que, al final de esta fase, la pasta de papel pasa de tener un 99% de grado de humedad a un 80%, aproximadamente. Después de ello, la pasta obtenida pasa a la cuarta fase: el prensado.

Etapa 4. Prensado

La lámina de pasta atraviesa una serie de rodillos de acero que ejercen una gran presión sobre ella expulsando el agua que alberga. El acero no toca el papel directamente, sino que hay una serie de capas de fieltro a cada lado que absorben el agua que se expulsa y que se sitúan entre el papel y los rodillos. Estas capas de fieltro están adheridas a unas cajas de vacío que las va secando para que puedan seguir ejerciendo su función a lo largo del proceso. Tras acabar esta fase, el contenido en agua del papel es ya alrededor del 50% o 60%.

Etapa 5. Secado

La quinta fase del proceso de producción es el secado. En esta sección se fija el grado final de humedad que se desea en el papel. Para ello, se hace pasar la lámina de papel sobre una serie de rodillos calentados mediante vapor, que provocan la evaporación de la humedad presente en la pasta del papel según va pasando. Tras terminar, se enrolla formando una bobina que se llama tambor, con un grado de humedad de tan sólo un 5%-10%.

Por último, hay una sexta fase opcional del proceso de producción para mejorar la calidad del papel que es la de estucado y satinado, en la que se mejoran blancura, homogeneidad, calidad, durabilidad e imprimabilidad del producto final.

Etapa 6. Estucado y satinado

El estucado consiste en la adición al papel de una capa de caolín (silicato de aluminio hidratado) y de carbonato de calcio (CaCO_3) mediante el uso de un aglutinante, para asegurar de que ambas sustancias se adhieran correctamente al papel. En este proceso se decide si el papel final es brillante o mate.

En el satinado, mediante la utilización de rodillos y sistemas que aportan calor al papel, se favorece que los componentes agregados en el proceso de estucado se distribuyan correctamente por el papel, eliminando las impurezas y anomalías que pueda presentar.

Tras esta última fase el papel se considera producido. Se embobina, embala y etiqueta, por lo que está listo para su distribución o uso posterior (SCA Publication Papers, 2010). En la Figura 1 se muestra el esquema completo de las diferentes etapas de las que consta el proceso productivo del papel.

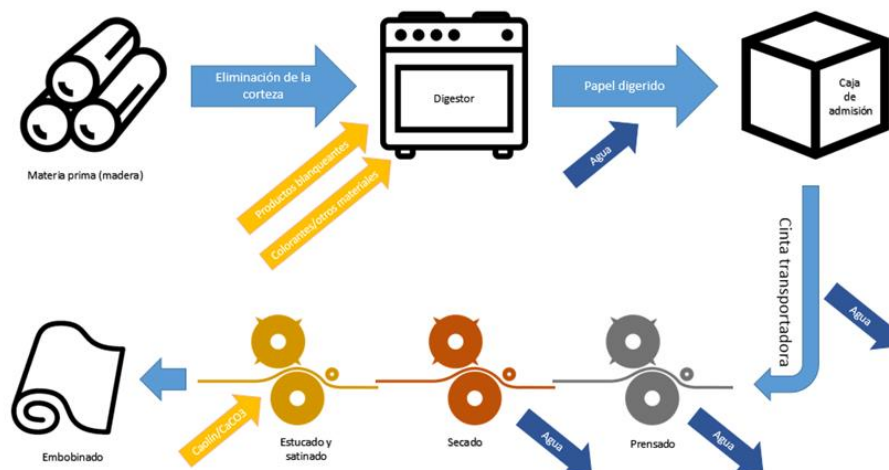


Figura 1. Esquema simplificado del proceso industrial de fabricación del papel (elaboración propia).

I.1.3. El papel y cartón en la sociedad actual y el Análisis del Ciclo de Vida (ACV)

Hoy en día, la sociedad emplea el papel y cartón para multitud de tareas diarias. En Europa en el año 2000, entre el 30% y el 40% de los residuos sólidos urbanos eran papel y cartón (Brown et al., 2000), representando una parte muy importante de los residuos generados, en el día a día, de la parte de la sociedad más desarrollada. Por otro lado, tratando el consumo de papel, una medida más indicativa de la dependencia de la sociedad en este material, en España en el año 2000 se sitúa en los 170 kg/habitante año (ASPAPPEL, 2003).

Entre sus muchos usos, el papel y cartón están en nuestras vidas en forma de material de escritura e impresión (libros, folios, posters, pegatinas, carátulas de películas, etc.), material de embalaje (bolsas y envoltorios), material de transporte (cajas, divisores, etc.), material de ocio (cartas, juegos de mesa, libros), material higiénico (papel higiénico, de cocina, cubrecamas en hospitales) o material dedicado a la alimentación (papel de cocina, papel de horno, envoltorios primarios de alimentos).

Es por tanto, clara la dependencia de los hábitos diarios de la sociedad actual con los productos que la industria papelera genera, utilizando una gran cantidad de materia prima (madera) para crear una muy importante cantidad de productos. No sólo eso, sino que sobre esa materia prima también se ha de tener en cuenta los procesos físicoquímicos que esta industria aplica para transformarla en papel y cartón. Estos procesos industriales mueven una enorme cantidad de recursos, lo que da lugar a grandes cantidades de subproductos, emisiones, vertidos y residuos. Desde el punto de

vista medioambiental, la industria del papel y el cartón resulta interesante desde diversos aspectos como son la extracción y aprovechamiento de recursos, optimización de recursos, evaluación del impacto ambiental del proceso productivo, comportamiento ambiental de las distintas industrias, caracterización y gestión de vertidos, emisiones o residuos (Greenpeace, 2004; Halweil & Mastny, 2004).

No obstante, un enfoque medioambiental de la industria no debe quedarse únicamente en lo que sucede en la misma. El producto generado tiene la misma importancia, pudiendo causar incluso mayor impacto sobre el medioambiente que la propia actividad industrial que lo genera. Por ejemplo, si bien la industria que genera pilas y baterías portátiles puede ser más o menos respetuosa con el medioambiente, las pilas tienen una capacidad para dañarlo conocida y muy importante. En el caso del papel y cartón es importante tener en cuenta el Análisis del Ciclo de Vida (ACV).

El ACV, también llamado balance ambiental, es un proceso que evalúa todos los posibles impactos ambientales que puede generar un producto, desde la extracción de las materias primas que lo conforman y actividad industrial que lo genera, pasando por su distribución y su uso, hasta su eliminación o transformación en residuo, y por último la gestión del mismo. De esta manera, la evaluación del impacto de un producto se lleva a cabo mediante el estudio multidisciplinar de todas las variables que influyen en todos los procesos que sufre. Para ello, se cuantifican los recursos necesarios para crear ese producto, así como las emisiones, vertidos y residuos que se generan para fabricarlo. Teniendo en cuenta esas variables, que se denominan inventario de ciclo de vida, se realiza después una evaluación del ciclo de vida, donde se tienen en cuenta otros factores. Por último, para comprobar la veracidad de ambas fases, se realiza una interpretación del ciclo de vida, que es un proceso sistemático que incluye la fiabilidad del análisis completo, así como características remarcables del mismo (Hauschild, 2000).

Una de las actividades que más reduce el impacto ambiental es el reciclaje. Tras su primer uso, en el momento en el que el papel y cartón es considerado residuo, el reciclaje de ambos supone una actividad positiva y a promover, que reduce significativamente el impacto que genera el ser humano en el desarrollo de sus actividades cotidianas con el uso de estos materiales. El uso de papel y cartón reciclados como “nueva” materia prima reduce en un 74% la emisión de gases contaminantes y reduce la contaminación de las aguas en un 35%, respecto a la elaboración de la misma cantidad de papel y cartón a partir de fibra virgen (Greenpeace, 2004).

No obstante, es importante considerar en el proceso de reciclaje tanto el uso anterior como el posterior que ha tenido y va a tener el producto de papel y cartón; ya que

en su composición original pueden haberse añadido sustancias con un propósito definido que imposibiliten o limiten otros usos posteriores y modifiquen importantemente su ACV (Hauschild, 2000). Esto es especialmente importante, al ser el reciclaje un proceso que presenta una tendencia a crecer y que, ya en 2002, alcanzaba los 84 kg/habitante año en España y suponía la materia prima del 38% del nuevo papel y cartón elaborado, equivalente a más de 3,3 millones de toneladas de papel y cartón usado (Hauschild, 2000; Greenpeace, 2004).

I.2. Legislación relativa al papel y cartón para su uso en la industria alimentaria

Uno de los sectores más vulnerables a la presencia de sustancias anómalas en el papel y cartón es el sector alimentario. Dado que, si determinadas sustancias nocivas pasan desde el envase al alimento que contiene, puede existir un riesgo importante para el consumidor.

La carencia de materias primas obliga, en el marco de un desarrollo sostenible, al reciclado de las mismas. Un ejemplo claro es el papel y cartón recuperado como fuente de fibra de celulosa para la nueva fabricación de papel y cartón. Las fibras recicladas de celulosa obtenidas de papel recuperado, no pueden ser utilizadas libremente para la fabricación de papel y cartón destinado a estar en contacto con alimentos. Ciertas fuentes de papel y cartón recuperado pueden contener contaminantes que suponen un riesgo para el consumidor si se ponen en contacto con alimentos, no así con otros usos. El empleo de las fibras recicladas de celulosa está en continuo incremento por claros motivos medioambientales de todos conocidos, y además debe fomentarse esta tendencia. Los productos de papel y cartón obtenido de fibras recicladas de celulosa y que están destinados al contacto con alimentos, deben ostentar una pureza determinada en el producto final para que no supongan un riesgo para el consumidor.

Frente a este problema, la legislación europea elaboró un marco de legislación a nivel supranacional con la Directiva 89/109/CEE del consejo de 21 de diciembre de 1988, relativa a materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Este documento, no vinculante, establecía un marco de acción a partir del cual los estados miembros podrían elaborar una legislación propia a nivel estatal para atajar esta situación. Sin embargo, los estudios necesarios para determinar niveles límite concisos de concentración para cada compuesto no estaban elaborados para la fecha, puesto que aún se estaba elaborando, con mayor prioridad, la legislación con respecto al uso de materiales plásticos en contacto con alimentos (AESAN, 2007).

Ya en el año 2002, el consejo, nuevamente, elabora una resolución (Resolución AP-2002-1, 2002) sobre artículos y materiales de papel y cartón destinados a estar en contacto con alimentos. Esta resolución ya establece métodos concretos de análisis del papel y cartón que vaya a estar en contacto con alimentos, dando pautas claras y concretas, procedimientos a realizar cuando el papel y el cartón van a ser creados a partir de otros ya empleados (reciclado) en diferentes partes del proceso de generación de papel, así como una lista de *mejores técnicas disponibles* (MTDs) para garantizar el mínimo paso de contaminantes hacia el papel que se va a generar, en diferentes etapas del proceso industrial. Estos tres grupos de procedimientos se engloban en tres documentos técnicos: el documento técnico 2 para métodos de análisis, el documento técnico 3 para pautas a tener en cuenta durante el reciclado, y el documento técnico 4 para las mejores técnicas disponibles. No obstante, el reglamento trata también acerca de un importante documento técnico 1, no desarrollado todavía (aparece como “*under preparation*”), donde se expondrán, en un futuro, los distintos tipos de contaminantes, así como los valores límite que el papel puede contener de cada uno. Para paliar esta ausencia, la resolución incluye dos pequeñas tablas que especifican los valores límite para algunos metales y para el pentaclorofenol (0,15 mg/kg).

En el año 2004, el 27 de octubre se publica el Reglamento CE 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. En este reglamento se actualiza el marco para la actuación a nivel estatal en materia de seguridad alimentaria, refiriéndose a los atributos de los materiales que vayan a estar en contacto con los alimentos. De nuevo, se menciona que cada material ha de regularse bajo medidas concretas que aún no han sido publicadas para el caso del papel y cartón. Además, como las Resoluciones del Consejo no son vinculantes, hay un gran vacío legislativo acerca de la regulación del contenido en contaminantes de estas sustancias, salvo en algunos países como Alemania o Países Bajos (AESAN, 2007).

En España, la reutilización o reciclado de materiales plásticos, para el posterior uso en contacto con alimentos se prohibió por el Real Decreto 2814/1983, de 13 de octubre, en un texto corto y conciso que dice así: “Artículo único.- *Se prohíbe la utilización de materiales poliméricos procedentes de objetos acabados, fragmentos de objetos, semielaborados, análogos, usados o no como materias primas, solos o en mezcla con material virgen, en la fabricación o transformación de envases y objetos que hayan de estar en contacto con productos alimenticios o alimentarios.*” No obstante, quedó derogado en 2011 con la expedición del Real Decreto 846/2011, de 17 de junio, por el que se establecen las condiciones que deben cumplir las materias primas a base de

materiales poliméricos reciclados para su utilización en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos. No obstante, y de nuevo, este documento no trata de manera explícita al papel y cartón, tratando únicamente los materiales plásticos, por lo que sigue situándose un vacío en la legislación a nivel estatal.

I.3. Compuestos organoclorados presentes en el papel y cartón

Una familia de sustancias químicas de gran importancia, debido a su elevada toxicidad, son los compuestos organohalogenados. Dichos compuestos forman parte de una familia de sustancias químicas orgánicas en las que al menos un átomo de carbono está ligado mediante enlace covalente a un halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), siendo los más comunes los que contienen cloro, que se denominan compuestos organoclorados (Elías, 2012).

La familia de compuestos organoclorados es grande, siendo los más comunes los alcanos, alquenos y compuestos aromáticos con sustituciones de átomos de cloro. Los alcanos clorados son cadenas carbonatadas de enlace simple que contienen algún átomo de cloro, como el triclorometano (CHCl_3) o el tetracloruro de carbono (CCl_4). Los alquenos clorados son, igualmente cadenas carbonatadas, que contienen uno o más átomos de carbono, y que además presentan uno o más enlaces dobles entre los carbonos (insaturaciones), como es el caso del haluro de vinilo, una molécula orgánica sencilla formada por dos carbonos unidos por un doble enlace con una sustitución de un átomo de hidrógeno por un átomo de cloro en un extremo. Este compuesto es muy conocido y producido a gran escala, pues es el monómero del plástico conocido como policloruro de vinilo (PCV), muy empleado por su versatilidad en el mercado actual (Allsopp & Vianello, 2012).

Por último, los compuestos aromáticos clorados son aquellos que están formados por uno o más anillos bencénicos (grupos fenilo) y contienen, a su vez, uno o más átomos de cloro ligados a uno o más carbonos del anillo, como por ejemplo el hexaclorociclohexano, siendo el más conocido, debido a su alta toxicidad, el isómero gamma (γ) llamado lindano (Rossberg et al., 2006a; Sasson, 2009).

Además, muchos compuestos organoclorados son utilizados como biocidas, más concretamente como herbicidas e insecticidas, que si bien ayudan a la producción agrícola también afectan al medioambiente en el que son añadidos, pudiendo pasar a formar parte de la materia prima que se utiliza para, por ejemplo la producción de madera, pudiendo entonces aparecer en productos finales derivados de ésta, como el papel y cartón. Algunos ejemplos incluirían el propio lindano, el dicloro difenil tricloroetano

(DDT), el heptacloro, el endosulfán, el clordano, el aldrín, el dieldrín o el pentaclorofenol (PCP), entre otros (Rossberg et al., 2006b).

Todos estos compuestos, junto con otros muchos organoclorados, forman parte también de las especies catalogadas como contaminantes orgánicos persistentes (COPs), que son compuestos orgánicos con determinada toxicidad y cuya durabilidad en el medioambiente es alta. Además, son sustancias cuya afinidad por las grasas es mayor que por el agua (lipofílicas), es decir, que presentan un coeficiente de reparto octano-agua alto y que además, pueden desplazarse grandes distancias, generalmente por el aire o por el agua, desde donde han sido utilizadas.

No obstante, y sin restar importancia a los organoclorados que están clasificados como COPs, hay otros compuestos de la misma familia que presentan también características importantes desde el punto de vista medioambiental pero que, atendiendo a su composición (principalmente a su polaridad), no se incluyen dentro de los COPs. Por ejemplo, en la industria del papel, se pueden llegar a emplear de 30 a 80 kg de cloro (Cl_2) para fabricar una tonelada de pasta del papel en el proceso de blanqueado del mismo (si bien cada vez es menor su uso), alrededor del 10% del cloro empleado acaba reaccionando con la madera, compuesta de moléculas orgánicas, dando lugar a compuestos organoclorados. Relacionando esta idea con el tamaño de la industria del papel, es importante considerar la generación de estos compuestos y conocer cuánto se genera, así como qué ocurre con ellos una vez que salen del proceso productivo, ya que se estima que las fábricas españolas producen entre 3 y 8 kg de estos compuestos por tonelada de papel fabricada (Elías, 2012).

I.3.1. Clorofenoles y cloroanisoles

En este Trabajo de Fin de Grado se van a analizar una serie de compuestos que pueden estar presentes en el papel y cartón como consecuencia del tratamiento de la materia prima, la madera, en los distintos estadios de su proceso industrial hasta la obtención del producto final tal y como se conoce. Se trata del grupo de compuestos organoclorados denominados clorofenoles y cloroanisoles.

I.3.1.1. Clorofenoles

Los clorofenoles son un grupo de sustancias químicas que se forman al agregar cloros (entre uno y cinco) al fenol. El fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) es un compuesto aromático derivado del benceno (C_6H_6) el hidrocarburo aromático más simple, que se forma al agregar un grupo hidróxido a un carbono para reemplazar un hidrógeno. En total, existen

19 clorofenoles diferentes. En la Figura 2 se muestra el clorofenol más sencillo, con la sustitución de un único átomo de hidrógeno por un átomo de cloro.

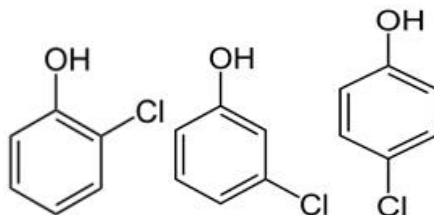


Figura 2. Estructuras químicas del 2-clorofenol.

Los clorofenoles son compuestos organoclorados que se presentan como sólidos cristalinos amarillentos a temperatura ambiente y tienen un fuerte olor y sabor a medicina. Su procedencia es mayoritariamente sintética, es decir, que se fabrican de manera artificial por parte del ser humano, mediante el proceso químico conocido como halogenación aromática electrofílica. El proceso consiste en utilizar cloro en su forma gaseosa (Cl_2) junto con cloruro de hierro (FeCl_3) la sal férrica del cloro, que actúa como catalizador en presencia de anillos de benceno, si bien para desarrollar esta reacción sobre un fenol, el catalizador puede ser prescindible. De esta manera, el benceno o el fenol admiten uno o más átomos de cloro en sus estructuras aromáticas. El propósito principal de la obtención voluntaria de estos compuestos por el ser humano son sus propiedades pesticidas, herbicidas, desinfectantes y fungicidas.

