



Memoria do Traballo de Fin de Máster

Estudio de compuestos orgánicos en grados EVA farmacológicos mediante técnicas de cromatografía de gases. Conformidad con la normativa USP 661.1

Estudo de compostos orgánicos en graos EVA farmacolóxicos mediante técnicas de cromatografía de gases. Conformidade coa normativa USP 661.1

Study of organic compounds in pharmacological EVA grades by gas chromatography techniques. Conformity with USP 661.1 regulation

Jacobo Boga Barbeito

Julio de 2023

**Tutores: Manuel Becerra Fernández
Piedad Curiel Camino**



Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña

Repsol Technology Lab

Estudio de compuestos orgánicos en grados EVA farmacológicos mediante técnicas de cromatografía de gases. Conformidad con la normativa USP 661.1

Estudo de compostos orgánicos en graos EVA farmacolóxicos mediante técnicas de cromatografía de gases. Conformidade coa normativa USP 661.1

Study of organic compounds in pharmacological EVA grades by gas chromatography techniques. Conformity with USP 661.1 regulation

**Jacobo
Boga
Barbeito**
Firmado digitalmente por
Jacobo Boga
Barbeito
Fecha:
2023.07.05
07:22:08 +02'00'

Jacobo Boga Barbeito

A Coruña, julio de 2023

Dr. Manuel Becerra Fernández y Piedad Curiel Camino en calidad de tutores de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

**BECERRA
FERNANDEZ
Z MANUEL -
32820909R**
Firmado digitalmente por BECERRA FERNANDEZ MANUEL - 32820909R
Fecha: 2023.07.05
10:20:44 +02'00'

Manuel Becerra Fernández

(Tutor académico)

**Piedad
Curiel**
Digitally signed by Piedad Curiel
Date: 2023.07.06
11:08:11 +02'00'

Piedad Curiel Camino

(Tutora de empresa)

Abreviaturas.

ÁA: ácido acético

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

CAR: carboxeno

DDS: sistemas de administración de fármacos

DVB: divinilbenceno

EI: ionización por impacto electrónico

EVA: etileno vinil acetato

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FID: detector de ionización de llama

GC: cromatografía de gases

HDPE: polietileno de alta densidad

HETP: altura equivalente de plato teórico

HS: espacio de cabeza

ICI: Imperial Chemical Industries

IF: índice de fluidez

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

IV: intravenosa

LCB: ramificación de cadena larga

LDPE: polietileno de baja densidad

LLDPE: polietileno lineal de baja densidad

MS: espectrometría de masas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: poliacrilato

PDMS: polidimetilsiloxano

PE: polietileno

PEG: polietilenglicol

PLOT: columna capilar de capa porosa

PVC: policloruro de vinilo

ROP: polimerización por apertura en anillo

SCB: ramificación de cadena corta

SCOT: columna capilar de soporte recubierto

SPME: microextracción en fase sólida

TOC: carbono orgánico total

USP: Farmacopea de los Estados Unidos

VA: acetato de vinilo

WCOT: columna capilar de pared recubierta

Índice.

1. Introducción.....	1
1.1. Polímeros.....	1
1.1.1. Origen e historia de la ciencia de polímeros.....	1
1.1.2. Tipos de polímeros y polimerizaciones.....	2
1.1.3. Estructura y propiedades de los polímeros.....	3
1.1.4. Distribución de masas molares y masa molar promedio.....	5
1.2. Polietileno.....	7
1.2.1. Caracterización básica del polietileno.....	7
1.2.2. Estructura y propiedades del polietileno.....	8
1.3. Etileno vinil acetato.....	9
1.3.1. Naturaleza, propiedades y aplicaciones del etileno vinil acetato.....	9
1.3.2. Métodos de fabricación del etileno vinil acetato.....	11
1.3.3. Etileno vinil acetato en la industria médica y farmacéutica.....	14
1.4. Farmacopea.....	15
1.5. Cromatografía de gases.....	16
1.5.1. Conceptos básicos de la cromatografía de gases.....	16
1.5.2. Instrumentación en cromatografía de gases.....	19
1.5.3. Detector de espectrometría de masas.....	20
1.6. Microextracción en fase sólida.....	21
2. Objetivos.....	22
3. Material y métodos.....	23
3.1. Extracción de compuestos orgánicos.....	23
3.2. Método de SPME-GC-MS.....	23
3.2.1. Análisis GC-MS.....	23
3.2.2. Procedimiento de SPME.....	25
3.2.3. Optimización de parámetros de SPME.....	25
3.2.4. Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos.....	27
3.3. Método de HS-GC-FID.....	28
3.3.1. Análisis GC-FID.....	28
3.3.2. Condiciones de HS.....	28
3.3.3. Identificación y cuantificación de acetato de vinilo y ácido acético residuales.....	28
4. Resultados y discusión.....	29
4.1. Método de SPME-GC-MS.....	29
4.1.1. Comparación de diferentes fibras de SPME.....	29

4.1.2. Optimización de la concentración de NaCl.....	30
4.1.3. Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos.....	31
4.2. Método de HS-GC-FID.	34
4.2.1. Identificación y cuantificación de acetato de vinilo y ácido acético residuales.	34
5. Conclusiones.....	35
6. Bibliografía.....	36
7. Anexos.....	I
7.1. Comparación de diferentes fibras de SPME.	I
7.2. Optimización de la concentración de NaCl.	III
7.3. Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos por SPME-GC-MS.....	V
7.3.1. Patrón de n-tridecano.	V
7.3.2. Muestra JCG23002.....	VI
7.3.3. Muestra JCG23003.....	VII
7.3.4. Muestra JCG23004.....	VIII
7.3.5. Muestra JCG23005.....	IX
7.3.6. Muestra JCG23006.....	X
7.3.7. Muestra JCG23007.....	XI
7.3.8. Muestra JCG23008.....	XII
7.3.9. Muestra JCG23009.....	XIII
7.3.10. Muestra JCG23010.....	XIV
7.4. Identificación y cuantificación de acetato de vinilo y ácido acético residuales por HS-GC-FID.	XIX
7.4.1. Patrón de acetato de vinilo y ácido acético.	XIX
7.4.2. Muestra JCG23002.....	XX
7.4.3. Muestra JCG23003.....	XX
7.4.4. Muestra JCG23004.....	XXI
7.4.5. Muestra JCG23005.....	XXI
7.4.6. Muestra JCG23006.....	XXII
7.4.7. Muestra JCG23007.....	XXII
7.4.8. Muestra JCG23008.....	XXIII
7.4.9. Muestra JCG23009.....	XXIII
7.4.10. Muestra JCG23010.....	XXIV

Resumen.

El etileno vinil acetato (EVA) es el copolímero de etileno con mayor volumen de mercado, resultado de la copolimerización radicalaria aleatoria entre monómeros de etileno y acetato de vinilo (VA). El aumento del contenido de VA en la composición final reduce la cristalinidad del copolímero y mejora propiedades como la flexibilidad, la claridad óptica o la resistencia al impacto. Entre las múltiples aplicaciones del EVA, en las últimas décadas, destaca su contribución a la innovación en campos como la terapia celular y la liberación controlada de fármacos.

En este trabajo se aplican dos métodos analíticos para determinar los compuestos orgánicos presentes en diferentes grados EVA que no cumplen las especificaciones de la USP 661.1, microextracción en fase sólida combinada con cromatografía de gases-espectrometría de masas (SPME-GC-MS) y espacio de cabeza combinado con cromatografía de gases con detector de ionización de llama (HS-GC-FID). Se comparan tres tipos de recubrimientos de fibra de SPME y el efecto de la adición de NaCl en la eficacia de la extracción. El método de SPME-GC-MS optimizado, con una inmersión directa de la fibra en las disoluciones acuosas de muestra durante 60 min a 40 °C bajo agitación (250 rpm) y una desorción térmica a 250 °C durante 5 min, permite la identificación y cuantificación de un amplio espectro de compuestos orgánicos, destacando el tolueno por ser el único presente en todas las muestras. Para determinar el contenido de acetato de vinilo y ácido acético residuales se aplica el método optimizado de HS-GC-FID (incubación de la muestra a 120 °C durante 40 min sin agitación), obteniéndose concentraciones que no muestran correlación aparente con el porcentaje teórico de VA en los grados EVA. Adicionalmente, se proponen cambios en el proceso de producción industrial de EVA para reducir la presencia de estos compuestos en el producto final.

Palabras clave: polímero, etileno vinil acetato, microextracción en fase sólida, espacio de cabeza, cromatografía de gases.

Resumo.

O etileno vinil acetato (EVA) é o copolímero de etileno con maior volume de mercado, resultado da copolimerización radicalaria aleatoria entre monómeros de etileno e acetato de vinilo (VA). O aumento do contido de VA na composición final reduce a cristalinidade do copolímero e mellora propiedades como a flexibilidade, a claridade óptica ou a resistencia ao impacto. Entre as múltiples aplicacións do EVA, nas últimas décadas, destaca a súa contribución á innovación en campos como a terapia celular e a liberación controlada de fármacos.

Neste traballo aplícanse dous métodos analíticos para determinar os compostos orgánicos presentes en diferentes graos EVA que non cumpren as especificacións da USP 661.1, microextracción en fase sólida combinada con cromatografía de gases-espectrometría de masas (SPME-GC-MS) e espazo de cabeza combinado con cromatografía de gases con detector de ionización de chama (HS-GC-FID). Compáranse tres tipos de recubrimentos de fibra de SPME e o efecto da adición de NaCl na eficacia da extracción. O método de SPME-GC-MS optimizado, cunha inmersión directa da fibra nas disolucións acuosas de mostra durante 60 min a 40 °C baixo axitación (250 rpm) e unha desorción térmica a 250 °C durante 5 min, permite a identificación e cuantificación dun amplo espectro de compostos orgánicos, destacando o tolueno por ser o único presente en todas as mostras. Para determinar o contido de acetato de vinilo e ácido acético residuais aplícase o método optimizado de HS-GC-FID (incubación da mostra a 120 °C durante 40 min sen axitación), obténdose concentracións que non mostran correlación aparente coa porcentaxe teórica de VA nos graos EVA. Adicionalmente, propóñense cambios no proceso de produción industrial de EVA para reducir a presenza destes compostos no produto final.

Palabras clave: polímero, etileno vinil acetato, microextracción en fase sólida, espazo de cabeza, cromatografía de gases.

Abstract.

Ethylene vinyl acetate (EVA) is the largest volume ethylene copolymer on the market, resulting from random radical copolymerization between ethylene monomers and vinyl acetate (VA). Increasing the VA content in the final composition reduces the crystallinity of the copolymer and improves properties such as flexibility, optical clarity and impact resistance. Among the many applications of EVA, in recent decades, its contribution to innovation in fields such as cell therapy and controlled drug release stands out.

In this work, two analytical methods are applied to determine the organic compounds present in different EVA grades that do not meet the specifications of USP 661.1, solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS) and headspace combined with gas chromatography with flame ionization detector (HS-GC-FID). Three types of SPME fiber coatings and the effect of NaCl addition on extraction efficiency are compared. The optimized SPME-GC-MS method, with a direct immersion of the fiber in the aqueous sample solutions for 60 min at 40 °C under agitation (250 rpm) and thermal desorption at 250 °C for 5 min, allows the identification and quantification of a broad spectrum of organic compounds, with toluene standing out as the only one present in all samples. To determine the content of residual vinyl acetate and acetic acid, the optimized HS-GC-FID method (incubation of the sample at 120 °C for 40 min without agitation) is applied, obtaining concentrations that show no apparent correlation with the theoretical percentage of VA in the EVA grades. Additionally, changes in the industrial production process of EVA are proposed to reduce the presence of these compounds in the final product.

Keywords: polymer, ethylene vinyl acetate, solid-phase microextraction, headspace, gas chromatography.

1. Introducción.

1.1. Polímeros.

1.1.1. Origen e historia de la ciencia de polímeros.

Los polímeros han existido en la naturaleza desde el comienzo de la vida, teniendo algunos de ellos, como el ADN, el ARN, los polisacáridos o las proteínas, un papel crucial en el desarrollo de la vida animal y vegetal. No obstante, los orígenes de la actual industria de polímeros se remontan al siglo XIX, con la aparición de importantes descubrimientos en la modificación de ciertos polímeros naturales. En 1820, Thomas Hancock descubre que, tras someter el caucho natural a altas fuerzas de cizallamiento de forma repetida, este se vuelve más fluido, lo que facilita tanto su moldeo como su mezcla con aditivos. Unos años más tarde, Charles Goodyear descubre que las propiedades elásticas de este material pueden mejorarse calentándolo con azufre, proceso conocido como vulcanización. En 1851, Nelson Goodyear patenta la vulcanización del caucho natural con gran cantidad de azufre para producir un material de mayor dureza denominado caucho duro, vulcanita o ebonita (Young & Lovell, 2011).

Otro polímero que adquiere notoriedad en la época es el nitrato de celulosa, preparado por primera vez en 1846 por Christian Schönbein. Este compuesto, a pesar de su valor comercial como explosivo, contribuye al crecimiento de la industria de los polímeros debido a su naturaleza de material duro, elástico, soluble y moldeable en diferentes formas mediante aplicación de presión y calor. En 1870, John e Isaiah Hyatt patentan un material similar al nitrato de celulosa, denominado celuloide, más fácil de procesar, preparado con alcanfor como plastificante. Todos estos materiales se clasifican como polímeros semisintéticos, ya que se producen a partir de polímeros de origen natural. No es hasta principios del siglo XX que aparecen los primeros polímeros totalmente sintéticos: las resinas de fenol-formaldehído o baquelita de Leo Baekeland. El primer caucho sintético, conocido como caucho metílico, se fabrica en Alemania a partir de 2,3-dimetilbutadieno durante la Primera Guerra Mundial (Young & Lovell, 2011).

A día de hoy, los polímeros sintéticos presentan gran variedad de aplicaciones en envases, materiales de revestimiento, embalajes, aislamiento de cables, vidrios orgánicos, calzado, piezas de automóvil, etc. Puesto que las propiedades de estos plásticos pueden modificarse mediante la incorporación de cargas, aditivos químicos y agentes de refuerzo, también desatacan en ingeniería como unidades mecánicas sometidas a tensión, piezas eléctricas,

componentes de alta fricción o unidades resistentes al calor y a productos químicos (Chanda & Roy, 2008). Asimismo, los polímeros sintéticos constituyen la base de multitud de dispositivos médicos y farmacéuticos como implantes ortopédicos, catéteres, materiales de sutura, tubos de diálisis o *carriers* para la administración de fármacos (Hacker et al., 2018).

1.1.2. Tipos de polímeros y polimerizaciones.

Los polímeros son sustancias compuestas por macromoléculas que poseen largas secuencias de una o más especies de átomos o grupos de átomos unidos entre sí mediante enlaces primarios, generalmente covalentes. A pesar de que las palabras polímero y macromolécula suelen utilizarse indistintamente, la segunda hace referencia estricta a las moléculas de las que se compone la primera. Estas macromoléculas se forman por la unión de un gran número de moléculas de tamaño mucho menor denominadas monómeros. El proceso por el que se combinan se conoce como polimerización (Odian, 2004; Young & Lovell, 2011).

La clasificación original de los polímeros en base a su estructura, realizada por Carothers en 1929, divide a estas sustancias en polímeros de condensación y polímeros de adición, en función de la diferencia de composición entre el polímero y el/los monómero/s a partir de los cuales se sintetiza. Los polímeros de condensación son aquellos formados a partir de monómeros polifuncionales por medio de reacciones de condensación química en las que se eliminan pequeñas moléculas, como agua, alcoholes o ácido clorhídrico. Ejemplos de este tipo de polímeros incluyen: las poliamidas generadas a partir de diaminas y diácidos, con eliminación de agua, los poliésteres formados a partir de diácidos y dioles, con eliminación de agua, o los policarbonatos obtenidos por reacción de un compuesto dihidroxi aromático con fosgeno, con eliminación de cloruro de hidrógeno. A su vez, algunos polímeros naturales como la celulosa, la lana, el almidón o la seda también se clasifican como polímeros de condensación. La celulosa puede considerarse el poliéter resultante de la deshidratación de la glucosa (Odian, 2004; Hacker et al., 2018).

Contrariamente, los polímeros de adición son aquellos que se producen por la reacción entre monómeros sin pérdida de moléculas pequeñas. En estos casos, la unidad repetitiva que conforma el polímero presenta la misma composición que el monómero. Los principales monómeros que originan este tipo de polímeros suelen contener dobles enlaces carbono-carbono en su estructura, reaccionando consigo mismos mediante la conversión de dichos enlaces en enlaces saturados. Otra forma de clasificar los polímeros es en base a los grupos químicos presentes en sus cadenas. Así, polímeros cuyas unidades repetitivas están unidas

mediante enlaces tipo éster, amina, éter, uretano o sulfuro se consideran polímeros de condensación, mientras que en los polímeros de adición estos grupos funcionales solo aparecen como sustituyentes en la cadena (Odian, 2004).

En cuanto a las reacciones de polimerización, estas se clasifican, dependiendo del proceso químico de formación de la cadena polimérica, en polimerizaciones en cadena y polimerizaciones por etapas. Los polímeros con un esqueleto carbono-carbono, como las poliolefinas, suelen seguir un mecanismo de crecimiento en cadena. Este tipo de polimerizaciones constan de tres etapas: iniciación, propagación y terminación, produciéndose el crecimiento de la cadena polimérica por la adición, generalmente a gran velocidad, de monómeros al extremo activo de la misma. Dependiendo de la naturaleza del centro reactivo de la cadena en propagación, las reacciones de crecimiento pueden subdividirse en radicalarias, iónicas (aniónicas y catiónicas) o medidas por metales de transición (Hacker et al., 2018). En la polimerización por etapas, propia de polímeros que poseen heteroátomos en su cadena principal, la masa molar del polímero aumenta lentamente mediante la reacción de dos especies moleculares cualesquiera (monómeros, oligómeros o cadenas poliméricas). Un tercer tipo de crecimiento, la polimerización por apertura en anillo (ROP), también permite producir polímeros con heteroátomos en su cadena. Este mecanismo suele emplearse para síntesis de poliéteres, como los polietilenglicoles (PEGs), de poliaminas y de la mayor parte de poliésteres biodegradables (Odian, 2004; Hacker et al., 2018).

1.1.3. Estructura y propiedades de los polímeros.

Aunque existe gran variedad de macromoléculas que poseen una estructura esquelética lineal representada por una cadena con dos extremos, bajo ciertas condiciones de reacción o determinados tipos de monómeros, la estructura polimérica puede variar notablemente (Figura 1). Los polímeros cíclicos o polímeros en anillo no tienen extremos de cadena y presentan propiedades muy diferentes a sus homólogos lineales. Los polímeros ramificados tienen cadenas laterales de longitud variable, conocidas como ramificaciones, que se unen a la cadena polimérica principal en puntos de ramificación o de unión. El cambio más significativo que provocan estas ramificaciones en las propiedades del material es una disminución en su cristalinidad. Cuando se producen polímeros en los que las moléculas están conectadas entre sí mediante puntos de unión distintos de sus extremos, se dice que los polímeros están reticulados. Esta reticulación puede producirse durante el proceso de

polimerización, mediante el uso de monómeros apropiados, o tras la polimerización, mediante diversas reacciones químicas que permiten unir cadenas preexistentes. Los polímeros reticulados se caracterizan por su densidad o grado de reticulación, que está directamente relacionado con el número de puntos de unión por unidad de volumen. En el momento en el que la reticulación es lo suficientemente elevada, se origina una estructura tridimensional o polímero en red en el que todas las cadenas se unen entre sí para formar una molécula de gran tamaño. Estas variaciones en la estructura del esqueleto polimérico dan lugar a importantes diferencias en las propiedades. Así, por ejemplo, grados de reticulación bajos se utilizan para conferir propiedades elásticas a los polímeros, mientras que grados de reticulación altos aportan rigidez y estabilidad al material (Odian, 2004; Young & Lovell, 2011). Actualmente, existe gran interés por la obtención de nuevas macromoléculas con formas esqueléticas más elaboradas. Entre ellas destacan los dendrímeros, polímeros muy ramificados con masa molar y estructura bien definidas, y los polímeros hiperramificados, similares a los dendrímeros, pero con masa molar y estructura mucho menos definidas (Young & Lovell, 2011).

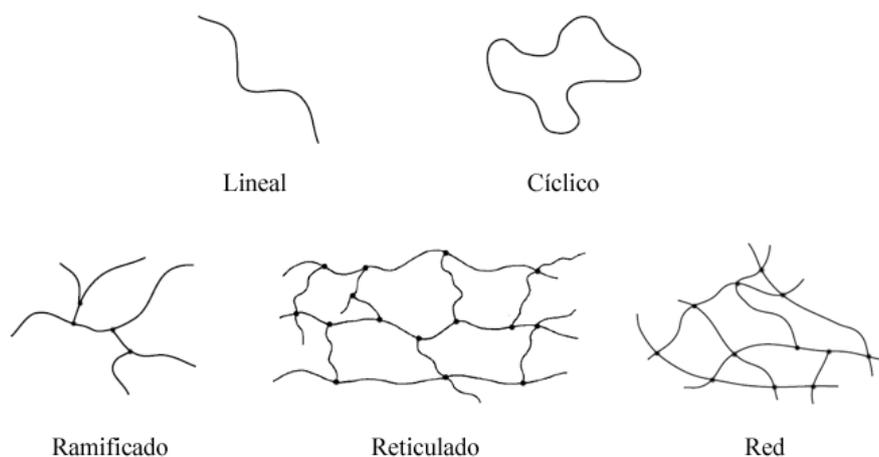


Figura 1. Representación de las principales estructuras esqueléticas de los polímeros. (Extraída de Young & Lovell, 2011).