En la industria papelera los clorofenoles pueden aparecer en el papel y cartón debido a dos procedimientos que se aplican sobre la madera hasta la obtención del producto final, y que consisten en:

- El primer procedimiento consiste en la aplicación directa y voluntaria de un clorofenol, generalmente el 2,4,6-triclorofenol (TCP), con el objeto de conservar la madera y protegerla frente al ataque de hongos y otros seres vivos que puedan afectar negativamente a la calidad de la pulpa, lo que ocasionaría problemas para la obtención del papel y cartón de la calidad deseada.
- En el segundo procedimiento tiene lugar la generación involuntaria de clorofenoles durante el proceso de blanqueo debido al uso de cloro y derivados sobre la pulpa, que al contactar con moléculas orgánicas puede dar lugar a la generación de estos compuestos.

El producto tradicional que se usó durante muchos años para blanquear la celulosa fue el cloro elemental (Cl_2) junto con otros químicos con contenido de cloro como el hipoclorito, pero debido a que su uso generaba subproductos peligrosos para las personas y contaminantes del medioambiente, como las dioxinas y furanos.

Hace unos 25 años, el uso del cloro y sus derivados, se reemplazó por las denominadas tecnologías “libres de cloro elemental” (*elemental chlorine free*, ECF) o “totalmente libres de cloro” (*totally chlorine free*, TCF).

En las tecnologías ECF se emplea clorato de sodio (NaClO_3) para formar dióxido de cloro (ClO_2), que es una sustancia muy oxidante y que es la responsable de blanquear la pulpa de celulosa, junto con álcali para la extracción de lignina, además de peróxido y oxígeno para reforzamiento en las etapas de extracción. El contacto entre el dióxido de cloro y los compuestos orgánicos presentes en la pulpa de la madera, puede desencadenar la producción de compuestos organoclorados (por ejemplo, clorofenoles). El uso clorato de sodio alcanza los cientos de millones de toneladas al año y aproximadamente el 95% del clorato fabricado se emplea en la industria del papel

En el caso de las tecnologías TCF se emplea peróxido de hidrógeno (H_2O_2) además de oxígeno, ozono, ácido peroxiacético y álcali para la extracción de la lignina.

Ambas tecnologías reducen significativamente la cantidad de compuestos organoclorados liberados en el medioambiente y son más eficientes porque se logra una mayor blancura a un menor costo de producción (Lignum, 2014).

I.3.1.2. Cloroanisoles

Los cloroanisoles son un grupo de sustancias orgánicas que principalmente son resultado de la degradación de los clorofenoles. En la Figura 3 se muestra uno de los isómeros del tricloroanisol, el 2,4,6-tricloroanisol.

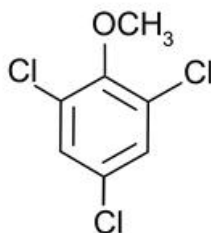


Figura 3. Estructura química del 2,4,6-tricloroanisol.

Dentro del grupo de los cloroanisoles, en el papel y cartón toma únicamente importancia el 2,4,6-tricloroanisol (TCA). El tricloroanisol es un compuesto derivado de la metabolización del triclorofenol mediante metilación por parte de organismos fúngicos, por lo que puede estar presente en distintas muestras de papel y cartón como consecuencia de estos procesos. Principalmente, se produce a consecuencia de la presencia de hongos (como los de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, entre otros) que se encuentran suspendidos en el aire y, al depositarse sobre el papel y cartón que pueda

contener niveles traza de clorofenoles, los transforman en derivados como los anisoles (Maggie et al., 2008).

I.3.2. Características medioambientales significativas de los clorofenoles y cloroanisoles

El interés ambiental que este tipo de compuestos orgánicos genera es principalmente de tipo toxicológico. El uso del 2,4,6-triclorofenol, el clorofenol más utilizado como pesticida, conservante de la madera, antiséptico y sustancia intermediaria de otras reacciones decae desde los años ochenta, por lo que la exposición está siendo cada vez menor. La decisión de disminuir su utilización se debe a su caracterización toxicológica, que lo clasifica con toxicidad aguda moderada, causante de efectos negativos sobre el sistema respiratorio, desajustes en el metabolismo y promotor de la aparición de determinados cánceres como el de linfoma, leucemia o carcinomas hepatocelulares, por lo que recibe la clasificación B2 (probablemente carcinógeno en humanos) por la *Environmental Protection Agency* (EPA). Por otro lado, el 2,4,5-triclorofenol sigue en uso como pesticida y por tanto la exposición es mayor que para el isómero anterior. Este isómero no presenta las propiedades carcinogénicas de su familiar, pero puede causar quemaduras por contacto directo con la piel e irritación del sistema respiratorio y ocular. Además, hay estudios que indican que la exposición crónica a este compuesto puede causar cambios degenerativos en riñones e hígado. Otros isómeros del triclorofenol causan problemas similares, respiratorios, cutáneos, oculares y presentan toxicidad moderada en episodios agudos de exposición (EPA, 2000).

Por otro lado, los tetraclorofenoles si bien presentan similitudes con los isómeros del triclorofenol, son más tóxicos que los anteriores. En concreto, los isómeros 2,3,4,5 y 2,3,4,6-tetraclorofenol son especialmente peligrosos para la vida acuática, pero además son menos polares que los triclorofenoles y, por tanto, tienden a bioacumularse a lo largo de la cadena trófica con facilidad, lo que aumenta los efectos toxicológicos sobre los seres vivos predadores (Tong et al., 2017).

Además, el pentaclorofenol (PCP), el fenol con cinco átomos de cloro, es el compuesto que mayores efectos toxicológicos tiene de toda la familia de los clorofenoles. En general, se emplea de manera restringida como biocida y conservador de madera, y si bien la exposición al mismo no es de las más elevadas, presentándose principalmente en las personas directamente expuestas a él en sus actividades laborales, es un compuesto que es capaz de entrar en el cuerpo humano a través de la barrera epitelial, por lo que la vulnerabilidad del ser humano frente a él es alta. Se trata de un compuesto muy nocivo, extremadamente tóxico por ingestión e inhalación, causando daños cardiovasculares,

hepáticos, oculares y del sistema nervioso. Tiene efectos conocidos sobre la reproducción de los seres vivos y se encuentra dentro del grupo B2. Además, al ser el compuesto con mayor número de átomos de cloro de la familia, se sitúa en la posición más perjudicial para los ecosistemas acuáticos debido a su baja polaridad y, por tanto, a su capacidad de acumularse en las redes tróficas, lo que sumado a sus características toxicológicas resulta peligroso tanto para los ecosistemas como para el ser humano y su relación con los bienes que obtiene de los mismos (EPA, 2000).

Por último, en el caso de los cloroanisoles, el grupo de los tricloroanisoles, el 2,4,6-tricloroanisol isómero más común, presenta en general propiedades toxicológicas menos nocivas que los clorofenoles. Aunque es el compuesto que mayor impacto genera, por ser el isómero más frecuente, las concentraciones de este compuesto a las que tanto el ser humano como los ecosistemas se encuentran expuestos son mínimas, lo que reduce su riesgo considerablemente. Se trata de un compuesto con toxicidad aguda moderada, que puede causar irritación ocular y que, a largo plazo, puede llegar a causar efectos nocivos sobre los ecosistemas acuáticos. El tricloroanisol, sin embargo, toma especial importancia en enología, dado que su mínima presencia, incluso en concentración de partes por trillón (pg/g) es capaz de modificar el sabor y el olor del vino, ya que es un fuerte supresor de la transducción de señal nerviosa para el sentido del olfato. La transducción de la señal nerviosa, en el sentido del olfato, es el mecanismo por el cual el cuerpo humano transforma la información que transmite una partícula exterior que llega a tener contacto con el sistema olfativo a una señal nerviosa capaz de ser interpretada por el cerebro. Esta sustancia aparece en el vino a consecuencia de la presencia de clorofenoles en el corcho de las botellas o en los barriles de maceración, que pueden contener maderas tratadas con clorofenoles para evitar sobre ellas el ataque de los seres vivos (Maggie et al., 2008).

A modo de resumen, en la Tabla 1 se muestra el grado de toxicidad de este tipo de compuestos en sus diferentes formas de causar daños sobre el ser humano y el medio ambiente. Las categorías, recogidas por PubChem y descritas en el código de regulaciones federales de la *Government Publishing Office* de los Estados Unidos (Government Publishing Office, 2016), se ordenan por números, siendo 4 el valor más bajo para un riesgo y 1 el mayor.

Tabla 1. Grado de toxicidad clorofenoles y cloroanisoles.

Compuestos	triclorofenoles					tetraclorofenoles			pentaclorofenol
	2,4,6	2,4,5	2,3,4	2,3,5	3,4,5	2,3,4,5	2,3,5,6	2,3,4,6	
Toxicidad aguda, vía oral	4		4	4	4	3	3	3	1 ó 2
Toxicidad aguda, vía cutánea					4			3	1 ó 2
Toxicidad aguda, vía respiratoria					4				1 ó 2
Irritación cutánea	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Irritación ocular	2A	2A	1	2A	1	1	1	2A	2A
Irritación de las vías respiratorias		3	3	3	3	3	3		3
Efectos narcóticos		3							
Tóxico para la reproducción		2							
Carcinogenicidad	2								2
Toxicidad al medio acuático, exp. Aguda	1	1		1	1	1		1	1
Toxicidad al medio acuático a largo plazo	1	1		1	1	1	1	1	1

En Azul: categorías de riesgo clasificadas como advertencia.

En Rojo: categorías de riesgo clasificadas como peligro inmediato (elaboración propia) Fuente: PubChem.

De lo comentado anteriormente destaca la importancia que tiene el control de la presencia y la cantidad de estas sustancias en los distintos materiales que se pueden utilizar en el desarrollo de la vida cotidiana, como es el caso del papel y cartón. Principalmente, porque pueden entrar en contacto con la población de muchas maneras: el mundo utiliza papel a diario para múltiples tareas y, por tanto, la exposición puede resultar en ocasiones significativa. Además, los clorofenoles causan irritación cutánea, precisamente la vía principal por la que estamos en contacto con el papel y cartón, y algunos son incluso tóxicos. También lo son por vía oral, por lo que es importante vigilar la presencia de estos compuestos en materiales que vayan a estar en contacto con alimentos. Además, es importante remarcar los efectos que tienen en el medioambiente, por lo que también deben ser vigilados ya que, aparte de modificar y afectar negativamente a los ecosistemas, que de por sí repercute en el ser humano, también pueden acumularse en los organismos vivos que el ser humano utiliza para nutrirse y afectar directamente a las poblaciones humanas.

I.4. Metodología analítica para la determinación de clorofenoles y cloroanisoles en papel y cartón

Para controlar y determinar la presencia y cantidad compuestos organoclorados en papel y cartón, caso que nos ocupa en la realización de este trabajo fin de grado, es necesaria la utilización de la Química Analítica.

Hoy en día, la Química Analítica está presente en la práctica totalidad de las actividades llevadas a cabo por el ser humano, ayudando a la resolución de un gran número de problemas considerados de impacto social. Es decir, el grado de interdisciplinariedad es muy elevado. De hecho, los retos de la Química Analítica más innovadora pertenecen a disciplinas tales como la ciencia de los materiales, ciencias medioambientales, biología o producción animal (Murray, 1999). La Química Analítica es la *“ciencia que estudia el conjunto de principios, leyes y técnicas, cuya finalidad es el conocimiento de la composición química de una muestra”*, mientras que el Análisis Químico es el *“conjunto de técnicas operativas que la Química Analítica utiliza en sus realizaciones prácticas”*. Todo ello permite llevar a cabo el análisis tanto cualitativo (conocer que sustancias de interés están presentes) como cuantitativo (conocer en qué cantidad están presentes) de las muestras de papel y cartón.

Desde un punto de vista medioambiental, la Química Analítica es de gran importancia porque permite determinar, en diferentes matrices (sólidas, líquidas o gaseosas), niveles muy bajos de sustancias que pueden resultar nocivas tanto para el

entorno como para los seres vivos, bien a corto o a largo plazo. Permitiendo detectar, identificar y cuantificar compuestos con una sensibilidad elevada (Skoog et al., 1996).

La presencia en el papel y cartón de clorofenoles y cloroanisoles se encuentra en lo que se denomina cantidades “traza o ultra traza”, es decir, a niveles de partes por millón ($\mu\text{g/g}$), billón (ng/g) o trillón (pg/g) en masa. Además se ha visto, como en el ejemplo del vino, que estos compuestos pueden producir efectos negativos (organolépticamente además de efectos sobre la salud) si pasan desde el papel y cartón al producto que éstos contienen o con el que están en contacto, por lo que su presencia y concentración han de ser controladas. Actualmente, la legislación sólo contempla el control de la presencia de pentaclorofenol con un valor límite de 0,15 mg de compuesto por kilogramo de papel (mg/kg).

I.4.1. Procedimientos de extracción y preconcentración

Si se quiere determinar la concentración de clorofenoles y cloroanisoles en muestras de papel y cartón, lo primero en lo que se debe pensar es, atendiendo a las características fisicoquímicas de estos compuestos, qué condiciones son las óptimas para conseguir la mejor extracción de este tipo de compuestos desde la matriz en la que están contenidos, es decir, el papel y/o cartón. Además, es necesario considerar una segunda etapa tras la extracción de igual importancia, que consiste en la selección de una técnica adecuada de preconcentración sobre el extracto obtenido, ya que, tal y como se ha mencionado, la concentración de estos compuestos es tan sumamente baja (partes por billón, principalmente), que es necesario obtener un extracto donde sea posible identificarlos y cuantificarlos con la suficiente sensibilidad de la que se dispone en los equipos instrumentales que se vayan a utilizar (Ezquerro et al., 2003).

Los procesos de preconcentración se aplican en la metodología analítica tras una primera fase de extracción, en la que usa un solvente o una mezcla de solventes, que pasan a denominarse “solución extractante”, con objeto de extraer la máxima cantidad de las sustancias que se quieren caracterizar a partir del material original donde se encuentran. Para favorecer esta etapa de extracción se pueden emplear métodos de agitación física, magnética o ultrasonidos que agilizan dicha extracción.

Preconcentrar consiste en disminuir, de alguna manera, el volumen de extractante una vez concluida la extracción, de tal manera que, la masa de las sustancias que se quieren analizar permanezca inalterada y, al disminuir el volumen de la disolución, la concentración de dichas sustancias aumente en la disolución final. De esta manera, se consigue que los equipos instrumentales habituales sean capaces de detectar dicho compuesto de interés, a niveles traza, sin necesidad de usar técnicas analíticas muy

sensibles o equipos muy específicos creados para detectar determinadas clases de sustancias.

En lo que se refiere a técnicas de extracción que permiten la preconcentración de sustancias, destacan actualmente la microextracción líquido-líquido por dispersión (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME), la microextracción en fase líquida con fibra hueca (*liquid phase microextraction*, HF-LPME), la extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE) y la microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*, SPME) (Pezo et al., 2007). Dentro de ellas, la SPME es la más empleada debido a la facilidad para su automatización y su sensibilidad (Oliveira et al., 2014).

1.4.1.1. Microextracción líquido-líquido por dispersión (DLLME)

La microextracción líquido-líquido por dispersión (DLLME) es un método de preconcentración que consiste en la inyección rápida y brusca de un solvente, diferente del utilizado en la primera etapa de extracción e inmisible con él, en una muestra que contiene un medio extractante con los analitos que se quieren determinar (generalmente de tipo acuoso). Tras agitar el vial, se obtiene una solución turbia formada por pequeñas gotas del solvente de en la matriz que es el medio extractante, pues ambos líquidos son inmiscibles. Al estar el solvente dividido en tal cantidad de gotas, la superficie de contacto entre el medio extractante acuoso y el solvente es muy grande, lo que fomenta la migración de los analitos al solvente. Tras ello, se deja reposar o se centrifuga, para separar ambos líquidos, y el solvente se extrae con una microjeringa, habiendo así reducido el volumen en el que los analitos problema se encuentran (unos mL) hasta una sola gota (Ahmad et al., 2015). En la Figura 4 se muestra un esquema de cómo funciona la microextracción líquido-líquido por dispersión.

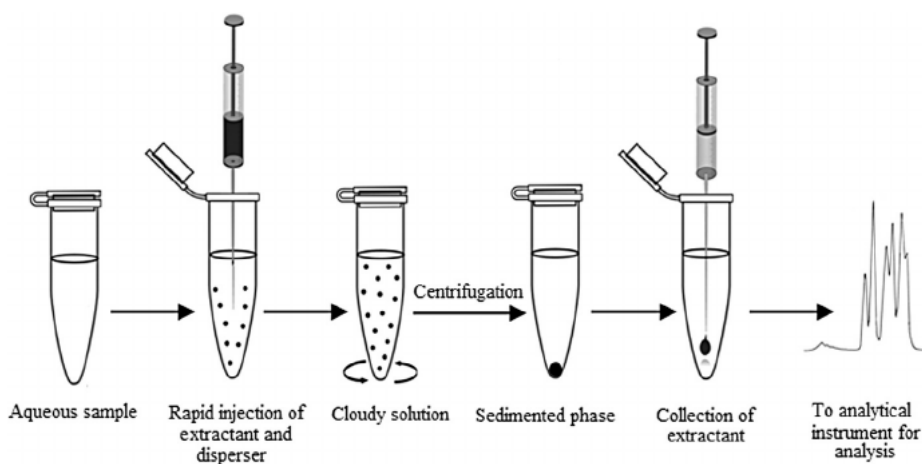


Figura 4. Esquema funcionamiento microextracción líquido-líquido por dispersión (Ahmad et al., 2015).

I.4.1.2. Microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME)

La HF-LPME es una técnica relativamente reciente de microextracción en fase líquida y está basada en el uso de fibras huecas como soporte de fases orgánicas inmiscibles con una fase acuosa que contiene el analito. Se trata de una herramienta muy útil para etapas de preconcentración, con un éxito bien descrito en la investigación biomédica y ambiental (Pezo et al., 2007).

Es un tipo de técnica de preconcentración en la que la extracción y concentración de las sustancias de interés ocurre desde una fase acuosa (extracto), también denominado donante, hacia una fase orgánica inmiscible con el agua que recibe el nombre de fase aceptora. Esta migración de una fase a la otra ocurre a través de una fibra hueca cuyas paredes tienen una estructura porosa, formando una membrana semipermeable (Oliveira et al., 2014). Más concretamente, lo que se hace es rellenar un vial con el extracto (fase acuosa) y se introduce la fibra hasta el fondo del vial para luego volver a sacarla formando una especie de U. El extremo de entrada de la fibra se acopla a un vial que contiene el solvente orgánico que se va a utilizar como fase aceptora, mientras que el otro extremo se conecta a una jeringuilla que, con un lento esfuerzo de succión, fuerza a la fase orgánica a recorrer interiormente toda la fibra en contacto con el extracto. Según la fase aceptora pasa por el interior de la fibra, los compuestos de interés dependiendo según su afinidad química por ambas fases, van pasando de la fase acuosa a la orgánica. Es necesaria agitación magnética para fomentar la homogeneidad del analito en la fase acuosa y la migración. En la Figura 5 se muestra el esquema de funcionamiento del sistema HF-LPME.

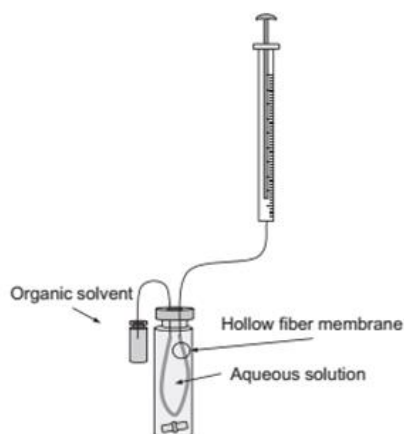


Figura 5. Esquema del funcionamiento HF-LPME (Oliveira et al., 2014).

La concentración tiene lugar porque la cantidad de fase aceptora que se hace pasar a través de la jeringuilla es muy pequeña, del orden de los 100 μL , mientras que el vial que contiene el extracto puede contener hasta 20 mL de fase acuosa, lo que

aumenta la concentración de manera significativa y permite que los analitos puedan ser detectados por los equipos instrumentales adecuados, en la nueva disolución.

I.4.1.3. Extracción y microextracción en fase sólida (SPE y SPME)

En el caso de las extracciones/microextracciones en fase sólida, en ambos casos se utiliza una fase estacionaria sólida con unas determinadas características fisicoquímicas que es capaz de atrapar en su estructura determinados tipos de sustancias, dependiendo del material con el que esté hecha la fase estacionaria.

Más concretamente, en la extracción en fase sólida (SPE) se emplean unos cartuchos que contienen la fase estacionaria adecuada (como los que se muestran en la Figura 6) a través de los cuales se hace pasar la muestra, de tal manera que la fase estacionaria retiene o los compuestos de interés o por el contrario retiene las impurezas que no interesa que estén presentes en la muestra.



Figura 6. Cartuchos para la extracción en fase sólida
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SPE_Cartridges.jpg).

Si se emplea para la primera finalidad, tras haberse retenido los compuestos de interés en la fase estacionaria, ésta se somete a un proceso de desorción con un solvente adecuado, eluyendo los compuestos de interés y permitiendo proceder a su correspondiente análisis estando los analitos de interés aislados y concentrados. Si, por el contrario, se utiliza con el propósito de eliminar sustancias que no interesan y que estén presentes en la disolución, simplemente se hace pasar la muestra a través de la fase estacionaria, de tal manera que el producto que sale a través de la misma habrá perdido la mayor cantidad posible de esas sustancias indeseadas.

La SPE es un método de separación y concentración más sencilla de llevar a cabo que la DLLME, ya que es más fácilmente ejecutable, es más rápida en cuanto a que puede automatizarse y el tiempo que requiere de trabajo en el laboratorio es menor.

Respecto al solvente empleado en la desorción (SPE) o la absorción (DLLME), en ambos se emplea una muy pequeña cantidad (SUPELCO, 1998).

En el caso de la microextracción en fase sólida (SPME), mientras la SPE se realiza con una fase estacionaria relativamente grande (del tamaño de un filtro de papel pequeño) y necesita una nueva alícuota de extractante para desorber los compuestos de interés una vez adsorbidos en la fase estacionaria (unos pocos mL); la SPME se realiza enteramente empleando una pequeña fibra o tubo cubiertos por un material adsorbente (fase estacionaria). En la Figura 7 se muestra la estructura del sistema SPME.

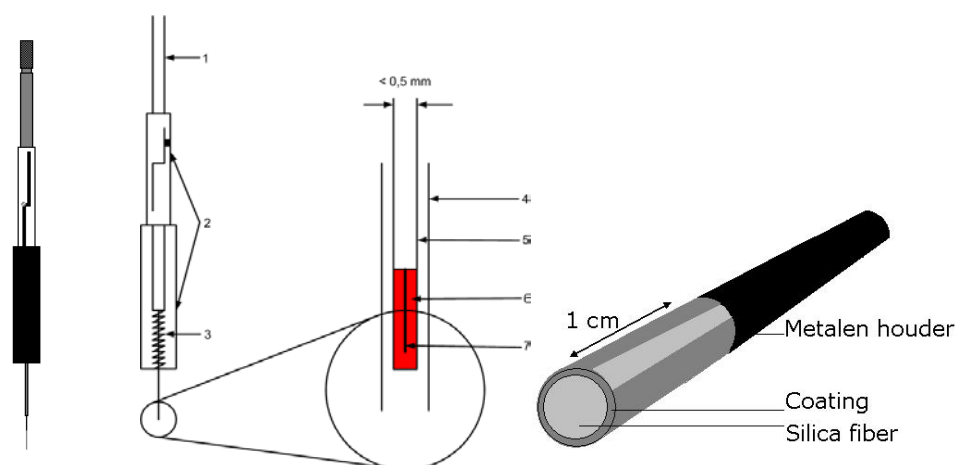


Figura 7. Ejemplos de fibras utilizadas para SPME (<https://commons.wikimedia.org>).

Una vez retenidos los compuestos de interés en la fibra, para la desorción se emplea una fase gas a alta temperatura, en caso de que se vaya a inyectar la muestra en un cromatógrafo de gases (GC), o una fase líquida en caso de que se inyecte en un cromatógrafo de líquidos (HPLC). En la SPME, el proceso de concentración de los analitos de interés se puede llevar a cabo de diferentes maneras, propiamente como SPME o mediante espacio de cabeza acoplado, es decir, como HS-SPME. En ambos casos, la fibra se inyecta en un vial, que contiene la muestra a concentrar, dicho vial puede estar lleno completamente o no, de fase líquida o extracto a concentrar.

a. Microextracción en fase sólida (SPME)

En la SPME, la fibra se sumerge en un vial con la disolución que contiene los compuestos de interés, y dependiendo de su afinidad con la composición de la fibra (fase estacionaria) y, tras alcanzar el equilibrio de concentración entre la fibra y el medio, se adsorben en cierta cantidad a la misma. Hay que favorecer la retención, generalmente dejando un tiempo y temperatura adecuados así como agitando la disolución. Tras ello, la fibra se puede acoplar a un cromatógrafo de gases, donde se puede desorber mediante la aplicación de temperatura y analizar directamente mediante cromatografía de gases (GC-MS).

b. Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME)

En este caso, la fibra se introduce en el vial pero sin tocar la fase líquida, es decir, únicamente en contacto con la fase gaseosa del vial. El vial, con la fibra dentro, se somete a calentamiento y agitación, de tal manera que los compuestos, especialmente aquellos volátiles, pasan de la fase líquida a la gaseosa (espacio de cabeza) y quedan retenidos en la fibra. Después, la fibra se lleva al cromatógrafo de gases, donde se desorbe mediante la aplicación de temperatura y se analiza directamente mediante cromatografía de gases (GC-MS) (Hinshaw, 2003). En la Figura 8 se muestra el esquema de funcionamiento del sistema HS-SPME.

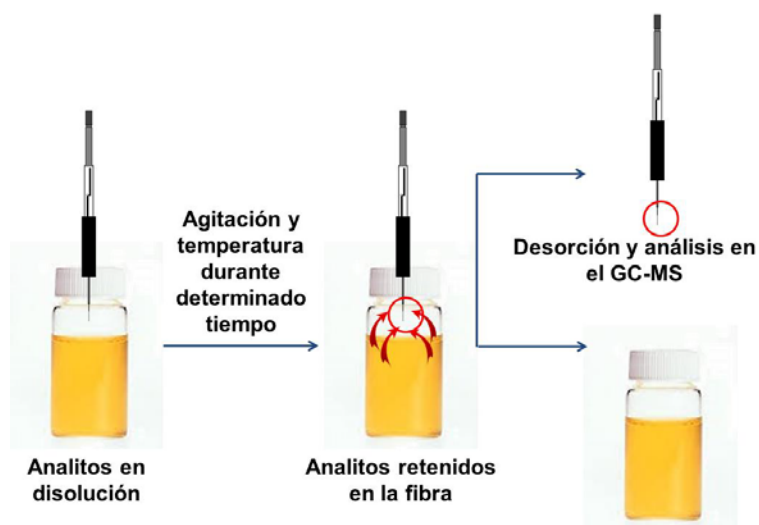


Figura 8. Sistema de preconcentración mediante HS-SPME (elaboración propia).

Es importante controlar que todas las muestras a analizar presenten la misma cantidad de líquido y por tanto de espacio de cabeza, para que tenga lugar de manera correcta y reproducible el proceso de retención de los analitos de interés.

II. Objetivos

De acuerdo con lo descrito anteriormente, es importante poder detectar y cuantificar los clorofenoles y cloroanisoles el cualquier vertido, emisión, residuo o producto que provenga de una actividad industrial que potencialmente pueda generarlos. Por lo tanto, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado consiste en:

- Desarrollar una metodología analítica que sea capaz de detectar y cuantificar concentraciones a niveles traza de clorofenoles y cloroanisoles, de manera que se puedan analizar diferentes muestras de papel y cartón, con objeto de cuantificar su presencia y evitar, en su caso, que no alcancen el medio ambiente.

Los objetivos específicos con los que alcanzar dicho objetivo general son:

- Determinar límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) para el análisis mediante cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS) de los compuestos de interés seleccionados
- Optimización del procedimiento para la extracción de clorofenoles y cloroanisoles de la matriz de papel y cartón en la que están presentes.
- Optimización del procedimiento de concentración de clorofenoles y cloroanisoles presentes en el extracto de muestra a analizar mediante la utilización de técnicas de microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) y microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME).
- Analizar una serie de muestras de papel y cartón, con objeto de determinar la ausencia o presencia de clorofenoles y cloroanisoles y, en su caso, cuantificarlos.

III. Experimental

III.1. Reactivos y equipos

A lo largo del desarrollo de la parte experimental de este Trabajo de Fin de Grado, realizado en el laboratorio del Departamento de Química Analítica ubicado en el edificio Torres Quevedo, de la Escuela de Ingeniería y Arquitectura en el campus Río Ebro, de la Universidad de Zaragoza, se han empleado además del material de cristal básico de laboratorio, entre el que se incluyen matraces aforados, pipetas, pipetas pasteur, vasos de precipitados y probetas, los siguientes reactivos y equipos:

III.1.1. Reactivos

- Etanol (grado GC-MS) Scharlau
- Agua ultra pura purificada por un sistema Milli-Q de Millipore
- Metil tert-butil éter (grado HPLC) Scharlau
- Tolueno (99,5%) Panreac
- 2,4,6-triclorofenol (100%) Riedel de Haën
- 2,4,6-tricloroanisol (99,9%) Riedel de Haën
- 2,3,4,6-tetraclorofenol (90%) Sigma-Aldrich

III.1.2. Equipos

- Cromatógrafo de gases Agilent 7890N con detector de masas Agilent 5977D (GC-MS)
- Cromatógrafo de gases Agilent 6890N con detector de masas Agilent 5975D (GC-MS) con inyector automático de SPME.
- Cromatógrafo de gases NCI SHIMAZU QP2010 Plus con detector de masas (GC-MS)
- Equipo automatizado para HF-LPME Aladdin AL-8000.
- Placas de agitación magnética y agitadores magnéticos.
- Bandeja de agitación mecánica.
- Baño de ultrasonidos Branson 3510.

III.2. Matriz y muestras

El objetivo principal de este Trabajo fin de grado es la determinación, a niveles traza, de la presencia de clorofenoles y cloroanisol en muestras de papel y cartón que puedan contenerlos. Según los datos proporcionados por la empresa que facilitó el cartón para su análisis, los compuestos organoclorados a determinar son el pentaclorofenol, 2,3,4,6 tetraclorofenol, 2,4,6 triclorofenol, pentacloroanisol, 2,3,4,6-tetracloroanisol y 2,4,6 tricloroanisol. De todos ellos, en el laboratorio sólo se disponía de patrones de

2,4,6-triclorofenol (TCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (TeCP) y 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Por lo que para la realización de este trabajo, sólo se seleccionaron estos tres compuestos organoclorados.

Las muestras a analizar son cajas de cartón duro que se utilizan para contener y transportar seis botellas de vino en su interior. Las cajas están impresas en su parte exterior con el logo e imágenes de la empresa en colores gris y negro. En la parte interior de la caja hay un separador de botellas de cartón más fino y que no está impreso. De cara a los análisis a realizar con estas muestras, de aquí en adelante se denominará cartón exterior al utilizado en la caja y que está impreso; y por otro lado se denominará cartón interior al utilizado para separar las botellas y no está impreso. En la Figura 9 se muestran las cajas de cartón a analizar en este trabajo.

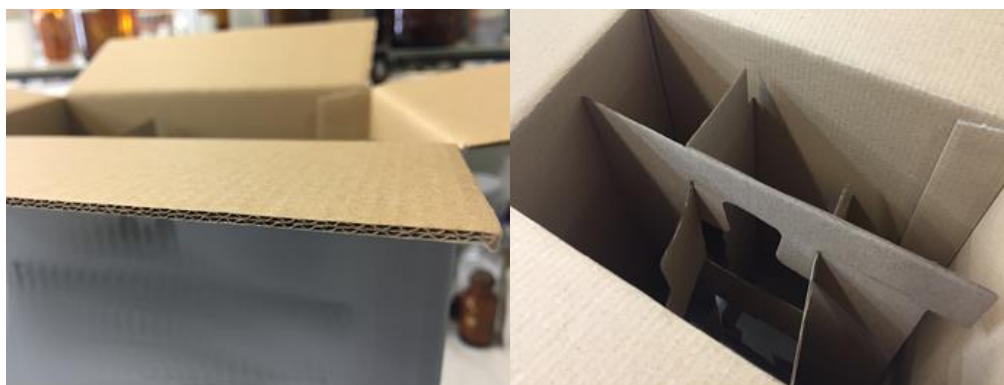


Figura 9. Muestras de cartón exterior e interior.

El cartón exterior es de tipo “single wall”, es decir, está compuesto por dos láminas finas, exterior e interior, entre las cuales hay una tercera lámina ondulada que absorbe los posibles impactos. Es el tipo de cartón más utilizado para embalar y transportar productos frágiles (caso de las botellas de vino). La cara exterior del cartón, se encuentra impresa con los dibujos y logos que la caja llevará cuando es producto finalizado. Las tintas son principalmente gris claro y negro. La cara interior del cartón es de color cartón y no parece estar tratada especialmente, ni blanqueada.

El cartón interior, que separa las botellas entre ellas, es cartoncillo sólido no blanqueado, fino por estar muy compactado pero ligero y algo duro al mismo tiempo. Se trata de una variante del cartón muy empleada en embalaje también, especialmente en el de bebidas. En el desarrollo de este proyecto, se analizarán ambos tipos de cartón, exterior e interior, y se verá además si existen diferencias entre ambos.

III.3. Selección del método de preconcentración

Para llevar a cabo la determinación de los compuestos de interés, clorofenoles y cloroanisolos en papel y cartón, lo primero que se hizo fue una búsqueda bibliográfica en relación a la extracción de este tipo de compuestos de matrices orgánicas, como es el caso del papel y cartón. Según bibliografía, la primera etapa consiste en una extracción con solución hidroalcohólica, generalmente mezclas de etanol o metanol/agua (Domeño et al., 2005; Callejon et al., 2007). Se decidió extraer las muestras de papel y cartón con una mezcla hidroalcohólica de etanol/agua.

III.3.1. Microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) con análisis mediante GC-MS

Viendo las posibilidades que la HF-LPME ofrecía y teniendo la posibilidad de llevarla a cabo en el laboratorio de Química Analítica, se decidió proceder con esta técnica de extracción para preconcentrar los extractos antes de analizarlos mediante cromatografía de gases (GC-MS). En el laboratorio se dispone de un sistema semi-automatizado que permite realizar HF-LPME, tal y como se muestra en la Figura 10.

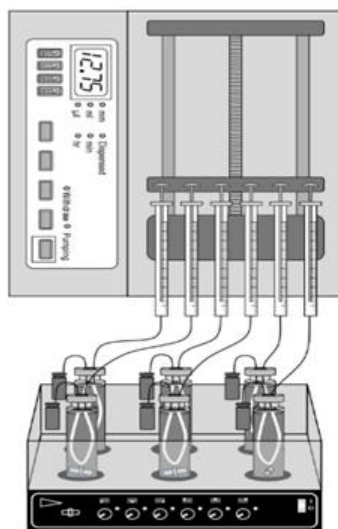


Figura 10. Sistema Aladdin AL-8000 semi-automático para HF-LPME (Pezo et al., 2007).

Este sistema permite colocar hasta seis viales con sus respectivas fibras y jeringuillas para hacer una microextracción automatizada mediante un temporizador y un mecanismo que tira de los émbolos de las jeringuillas. De esta manera, tras unos treinta minutos el sistema ha completado la microextracción. El sistema además, permite la activación simultánea de núcleos magnéticos para la agitación, y los viales se hallan sumergidos en un baño de agua destilada a 50°C que se encuentra constantemente en movimiento con la ayuda de una bomba para mantener la temperatura constante.

III.3.1.1. Elección del solvente más adecuado para la HF-LPME

Para la optimización de las condiciones más adecuadas para la extracción de los compuestos de interés con la HF-LPME en extractos hidroalcohólicos, se llevó a cabo una nueva revisión bibliográfica para conocer cuáles eran los solventes más adecuados tanto para la extracción como para después ser inyectados en un cromatógrafo de gases con detector de masas (GC-MS). Se decidió utilizar la cromatografía de gases GC-MS ya que se trata una técnica muy sensible para compuestos volátiles, como es el caso de clorofenoles y cloroanísoles.

El resultado de la búsqueda bibliográfica (Pezo et al., 2007; Oliveira et al., 2014) mostró que en la mayoría de los casos se emplea tolueno y en menor cantidad el metil tert-butil éter (MTBE). Lo primero que se hizo fue fijar las condiciones cromatográficas para llevar a cabo el análisis de los tres compuestos organoclorados de interés en disoluciones de los dos solventes seleccionados, con objeto de determinar los tiempos de retención de cada uno de ellos así como los límites de detección y cuantificación de los mismos en el equipo seleccionado.