Teniendo en cuenta la estructura molecular subyacente de los polímeros, estos pueden dividirse en tres grupos: termoplásticos, elastómeros y termoestables, separándose los primeros en cristalinos y amorfos (los términos “cristalino” y “amorfo” hacen referencia a las regiones ordenadas y desordenadas de un polímero, respectivamente). Los termoplásticos se definen como polímeros lineales o ramificados que pasan a estado líquido al aplicar calor. A día de hoy, suponen, con diferencia, el mayor porcentaje de la producción comercial total de polímeros, debido a su capacidad de moldearse en prácticamente cualquier forma por

técnicas de procesamiento como la extrusión o el moldeo por inyección. En general, los termoplástico no cristalizan fácilmente al enfriarse, ya que para ello es necesario un ordenamiento importante de las macromoléculas altamente enredadas en el estado líquido. Aquellos que sí cristalizan lo hacen para formar materiales semicristalinos con regiones tanto cristalinas como amorfas. Las fases cristalinas de este tipo de polímeros se caracterizan por su temperatura de fusión (T_m), por encima de la cual el material se procesa con facilidad. A su vez, las fases amorfas se caracterizan por su temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura a la que pasan rápidamente de un estado duro (vítreo) a un estado blando o gomoso. Por debajo de la T_g las cadenas poliméricas son incapaces de moverse, permaneciendo fijas en su posición. El aumento de las fuerzas intermoleculares y la rigidez de las cadenas supone un incremento de la T_m y la T_g (Young & Lovell, 2011).

Los elastómeros son polímeros reticulados de tipo gomoso con la capacidad de estirarse fácilmente bajo tensión hasta alcanzar grandes extensiones y de recuperar sus dimensiones originales cuando dicha tensión cesa. Esta propiedad es un reflejo de su estructura polimérica, en la que la red molecular presenta un bajo grado de reticulación. Las cadenas se extienden al deformarse, pero su reticulación impide que fluyan permanentemente, devolviéndolas a la posición original. Una vez formados, los elastómeros se degradan con la aplicación de calor. Finalmente, los polímeros termoestables son, en su mayoría, materiales rígidos en los que el movimiento de las cadenas se encuentra muy restringido por su alto grado de reticulación (Young & Lovell, 2011).

1.1.4. Distribución de masas molares y masa molar promedio.

Muchas propiedades y aplicaciones de los polímeros dependen en gran medida del tamaño de sus cadenas, por lo que resulta fundamental caracterizar sus dimensiones. Para ello, suele utilizarse la masa molar (M), que se corresponde con la masa de 1 mol de polímero expresada en unidades de $g \cdot mol^{-1}$ o $kg \cdot mol^{-1}$. El término “peso molecular” también se emplea a menudo, sin embargo, este puede inducir a error, ya que hace referencia a la relación entre la masa media por unidad de fórmula de una sustancia y la doceava parte de la masa de un átomo de carbono-12 y es adimensional. Multiplicando el valor numérico del peso molecular por las unidades $g \cdot mol^{-1}$ se obtiene el valor equivalente de masa molar (Odian, 2004; Young & Lovell, 2011). La mayor parte de aplicaciones prácticas de los polímeros requieren una masa molar elevada para conseguir mayores resistencias. Los polímeros que presentan fuertes enlaces intermoleculares entre sus cadenas, como poliésteres y poliamidas,

desarrollan suficiente resistencia para ser útiles a masas molares muy inferiores a las de los polímeros con fuerzas intermoleculares más débiles, como el polietileno.

A diferencia de los compuestos de pequeño tamaño, los polímeros son heterogéneos o polidispersos en sus masas molares y, aunque se sintetizan libres de contaminantes e impurezas, siguen sin ser sustancias puras en el sentido comúnmente aceptado. Dado que la masa molar varía en intervalos de M_0 (masa molar de la unidad repetitiva), su distribución es discontinua. Sin embargo, estos intervalos, en la mayoría de polímeros, son considerablemente pequeños en comparación con el intervalo total de masa molar y se puede suponer una distribución continua (Figura 2).

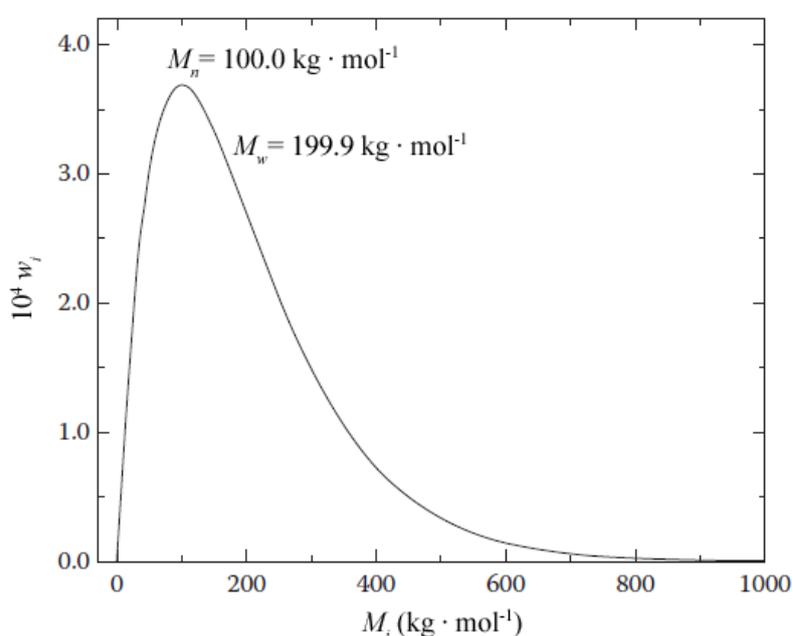


Figura 2. Curva de distribución de masas molares de un polímero. Masa molar de la unidad repetitiva de $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. (Extraída de Young & Lovell, 2011).

Aunque el estudio de la distribución de masas molares resulta esencial para muchos usos de los polímeros, también es conveniente caracterizar los materiales en términos de promedios de masa molar. Estos se definen teniendo en cuenta la naturaleza discontinua de la distribución, en la que las macromoléculas del polímero existen en fracciones i que contienen N_i moléculas de masa molar M_i . De esta forma, la masa molar promedio en número (\bar{M}_n) se define como el sumatorio de los productos de la masa molar de cada fracción multiplicada por su fracción molar, de acuerdo con la ecuación (1):

$$\bar{M}_n = \sum X_i \cdot M_i = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} \quad (1)$$

donde X_i es la fracción molar de moléculas con masa molar M_i que vienen dado por la relación entre N_i y el número total de moléculas.

En ocasiones es más conveniente emplear fracciones de peso en lugar de número de moléculas. La fracción w_i representa la masa de moléculas que poseen una masa molar M_i dividida por la masa total de todas las moléculas del polímero, según la ecuación (2):

$$w_i = \frac{N_i \cdot M_i}{\sum N_i \cdot M_i} \quad (2)$$

La masa molar promedio en peso (\bar{M}_w) se define, pues, como el sumatorio de los productos de la masa molar de cada fracción multiplicada por su fracción en peso (3).

$$\bar{M}_w = \sum w_i \cdot M_i \quad (3)$$

Combinando esta ecuación con la ecuación (2), es posible expresar la masa molar promedio en peso en términos de número de moléculas (4).

$$\bar{M}_w = \frac{\sum N_i \cdot M_i^2}{\sum N_i \cdot M_i} \quad (4)$$

La relación M_w/M_n , conocida como índice de heterogeneidad o polidispersidad, es superior a la unidad en polímeros polidispersos. Su valor se emplea como medida de la amplitud de la distribución de masas molares y, normalmente, se sitúa entre 1.5 y 2.0. No obstante, existen muchos polímeros con valores menores o mucho mayores de índice de polidispersidad. Por definición, un polímero perfectamente monodisperso tendrá un M_w/M_n igual a la unidad. La razón de esta heterogeneidad en los polímeros reside en las variaciones estadísticas propias de los procesos de polimerización. Así pues, tanto la masa molar promedio como la distribución exacta de masas molares son necesarias para caracterizar correctamente un polímero (Young & Lovell, 2011).

1.2. Polietileno.

1.2.1. Caracterización básica del polietileno.

El polietileno (PE) es el polímero con la estructura más sencilla de todos y supone, a día de hoy, el plástico de mayor tonelaje disponible a nivel global. Entre sus principales atractivos

se encuentran, además de su bajo precio, sus excelentes propiedades de aislante eléctrico, buena procesabilidad, gran resistencia química, flexibilidad, tenacidad y cierto grado de transparencia. Aunque el PE se define como un polímero de adición, a lo largo de los años también se han sintetizado polímeros con fórmula $(\text{CH}_2)_n$ por medio de reacciones de condensación (Ronca, 2017). Comúnmente, las resinas de PE se clasifican en base a su índice de fluidez (IF) y su densidad. Mientras que el IF es indicativo de la procesabilidad y masa molar de la resina, la densidad se utiliza como medida de la cristalinidad, la cual influye en la rigidez y el comportamiento ante impactos del producto final. Modificando los tipos de catalizadores y comonómeros empleados en los procesos de fabricación pueden obtenerse diversos homopolímeros y copolímeros de etileno (Patel, 2016).

La historia comercial del PE comienza con el descubrimiento accidental del polietileno de baja densidad (LDPE) por *Imperial Chemical Industries* (ICI) en 1933, derivado de los estudios con etileno a altas presiones y temperaturas. En 1939, ICI construye su primera planta de LDPE empleando un reactor autoclave. Poco después, la empresa alemana BASF desarrolla un reactor tubular para conseguir una mayor conversión de etileno por pasada y, con ello, mayores índices de producción de LDPE. Hasta 1954, todo el PE se produce mediante procesos de alta presión, dando lugar a materiales ligeramente ramificados y con \bar{M}_n moderada. En ese año aparecen dos nuevas rutas, una que utiliza un catalizador de óxido metálico soportado sobre sílice/alúmina (proceso Phillips) y otra basada en compuestos de metales de transición combinados con alquilos de aluminio y materiales similares (proceso Ziegler-Natta). La principal ventaja de estos procesos es que permiten obtener polímeros a temperaturas y presiones más bajas y con una estructura modificada, dando origen a los conocidos como polietilenos de alta densidad (HDPEs), más duros y con mayor densidad. A finales de los años setenta se introducen los polietilenos lineales de baja densidad (LLDPEs), copolímeros de etileno y α -olefinas basados en la tecnología catalítica Ziegler-Natta, cuya estructura y propiedades resultan intermedias entre las de los materiales de baja y alta presión. El último gran hito tecnológico en el campo del PE se produce en la década de 1990, con la introducción de resinas de PE catalizadas por metalloceno. Actualmente, el PE sigue constituyendo más de un tercio del mercado global de termoplásticos (Patel, 2016; Ronca, 2017).

1.2.2. Estructura y propiedades del polietileno.

El PE es, en esencia, un hidrocarburo alifático de tipo $(CH_2)_n$. Los LDPEs y LLDPEs son sólidos blanquecinos, translúcidos y bastante flexibles, mientras que los HDPEs son sólidos blancos, opacos y con mayor rigidez. Teniendo en cuenta que la T_g está asociada al movimiento de cadenas poliméricas en la materia amorfa y que el PE se trata de un polímero semicristalino, este parámetro no tiene gran importancia física. Mayor relevancia presenta la T_m , generalmente situada en el rango 108-132 °C. Estos valores tan bajos son consecuencia de una estructura del PE basada en enlaces carbono-carbono flexibles y de la ausencia de fuerzas intermoleculares fuertes. Gran parte de la resistencia de este material se debe a que la cristalización hace posible un empaquetamiento molecular estrecho (Whiteley, 2012; Ronca, 2017).

Tanto el nivel de ramificación de cadena corta (SCB), *in situ* o resultado de la incorporación de comonómeros, como el nivel de ramificación de cadena larga (LCB) controlan la densidad/cristalinidad del PE. Estas ramificaciones interfieren en el proceso de cristalización dando lugar a una menor densidad (se reduce el empaquetamiento molecular), menor opacidad (se impide el crecimiento de grandes estructuras cristalinas) y menor T_m , dureza superficial y límite elástico. Contrariamente, en el caso de los copolímeros polares de etileno, a medida que aumenta el porcentaje de comonómero disminuye la cristalinidad, pero la densidad aumenta. Esto se debe a que los grupos polares voluminosos incrementan la densidad de la fase amorfa y, en consecuencia, la densidad global del polímero (aunque la cristalinidad sea menor). Otro aspecto sobre el cual actúan las ramificaciones son las propiedades de fluidez. Así, polímeros no ramificados poseen viscosidades mucho más elevadas que los polímeros ramificados con \bar{M}_w similar. Cuanto mayor es la masa molar, más entrecruzamientos se producen entre las moléculas y, como resultado, la viscosidad es mayor (Patel, 2016). Con todo, en la actualidad existen cientos de grados de PE con propiedades diferentes, siendo las principales variables el grado de SCB y LCB, la masa molar promedio, la distribución de masas molares, la presencia de pequeñas cantidades de comonómeros y la presencia de impurezas o residuos de polimerización, algunos de los cuales se combinan con el propio PE.

1.3. Etileno vinil acetato.

1.3.1. Naturaleza, propiedades y aplicaciones del etileno vinil acetato.

El etileno vinil acetato (EVA) representan el copolímero de etileno con mayor volumen de mercado y es el resultado de la copolimerización radicalaria aleatoria entre los monómeros

etileno y acetato de vinilo (VA) en una proporción determinada (Figura 3). En sus inicios, la fabricación de EVA utiliza bajos volúmenes de comonómero VA, obteniéndose polietileno modificado. No es hasta finales de los años cincuenta que la gama de EVAs se amplía significativamente, llegando a convertirse en el copolímero con el espectro de aplicaciones más amplio de todos los polímeros sintéticos (Henderson, 1993).

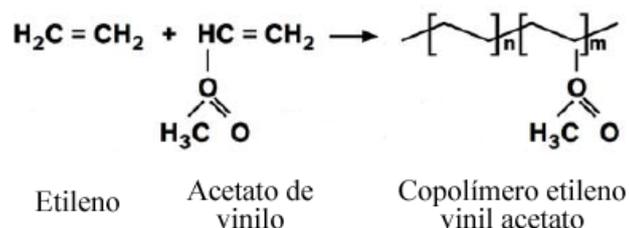


Figura 3. Estructura química del copolímero EVA y sus monómeros. (Extraída de Camacho Adrianza, 2015).

La presencia de VA altera las regiones cristalinas formadas por el PE. Los PEs de alta y media densidad suelen presentar un grado de cristalización del orden de 40-65%. Al aumentar el contenido de VA, esta cristalinidad se reduce progresivamente hasta que, entre el 40% y 55% en peso de VA, el material se vuelve completamente amorfo. De este modo, variando el porcentaje de comonómero VA en la composición final se obtienen EVAs con características muy diferentes, desde termoplásticos hasta productos similares a la goma. La reducción de cristalinidad origina la aparición de una T_g , reduce la T_m y mejora propiedades como la flexibilidad, la claridad óptica, el coeficiente de fricción, la resistencia al impacto y la resistencia a las fisuras por tensión y flexión. No obstante, el EVA presenta menor dureza, resistencia química (generalmente), temperatura de termosellado y propiedades dieléctricas que los homopolímeros de PE. Por otra parte, la naturaleza polar de las moléculas de VA confiere polaridad al EVA, originando copolímeros más receptivos a las cargas de relleno y con mayor capacidad de combinación con resinas polares, plastificantes y adhesivos (Henderson, 1993; Camacho, 2015). El EVA es térmicamente inestable a temperaturas superiores a los 220 °C, por lo que debe procesarse cuidadosamente para evitar su descomposición en ácido acético.

Otro atributo estructural a tener en cuenta es la ya mencionada distribución de masas molares. El aumento del contenido de VA incrementa la transferencia de cadena (reacción mediante la cual la actividad de una cadena polimérica en crecimiento se transmite a una nueva molécula), pudiendo conducir a una distribución de masas molares más amplia. Como en el resto de polímeros, el ensanchamiento de la distribución de masas molares en el EVA

afecta a sus características de fluidez. Los copolímeros EVA con una distribución de masas molares ancha tienen una viscosidad relativamente alta a esfuerzos de cizallamiento bajos, mientras que bajo un esfuerzo de cizallamiento elevado, estos fluyen más fácilmente que los polímeros con una distribución de masas molares estrecha. Además del efecto sobre la viscosidad, la masa molar también influye en propiedades como el incremento de la resistencia al impacto, la resistencia a la rotura por tracción, la resistencia a fisuras por estrés ambiental o la disminución de la solubilidad. En cuanto al efecto de las ramificaciones de cadena corta, estas alteran la cristalinidad de las fracciones de PE al igual que el contenido de VA. Por su parte, las ramificaciones de cadena larga influyen en el copolímero aumentando la elasticidad del fundido (Henderson, 1993).

Las principales aplicaciones de los copolímeros EVA son: *film* de envasado, capas de coextrusión, adhesivos, moldeo y extrusión, aislamiento de cables y alambres, espumas y láminas de amortiguación acústica. El EVA con alto contenido de VA se suele utilizar en aplicaciones adhesivas (> 20% de VA), mientras que los copolímeros con bajo contenido de VA tienen mayor uso en *films* (< 20% de VA), extrusión y moldeo por inyección (10-30% de VA). Aquellos EVAs con un contenido muy reducido de VA (3% de VA) son considerados como una modificación del LDPE. Respecto al IF, a medida que este aumenta, el copolímero EVA incrementa su flexibilidad y disminuye su estabilidad térmica, dureza y resistencia a la tracción. Por este motivo, los grados EVA con un IF alto son más apropiados para el moldeo por inyección, llenando las cavidades del molde y solidificándose rápidamente. Por el contrario, en los procesos de extrusión, se prefieren grados con un IF bajo que otorguen resistencia al polímero fundido antes de su solidificación. Algunos usos finales de los EVAs resultantes de los procesos de moldeo y extrusión incluyen: mangueras y tubos flexibles, juguetes y artículos deportivos, elementos de calzados, componentes de alambres y cables, juntas de cierre, tapones y piezas de automoción (Camacho, 2015). El EVA también tiene un papel relevante en la industria de los módulos fotovoltaicos, donde cumple funciones de aislamiento físico y eléctrico, soporte estructural y conducción térmica en las células fotovoltaicas.

1.3.2. Métodos de fabricación del etileno vinil acetato.

El copolímero EVA puede fabricarse mediante tres procesos diferentes: polimerización en emulsión, polimerización en solución y polimerización en masa a alta presión. Aquellos EVAs con un contenido de VA superior al 70% en peso se preparan, mayoritariamente, por

procesos de polimerización en emulsión a presiones de 30 bares a 500 bares y temperaturas de 20 °C a 100 °C. Por lo general, el polímero no se aísla de la dispersión resultante, sino que se utiliza directamente en forma de dispersión acuosa (látex) para su posterior transformación, vendiéndose como emulsiones o resinas gomosas destinadas a la mezcla con otras resinas (Camacho, 2015). El EVA con bajo contenido de VA (hasta el 30% en peso) se produce económicamente mediante polimerización en masa. Al presentar un contenido de VA bajo, los copolímeros tienen la cristalinidad propia del PE a temperatura ambiente y son de carácter termoplástico. En la práctica se utilizan dos tipos de reactores para este proceso: un reactor de tanque agitado continuo o un reactor tubular continuo. Los cocientes de reactividad de los monómeros empleados pueden afectar a la uniformidad del copolímero final, especialmente en los reactores tubulares, en los cuales resulta complicado alimentar y mezclar los comonómeros a lo largo de todo el reactor durante el transcurso de la reacción. Un reactor de agitación continua con mezcla de extremo a extremo permite conseguir esta uniformidad. No obstante, dado que los cocientes de reactividad del etileno y VA se acercan a la unidad, los copolímeros producidos son aleatorios y su composición no varía mucho a medida que avanza la reacción y se consumen los monómeros (ambos al mismo ritmo). Tanto los monómeros como los iniciadores se introducen en el reactor a presiones de 1000 bares a 3000 bares. Esta reacción de polimerización en masa es fuertemente exotérmica, por lo que la temperatura debe mantenerse entre 150 °C y 250 °C para evitar posibles descomposiciones violentas y explosivas. Para ello, se añaden agentes de transferencia de cadena como alcanos, olefinas o cetonas y se modifica la velocidad de adición del iniciador. A mayores, el aumento del contenido de VA en la alimentación influye en las dinámicas del reactor disminuyendo la temperatura (Henderson, 1993; Chien et al., 2007; Shin et al., 2023).

La técnica de polimerización en solución se utiliza, principalmente, para producir EVA con un contenido de VA del 20-50 % en peso. Este método es similar al de polimerización en masa ya que también implica una compresión de los monómeros, una polimerización mediante iniciador de radicales libres, como peróxidos orgánicos o azocompuestos, y la separación de los monómeros del copolímero resultante. Sin embargo, requiere los pasos adicionales de recuperación y eliminación de disolventes, en los cuales permanecen los polímeros durante todo el proceso de polimerización. Entre los disolventes más empleados se encuentra benceno, tolueno, mezclas de butanol terciario y agua y ésteres. Las condiciones de presión y temperatura son inferiores a las de la polimerización en masa, con valores de 200 bares a 700 bares y de 30 °C a 150 °C, respectivamente. Los productos obtenidos por

este método son copolímeros de alta masa molar, ligeramente ramificados y con contenidos de VA que, en ocasiones, pueden llegar al 75 % en peso (Henderson, 1993). Pese a que, por motivos de confidencialidad, se desconoce la fabricación de EVA por parte de Repsol Química S.A., teniendo en cuenta el contenido de VA de los grados, resulta lógico incluirla dentro de la categoría de polimerización en solución o polimerización en masa a alta presión. A continuación se comenta más detalladamente un ejemplo de polimerización en solución a nivel industrial (Kuraray Company) (Figura 4).