Se trabajó con el equipo de cromatografía de gases (GC-MS) 7890N Agilent con detector de masas 5977D, acoplado con una columna cromatográfica HP-5MS (30m x 25mm x 0,25µm). Se fijaron las siguientes condiciones cromatográficas: 50°C durante 3 min, rampa de 10°C/min hasta los 300°C y mantener 2 min. Temperatura del inyector 250°C, modo splitless. Adquisición en modo SCAN y SIM con un *solvent delay* de 8 min.

Se prepararon disoluciones madre de concentración perfectamente conocida (control gravimétrico) de los tres compuestos organoclorados seleccionados (triclorofenol, tetraclorofenol y tricloroanisol). En concreto, se prepararon dos disoluciones madre multipatrón de 25 µg/g tanto en tolueno como en MTBE. Inicialmente, esas disoluciones se inyectaron en el cromatógrafo GC-MS en modo SCAN (con una adquisición de 50 a 405 m/z), con el objetivo de determinar los tiempos de retención correspondientes a cada uno de los tres compuestos y obtener los correspondientes espectros de masas para llevar a cabo la correcta identificación de los patrones. Los análisis se hicieron por triplicado.

En la Figura 11 se muestra el cromatograma obtenido del análisis de la disolución multipatrón en tolueno, con los tres picos cromatográficos correspondientes a cada uno de los tres compuestos organoclorados, junto con su correspondiente espectro de masas obtenido. Tal y como se puede observar, los tres patrones se separan e identifican perfectamente bajo esas condiciones cromatográficas.

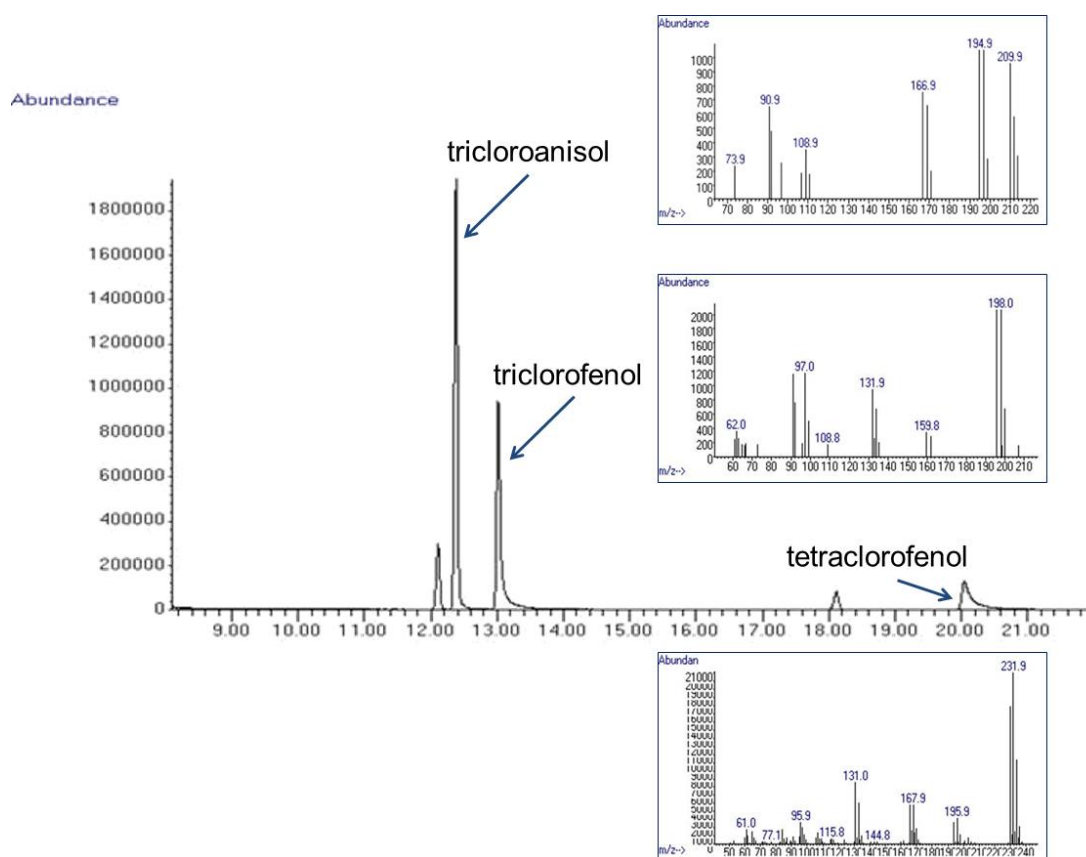


Figura 11. Cromatograma obtenido del análisis de la disolución multipatrón en tolueno mediante GC-MS con adquisición en modo SCAN.

Con objeto de poder aumentar la sensibilidad del equipo, y así poder determinar concentraciones menores de compuestos organoclorados, se decidió diseñar un método cromatográfico con una detección en modo SIM, mediante la selección y adquisición únicamente de las masas más selectivas de cada uno de los patrones. Las condiciones de adquisición en modo SIM fueron: masas (m/z) 195 (propia del TCA); 196 (propia del TCP); y 231 y 232 (propias del TeCP).

En las Figuras 12 y 13 se muestran los cromatogramas de las disoluciones multipatrón de 25 $\mu\text{g/g}$ en tolueno y MTBE respectivamente, adquiridas mediante GC-MS en modo SIM. En ambos casos puede observarse que si bien la abundancia de la señal disminuye, lógico dado que solo se adquieren las masas selectivas, la definición de los picos mejora significativamente, así como desaparecen otros picos cromatográficos provenientes de la columna cromatográfica o el disolvente.

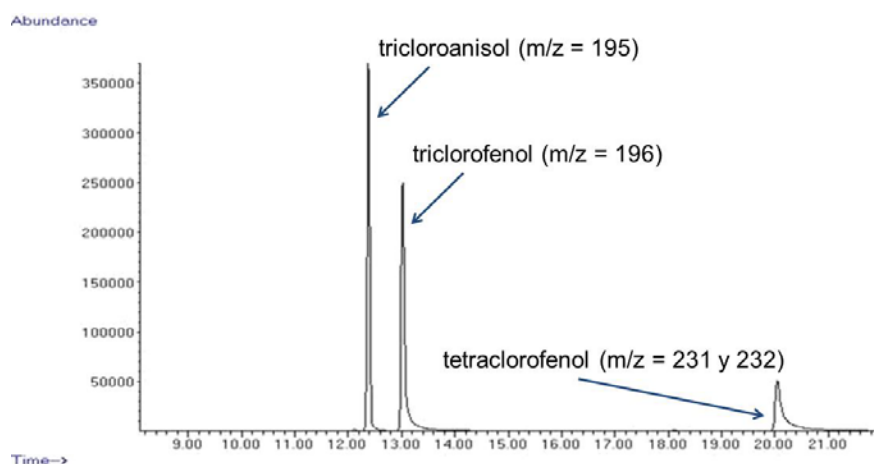


Figura 12. Cromatograma obtenido del análisis de la disolución multipatrón en tolueno mediante GC-MS con adquisición en modo SIM.

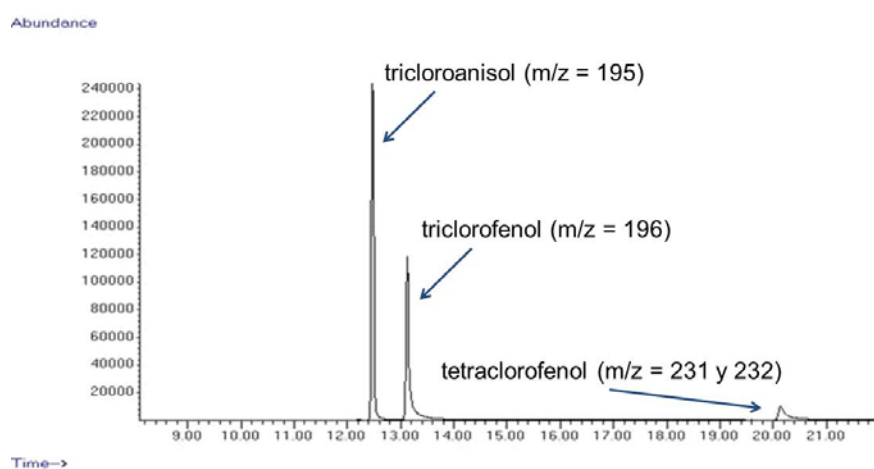


Figura 13. Cromatograma obtenido del análisis de la disolución multipatrón en MTBE mediante GC-MS con adquisición en modo SIM.

III.3.1.2. Cálculo límites de detección y cuantificación para el análisis mediante cromatografía GC-MS

Una vez visto que los tres patrones podían separarse e identificarse mediante cromatografía de gases GC-MS con detección en modo SIM, para los dos solventes seleccionados, la siguiente etapa consistió en la determinación del límite de detección y cuantificación de los mismos bajo estas condiciones cromatográficas. Con los datos obtenidos de la integración de los picos cromatográficos de los tres patrones se procedió al cálculo de los límites de detección y cuantificación, en tolueno y en MTBE, según las ecuaciones:

$$\text{Límite de detección (LD)}: = 3 \times \frac{H_{\text{ruido}}}{H_{\text{pico}}} \times C_{\text{pico}}$$

Siendo H_{ruido} la altura del ruido de fondo del cromatograma, H_{pico} la altura del pico cromatográfico correspondiente al patrón y C_{pico} su concentración. Además,

$$\text{Límite de cuantificación (LQ)}: = 10 \times \frac{H_{\text{ruido}}}{H_{\text{pico}}} \times C_{\text{pico}}$$

En la Tabla 2 se muestran los datos obtenidos de la integración de los picos cromatográficos correspondientes a los patrones de tricloroanisol (TCA), triclorofenol (TCP) y tetraclorofenol (TeCP), en los dos disolventes (tolueno y MTBE), analizados mediante GC-MS con la adquisición en modo SCAN y SIM. Para el cálculo de la altura del ruido de fondo, se tomaron 6 medidas y se realizó el promedio. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

Tabla 2. Resultados integración disoluciones multipatrón en tolueno y MTBE para el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

Tolueno				MTBE			
Modo SCAN							
	TCA	TCP	TeCP		TCA	TCP	TeCP
C (µg/g)	23,67	26,26	27,12	C (µg/g)	23,84	25,39	22,72
H _{pico}	1943452	939742	128618	H _{pico}	1001720	164463	1847
H _{ruido}	1003,4	1410	853,5	H _{ruido}	187,16	187,16	160,3
Modo SIM							
	TCA	TCP	TeCP		TCA	TCP	TeCP
C (µg/g)	23,67	26,26	27,12	C (µg/g)	23,84	25,39	22,72
H _{pico}	370086	248879	50286	H _{pico}	178724	39591	631
H _{ruido}	1,0	3,5	8,0	H _{ruido}	3,0	3,6	4,0

A partir de los datos obtenidos, se procedió a realizar el cálculo de los límites de detección y de cuantificación para cada compuesto dependiendo de su disolvente y del modo de adquisición en el que se habían analizado.

El límite de detección (LD) de un equipo instrumental es la concentración mínima por debajo de la cual el compuesto, aunque esté presente en la muestra, no se puede detectar mediante esa técnica instrumental. Por otro lado, el límite de cuantificación (LQ) es aquel que, si bien se sitúa por encima del límite de detección, por debajo de él es muy poco fiable estimar la concentración de manera cuantitativa de un compuesto; es decir, es la concentración mínima por debajo de la cual no puede cuantificarse el compuesto aunque sea detectado. De las dos definiciones se deduce, que un compuesto por debajo de ambos límites no es detectable ni cuantificable. Si se encuentra en una concentración por debajo del límite de cuantificación y por encima del límite de detección, se puede informar de la presencia del compuesto pero no de su concentración. Con una concentración por encima de ambos límites se puede determinar la concentración del compuesto en la muestra según la técnica instrumental y las condiciones aplicadas.

Con los datos obtenidos se aplicaron las correspondientes ecuaciones para el cálculo de los límites de detección y cuantificación, que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Límites de detección y cuantificación de los patrones organoclorados en tolueno y MTBE según análisis mediante GC-MS en modo SCAN y SIM.

Tolueno				MTBE			
Límite de detección (ng/g)							
	TCA	TCP	TeCP		TCA	TCP	TeCP
SCAN	36,65	118,21	539,95	SCAN	13,36	86,66	5.915,82
SIM	0,19	1,11	12,28	SIM	1,20	6,93	432,09
Límite de cuantificación (ng/g)							
	TCA	TCP	TeCP		TCA	TCP	TeCP
SCAN	122,18	394,05	1.799,84	SCAN	44,54	288,89	19.719,41
SIM	0,64	3,69	40,94	SIM	4,00	23,08	1.440,31

$\mu\text{g/g}$ = partes por millón (ppm); y ng/g = partes por billón (ppb).

Como se puede ver en los resultados obtenidos en el cálculo de los límites de detección y cuantificación, en todos los casos, cuando se adquiere en modo SIM se obtiene una mayor sensibilidad ya que es capaz de dar límites de detección y cuantificación más bajos que cuando se adquiere en modo SCAN, algo totalmente esperado. De hecho, cuando se trabaja en modo SIM se pueden llegar a detectar y cuantificar partes por billón (ng/g). Si se comparan los resultados de acuerdo con el solvente, se puede observar que los resultados son mejores en el caso de las disoluciones en tolueno.

Si bien el cálculo de los límites de detección y cuantificación muestra que se obtienen mejores resultados con las disoluciones en tolueno, en el momento de llevar a cabo los análisis el equipo de cromatografía 7890N Agilent (GC-MS) presentó un problema serio en la señal cromatográfica cuando se trabajaba con tolueno, por lo que se procedió a una revisión por parte del técnico y se decidió trabajar con las disoluciones en MTBE.

Una vez seleccionado el MTBE como solvente de trabajo para la extracción mediante HF-LPME, se decidió preparar nuevas disoluciones multipatrón de menores concentraciones con objeto de calcular de manera más eficaz los límites de detección y cuantificación, dado que deben hacerse con las concentraciones que menor señal cromatográfica dan. Además, permite establecer los puntos de concentración en los que los patrones dan o no dan señal medible. Para ello, se preparó una disolución multipatrón en MTBE, controlada gravimétricamente, de 1 $\mu\text{g/g}$ de TCA, 6 $\mu\text{g/g}$ de TCP y 25 $\mu\text{g/g}$ de TeCP. La disolución se inyectó con las mismas condiciones cromatográficas en el

cromatógrafo GC-MS, y se adquirió únicamente en modo SIM. Todos los análisis se hicieron por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados integración, límites de detección y cuantificación de la disolución multipatrón en MTBE analizada mediante GC-MS con adquisición en modo SIM.

MTBE (adquisición en modo SIM)			
	TCA	TCP	TeCP
C (µg/g)	0,7725	6,5395	23,7542
Hpico	287	192	177
Hruido	2,75	2,75	4,66
Límite de detección (ng/g)	22,86	289,33	1.876,16
Límite de cuantificación (ng/g)	76,21	964,44	6.253,87

Tal y como cabía esperar, al trabajar con una disolución multipatrón de menor concentración, los límites de detección y cuantificación aumentan al compararlos con los de la Tabla 3, pero son más cercanos a la realidad. Por tanto, para el análisis de clorofenoles y cloroanisolos mediante GC-MS con adquisición en modo SIM, quedan fijados los siguientes límites de detección y cuantificación:

- 2,4,6-tricloroanisol: LD = 22,86 ng/g y LQ = 76,21 ng/g
- 2,4,6-triclorofenol: LD = 289,33 ng/g y LQ = 964,44 ng/g
- 2,3,4,6-tetraclorofenol: LD = 1.867,16 ng/g y LQ = 6.253,87 ng/g

El compuesto más sensible, en estas condiciones de trabajo, es el 2,4,6-tricloroanisol mientras que el menos sensible es el 2,3,4,6-tetraclorofenol.

III.3.1.3. Extracción de los compuestos organoclorados de la matriz del cartón

Una vez conocidos los límites de detección y cuantificación de los tres compuestos de interés en las condiciones de análisis fijadas, así como elegido el disolvente con el que llevar a cabo la microextracción en fase líquida HF-LPME, se procedió a extraer las muestras de cartón con disolución hidroalcohólica. Para ello, se diseñó un método de extracción sencillo, basado en bibliografía, en el que 12,5 cm² de cartón cortado en pequeñas cuadrados, para aumentar la superficie de contacto, se sometió a maceración con agitación magnética durante 24 h tras la adición de 15 mL, controlados gravimétricamente, de una disolución de etanol/agua Milli-Q al 75%.

En la Figura 14 se muestra el procedimiento de extracción seguido con las muestras de cartón.



Figura 14. Muestra de cartón sometida a extracción 24 h con solución EtOH/H₂O (3:1).

Una vez transcurridas las 24 h de extracción, los extractos se filtraron y recogieron en viales limpios de 20 mL, para posteriormente ser sometidos a la microextracción HF-LPME. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

III.3.1.4. Aplicación microextracción HF-LPME con análisis mediante GC-MS y resultados

Antes de llevar a cabo la microextracción, se toman 10 g del extracto hidroalcohólico obtenido y se adiciona agua Milli-Q hasta los 19 g, asegurando que todo el vial de 20 mL queda completamente lleno de líquido y por tanto diluyendo el extracto hasta un 39,5% de EtOH. Para aplicar la microextracción, se empleó el equipo automatizado Aladdin AL-8000 con seis jeringuillas acopladas y fibras huecas semipermeables.

De acuerdo con trabajos de investigación que se están desarrollando en el grupo de investigación GUIA y que se encuentran pendientes de publicación, las condiciones de trabajo aplicadas para la microextracción fueron: solvente (fase aceptora) = metil tert-butil éter (MTBE), tiempo microextracción = 30 min, temperatura = 50°C, volumen recogido = 70 µL, sin agitación magnética, tipo de fibra hueca apolar y ausencia de fuerza iónica o ajuste alguno de pH.

Se sometieron a microextracción HF-LPME extractos de cartón interior y exterior, y se analizaron, por triplicado, mediante cromatografía GC-MS con las condiciones cromatográficas anteriormente fijadas. En las Figuras 15 y 16 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada uno de los extractos de cartón analizados.

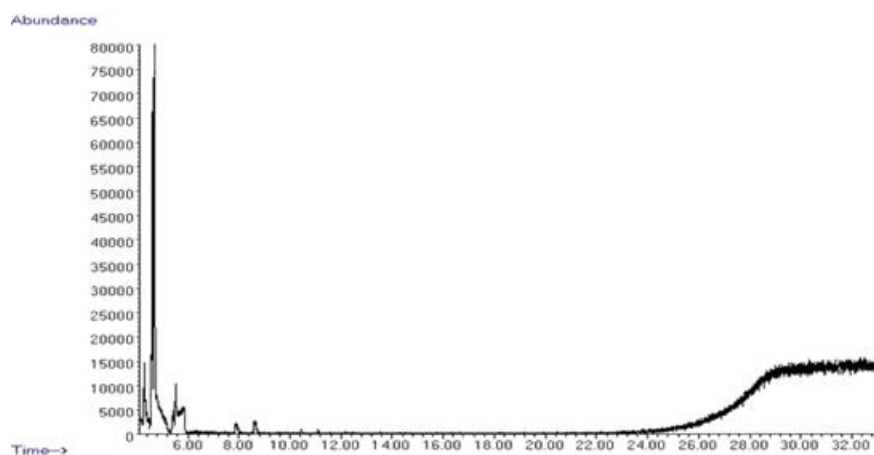


Figura 15. Cromatograma del análisis GC-MS de un extracto de cartón interior sometido a microextracción HF-LPME.

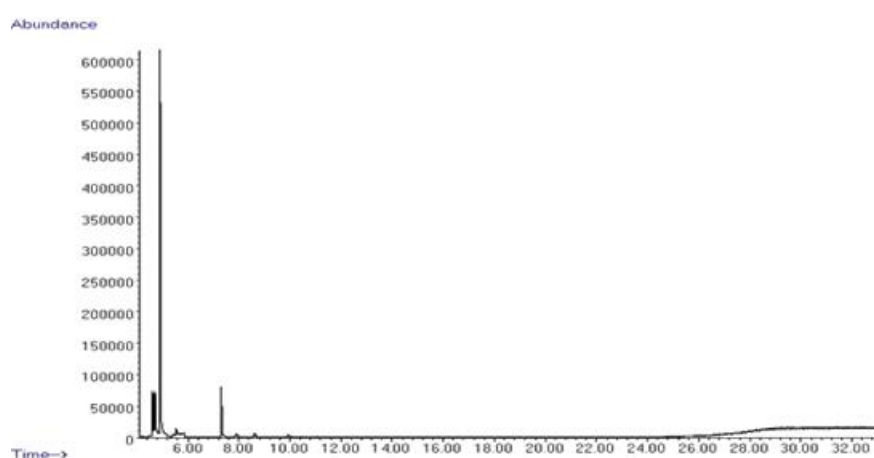


Figura 16. Cromatograma del análisis GC-MS de un extracto de cartón exterior sometido a microextracción HF-LPME.

En ninguno de los dos casos se obtuvo señal cromatográfica de alguno de los tres compuestos de interés (TCA, TCP y TeCP). Esto puede ser debido a que en las muestras de cartón no hay compuestos organoclorados, o bien no se encuentran en la concentración suficiente para ser detectados en las condiciones cromatográficas de trabajo, o bien el procedimiento HF-LPME aplicado como etapa de preconcentración no ha sido eficaz y no se alcanza la suficiente concentración para ser detectados y/o cuantificados.

Para saber si el procedimiento que se estaba aplicando funcionaba bien, lo primero que se hizo fue preparar extractos hidroalcohólicos (EtOH/agua) dopados con una disolución multipatrón y tratados mediante HF-LPME como si fuesen una muestra real. Con el objetivo de aplicar el procedimiento, recoger el extracto concentrado e inyectarlo en el cromatógrafo GC-MS para comprobar si el procedimiento ha sido eficaz y calcular el porcentaje de recuperación para cada uno de los compuestos organoclorados.

Antes de pasar a comentar los resultados obtenidos, es importante señalar que durante el desarrollo del procedimiento de microextracción HF-LPME se han presentado innumerable cantidad de problemas técnicos, derivados del funcionamiento del propio equipo semi-automático.

Lo primero que se observó fue que la colocación correcta de la fibra a través del tubo metálico que atraviesa el tapón del vial requiere técnica y precisión; además de que la fibra se doblaba con cierta facilidad en el proceso dañándose e incluso rompiéndose. En general, la ruptura de la fibra, si la había, era difícilmente perceptible e incluso aunque sólo se doblara; el funcionamiento ya no era el correcto. Además, el segmento de tubo metálico acoplado a la microjeringa mediante un sistema de rosca, en ocasiones no aislaba completamente el tubo exterior y, por tanto, hacía inútil el esfuerzo de succión por parte de las microjeringas permitiendo la entrada de aire exterior. Por último, debido a la baja velocidad de circulación de la fase aceptora (MTBE) a través de la fibra (70 μ L eran succionados en 30 minutos), en ocasiones el proceso terminaba sin que las microjeringas tuvieran nada en su interior, pues aún se hallaba la fase móvil en alguna parte de la fibra. Todo ello hizo que, en la mayoría de las ocasiones, tras pasar los treinta minutos únicamente una o dos microjeringas presentaban fase móvil en su interior. El resto presentaban burbujas de aire que superaban la mitad de esos 70 μ L, habían llegado a una cantidad menor o, simplemente, no había subido nada a través de ellos más que aire. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para los blancos y los extractos de cartón exterior e interior dopados.

Tabla 5. Resultados recuperación compuestos organoclorados con microextracción HF-LPME, y posterior análisis GC-MS.

% recuperación patrones organoclorados				
Conc (μ g/g) ¹	Dopado vial	0,11	0,11	0,10
Muestra	características	% TCA	% TCP	% TeCP
BLD1_030317	blanco 1	0,16	1,55	2,86
BLD2_200317	blanco 2	0,15	1,49	1,92
% recuperación patrones organoclorados				
Conc (μ g/g) ²	Dopado vial	5,4	5,5	4,8
Muestra	características	% TCA	% TCP	% TeCP
BLD3_200317	blanco 3	0,02	0,42	0,27
BLD4_210317	blanco 4	0,20	0,84	1,19
BLD5_210317	blanco 5	0,10	0,55	0,92
BLD6_210317	blanco 6	0,01	0,30	0,13
ETB3D_270317	cartón exterior	0,09	2,72	40,17
ITB4D_270317	cartón interior	0,57	3,23	56,45

¹Dopado a bajas concentraciones, ²Dopado a altas concentraciones.

A partir de los resultados que se muestran en la Tabla 5 se puede afirmar que el proceso de concentración de los analitos, presentes en el extracto hidroalcohólico, mediante el procedimiento de microextracción HF-LPME **no es eficaz**, dado que el porcentaje de recuperación obtenido es bajísimo, en todos los casos y para todos los analitos estudiados. En el caso del TCA, el compuesto con menor límite de detección y cuantificación, en ningún caso se obtienen porcentajes de recuperación superiores al 0,2%, es decir, prácticamente no se extrae nada. El caso del TCP no es mejor, ya que se llega a un porcentaje de recuperación máximo del 3%. Y por último, en el caso del TeCP los porcentajes de recuperación son parecidos, y únicamente en el caso de los extractos de cartón dopados se obtienen recuperaciones del orden del 50%. En este último caso, los extractos de cartón dopados fueron concentrados en una fecha y tanda diferente que los blancos dopados, poniendo de manifiesto que junto con los problemas técnicos comentados anteriormente, el procedimiento en las condiciones de trabajo fijadas no es eficaz ni tan siquiera reproducible.

En la Figura 17 se muestra, de manera gráfica, la baja eficacia obtenida en la microextracción HF-LPME, al comparar el cromatograma de un extracto dopado con el cromatograma de un patrón de la misma concentración.

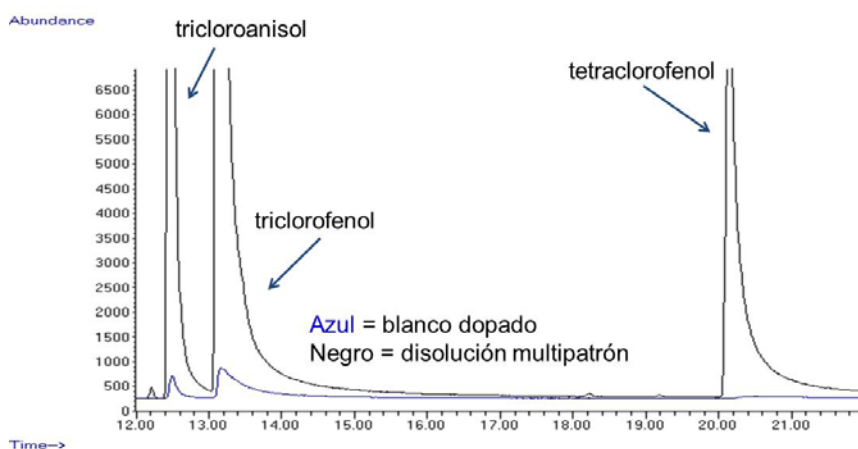


Figura 17. Comparación cromatogramas disolución multipatrón (negro) y blanco dopado (azul) en la misma concentración.

Por todo ello, **la microextracción HF-LPME no resulta un procedimiento de concentración eficaz para los clorofenoles y cloroanisoles en muestras de cartón**, además de presentar una muy baja reproducibilidad; así como numerosos y frecuentes problemas técnicos que hacen que se descarte su utilización en este trabajo fin de grado.

Por lo que se decidió continuar el trabajo con una de las técnicas de preconcentración más utilizadas y que permite un trabajo automático y acoplado a un equipo de cromatografía GC-MS: la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME).

III.3.2. Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a GC/MS

Tal y como ya se ha mencionado anteriormente, una de los procedimientos más utilizados, dada su versatilidad y automatización, es la microextracción en fase sólida, SPME. Este procedimiento, a diferencia de la HF-LPME, no emplea dos fases líquidas inmiscibles, sino que únicamente se pone en contacto el propio extracto y una fibra (fase sólida). La función de la fibra es la de retener, por fenómenos de adsorción, los compuestos de interés que se encuentren en el extracto (líquido), o bien en el espacio de cabeza generado (gas). Para llevarlo a cabo, la fibra puede sumergirse directamente en el extracto (SPME tradicional) o puede quedarse dentro del vial, pero sin ser sumergida, en contacto con la fase gas (HS-SPME). Para el desarrollo de este trabajo fin de grado se decidió trabajar con la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza.

Al igual que en el caso de la HF-LPME donde es necesario seleccionar el solvente más adecuado para la eficaz extracción de los compuestos de interés; en el caso de la SPME es necesario seleccionar el tipo de fibra a utilizar, ya que existen en el mercado diferentes tipos con diferentes características según las características químicas de los analitos que se quieran retener. De acuerdo con la bibliografía consultada para la retención de clorofenoles y cloroanisoles, la fibra más utilizada es la que se denomina fibra gris de tipo PDMS/DVB/CAR, adecuada para analitos con características ni muy polares ni muy apolares, por lo que se ajusta bien a los compuestos de interés seleccionados en este trabajo (Su-Fen et al., 2016).

El equipo instrumental utilizado en el laboratorio para llevar a cabo la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza fue un cromatógrafo (GC-MS) Agilent 6890N con detector de masas 5975D, acoplado a un módulo CombiPal que permite la completa automatización del proceso de HS-SPME. El módulo CombiPal se encarga tanto de calentar como de agitar el vial durante la HS-SPME, para después inyectar la fibra en el cromatógrafo y llevar a cabo la desorción de los analitos que se someterán a la cromatografía de gases, permitiendo llevar a cabo todo el procedimiento de microextracción de manera mucho más rápida, fácil y reproducible en comparación con la microextracción HF-LPME.

Como en el caso de la HF-LPME, lo primero que se hizo fue someter a microextracción HS-SPME los extractos de cartón interior y exterior obtenidos tras la maceración con 10 mL de EtOH al 75% y agitación magnética durante 24 h. Para llevar a cabo esta primera prueba, se trabajó con algunas de las condiciones mostradas en el trabajo llevado a cabo por *Su-Fen et al.*, 2016. Las condiciones de trabajo en el módulo CombiPal fueron: 5 g de extracto en el vial, temperatura de incubación 60°C, agitación

250 rpm, tiempo de incubación 30 min, fibra PDMS/DVB/CAR (50/30 μm) y tiempo de desorción de la fibra en el GC-MS 2 min. Se trabajó con una columna cromatográfica HP-5MS (30m x 25mm x 0,25 μm) y las condiciones cromatográficas fueron muy similares a las utilizadas en el cromatógrafo 7890N Agilent con detector de masas 5977D: 50°C durante 3 min, rampa de 10°C/min hasta los 300°C y mantener 2 min. Temperatura del inyector 250°C. *Solvent delay* de 3 min, y adquisición en modo SIM con la selección de las siguientes masas (m/z): 195 y 210 (propias del TCA); 97 y 196 (propias del TCP); y 231 y 232 (propias del TeCP). Los análisis se hicieron por triplicado. Los cromatogramas obtenidos de la microextracción HS-SPME aplicada a los extractos hidroalcohólicos de cartón interior y exterior se muestran en las Figuras 18 y 19.

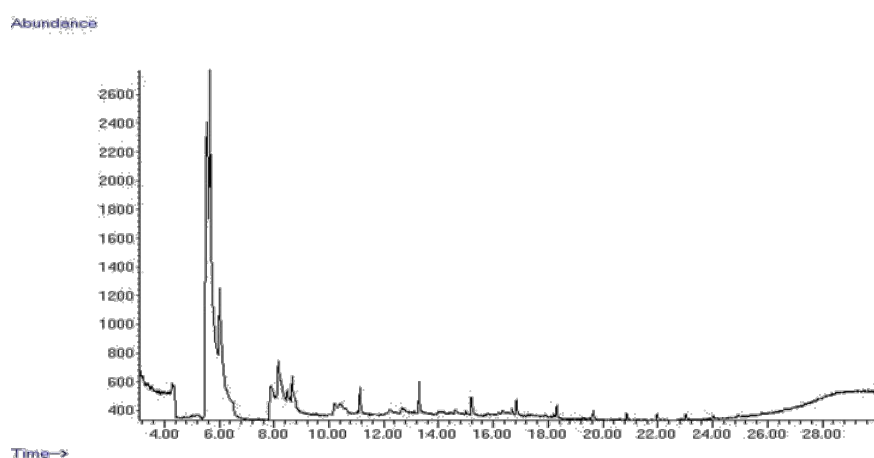


Figura 18. Cromatograma del análisis mediante GC-MS de un extracto de cartón interior sometido a microextracción HS-SPME.

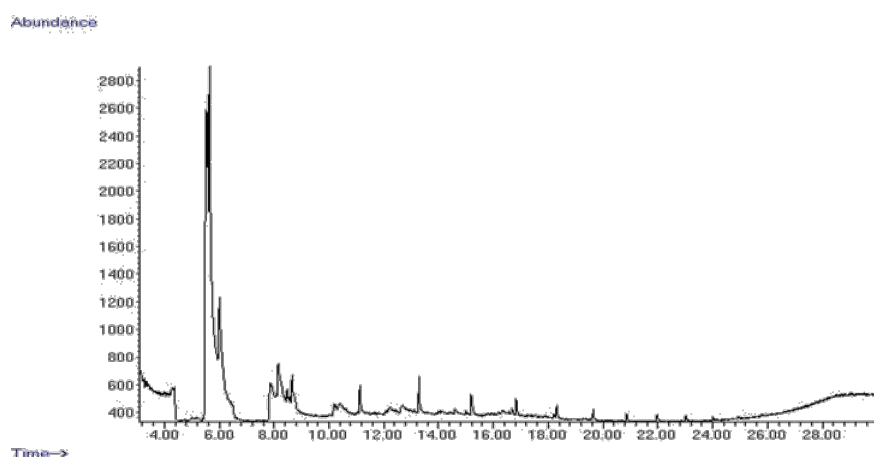


Figura 19. Cromatograma del análisis mediante GC-MS de un extracto de cartón exterior sometido a microextracción HS-SPME.

Como en el caso de los extractos de cartón sometidos a HF-LPME, en estos nuevos análisis mediante HS-SPME/GC-MS no se observa la presencia de ninguno de los tres compuestos de interés (TCA, TCP y TeCP), lo cual puede ser debido a que en las muestras de cartón no hay compuestos organoclorados, o bien no se encuentran en la

concentración suficiente para ser detectados en las condiciones de trabajo, o bien el procedimiento HS-SPME/GC-MS aplicado como etapa de preconcentración no ha sido eficaz y no se alcanza la suficiente concentración para ser detectados y/o cuantificados.

Así que, antes de pasar a optimizar el procedimiento HS-SPME/GC-MS se decidió preparar disoluciones patrón de cada uno de los tres compuestos de interés (TCA, TCP y TeCP) para fijar las condiciones cromatográficas adecuadas para su determinación mediante esta técnica.

Lo primero que se hizo fue reducir el % de etanol en las disoluciones dado que se recomienda que el porcentaje en la disolución a extraer mediante HS-SPME sea lo más bajo posible, ya que dificulta la retención de los compuestos en la fibra. Por lo tanto, se prepararon dos disoluciones multipatrón de 10 ng/g y 100 ng/g (partes por billón) en etanol al 50% y se analizaron mediante HS-SPME acoplada a GC-MS con la adquisición en modo SCAN (rango de 50 a 405 m/z) para poder obtener los espectros de cada uno de los compuestos a determinar. Los análisis se hicieron por triplicado.

El análisis de la disolución multipatrón de 10 ng/g no dio ninguna señal cromatográfica, mientras que en el análisis de la disolución de 100 ng/g únicamente dio señal cromatográfica el tricloroanisol, que ya se había visto anteriormente que es el compuesto más sensible de los tres estudiados, y se podía intuir la presencia del triclorofenol pero no del tetraclorofenol. Por lo tanto, se decidió preparar una nueva disolución multipatrón de mayor concentración (partes por millón) para poder tener suficiente sensibilidad y detectar los tres compuestos, en concentración de 5 µg/g (TCA), 10 µg/g (TCP) y 20 µg/g (TeCP) en etanol al 50%. Se inyectó en modo SCAN y se seleccionaron las masas características de cada compuesto con objeto de seleccionarlas para el análisis en modo SIM si permitían la identificación y separación de los tres compuestos. En la Figura 20 se muestra el cromatograma obtenido, de la inyección de la disolución multipatrón, con la selección de las masas (m/z) 195 para el TCA, 196 para el TCP y 232 para el TeCP.

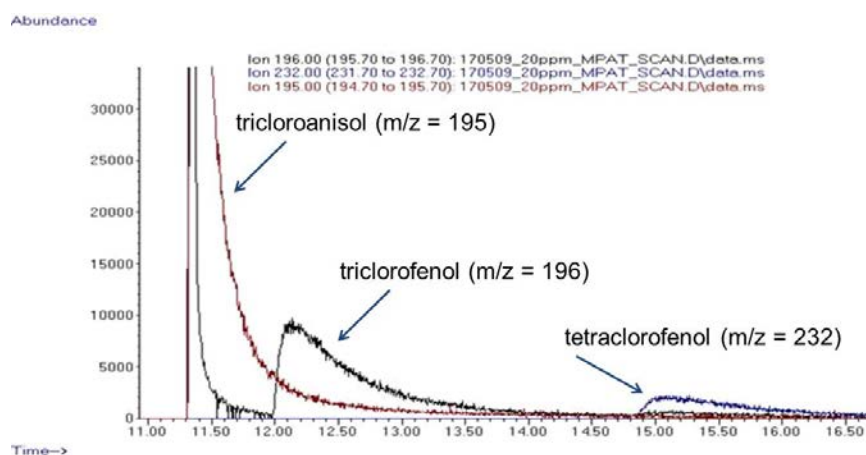


Figura 20. Cromatograma separado por masas seleccionadas de una disolución multipatrón de TCA, TCP y TeCP.