El proceso consta de dos etapas principales: copolimerización del etileno y VA en un disolvente alcohólico y recuperación del VA sin reaccionar. Inicialmente, una corriente que contiene etileno, VA y metanol se introduce en el reactor de polimerización (R1). El metanol, utilizado como disolvente, se desoxida previamente mediante burbujeo de nitrógeno para que su concentración de oxígeno no sea superior a 1 ppm. En el reactor, la temperatura de polimerización se establece entre 50 °C y 80 °C, y la presión de la fase gaseosa (etileno) entre 20 bares y 80 bares, empleando 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) como agente iniciador. Bajo estas condiciones, se obtiene un grado de EVA con contenido de VA del 30-80% en peso. Seguidamente, se adiciona un inhibidor de polimerización (β -mirceno) a la solución que contiene el copolímero EVA y el gas etileno sin reaccionar se evapora de la solución en un tanque *flash* (S1), extrayéndose a través de su parte superior. La solución de reacción, extraída de forma continua a través de la parte inferior del reactor, se introduce en una torre de destilación tipo *bubble cap* (C1) rellena de anillos de Raschig, con el fin de extraer el VA sin reaccionar de la solución de copolímero. Un vapor del disolvente alcohólico (en este caso metanol) se insufla continuamente en la torre de destilación a través de la parte inferior de la misma. El VA sin reaccionar se extrae de la torre por la parte superior, junto con parte del metanol, mientras que la solución de copolímero EVA se extrae por la parte inferior. A continuación, la solución mezcla extraída de la torre de destilación a través de la parte superior (VA y metanol) se pasa a otra columna de tratamiento (C2) en la que el VA se separa del resto de la mezcla mediante destilación extractiva con agua y se extrae aislado de una solución disolvente alcohol/agua. Para finalizar, separando y purificando esta mezcla alcohol/agua en (C3) se puede recuperar un disolvente alcohólico. Tanto el VA sin reaccionar como el disolvente alcohólico recuperado se reutilizan en la reacción de copolimerización. Adicionalmente, el disolvente recuperado se reutiliza en la recuperación de VA (C2) (Camacho, 2015).

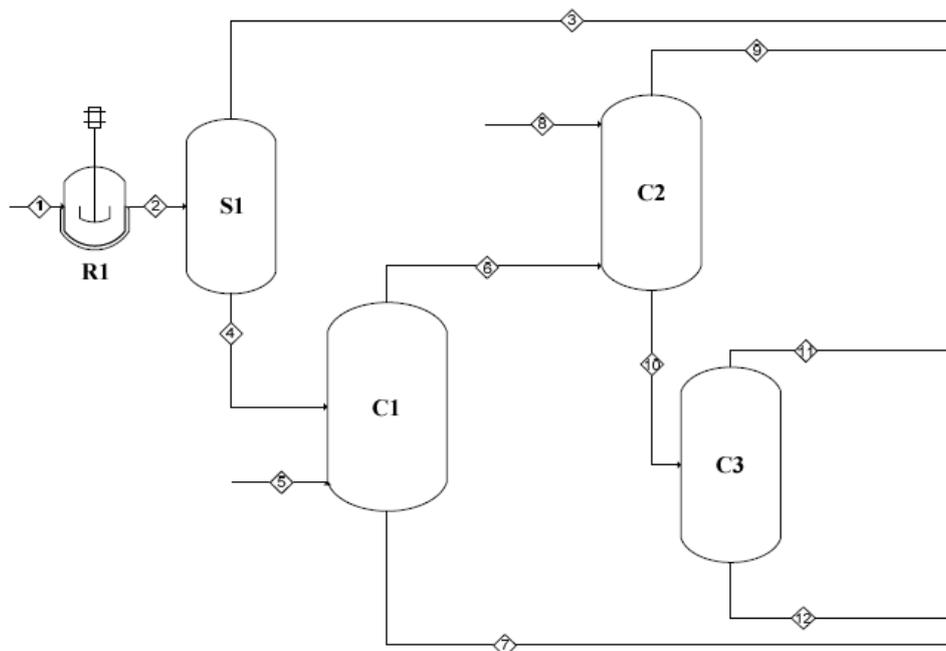


Figura 4. Diagrama del proceso de producción industrial del copolímero EVA mediante polimerización en solución. (Extraída de Camacho Adrianza, 2015).

1.3.3. Etileno vinil acetato en la industria médica y farmacéutica.

La industria farmacéutica y la industria de dispositivos médicos desarrollan nuevos productos enfocados a mejorar la atención del paciente y la calidad de vida en general. El EVA se utiliza en ambos sectores desde hace años y ha supuesto un importante impulsor de la innovación. A día de hoy y de cara al futuro, el copolímero EVA destaca en campos emergentes como la terapia celular o la liberación controlada de productos biológicos.

1.3.3.1. Terapia intravenosa.

La mayor parte de la terapia intravenosa (IV) está orientada a la administración de cloruro sódico, cloruro potásico, nutrientes o sacarosa. En torno al 80% de los pacientes hospitalizados reciben algún tipo de terapia IV. En 1950, el doctor Carl Walter inventa la bolsa médica de plástico, que sustituye a los frascos de vidrio utilizados en la época, reduciendo las roturas y el peso durante el transporte y facilitando la manipulación durante situaciones urgentes o de peligro. Inicialmente, estas bolsas se fabrican con policloruro de vinilo (PVC), sin embargo, en los años setenta y ochenta, se empiezan a buscar nuevas alternativas debido a que el plastificante ftalato, utilizado habitualmente en la producción de PVC, migran a los fluidos nutricionales contenidos en las bolsas IV. El EVA ofrece la ventaja de tener una gran flexibilidad sin la necesidad de incorporar plastificantes

(aumentando el contenido de comonomero VA), además de una excelente transparencia y biocompatibilidad (Reyes, 2014).

1.3.3.2. Terapia con células madre.

Los investigadores y profesionales médicos almacenan las células madre en condiciones criogénicas (temperaturas de $-156\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) para que estén disponibles en el momento que se necesiten. Entre los diferentes polímeros utilizados para estos contenedores de almacenamiento, el copolímero EVA es el de mayor uso. Como ya se ha comentado anteriormente, es posible modificar la flexibilidad y T_g del EVA variando el contenido de VA. Así, para grados con un alto contenido de VA, se puede conseguir una T_g del material de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que proporciona buen rendimiento a baja temperatura y alta claridad del contenedor. Al no ser necesario añadir aditivos para controlar las propiedades del polímero se reduce el riesgo de migración de sustancias al contenido almacenado. A mayores, el EVA se esteriliza con facilidad mediante radiación gamma, habitualmente utilizada para la esterilización de bolsas de crioconservación (Reyes, 2014).

1.3.3.3. Sistemas de administración de fármacos.

Los primeros estudios sobre la incorporación de moléculas bioactivas en polímeros sólidos para conseguir un perfil de liberación continuo se realizan en las décadas de 1950 y 1960. A pesar de que, desde entonces, se han investigado multitud de polímeros diferentes para su uso en sistemas de administración de fármacos (DDS), solo unos pocos presentan propiedades adecuadas para la liberación de una amplia gama de fármacos, incluidas proteínas y enzimas. El EVA destaca en este campo por su amplia aplicabilidad, sus características inflamatorias favorables y sus largos tiempos de liberación continuada. Además, es un copolímero hidrófobo que no requiere el uso de disolventes o plastificantes para la administración del fármaco y que ofrece mayores tasas de liberación a medida que aumenta su contenido de VA (con el consiguiente incremento de contenido amorfo). Su biocompatibilidad está bien estudiada, con datos que incluyen citotoxicidad, genotoxicidad, irritación, toxicidad intracutánea y toxicidad sistémica grave. En consecuencia, el EVA se utiliza en gran variedad de vías de administración, como parches dérmicos, implantes subcutáneos o anillos intravaginales, y aplicaciones comerciales, como los anticonceptivos NuvaRing®, Progestesert®, Implanon® y Nexplanon® (Reyes, 2014; Genina et al., 2016; Schneider et al., 2017).

1.4. Farmacopea.

Una farmacopea es una recopilación, jurídicamente vinculante, de normas y especificaciones de calidad para los medicamentos utilizados en una región o país. Dentro de la farmacopea, una especificación de calidad constituye un conjunto de pruebas adecuadas para confirmar la identidad y pureza del producto y determinar la potencia de la sustancia activa y sus características de funcionamiento. La farmacopea abarca, además, las materias primas farmacéuticas, los excipientes, los productos intermedios y los productos acabados. También puede recoger requisitos generales sobre temas relacionados con la calidad de los medicamentos, como los métodos analíticos, las pruebas de disolución, la estabilidad o la pureza microbiológica. Estas especificaciones son necesarias para el correcto funcionamiento y el control reglamentario de la producción de fármacos (Thomson, 2013).

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) es un organismo privado formado por 300 delegados que representan a asociaciones y facultades de medicina, farmacia y enfermería (a nivel estatal y nacional), a la industria y a organismos del gobierno federal. Esta farmacopea, constituida en 1900, tiene como objeto establecer normas para los productos sanitarios de Estados Unidos y recopilar y difundir información sobre el uso de los mismos a consumidores y proveedores. Cada cinco años, la USP publica normas revisadas para multitud de medicamentos en *The United States Pharmacopeia* y *The National Formulary*. Estas normas son de obligado cumplimiento por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y son reconocidas como oficiales por el gobierno americano. Las normas incluyen especificaciones sobre potencia, pureza, calidad, envasado y etiquetado de los medicamentos. La USP también proporciona estándares de referencia oficiales para fármacos, probados y controlados en sus propios laboratorios (Council on Health Care Technology, 1988). En comparación con las farmacopeas nacionales y regionales, la Farmacopea Internacional (Ph. Int.) se publica por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con la intención de proporcionar normas internacionales para su adopción por los estados miembros y ayudar a lograr una uniformidad global de las especificaciones de calidad de productos farmacéuticos.

1.5. Cromatografía de gases.

1.5.1. Conceptos básicos de la cromatografía de gases.

La invención de la cromatografía de gases (GC) se suele atribuir a A.T. James y A.J.P. Martin en su trabajo seminal de 1952, en el que reportan la separación de ácidos grasos volátiles por cromatografía de partición utilizando gas nitrógeno como fase móvil y una fase

estacionaria de aceite de silicona/ácido esteárico soportada sobre tierra de diatomeas. Rápidamente, se descubre que la GC es una técnica sencilla y aplicable a la separación de numerosos compuestos volátiles, especialmente productos petroquímicos, separados en aquella época por procesos de destilación. La industria petrolera adapta esta técnica para el análisis composicional de sus materiales, con importantes investigaciones de Shell y British Petroleum a la cabeza. En las décadas posteriores, la GC se expande a muchos otros campos de aplicación, sobre todo bioquímicos, incluyendo el análisis de aminoácidos, alimentos, productos naturales y aromas. Destaca, también, el crecimiento exponencial de la GC de columna capilar en los años ochenta (Bartle & Myers, 2002; McNair et al., 2019).