Por tanto, se diseñó una adquisición en modo SIM con la selección de las tres masas (m/z) características de cada uno de los tres patrones; y se procedió ahora a optimizar las condiciones de la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza.

III.3.2.1. Optimización microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME)

Se llevó a cabo una optimización de las condiciones de funcionamiento de la extracción HS-SPME trabajando con extractos hidroalcohólicos (EtOH/agua) dopados con una disolución multipatrón y sometidos al procedimiento como si fuesen muestra real.

Para ello, se hizo una nueva revisión bibliográfica y se vio que los parámetros que influyen en la extracción de los compuestos cuando se trabaja con HS-SPME son principalmente: temperatura de incubación, porcentaje de etanol en el extracto que se somete a análisis, velocidad de agitación y adición de cloruro sódico (NaCl) en el vial para modificar la fuerza iónica. Este último parámetro se incluyó, ya que en la mayoría de los trabajos con HS-SPME se reporta una mejora significativa de la señal analítica de los compuestos volátiles al añadir una cantidad de NaCl del orden de un 14-15% en peso (Pezo et al., 2007). Esto es debido a que la sal se disuelve en el extracto acuoso, disminuyendo la capacidad que tiene la solución hidroalcohólica de retener los compuestos disueltos en disolución. Esto, sumado a la elevada volatilidad de los compuestos de interés, favorece una mayor migración de los mismos desde la disolución al espacio de cabeza y, por tanto, una mayor retención en la fibra utilizada en el procedimiento HS-SPME.

De acuerdo con todo lo anterior, se decidió preparar disoluciones patrón individuales, para ver cómo afectaban las modificaciones de los parámetros en el caso de

cada compuesto, de concentración 25 µg/g (partes por millón) en el caso del TCP y TeCP, y de 500 ng/g (partes por billón) en el caso del TCA. Las condiciones de trabajo con las que se llevó a cabo la optimización fueron las siguientes:

- Variación del porcentaje de etanol en el extracto hidroalcohólico: 50%, 37,5%, 25% y 12% de EtOH. Las disoluciones patrón se prepararon en cada caso en el % de etanol a ensayar.
- Temperatura de incubación: 70°C y 80°C. *Su-Fen et al.*, 2016, hablan de un rango de trabajo entre 30-80°C y *Domeño et al.*, 2005, hablan de un rango entre 40-60°C.
- Adición o no de sal (NaCl) al extracto hidroalcohólico en un 15% en peso.

Los parámetros del módulo CombiPal que se mantuvieron constantes fueron: agitación a 250 rpm, tiempo de incubación 30 min y tiempo de desorción de la fibra 2 min. En todos los casos se prepararon blancos de análisis con el % de EtOH a ensayar. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Para el análisis de los resultados obtenidos en la optimización se tomaron las áreas cromatográficas de cada uno de los patrones. Los resultados obtenidos del estudio llevado a cabo se muestran, de manera gráfica, en las Figuras 21 a 23.

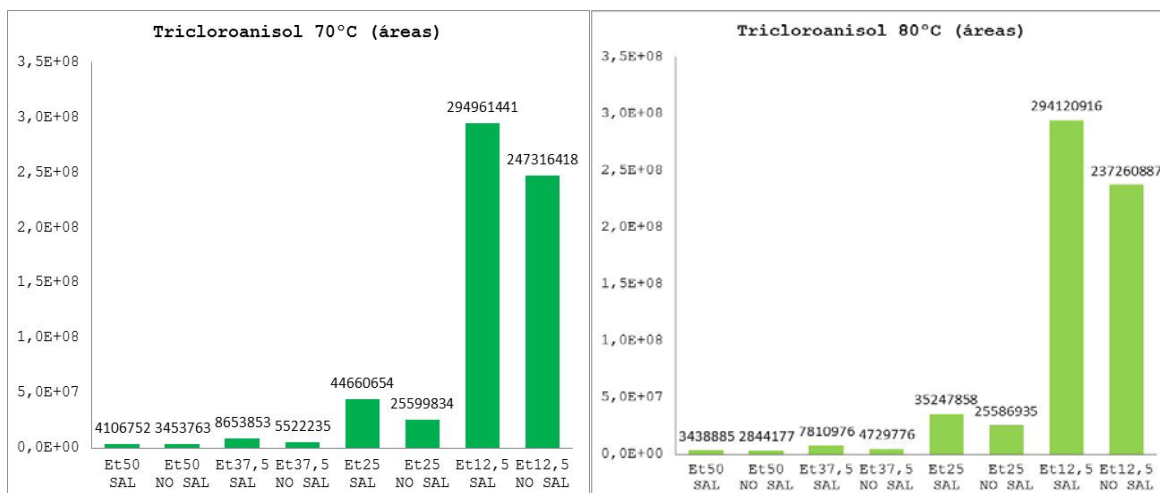


Figura 21. Comparación resultados obtenidos para el tricloroanisol con un tiempo de incubación de 70 y 80°C.

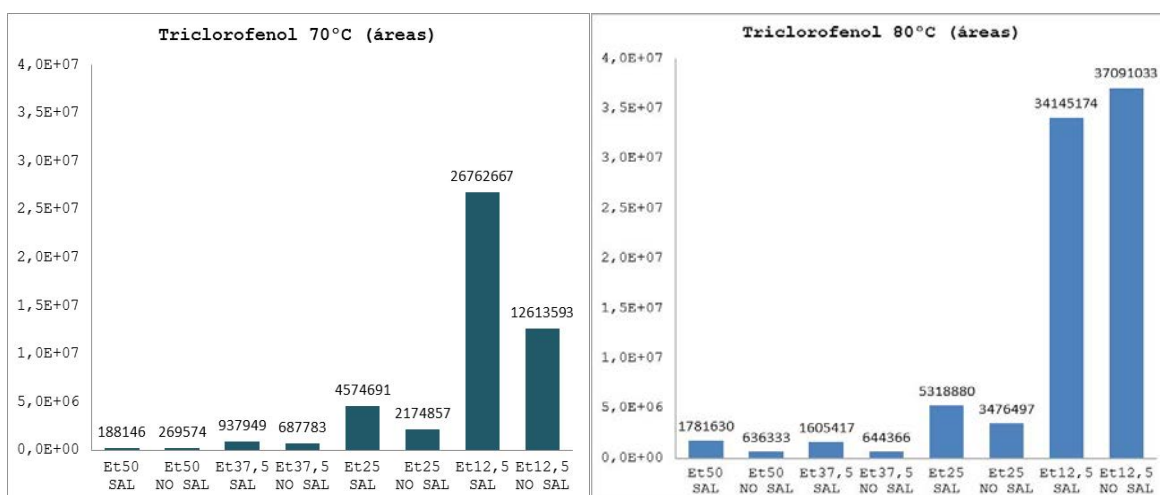


Figura 22. Comparación resultados obtenidos para el triclorofenol con un tiempo de incubación de 70 y 80°C.

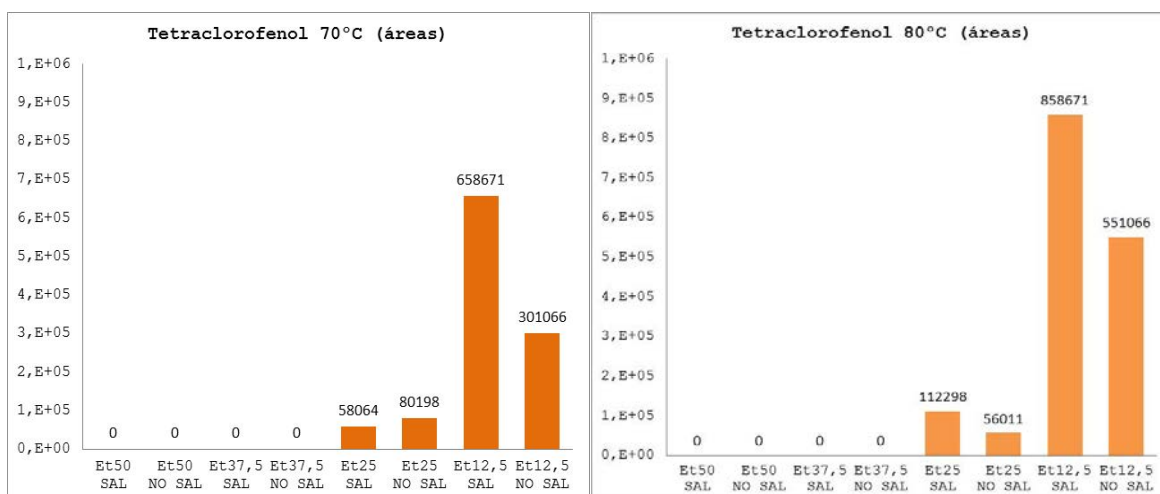


Figura 23. Comparación resultados obtenidos para el tetraclorofenol con un tiempo de incubación de 70 y 80°C.

Lo primero que se observa en los resultados obtenidos es la importante variación de la señal analítica, expresada como área de pico cromatográfico, cuando se modifica la proporción de etanol/agua en la disolución. Como ya se había mencionado anteriormente, un elevado % de etanol en la disolución dificulta la adsorción, y por tanto la eficacia, de la fibra para retener los compuestos de interés. En el caso del TCA y TCP se observa que el área aumenta conforme disminuye el % EtOH, pero dan señal incluso trabajando con un 50%, mientras que en el caso del TeCP hasta que no se reduce a un 25% de EtOH ni siquiera da señal cromatográfica, poniendo de manifiesto la importancia que tiene el % de etanol en el extracto.

Por otro lado, se observa la influencia de la adición de cloruro sódico a la disolución hidroalcohólica, mostrando un aumento de la señal (área) cuando se trabaja con un 15% (p/p) de cloruro sódico frente a cuando no se adiciona. Al añadir NaCl a la

disolución aumenta la fuerza iónica de la misma, lo que produce cambios en la solubilidad de los compuestos. Al existir mayor interacción entre las moléculas del solvente y la sal (NaCl), hay menos moléculas de solvente disponibles para los analitos disueltos, por lo que se facilita el paso de éstos al espacio de cabeza durante la fase de incubación de la HS-SPME. Así, termina habiendo una mayor adsorción de los compuestos en la fibra al haber una mayor concentración de los mismos en el espacio de cabeza, y como resultado aumente la señal al ser analizados mediante HS-SPME/GC-MS.

Por último, en el caso de los clorofenoles (TCP y TeCP) principalmente, y en menor medida en el caso del TCA, se aprecia un aumento del área cromatográfica cuando se lleva a cabo la incubación a 80°C frente a 70°C. El aumento de esta señal va ligado al paso de los compuestos desde la fase líquida hasta el espacio de cabeza (equilibrio líquido/gas). Al aumentar la temperatura de incubación, los analitos ven favorecido su paso de la fase líquida al espacio de cabeza (volatilidad). En el caso del TCA la señal obtenida, cuando se trabaja a 70 y a 80°C, prácticamente es la misma, ya que se trata del compuesto más volátil presentando una presión de vapor a 20°C de 0,023 mmHg, frente a 0,008 mmHg y 0,00423 mmHg del TCP y TeCP, respectivamente. Es decir, el compuesto más volátil es el TCA, de ahí que no influya el aumento de la temperatura en 10°C; mientras que el TeCP es el menos volátil de los tres y sí se ve influenciado por el aumento de la temperatura de incubación.

Las condiciones óptimas de trabajo para el análisis mediante HS-SPME/GC-MS quedaron fijadas de la siguiente manera:

- Extractos hidroalcohólicos con 12,5% de etanol.
- Cantidad de extracto en el vial: 5 g.
- Temperatura de incubación: 80°C durante 30 min.
- Adición de cloruro sódico (NaCl) al extracto en un 15% en peso.
- Agitación a 250 rpm.
- Tiempo de desorción en el GC-MS de 2 min.

III.3.2.2. Calibrado y cálculo límites de detección y cuantificación de clorofenoles y cloroanisol mediante HS-SPME/GC-MS

Una vez optimizadas las condiciones del análisis mediante HS-SPME/GC-MS, se procedió a calcular los límites de detección y cuantificación de los tres patrones; y para ello se preparó una disolución multipatrón de 100 ng/g de TCA y TCP; y de 1 µg/g de TeCP en EtOH al 12,5%. Este primer análisis mostró que no era suficiente la concentración de TCP y TeCP (clorofenoles) para ser detectados con esta técnica instrumental, ya que únicamente se podía ver el pico cromatográfico correspondiente al

TCA. Así que, se preparó una nueva disolución multipatrón en EtOH al 12,5% de 50 ng/g de TCA, y 10 µg/g de TCP y TeCP, es decir, en partes por billón el tricloroanisol (mayor sensibilidad) y partes por millón los clorofenoles (menor sensibilidad). Los análisis se llevaron a cabo por triplicado. En este caso sí que se obtuvo señal cromatográfica para los tres compuestos, identificándose el TCA con un tiempo de retención de 12,01 min; el TCP a 12,5 min y el TeCP a 16,5 min.

Con estos resultados, se decidió preparar una recta de calibrado para determinar los límites de detección y cuantificación de cada uno de los tres compuestos. Las concentraciones de los puntos de la recta preparados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones de TCA, TCP y TeCP en las rectas de calibrados preparadas en etanol al 12,5%.

Concentración (ng/g)			
	TCA	TCP	TeCP
Punto 1	1,13	520,9	1.125,4
Punto 2	2,87	777,0	4.777,6
Punto 3	4,13	1.068,2	11.106,2
Punto 4	6,20	3.030,0	14.884,6
Punto 5	17,15	5.070,8	19.968,5
Punto 6	30,30	7.046,9	25.566,6

Lo primero que se hizo fue preparar el punto tres de la recta de calibrado y analizarlo mediante HS-SPME/GC-MS; como se vio que daban señal los tres compuestos se prepararon los dos puntos anteriores. En el caso del TCP los puntos 1 y 2 no dieron señal detectable (menos de 1000 ng/g); y en el caso del TeCP únicamente el punto 1 (aprox. 1000 ng/g) no dio señal cromatográfica. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado. En la Figura 24 se muestra el cromatograma obtenido para uno de los puntos de la recta de calibrado, donde se aprecian los tres picos cromatográficos correspondientes a cada uno de los patrones.

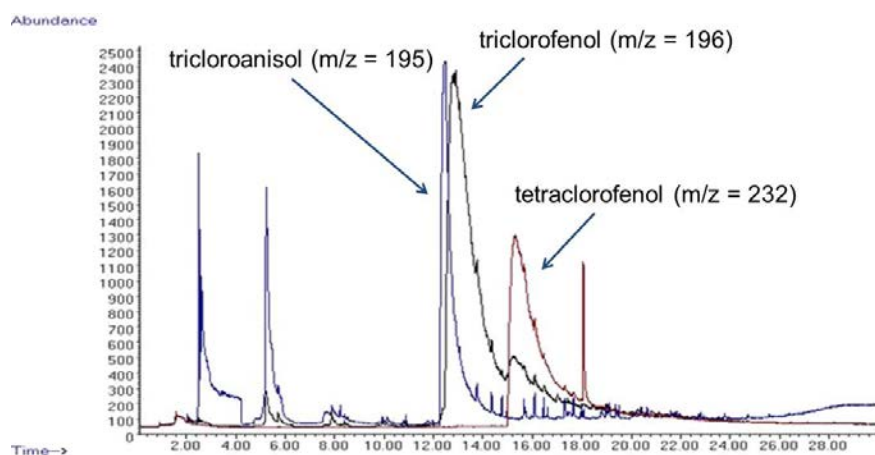


Figura 24. Cromatograma correspondiente a un punto de la recta de calibrado.

En la Tabla 7 se muestran las rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los tres compuestos estudiados; y en la Figura 25 se muestran las gráficas obtenidas.

Tabla 7. Rectas de calibrado para el triclороанисол, triclорофенол y тетраклорофенол.

Rectas de calibrado			
	pendiente	ordenada	R ²
2,4,6-triclороанисол (TCA)	88856,5	-44075,0	0,9967
2,4,6-triclорофенол (TCP)	3037157,2	-1218021,0	0,9979
2,3,4,6-tetraclорофенол (TeCP)	366640,4	-816979,4	0,9984

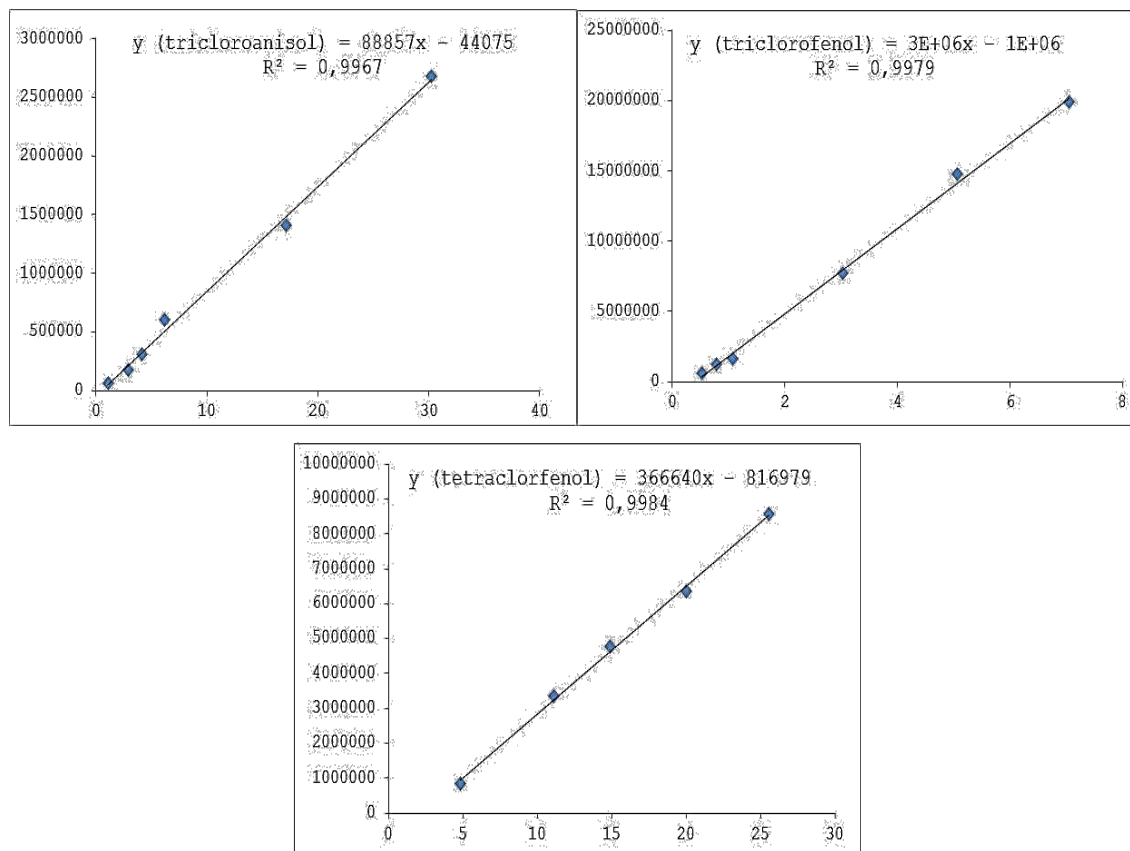


Figura 25. Rectas de calibrado análisis HS-SPME/GC-MS de TCA, TCP y TeCP.

Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación se procedió de la misma manera que en el apartado correspondiente al análisis mediante GC-MS. Se seleccionó el punto de más baja concentración de la recta donde se ha identificado cada uno de los patrones y se obtuvo la señal del pico y del ruido de fondo. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos

Tabla 8. Resultados integración, límites de detección y cuantificación de la disolución multipatrón en etanol 12,5% analizada mediante HS-SPME/GC-MS.

Análisis HS-SPME/GC-MS (adquisición en modo SIM)			
	TCA	TCP	TeCP
C (ng/g)	1,13	1.068,2	4.777,6
H _{pico}	157	2249	1238
H _{ruido}	4,0	15,5	5,7
Límite de detección (ng/g)	0,09	22,09	65,64
Límite de cuantificación (ng/g)	0,29	73,62	218,81

Si se comparan los límites con los obtenidos para el análisis únicamente mediante GC-MS (Tabla 4):

Análisis mediante GC-MS (adquisición en modo SIM)			
Límite de detección (ng/g)	22,86	289,33	1.876,16
Límite de cuantificación (ng/g)	76,21	964,44	6.253,87

Se puede observar que los límites (LD y LQ) mejoran claramente cuando se trabaja con HS-SPME/GC-MS. En el caso del TCA se baja un orden de magnitud con un límite de cuantificación de 0,3 ng/g (ppb); en el caso del TCP también se baja un orden de magnitud hasta los 75 ng/g (ppb); pero donde mejora significativamente el límite de cuantificación es en el caso del TeCP que llega al orden de los 5 µg/g (ppm). Por lo que queda claro que el trabajo con esta técnica analítica permite aumentar mucho la sensibilidad, y puede llevarse a cabo el análisis de compuestos que se encuentren en niveles de ultratrazas (partes por billón).

III.3.2.4. Aplicación del procedimiento HS-SPME/GC-MS y resultados

Una vez optimizado el procedimiento para la concentración y análisis de los clorofenoles y cloroanisoles, el siguiente paso consistió en aplicar dicha metodología a muestras reales de extractos de cartón.

El primer problema que se encontró fue que, si bien por bibliografía se recomienda extraer el papel y cartón con solución hidroalcohólica con alto % de etanol (entre un 50 y el 100%); Callejon *et al.*, 2007 recomiendan la extracción con 100% de etanol para los cloroanisoles y con un 75% para los clorofenoles; se ha visto experimentalmente que el porcentaje de etanol en los extractos debe ser como máximo del 12,5%, lo que limita la

correcta extracción del papel y cartón; o bien hace que se tengan que diluir los extractos perdiendo sensibilidad.

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de cartón interior y exterior se aprovechó a realizar modificaciones sobre el proceso de extracción previo, así como la composición de la fase extractante. Dado que el número de muestras a extraer iba a ser importante, para la agitación mecánica se descartó el uso de placas individuales de agitación y se optó por la agitación en bandeja agitadora, y se decidió trabajar con viales de 20 mL con cierre de rosca para evitar pérdidas por volatilización al trabajar con vasos de precipitados abiertos. Los ensayos realizados, por triplicado, fueron los siguientes:

- a.** Extracción de cartón interior y exterior con agitación mecánica durante 24 h con 15 mL (control gravimétrico) de etanol al 75%, filtración y dilución hasta obtener 5 g de extracto al 12,5% EtOH en el vial para analizar mediante HS-SPME/GC-MS.
- b.** Extracción de cartón interior y exterior con agitación mecánica durante 24 h con 10 mL de EtOH al 50%, filtración y dilución hasta obtener 5 g de extracto al 12,5% EtOH en el vial para analizar mediante HS-SPME/GC-MS.
- c.** Extracción de cartón interior y exterior con agitación en baño de ultrasonidos durante 30, 60 y 120 min tras la adición de 15 mL de EtOH al 50%. Filtración y dilución hasta obtener 5 g de extracto al 12,5% EtOH en el vial para analizar mediante HS-SPME/GC-MS.
- d.** Extracción de cartón interior y exterior con agitación en baño de ultrasonidos durante 30 y 60 min tras la adición de 10 mL de EtOH al 50%. Filtración y dilución hasta obtener 5 g de extracto al 12,5% EtOH en el vial para analizar mediante HS-SPME/GC-MS.

Ninguno de los extractos preparados bajo las condiciones anteriormente descritas dio señal identificable de ninguno de los tres compuestos de interés: TCA, TCP y TeCP. A modo de ejemplo, en las Figura 26 a 29 se muestran cromatogramas obtenidos de los extractos de cartón analizados, para cada una de las cuatro tandas de extracción probadas.

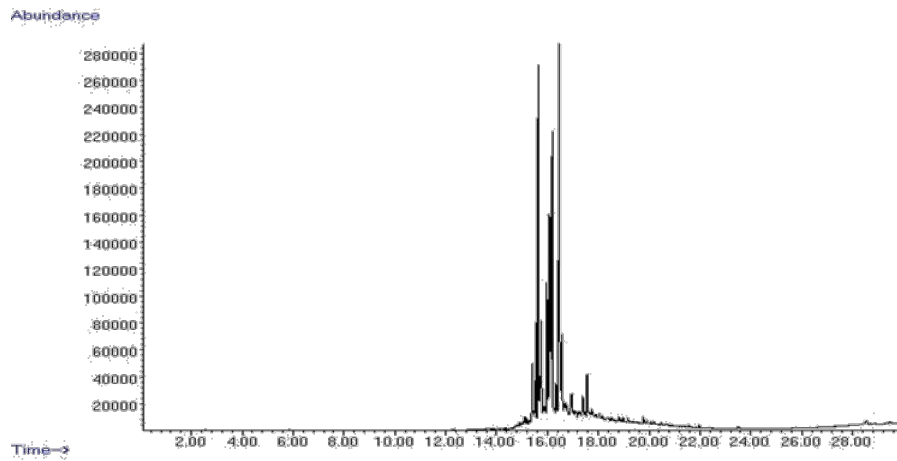


Figura 26. Cromatograma de una muestra de cartón exterior extraída según procedimiento (a).

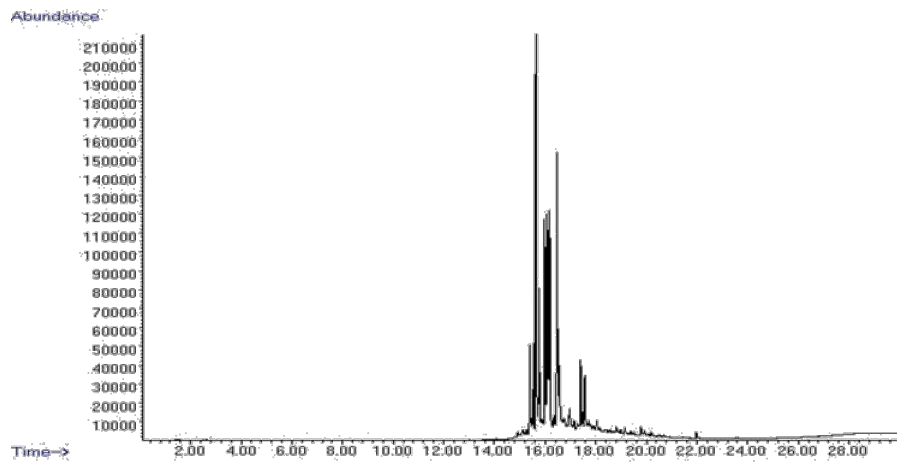


Figura 27. Cromatograma de una muestra de cartón interior extraída según el procedimiento (b).

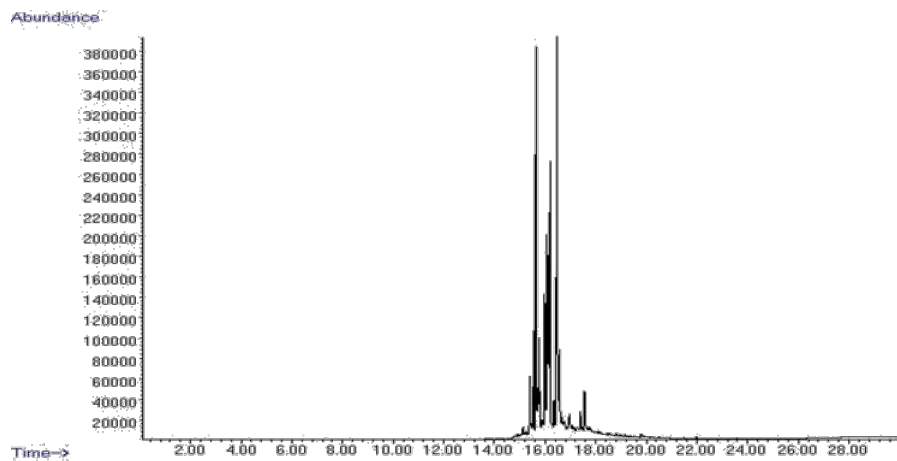


Figura 28. Cromatograma de una muestra de cartón exterior extraída según el procedimiento (c).

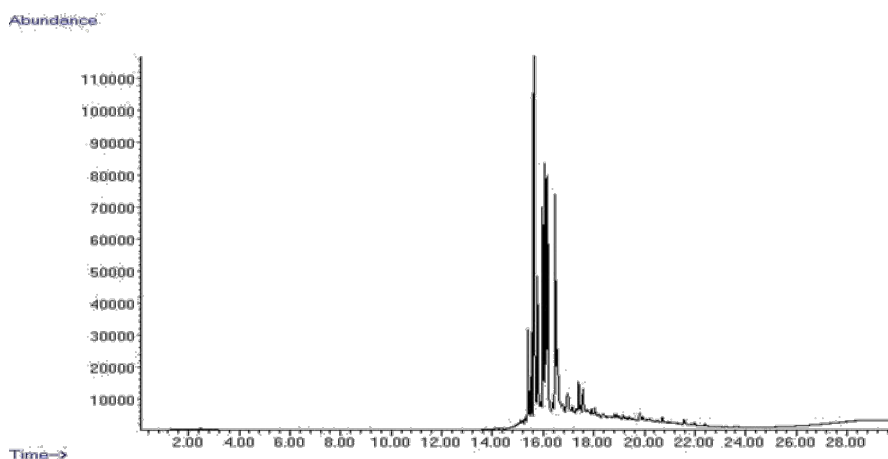


Figura 29. Cromatograma de una muestra de cartón interior extraída según el procedimiento (d).

Si bien se observa la aparición de picos cromatográficos (en todas las muestras con un perfil muy similar), ninguno de ellos corresponde a alguno de los clorofenoles (TCP y TeCP) o cloroanisol (TCA) que se tratan de identificar.

Se probó a realizar pequeñas modificaciones sobre los procedimientos de extracción aplicados, con objeto de ver si se conseguía determinar el TCA, TCP o TeCP. Las modificaciones realizadas fueron:

b.1. Extracción de cartón interior y exterior con agitación mecánica durante 24 h con 10 mL de EtOH al 12,5%, filtración y análisis directo de 5 g de extracto mediante HS-SPME/GC-MS.

Se probó esta modificación para no tener que diluir el extracto y ver si un 12,5% de EtOH es suficiente para extraer los compuestos de interés de la matriz del cartón.

b.2. Extracción de cartón interior y exterior con agitación mecánica durante 24 h con 10 mL de EtOH al 75%, filtración y dilución hasta obtener 5 g de extracto al 12,5% EtOH en el vial para analizar mediante HS-SPME/GC-MS.

Se llevó a cabo esta modificación aumentando el % de EtOH, que seguro que extrae los clorofenoles y cloroanisoles de la matriz del cartón; aunque luego haya que hacer una mayor dilución para tener las condiciones adecuadas de trabajo.

d.1. Extracción de cartón interior y exterior con agitación en baño de ultrasonidos durante 240 min tras la adición de 10 mL de EtOH al 12,5%. Filtración y análisis directo de 5 g de extracto mediante HS-SPME/GC-MS.

En este último caso, además de trabajar directamente con EtOH al 12,5% se intentó reducir el tiempo de extracción trabajando en baño de ultrasonidos durante 2 h frente a la extracción con agitación mecánica de 24 h.

Al igual que en los casos anteriores, no se logró detectar ninguno de los compuestos de interés en los extractos analizados. Por último, se decidió tomar cuatro extractos de cartón interior y exterior sometidos a baño de ultrasonidos y cuatro extractos a maceración durante 24 h, extraídos con etanol al 50% y al 75% (un total de 8 extractos) y doparlos con una disolución multipatrón de concentración conocida de los tres compuestos de interés. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis mediante HS-SPME/GC-MS de los ocho extractos dopados.

Tabla 9. Resultados dopados extractos de cartón interior y exterior sometidos a análisis mediante HS-SPME/GC-MS.

Ensayo	TCA (m/z=195)		TCP (m/z=196)		TeCP (m/z=232)	
	C (ng/g) dopada	C (ng/g) medida	C (µg/g) dopada	C (µg/g) medida	C (µg/g) dopada	C (µg/g) medida
Int-75-24h	31,68	20,24	1,41	0,40	10,31	-
Ext-75-24h	15,58	8,35	1,39	0,39	9,66	-
Int-50-24h	23,58	14,37	1,46	0,40	9,46	-
Ext-50-24h	18,29	9,78	1,43	0,39	9,99	-
Int-75-US	15,33	8,58	1,49	0,39	9,46	-
Ext-75-US	19,17	12,03	1,47	0,39	9,36	-
Int-50-US	14,89	7,04	1,43	0,39	10,81	-
Ext-50-US	17,68	11,26	1,45	0,40	9,23	-

Los resultados de los extractos dopados muestran un importante descenso en la concentración medida frente a la concentración dopada. En concreto, para el TCA la cantidad medida es prácticamente la mitad de la cantidad dopada; en el TCP se observa una reducción del 70% y, en el caso del TeCP ni tan siquiera se obtiene señal cuantificable; si bien el límite de detección calculado para esta técnica está en 0,2 µg/g, muy por debajo de la concentración con la que se han dopado las muestras (del orden de los 10 µg/g).

Dado que el dopado se realizó de la misma manera que se prepararon las disoluciones patrón para el cálculo de las rectas de calibrado (en fase líquida), y por tanto se debería recuperar prácticamente la misma cantidad que se dopa, los resultados obtenidos ponen de manifiesto una serie de cuestiones. Por un lado, tal y como cabría esperar por la naturaleza fisicoquímica de estos compuestos, existe una inestabilidad importante de las disoluciones multipatrón a pesar de controlarse gravimétricamente cada vez que son utilizadas. Este tipo de compuestos pueden quedar fácilmente adsorbidos en el vidrio de los viales, haciendo que la concentración de los mismos en la disolución disminuya y por tanto el dopado de los extractos no se esté llevando a cabo en la

concentración teórica calculada. Y por otro lado, muestra la gran importancia que tiene en este tipo de análisis, a niveles ultratrazas (ng/g), la preparación y análisis inmediato de todos los extractos y disoluciones para poder detectar y cuantificar de manera correcta estos compuestos.

Además, en el caso particular del TeCP se observa que, al trabajar con extractos reales de cartón, la masa selectiva del mismo ($m/z = 232$) da señal a lo largo de todo el cromatograma y en concreto en el tiempo de retención al que debería identificarse, por lo que pone de manifiesto un posible problema de interferencia de la matriz del cartón, al extraerse compuestos que no permiten la identificación correcta del TeCP. En el Figura 30 se muestra un extracto de cartón dopado, con la separación de masas para la identificación de cada uno de los tres patrones, y puede apreciarse el problema de identificación del TeCP.

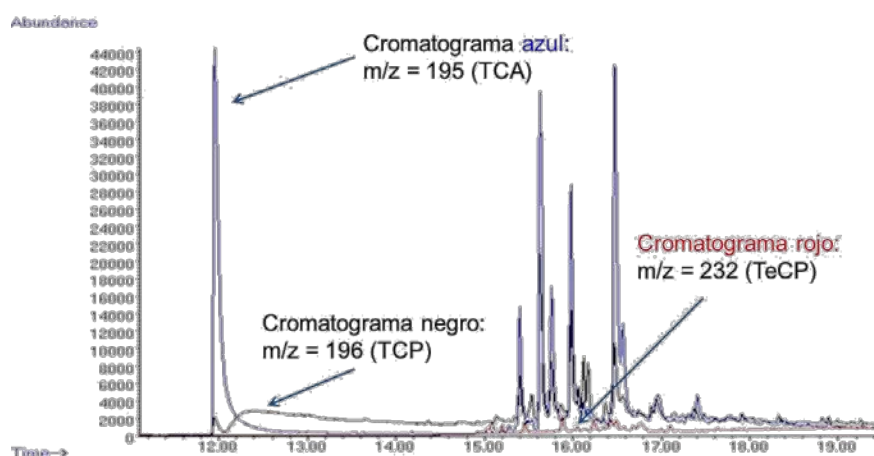


Figura 30. Cromatograma extracto dopado cartón interior extraído con 75% EtOH durante 24 h.

En cualquier caso, a pesar de poner a punto una metodología para la determinación de clorofenoles y cloroansoles mediante HS-SPME/GC-MS con unos muy buenos límites de detección y cuantificación; al trabajar con muestras reales y llevar a cabo la extracción de las mismas no se logró ni identificar ni cuantificar ninguno de los tres compuestos de interés, TCA, TCP y TeCP.

Las razones para no poder identificar estos compuestos pueden ser varias, por una parte que no esté presente ninguno de los tres compuestos en la matriz del cartón estudiado (interior y exterior), y por tanto verifique la ausencia de ellos, tal y como es deseable. Pero también puede haber sucedido que, si bien los límites de detección y cuantificación obtenidos son muy bajos y permiten el análisis de ultratrazas (ppb); es necesario trabajar con extractos al 12,5% en EtOH, y esto hace que:

- Por una parte; si se trabaja directamente con EtOH al 12,5% no se consiguen extraer de la matriz del cartón ni los clorofenoles ni los cloroanisoles, debido a la baja solubilidad que tienen en el agua (500 mg/L; 10 mg/L y <1mg/L para el TCP, TCA y TeCP respectivamente).
- Por otra parte, si se extrae el cartón con EtOH al 75% (el más adecuado para la buena extracción de los compuestos), hace necesaria una dilución importante de los extractos antes de someterlos al procedimiento HS-SPME/GC-MS, haciendo que la cantidad presente de los compuestos se encuentre por debajo del límite de detección y cuantificación de la técnica.