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la cromatografía es “un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida”. En la GC, la muestra vaporizada es transportada por la fase móvil gaseosa o gas portador a través de la columna. Las muestras se dividen/equilibrán dentro y fuera de la fase estacionaria líquida en función de su solubilidad a la temperatura de trabajo. Los componentes de estas muestras, denominados analitos, se separan unos de otros según sus presiones de vapor relativas y su afinidad por la fase estacionaria. El uso de un gas como fase móvil exige que el sistema esté contenido y no presente fugas, lo que se consigue gracias a la ya mencionada columna cromatográfica, un tubo de vidrio o metal en cuyo interior se encuentra la fase estacionaria. Los analitos que tienen una mayor distribución en la fase móvil avanzan por la columna más rápidamente que aquellos que tienen mayor distribución en la fase estacionaria y que, en consecuencia, pasan más tiempo en ella. La relación entre la masa de analito en la fase estacionaria y la masa en la fase móvil proporciona el factor de retención (k), una de las variables cromatográficas más relevantes. Finalmente, los componentes de la muestra abandonan la columna, pasando por el detector y generando una señal de salida que da lugar al cromatograma (McNair et al., 2019).

La tendencia de un analito dado a ser atraído por la fase estacionaria se expresa en términos químicos como una constante de equilibrio denominada constante de distribución o coeficiente de reparto (K_c). Cuanto mayor es el valor de esta constante, mayor es la atracción hacia la fase estacionaria, proporcionando, así, un valor numérico de la sorción total del analito sobre (adsorción) o en (absorción) la fase estacionaria. La K_c es un parámetro termodinámico que depende fuertemente de la temperatura y sus diferencias afectan a las

velocidades de migración de los componentes a través de la columna. En la Figura 5 se muestra un cromatograma típico de un único analito (B), con un pequeño pico adicional al principio del mismo. El analito, retenido en la columna, se puede caracterizar por su tiempo de retención o volumen de retención (t_R o V_R , respectivamente). Ambos valores están representados en la Figura 5 como la distancia desde el punto de inyección hasta el pico máximo del analito. El t_R se entiende como el tiempo necesario para que el analito eluya de la columna, mientras que el V_R representa el volumen de gas portador necesario para hacerlo eluir, suponiendo un caudal constante (F_c) (McNair et al., 2019).

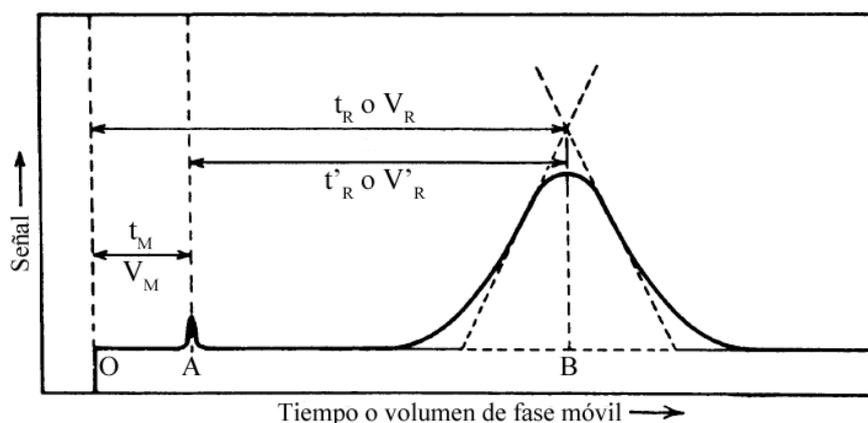


Figura 5. Representación idealizada del cromatograma de un analito B. (Extraída de McNair et al., 2019).

El pequeño pico inicial representa un analito que no queda retenido en la fase estacionaria. Según la definición ofrecida por la IUPAC, el volumen muerto (V_M) es “el volumen de fase móvil necesario para eluir el compuesto no retenido de la columna cromatográfica, reportado a temperatura de columna y presión ambiente”, el parámetro de tiempo análogo, tiempo muerto (t_M) es “el tiempo necesario para que la fase móvil pase a través de la columna cromatográfica”. En GC, suele utilizarse aire como componente de no retención, por lo que, en ocasiones, se conoce al pico A de la Figura 5 como pico de aire.

Para expresar la eficiencia de una columna cromatográfica para separar componentes es necesaria una medida de la anchura del pico que sea relativa al tiempo de retención del mismo, ya que la anchura aumenta con el tiempo de retención. La medida más común para esto es el número de platos teóricos (N) (5):

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (5)$$

donde t_R es el tiempo de retención, W_b la anchura del pico en la base y $W_{1/2}$ la anchura del pico a media altura. Los diferentes términos se deben a que la medición de la desviación estándar (σ) puede hacerse a diferentes alturas en el pico. Así, en la base es 4σ , por lo que la constante numérica es 16, mientras que a media altura es 2.354σ y la constante pasa a ser 5.54.

El parámetro N es adimensional y valores grandes de N se corresponden con una columna eficiente. En un cromatograma con muchos picos, los valores de N para picos individuales pueden variar en función de la precisión de las mediciones. Otro parámetro relacionado que también sirve para expresar la eficiencia de una columna es la altura de plato (H) (6):

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

donde L es la longitud de la columna. H tiene unidades de longitud y resulta más adecuada que N para comparar eficiencias de columnas con diferente longitud. También recibe el nombre de altura equivalente de plato teórico (HETP). Una columna deseable debe tener una H pequeña y una N grande (McNair et al., 2019).

1.5.2. Instrumentación en cromatografía de gases.

Todos los cromatógrafos de gases cuentan con los mismos componentes básicos: suministro de un gas portador, controlador de flujo, puerto de inyección o entrada de muestra, columna cromatográfica (en el interior de un horno), detector y sistema de registro de datos. El gas portador, por ejemplo helio, fluye de forma continua a través de la entrada, la columna y el detector. El caudal de dicho gas se controla cuidadosamente para asegurar tiempos de retención reproducibles y minimizar el ruido y la deriva del detector. La muestra, inyectada y vaporizada en la entrada, se transporta hacia la columna, que suele ser una columna capilar de 15-30 m de longitud recubierta en su interior con una fina capa de fase estacionaria (líquido de elevado punto de ebullición). Como ya se ha comentado, la muestra se reparte entre las fases móvil y estacionaria separándose en componentes individuales. Tras pasar por la columna, el gas portador y la muestra llegan a un detector. Este dispositivo mide la cantidad de muestra generando una señal eléctrica que se envía al sistema de datos para obtener el cromatograma. Generalmente, el sistema de datos integra el área del pico de forma automática, realiza los cálculos necesarios y crea un informe con resultados cuantitativos y tiempos de retención (McNair et al., 2019).

Las primeras columnas cromatográficas consisten en tubos metálicos rellenos de soportes inertes recubiertos con fase estacionaria líquida. A día de hoy, las columnas más populares son las denominadas columnas capilares, tubos de sílice fundida abiertos con dimensiones de 10-100 m de longitud y 0.1-0.53 mm de diámetro interno. Estas columnas pueden ser de tres tipos básicos: de pared recubierta (WCOT), de soporte recubierto (SCOT) y de capa porosa (PLOT). En las WCOT la fase estacionaria recubre la superficie interna de la pared capilar con espesores de 0.1 μm a 5 μm (Figura 6a). Las SCOT contienen una capa de soporte sólido adsorbente, como Celite®, recubierta de fase estacionaria líquida (Figura 6c), mientras que las PLOT consisten en una capa porosa de adsorbente sólido, como alúmina o Porapak® (Figura 6b). Estas dos últimas columnas pueden contener más fase estacionaria y poseen mayor capacidad de muestras que las WCOT. Adicionalmente a las columnas capilares, existen las columnas empaquetadas. Este tipo de columna suele tener 1-2 m de longitud y 0.2-0.4 cm de diámetro interno y está rellena de partículas formadas por un soporte sólido recubierto con fase estacionaria (Figura 6d) (McNair et al., 2019).

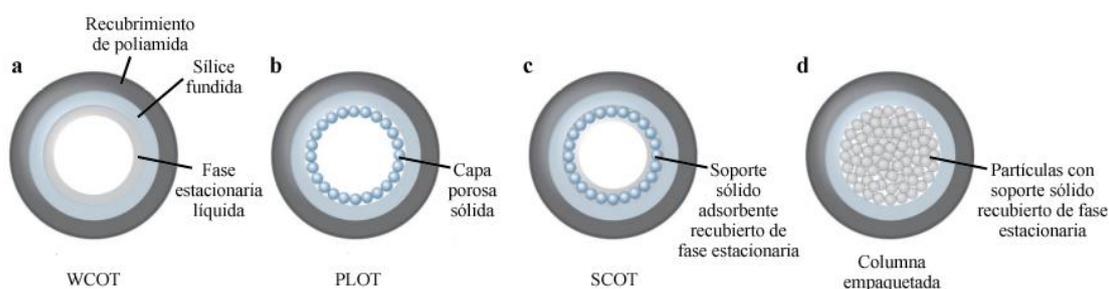


Figura 6. Representación de las columnas cromatográficas (a) WCOT, (b) PLOT, (c) SCOT y (d) empaquetada. (Extraída de Granger et al., 2017).

1.5.3. Detector de espectrometría de masas.

La cromatografía combinada con diversas técnicas de detección constituye uno de los métodos analíticos más ampliamente utilizados y con mayor rendimiento. Entre ellos, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (MS) suma las ventajas de la cromatografía (eficacia de separación y gran selectividad) y las de la espectrometría de masas (información estructural y aumento de la selectividad), al tiempo que resulta relativamente sencilla de aplicar. La MS es una técnica analítica que mide con precisión las masas moleculares de moléculas y átomos individuales convirtiéndolos en iones cargados. Permite deducir la estructura de la molécula de interés y está cualificada para ofrecer información cuantitativa de un analito a niveles de especificidad y sensibilidad estructural excepcionalmente elevados. Así pues, la MS supone una de las técnicas más completas y

versátiles de las que disponen actualmente los químicos y bioquímicos (Károly, 2001; Chhabil, 2007).

Las mediciones por MS tratan con iones cargados ya que su movimiento y dirección son más fácilmente manipulables que en el caso de las especies neutras. En los análisis por MS se diferencian tres procesos básicos: ionización, que convierte las moléculas o átomos en especies iónicas en fase gas (el exceso de energía transferido durante el proceso de ionización rompe la molécula en fragmentos característicos), separación y análisis de masas de los iones moleculares y fragmentos en función de sus relaciones masa/carga (m/z) y medición de la corriente de iones, que se amplifica y se muestra en forma de un espectro de masas (gráfico de los valores m/z de todos los iones que llegan al detector frente a sus abundancias). Los dos primeros procesos se realizan en condiciones de alto vacío, permitiendo a los iones moverse libremente sin colisionar ni interactuar con otras especies. Estas colisiones pueden llevar a la fragmentación de los iones moleculares e incluso a la aparición de especies diferentes a través de reacciones ion-molécula, lo que aumenta la ambigüedad de las mediciones y reduce la sensibilidad y resolución (Chhabil, 2007). Los componentes esenciales de un espectrómetro de masas son los siguientes: un sistema de entrada, transfiere la muestra a la fuente de iones, una fuente de ionización, convierte las moléculas neutras en iones en fase gas (técnicas de ionización electrónica e ionización química), un analizador de masas, separa y analiza las masas de las especies iónicas empleando campos magnéticos y/o eléctricos para controlar el movimiento de los iones (cuadrupolo, tiempo de vuelo, sector magnético, trampa de iones, etc.), un detector, mide y amplifica la corriente electrónica, un sistema de datos, registra, procesa, almacena y muestra los resultados, y un sistema de vacío, mantiene el equipo a presiones muy bajas (valores de 10^{-4} torr a 10^{-8} torr en la fuente de ionización y alrededor de 10^{-8} torr en el analizador de masas). El alto nivel de especificidad molecular, la disponibilidad de diversas técnicas de ionización y la sensibilidad de detección hacen que la MS desempeñe un papel fundamental en casi todos los campos de la ciencia (Karasek & Clement, 1988; Chhabil, 2007).