No se puede confirmar ni la presencia ni la ausencia de estos compuestos en las muestras de cartón interior y exterior, sólo se puede decir que están por debajo de los límites de detección de la técnica analítica seleccionada.

De acuerdo con los datos requeridos por la empresa que facilitó las muestras de cartón, los niveles de aceptación en los extractos obtenidos, en organoclorados, para las cajas de cartón deberían ser: < 0,25 µg/L para el TCP y TeCP y ausencia en el caso del TCA. De hecho, si se toman los límites de cuantificación para la técnica puesta a punto HS-SPME/GC-MS de cada uno de los compuestos, y teniendo en cuenta la cantidad de extractante añadido y la dilución aplicada, se puede informar que:

- En el caso del TCA no pueden cuantificarse cantidades < 1,1 µg/L.
- En el caso del TCP no pueden cuantificarse cantidades < 270,9 µg/L.
- En el caso del TeCP no pueden cuantificarse cantidades < 805,22 µg/L.

Y en el caso de los límites de detección, se obtiene que:

- En el caso del TCA no pueden detectarse cantidades < 0,33 µg/L.
- En el caso del TCP no pueden detectarse cantidades < 81,29 µg/L.
- En el caso del TeCP no pueden detectarse cantidades < 241,59 µg/L.

Por lo tanto, no se puede llegar a los límites de cuantificación deseados para la determinación de estos compuestos en extractos de cartón y papel.

III.3.2. Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a GC/MS de impacto electrónico negativo (NCI)

Si bien la optimización del procedimiento de microextracción HS-SPME/GC-MS durante la realización de este trabajo fin de grado ha sido satisfactoria, y se decidió que cumplía todos los objetivos fijados para el mismo; desde el departamento de Química

Analítica, en concreto desde el Grupo de Análisis Químico de Aromas y Enología (LAE), se nos ofreció la posibilidad de trabajar durante un muy breve espacio de tiempo con un equipo de análisis HS-SPME acoplado a un detector de espectrometría de masas (MS) de impacto electrónico negativo (NCI) muy adecuado para la detección y cuantificación de compuestos organoclorados. Se decidió llevar a analizar los extractos de cartón obtenidos y bajo las condiciones optimizadas en el sistema HS-SPME, para ver si se podían identificar y cuantificar los compuestos de interés (TCA, TCP y TeCP).

Hasta hace bien poco, muchos de los cromatógrafos de gases empleados contaban con un detector de espectrometría de masas con impacto electrónico (EI) para, bombardeando las moléculas de la muestra con electrones, romper la molécula en fragmentos. A partir de esos fragmentos, y basándose en la proporción en la que los fragmentos aparecían, el detector de masas era capaz de dar un espectro de masas a partir del cual se podía identificar un compuesto según la biblioteca de espectros de la que se disponía en el equipo. Pero también existen otras formas de fragmentar los compuestos que salen del cromatógrafo y es mediante la ionización química (CI). En este caso el detector emplea un gas reactivo que se ioniza mediante un bombardeo de electrones. Este gas reactivo, ionizado, entra en contacto con las moléculas que salen del cromatógrafo y tienen lugar fenómenos de transferencias de protones y electrones entre las moléculas del gas reactivo y las de la muestra. Fruto de esa interacción, las moléculas de la muestra terminan ionizadas, por lo que el sistema es capaz de detectarlas debido a su carga. Y al igual que en caso anterior obtener los correspondientes espectros de masas.

A diferencia del detector de masas de impacto electrónico, en el caso de la ionización química, no es la muestra la que es directamente bombardeada por los electrones, fragmentándola, sino que es el gas el que recibe este bombardeo, y luego ioniza a la muestra. Esto se traduce en que muchas veces, en lugar de obtener un espectro de fragmentos como en el impacto electrónico, se obtiene la masa de la molécula completa, ya que ésta no se suele romper, sólo se ioniza.

El espectrómetro de masas por ionización química puede ejecutarse en modo positivo o negativo, siendo el negativo el que presenta una muy alta sensibilidad. En el modo positivo, el gas se somete a impacto electrónico hasta que las moléculas del gas quedan con carga positiva. A partir de ese momento, casi todos los analitos neutros que entran en el detector son capaces de ionizarse y formar iones positivos mediante su interacción con el gas reactivo. Por otro lado, en el modo negativo, el gas se ioniza de tal manera que éste queda cargado negativamente para después crear iones negativos a partir de las moléculas de analito que entren en contacto con él. Sin embargo, hay muy

pocos analitos que sean capaces de ionizarse en un ion negativo, y los que lo hacen requieren de un sistema especial como la ionización de captura electrónica para hacerlo. Incluso con la ionización de captura electrónica, muy pocos compuestos forman iones negativos, por lo que la ionización química negativa tiene un grado de selectividad muy alto que no tienen otros sistemas. Los compuestos capaces de crear iones negativos son, principalmente, aquellos que contienen átomos muy electronegativos, como es el caso de los compuestos halogenados. Por eso, los pesticidas, PCBs y otros compuestos organoclorados, como los de este proyecto, que además por legislación se requiere su cuantificación en cantidades muy pequeñas, son analizados frecuentemente mediante un cromatógrafo de gases con un detector de captura electrónica (Dougherty, 1981).

Los extractos de cartón interior y exterior obtenidos, así como una serie de disolución multipatrón de diferentes concentraciones fueron llevadas al laboratorio para analizar mediante HS-SPME/GC-MS (NCI). Mencionar que no se pudo llevar a cabo ningún tipo de optimización dado que únicamente se dispuso de 3 días de trabajo con el equipo, dada la alta demanda del mismo por parte del grupo de investigación. Únicamente se ajustaron algunos parámetros cromatográficos de acuerdo con trabajos anteriores con compuestos de similares características.

- Los extractos de cartón obtenidos mediante extracción con EtOH al 50% se diluyeron hasta obtener 5 g de extracto al 12,5% de EtOH. Se llevaron a analizar nada más prepararse.
- Los rangos de concentración de las disoluciones multipatrón preparadas en EtOH al 12,5% para calcular las rectas de calibrado fueron: para el TCA de 0,2 a 1,5 ng/g; para el TCP de 0,4 a 3,7 ng/g y para el TeCP de 5,2 a 50,9 ng/g.
- Condiciones sistema HS-SPME: optimizadas anteriormente.
- Condiciones cromatógrafo GC-MS (NCI): columna DB5 (30m x 0,18mm x 0,18 μ m), programa de temperaturas: 50°C durante 2 min, rampa de 10°C/min hasta los 300°C, mantener 2 min. Inyección 5 min modo splitless y luego split 1/10. Detector a 220°C e interfase a 280°C. Adquisición en modo SCAN (de 35 a 320 m/z) y en modo SIM selección de m/z = 35, 37, 79, 81, 174, 176, 194, 198, 200, 262 y 264.

Los resultados obtenidos de estos análisis mostraron que únicamente se podían identificar y cuantificar el TCA y el TCP, en el caso del TeCP se encontraron problemas para su correcta detección, en las condiciones de trabajo fijadas. Sólo se pudieron obtener las rectas de calibrado para el tricloroanisol y triclorofenol, que se muestran en la Tabla 10, junto con los límites de detección y cuantificación calculados.

Tabla 10. Recta de calibrado y límites de detección y cuantificación para análisis HS-SPME/GC-MS (NCI).

Análisis HS-SPME/GC-MS(NCI)			
	pendiente	ordenada	R ²
2,4,6-tricloroanisol (TCA)	9344604,11	1731188,80	0,9759
2,4,6-triclorofenol (TCP)	4936,81	14650,37	0,9465
	TCA	TCP	
Límite de detección (ng/g)	0,01	0,52	
Límite de cuantificación (ng/g)	0,04	1,74	

Puede observarse que los límites de detección y cuantificación disminuyen de manera importante, logrando una mayor sensibilidad en el análisis, tal y como cabía esperar de acuerdo a la técnica instrumental, en concreto a la espectrometría de masas de impacto químico negativo (GC-MS (NCI)).

De acuerdo con los calibrados realizados y el análisis de las muestras de cartón interior y exterior, se obtuvieron los datos que se muestran en la Tala 11. Es importante señalar que los resultados obtenidos corresponden al análisis de una sola réplica de cada uno de los extractos (cartón interior y exterior), ya que durante el periodo de trabajo con el equipo se utilizaron extractos para pruebas cromatográficas y aunque se volvieron a pinchar por haber transcurrido más de 24 h mostraron datos anómalos que corresponden con el fenómeno de adsorción de estos compuestos sobre las paredes de vidrio de los viales que contienen los extractos.

Tabla 11. Resultados análisis cartón interior y exterior mediante HS-SPME/GC-MS (NCI).

Análisis HS-SPME/GC-MS(NCI)			
	Cartón interior	Cartón exterior	Límite
2,4,6-tricloroanisol (TCA)	0,71 µg/g	0,06 µg/g	ausencia
2,4,6-triclorofenol (TCP)	4,23 µg/g	3,57 µg/g	< 0,25 µg/L

Dado que el gramaje de las muestras de cartón es diferente, y por tanto los 12,5 cm² de muestra que se someten a extracción pesan diferente, es importante mostrar los resultados del análisis en ng/g de cartón, quedando los resultados:

	Cartón interior	Cartón exterior
2,4,6-tricloroanisol (TCA)	12,92 ng/g	0,93 ng/g
2,4,6-triclorofenol (TCP)	118,73 ng/g	51,89 ng/g

Para poder informar realmente de la concentración de los tres compuestos de interés en las muestras de cartón habría que llevar a cabo más análisis de extractos (réplicas) así como terminar de optimizar el análisis mediante HS-SPME/GC-MS (NCI), que no se pudo llevar a cabo.

IV. Conclusiones

- Se ha tratado de optimizar un procedimiento para la determinación de 2,4,6-tricloroanisol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,4,6-tetraclorofenol mediante microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) para posterior análisis mediante GC-MS, pero no se ha conseguido la suficiente eficacia y reproducibilidad para su correcta aplicación a muestras de cartón, por lo que se ha descartado su utilización.
- Se ha puesto a punto un procedimiento para la determinación de 2,4,6-tricloroanisol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,4,6-tetraclorofenol mediante microextracción en fase sólida con espacio de cabeza acoplada a cromatografía de gases con detector de masas (HS-SPME/GC-MS) en muestras de cartón.
- Los parámetros optimizados para la aplicación de la metodología HS-SPME han sido la proporción etanol/agua del solvente, temperatura de incubación y adición o no de sal. Los mejores resultados se han obtenido con un 12,5% de etanol en el extracto, una temperatura de incubación de 80°C y con la adición de sal en un 15% en peso.
- Para el análisis mediante HS-SPME/GC-MS se han calculado los límites de detección del 2,4,6-tricloroanisol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,4,6-tetraclorofenol, establecidos en 0,09 ng/g; 22,09 ng/g y 65,64 ng/g, respectivamente.
- Para el análisis mediante HS-SPME/GC-MS se han calculado los límites de cuantificación del 2,4,6-tricloroanisol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,4,6-tetraclorofenol, quedando establecidos en 0,29 ng/g; 73,62 ng/g y 218,81 ng/g, respectivamente.
- El análisis de muestras reales de cartón mediante HS-SPME/GC-MS no ha dado resultado positivo ni en la determinación ni cuantificación del 2,4,6-tricloroanisol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,4,6-tetraclorofenol. Por lo que se puede decir, que las muestras de cartón estudiadas no tienen dichos compuestos o estos se encuentran por debajo de los límites de detección de la técnica instrumental aplicada.

V. Bibliografía

- AESAN.** Documento AESAN-2007-004. *Líneas directrices del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el empleo de papel y cartón obtenido de fibras recicladas de celulosa para estar en contacto con alimentos*, 2007.
- Ahmad W.**, Al-Sibaai A.A., Bashammakh, A.S., Alwael H., El-Shahawi M.S. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2015.
- Allsopp M.W.**, Vianello G., Poly(Vinyl Chloride) in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Ed. Wiley-VCH, 2012.
- Aspapel.** *Informe estadístico 2002*, publicado en 2003.
- Barrett T.H.** *The woman who discovered printing*. Ed. Yale University Press, 2008.
- Brown L.**, et al. *Signos Vitales 2000: Las tendencias que guiarán nuestro futuro*. Vol 1, pp165. Madrid: Bakeaz y Gaia Proyecto 2050, 2000.
- Burger P.** *Charles Fenerty and his paper invention*. Printed in Canada, PB Publishing Inc., 2007.
- Callejon R.M.**, Troncoso A.M., Morales M.L. Analysis for chloroanisoles and chlorophenols in cork by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 71(5):2092-2097, 2007.
- Clark J.D.**, Harris J.W.K. Fire and its roles in early hominid lifeways. *The African Archaeological Review*, 3:3-27, 1985.
- Daniels P.**, Bright W. *The world's writing systems*. Oxford University Press, 1996.
- Directiva 89/109/CEE** del Consejo de 21 de diciembre de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios, 1988.
- Dougherty RC.** Negative chemical ionization mass spectrometry: applications in environmental analytical chemistry. *Biomed. Mass Spectrometry*. 8 (7): 283–292, 1981.
- Domeño C.**, Munizza G., Nerín C. Development of a solid-phase microextraction method for direct determination of pentachlorophenol in paper and board samples: Comparison with conventional extraction method. *Journal of Chromatography A*, 1095(1-2):8-15, 2005.

- Elías X.** *Tratamiento y valorización energética de residuos*. Ediciones Díaz de Santos, 2012.
- Ezquerro O., Pons B., Tena, M.T.** *Journal of Chromatography A*, 999(155–164), 2003.
- EPA.** 2,4,6–trichlorophenol 88-06-2, 2000.
- EPA.** 2,4,5–trichlorophenol 95-95-4, 2000.
- EPA.** pentachlorophenol 87-86-5, 2000.
- Febvre L., Martin H.J.** *The coming of the book: The impact of printing 1450-1800*. Ed. Verso Classics, Reprint edition, 1976.
- Greenpeace.** *Cómo reducir el consumo y optimizar el uso y reciclaje de papel en: Guías para un consumo responsable de productos forestales*, 2004. Consultado en: www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/other/el-papel.pdf
- Haarmann H.** *Geschichte der Schrift* (Historia de la escritura). C.H. Beck, Wissen, 2002.
- Halweil B., Mastny L.** *La situación del mundo 2004*. Informe anual del Worldwatch Institute sobre progreso hacia una sociedad sostenible. © Worldwatch Institute, Icaria Editorial y Fuhem, 2004.
- Hauschild M.** *Risk assessment and life cycle assessment*. Nordic Council of Ministers, pp 39-61, 2000.
- Hinshaw J.** Solid-Phase Microextraction. *GC Connections*. LCGC Europe, 2003.
- Kinsella S., Gleason G., Mills V., Rycroft N., Ford J., Sheehan K., Martin J.** *The state of the paper industry monitoring the indicators of environmental performance. A collaborative report by the Steering Committee of the Environmental Paper Network*. Copyright Environmental Paper Network, 2007.
- Lignum.** Blanqueo de la celulosa: el proceso clave, 2014.
- Maggie L., Mazzoleni V., Furni M.D., Salinas M.R.** Transformation ability of fungi isolated from cork and grape to produce 2,4,6-trichloroanisole from 2,4,6-trichlorophenol. *Food Additives and Contaminants*, 25(03), pp.265-269, 2008.
- Meggs P.B.** *A History of graphic design*. Ed. John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- Murray R.W.** Analytical Chemistry-Then and now. *Analytical Chemistry*, 71:A425, 1999
- Oliveira E.C., Echegoyen Y., Cruz S.A., Nerín C.,** Comparison between solid phase microextraction (SPME) and hollow fiber liquid phase microextraction (HFLPME) for determination of extractables from post-consumer recycled PET into food simulants. *Talanta*, 127(59-67), 2014.

- Pezo D.**, Salafranca J., Nerín C., Development of an automatic multiple dynamic hollow fibre liquid-phase microextraction procedure for specific migration analysis of new active food packagings containing essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1174(85-94), 2007.
- Real Decreto 2814/1983**, de 13 de octubre, *por el que se prohíbe la utilización de materiales poliméricos recuperados o regenerados que hayan de estar en contacto con los alimentos*, 1983.
- Reglamento CE 1935/2004** del Parlamento Europeo y del Consejo, *sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos*, 2004.
- Resolución AP-2002-1**, *Resolución de consejo de europa sobre papel y cartón [ResAP(2002)1] destinados a estar en contacto con alimentos*, 2002.
- Risbrudt C.D.** Wood and Society, in: *Handbook of wood chemistry and wood composites*. Copyright by CRC Press LLC, 2005.
- Rossberg M.**, et al. *Chlorinated hydrocarbons in Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Ed. Wiley-VCH, 2006a.
- Rossberg M.**, et al. *Insect control in Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*. Ed. Wiley-VCH, 2006b.
- Sasson Y.** *Formation of carbon-halogen bonds (Cl, Br, I) in patai's chemistry of functional groups*. Ed. Wiley-VCH, 2009.
- Sauer C.O.** Seashore primitive home of man? *Proceedings of the American Philosophical Society*, 106:41-7, 1962.
- SCA Publication Papers**, *Fabricación de papel*. Ed. Tryckeribolaget, 2010.
- Skoog D.**, West D., Holler F. *Fundamentos de Química Analítica*. Ed. Reverte, 1996.
- Su-Fen Y**, Ze-Hua L, Hai-Xian L, Chuangtao Y, Qing L, Hua Y, Zhi, D. Simultaneous determination of estrogenic odorant alkylphenols, chlorophenols, and their derivatives in water using online headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19):19116-19125, 2016.
- SUPELCO**. Guide to Solid Phase Extraction. *Bulletin 910*, 1998.
- SUPELCO**. Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions. *Bulletin 923*, 1998.

Tong L.D., Guo L.X., Lv X.J., Li Y. Modification of polychlorinated phenols and evaluation of their toxicity, biodegradation and bioconcentration using three-dimensional quantitative structure-activity relationship models. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 71(1-12), 2017.

Universidad de Murcia. Seminario de Espectrometría de masas para usuarios del SUIC, 2010. Consultado en agosto del 2017 en:
(http://www.um.es/documents/1765772/1843567/sic_seminario_em_usuarios_2010.pdf/).

Universidad del estado de Iowa. Mass Spectrometry Tutorial. Consultado en agosto del 2017 en:
(<http://www.cif.iastate.edu/mass-spec/ms-tutorial>)