1.6. Microextracción en fase sólida.

La técnica más utilizada de muestreo con microextracción en fase sólida (SPME) consiste en la exposición de una fibra de sílice fundida recubierta con una pequeña cantidad de fase estacionaria (fase extractora) a una muestra acuosa o gaseosa durante un tiempo predeterminado, hasta que se establece el equilibrio entre el analito en la muestra y en la

fibra. Tanto en muestras acuosas como gaseosas, el coeficiente de reparto (K_{fs}) se define como $K_{fs} = C_f^\infty / C_s^\infty$, siendo C_f^∞ la concentración de equilibrio del analito en la fase estacionaria y C_s^∞ la concentración de equilibrio del analito en la muestra. La cantidad de analito extraída se corresponde directamente con su concentración en la matriz, independientemente del volumen de muestra analizado. Durante el proceso de extracción, la concentración de analito en la fibra aumenta rápidamente al principio y se va ralentizando hasta alcanzar el equilibrio tras un cierto tiempo. Este tiempo de equilibrio es proporcional al cuadrado del espesor de la fase estacionaria e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del analito en la fibra. Condiciones como la temperatura, el pH, la concentración de sales o el contenido de disolventes orgánicos afecta al K_{fs} (Prosen & Zupančič-Kralj, 1999; Pawliszyn, 2012).

Existen tres modos principales de extracción mediante SPME: extracción directa, extracción por espacio de cabeza (HS) y extracción con membrana protectora. En la extracción directa, la fibra se introduce en la muestra y los analitos se transportan directamente desde la matriz a la fase estacionaria. Para transportar los analitos hasta las proximidades de la fibra y conseguir una extracción más rápida es necesario un cierto nivel de agitación (en el caso de muestras gaseosas, la convección natural del aire es suficiente para alcanzar un equilibrio rápido). En el muestreo de espacio de cabeza, la fibra se introduce en el espacio de cabeza situado por encima de la matriz acuosa, extrayéndose solo los analitos relativamente volátiles. Este modo de muestreo resulta ventajoso para muestras con interferencias de alto peso molecular. Finalmente, en el caso de muestras con analitos de interés no volátiles e interferencias de alto peso molecular, la SPME protegida por membrana permite mayor precisión y reproducibilidad. Siendo el cromatógrafo de gases el instrumento analítico más utilizado con SPME, una vez realizada la extracción de los analitos, estos se desorben de la fibra a altas temperaturas en el puerto de inyección y se analizan por GC (Pawliszyn, 2012).

En las últimas décadas, las aplicaciones orgánicas en las que se utiliza la SPME con mayor frecuencia incluyen: análisis farmacológico y toxicológico de fluidos corporales, análisis de ingredientes de alimentos y bebidas y análisis de pesticidas y otros contaminantes en muestras ambientales (Prosen & Zupančič-Kralj, 1999).

2. Objetivos.

- Extracción de compuestos orgánicos presentes en grados EVA de aplicación farmacológica.

- Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos en grados EVA por medio de SPME-GC-MS.
- Identificación y cuantificación de acetato de vinilo y ácido acético residuales en grados EVA por medio de HS-GC-FID.
- Estudio de los compuestos orgánicos de mayor concentración en los grados EVA. Origen y medidas para reducir su presencia.
- Estudio de la conformidad de los grados EVA con las exigencias recogidas en la USP 661.1.

3. Material y métodos.

3.1. Extracción de compuestos orgánicos.

De acuerdo con la normativa 661.1 de la USP, se realiza una extracción con agua de los diferentes grados EVA objeto de estudio (Tabla 1). Para ello, se introducen aproximadamente 25 g de material EVA, en formato granza, en un matraz de fondo redondo de 1000 ml. A continuación, se añaden 500 ml de agua ultrapura Milli-Q y se calienta a reflujo durante 4 h con agitación magnética (120 °C y 830 rpm). La disolución de extracción obtenida se deja enfriar en un baño de agua a baja temperatura y se filtra a vacío empleando un filtro de vidrio sinterizado. El filtrado se recoge en un matraz aforado de 500 ml y se diluye con agua ultrapura Milli-Q hasta volumen. La disolución final se utiliza dentro de las 4 h posteriores a su preparación.

Tabla 1. Grados EVA seleccionados. Se muestran los diferentes lotes de producción y la referencia interna asignada a cada muestra.

Grado EVA	Lote	Ref. muestra
HVA18G	VA-06481	JCG23002
HVA18G1	VK-14412	JCG23003
HVA28G1	VE-06441	JCG23004
HVA18G	VA-06461	JCG23005
HVA18G	VA-09481	JCG23006
HVA18G	VD-11461	JCG23007
HVA18G1	VK-19411	JCG23008
HVA28G2	TK-23441	JCG23009
HVA08G	TT-27463	JCG23010

3.2. Método de SPME-GC-MS.

3.2.1. Análisis GC-MS.

Los análisis cromatográficos se ejecutan en un cromatógrafo de gases Agilent 8890 GC System (Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con un inyector *split/splitless* y conectado a un espectrómetro de masas Agilent 5977B GC/MSD (Santa Clara, CA, EE.UU.) (Figura 7). Para la separación de los analitos se selecciona una columna capilar Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert con polietilenglicol (PEG) como fase estacionaria (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm de espesor de fase). El puerto de inyección se mantiene a 250 °C y 9.146 psi, operando en modo *splitless*. El programa de temperaturas del horno es el siguiente: temperatura inicial de 40 °C (mantenida durante 4 min), aumento hasta 90 °C a 12 °C · min⁻¹ y aumento final hasta 250 °C a 20 °C · min⁻¹ (mantenida durante 2 min), con un *post run* de 4 min a 200 °C. El tiempo total de análisis es, por tanto, de 22 min para cada muestra. Se utiliza helio (99.99%) como gas portador a un caudal constante de 1.2 ml · min⁻¹.



Figura 7. Fotografía del cromatógrafo de gases Agilent 8890 GC System (derecha) conectado a un espectrómetro de masas Agilent 5977B GC/MSD (izquierda). En la parte superior del equipo se observa un muestrador automático Combi PAL RTC 120 de CTC Analytics.

El espectrómetro de masas funciona en modo de ionización por impacto electrónico (EI) con una energía de electrones de 70 eV. Las temperaturas de la fuente de iones, el cuadrupolo y la línea de transferencia se fijan en 230 °C, 150 °C y 230 °C, respectivamente. El rango de masas escaneado es de 50-550 m/z en modo de adquisición de barrido completo (frecuencia

2.9 scans \cdot s⁻¹) y el voltaje del multiplicador de electrones se ajusta de forma automática en 1109 V. Adicionalmente, el equipo de GC-MS cuenta con un muestreador automático Combi PAL RTC 120 de CTC Analytics (Zwingen, Suiza) con módulos intercambiables para SPME, HS e inyección líquida.

3.2.2. Procedimiento de SPME.

Para la extracción de los analitos disueltos en agua se utiliza el módulo SPME del muestreador automático Combi PAL con la fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μ m de Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.). Previa a su aplicación inicial, la fibra se acondiciona según las recomendaciones del fabricante, calentándola a 270 °C durante 0.5 h en la estación de acondicionamiento del muestreador Combi PAL. Tras el preacondicionamiento, se realiza un ensayo en blanco de la fibra (vial vacío) para confirmar la ausencia de picos cromatográficos correspondientes a compuestos introducidos por la misma. El procedimiento de SPME adoptado es el siguiente: en primer lugar, se preparan 3 viales de 10 ml de la disolución de extracción obtenida a partir de la grana de material EVA (3 réplicas de cada grado EVA a estudiar), para comprobar el efecto de la fuerza iónica en la eficacia de la extracción se preparan otros 3 viales de 10 ml de la disolución de extracción con 50 g \cdot l⁻¹, 100 g \cdot l⁻¹ y 150 g \cdot l⁻¹ de NaCl (Sigma-Aldrich, \geq 99.5%). El pH no se ajusta. A continuación, la fibra se introduce por inmersión directa en la disolución muestra durante 60 min a 40 °C y 250 rpm, con el módulo de agitación encendido y apagado 30 s y 20 s, respectivamente. Finalizada la extracción, la fibra pasa al inyector caliente del sistema GC y los compuestos se desorben térmicamente a 250 °C durante 5 min. Se realizan blancos de análisis con agua ultrapura Milli-Q antes y después de cada secuencia de 3 viales, así como, un programa de acondicionamiento de la fibra entre cada extracción (250 °C, 10 min), para eliminar la posibilidad de contaminación entre muestras.

3.2.3. Optimización de parámetros de SPME.

La optimización de los parámetros operativos de SPME es esencial para maximizar la eficacia y el rendimiento del proceso de extracción. Los principales factores que afectan a dicho proceso son el tipo de fibra, el modo de extracción, la temperatura y el tiempo de extracción y la fuerza iónica de la disolución (Jabali et al., 2019).

Existen dos tipos de recubrimientos de SPME: películas poliméricas, para la absorción de los analitos, y partículas porosas embebidas en películas poliméricas, para la adsorción de

los analitos. Las fibras absorbentes incluyen los revestimientos de poliacrilato (PA), PEG y PDMS, mientras que las fibras de tipo adsorbente contienen partículas como CAR, DVB o una combinación de ambas, generalmente con PDMS como elemento aglutinante. Por lo general, la adsorción es el mecanismo de extracción más eficiente, por lo que las fibras de SPME basadas en partículas resultan más apropiadas para los análisis a bajas concentraciones. A la hora de seleccionar la fibra adecuada, es necesario tener en cuenta las propiedades físicas y químicas de los compuestos a analizar, siendo la polaridad uno de los aspectos más importantes. En cuanto a la selección del modo de extracción, como ya se ha comentado anteriormente, si los analitos de interés son relativamente volátiles, HS es la mejor opción. Sin embargo, puesto que en el presente trabajo se espera que la disolución muestra contenga compuestos de volatilidad baja a media y de polaridad media a alta, se escoge el modo de extracción por inmersión directa. En la mayoría de los casos, la eficacia de extracción en inmersión directa es mucho mayor que en HS.

La temperatura de extracción afecta al proceso de SPME desde el punto de vista termodinámico y cinético. Así, el aumento de la temperatura conduce a un incremento del coeficiente de difusión de los analitos y a una reducción del tiempo de extracción. Contrariamente, este aumento de temperatura también puede disminuir la cantidad de analitos extraídos por la fibra en equilibrio (Jabali et al., 2019). Otro parámetro crítico es el tiempo de extracción. Dado que la SPME es un proceso de partición de compuestos entre la muestra y la fibra, es necesario determinar el tiempo de extracción óptimo para el cual la fibra es capaz de extraer la mayor cantidad de analitos (tiempo de equilibrio). Este equilibrio puede alterarse modificando la fuerza iónica o el pH de la disolución. Por otra parte, la aplicación de una agitación constante durante la exposición de la fibra mejora la cinética del proceso, aumentando la eficacia de la extracción y proporcionando tiempos de extracción más cortos.

Frecuentemente, se adiciona NaCl a la muestra para aumentar su fuerza iónica y mejorar, así, la extracción de analitos por la fibra. Este incremento de fuerza iónica conduce a una disminución de la solubilidad de los compuestos presentes en la disolución por medio del denominado efecto *salting-out*. Numerosas publicaciones recogen los beneficios que supone la adición de NaCl sobre la eficacia de extracción de diversos compuestos (Pan et al., 1995; Peñalver, 2002; Pereira et al., 2014; Jabali et al., 2019). Se recomienda saturar con NaCl para conseguir una fuerza iónica similar en todas las muestras, asegurando mayor reproducibilidad.

3.2.4. Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos.

Finalizado el análisis SPME-GC-MS, los datos adquiridos por el espectrómetro de masas se recogen con el software Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0. Este software permite integrar, tanto manual como automáticamente, los picos cromatográficos de cada muestra y extraer su espectro de masas. El software está equipado con la biblioteca de espectros NIST14, que se utiliza para identificar los compuestos desconocidos por comparación con los espectros experimentales obtenidos. Adicionalmente, propone una puntuación relativa que refleja el nivel de coincidencia entre ambos espectros de masas. El principal problema asociado a esta identificación por búsqueda se basa en suponer que el patrón de fragmentación de un compuesto es único independientemente de las condiciones de análisis (la mayoría de bibliotecas consisten en espectros obtenidos mediante EI y analizadores tipo cuadrupolo).

Una vez identificados los compuestos orgánicos presentes en las muestras, se procede a su semicuantificación por medio del método de patrón externo. Se preparan 3 réplicas de una disolución patrón $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de n-tridecano (Supelco, $\geq 99.3\%$) en etanol (Supelco, $\geq 99.9\%$). Para ello, se introducen aproximadamente $6.6 \mu\text{l}$ de n-tridecano en un matraz aforado de 50 ml y se diluyen con etanol hasta volumen. Los viales de 10 ml de disolución patrón se someten al mismo análisis SPME-GC-MS que las muestras y los picos cromatográficos obtenidos se integran automáticamente con el software Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0. Puesto que el área bajo el pico de n-tridecano es directamente proporcional a su concentración, se obtiene un factor de respuesta que permite semicuantificar la concentración de los compuestos de interés (7).

$$RF_i = \frac{C_i}{A_i} \quad (7)$$

Donde RF_i es el factor de respuesta para un compuesto i , C_i la concentración del compuesto i en el patrón y A_i el área del pico cromatográfico del compuesto i en el patrón.

De este modo, la concentración de los diferentes compuestos orgánicos en las muestras se calcula de acuerdo con la ecuación (8):

$$C_{im} = RF_i \cdot A_{im} \cdot DF \quad (8)$$

siendo C_{im} la concentración del compuesto i en la muestra, A_{im} el área del pico cromatográfico del compuesto i en la muestra y DF el factor de dilución.

3.3. Método de HS-GC-FID.

3.3.1. Análisis GC-FID.

Los análisis cromatográficos se ejecutan en un cromatógrafo de gases Agilent 8890 GC System (Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y acoplado a un muestreador automático Combi PAL RTC 120 de CTC Analytics (Zwingen, Suiza) con módulos intercambiables para HS, SPME, e inyección líquida. Para la separación de los analitos se selecciona una columna capilar Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert con PEG como fase estacionaria ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ de espesor de fase). El puerto de inyección se mantiene a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 16.086 psi con una relación de *split* de 75:1 y un flujo de *split* de $150\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. El programa de temperaturas del horno es el siguiente: temperatura inicial de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (mantenida durante 0.5 min), aumento hasta $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ y aumento final hasta $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, con un *post run* de 4 min a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. El tiempo total de análisis es, por tanto, de 11.5 min para cada muestra. Se utiliza helio (99.99%) como gas portador a un caudal constante de $2\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. La temperatura del detector FID se fija en $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los flujos de hidrógeno, aire y gas auxiliar (N_2) en $40\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $450\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ y $10\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente.

3.3.2. Condiciones de HS.

Para la extracción de los analitos se utiliza el módulo HS del muestreador automático Combi PAL. La temperatura del horno de HS se mantiene a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, al igual que la temperatura del *loop* y de la línea de transferencia. Antes de realizar la inyección, el vial de muestra sellado se incuba durante 40 min sin agitación para que el sistema alcance el equilibrio. A continuación, se presuriza el vial con gas portador helio (99.99%), se recoge una muestra de 0.5 ml del vapor y se inyecta en el sistema GC-FID. Al igual que en otras técnicas de extracción, la partición entre las fases sólida/líquida y vapor y los volúmenes de ambas fases son los principales factores que determinan la cantidad de analito extraído.

3.3.3. Identificación y cuantificación de acetato de vinilo y ácido acético residuales.

La cuantificación de los analitos se realiza por medio del método de patrón externo. El procedimiento es el siguiente: en primer lugar, se preparan los patrones de acetato de vinilo y ácido acético sobre material EVA desgasificado. Para ello, se introducen aproximadamente 10 g del grado EVA HVA08G en la estufa a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y alto vacío durante 12 h. A continuación,

se comprueba la ausencia de analitos sometiendo la muestra al análisis HS-GC-FID. Confirmada la ausencia de picos cromatográficos, se preparan 3 viales de 10 ml con aproximadamente 500 mg de copolímero EVA desgasificado, a los que se añaden, aproximadamente, 2.7 μl de acetato de vinilo (Sigma-Aldrich, $\geq 99.0\%$) y 0.3 μl de ácido acético (Scharlab, $\geq 99.5\%$). Los viales se sellan inmediatamente después de su preparación para evitar la pérdida de volátiles. La concentración exacta de cada uno de los compuestos se calcula de acuerdo con la ecuación (9):

$$C_i(\text{ppm}) = \frac{V_i(\mu\text{l}) \cdot \rho_i(\text{mg} \cdot \mu\text{l}^{-1})}{\text{Peso de muestra (g)}} \cdot 1000 \quad (9)$$

donde C_i es la concentración del compuesto i , V_i es el volumen de compuesto i añadido y ρ_i es la densidad del compuesto i .

Los datos adquiridos por el detector FID se recogen con el software Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0, integrando los picos cromatográficos de cada patrón. A diferencia del método de SPME-GC-MS, en el que la identificación de compuestos consiste en una comparación de sus espectros de masas con una base de datos de espectros, la identificación de acetato de vinilo y ácido acético en el método de HS-GC-FID se basa en los tiempos de retención a los que aparecen los picos de cada analito en el cromatograma (2.6 min para el acetato de vinilo y 6.3 min para el ácido acético). Puesto que el área bajo el pico de cada compuesto es directamente proporcional a su concentración, se obtiene un factor de respuesta (7) para el acetato de vinilo y para el ácido acético.

Los viales de muestra, con aproximadamente 500 mg de material EVA en formato grana, se someten al mismo análisis HS-GC-FID que los patrones y los picos cromatográficos obtenidos se integran automáticamente con el software Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0. La concentración de acetato de vinilo y ácido acético en cada muestra se calcula según la ecuación (8).

4. Resultados y discusión.

4.1. Método de SPME-GC-MS.

Los cromatogramas y las tablas de resultados analíticos se recogen detalladamente en el apartado “Anexos”.

4.1.1. Comparación de diferentes fibras de SPME.

La selección del revestimiento adecuado de la fibra resulta fundamental para optimizar la técnica de SPME. Puesto que se prevé que las disoluciones obtenidas tras la extracción de las muestras con agua contengan, mayoritariamente, compuestos de polaridad media a alta, se realiza un primer estudio comparativo con dos fibras adsorbentes bipolares comercializadas por Supelco: 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y 85 μm CAR/PDMS. Las fibras de CAR/PDMS funcionan bien para compuestos de bajo peso molecular y elevada volatilidad, mientras que las fibras de DVB/PDMS, con DVB más macroporoso y mesoporoso que el CAR, son más adecuadas para compuestos de mayor peso molecular. Las fibras de SPME que combinan DVB y CAR cubren ambas áreas y amplían el rango de pesos moleculares que se puede extraer con una única fibra. No obstante, estas tienen una capacidad ligeramente inferior para analizar los compuestos más ligeros o más pesados en comparación con las fibras constituidas por un solo adsorbente (Merck, 2020).

Tomando como referencia los cromatogramas obtenidos con ambas fibras para la muestra JCG23004 (grado HVA28G1, lote VE-06441) (Figuras 9 y 10, Anexo 7.1), se puede concluir que la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS proporciona mejores resultados de extracción, evaluados mediante el número total de picos cromatográficos integrados, que la fibra de 85 μm CAR/PDMS. Asimismo, se observa que más de la mitad de los compuestos extraídos con esta última fibra también se extraen de forma eficiente con la fibra de DVB/CAR/PDMS. En consecuencia, se selecciona la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS para realizar la SPME del resto de muestras a analizar.

Por otra parte, con el objeto de estudiar la posible presencia de compuestos de mayor polaridad, se realiza una extracción adicional de la misma muestra con una fibra absorbente polar de Supelco: 60 μm PEG. El cromatograma obtenido con esta fibra (Figura 11, Anexo 7.1), muestra picos cromatográficos a tiempos de retención elevados (por encima de los 12 min), correspondientes, en su mayoría, a compuestos procedentes de la propia fibra de SPME o del sangrado de la columna cromatográfica (compuestos derivados del silicio). En la Tabla 3 (Anexo 7.1), se compara el número total de compuestos orgánicos identificados en la muestra JCG23004 con las diferentes fibras de SPEM estudiadas.

4.1.2. Optimización de la concentración de NaCl.

Como ya se ha comentado, la adición de NaCl a la muestra mejora la extracción de la mayoría de los compuestos al aumentar la fuerza iónica de la disolución. El aumento de la fuerza iónica disminuye la solubilidad de los compuestos en la fase acuosa y potencia su

difusión hacia la fibra de SPME. Este efecto no es general, dependiendo principalmente de las características del analito, de la fibra y de la propia muestra (Peñalver, 2002). A modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos para la muestra JCG23008 (grado HVA18G1, lote VK-19411) a concentraciones de NaCl de $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ y $150 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, en comparación con la muestra sin sal (Figuras 12-15, Anexo 7.2), permiten observar que la adición de una mayor cantidad de NaCl conduce a una extracción de los compuestos orgánicos disueltos más eficiente, evaluada mediante el área de pico cromatográfico, hasta alcanzar un valor máximo. Esta comprobación se realiza en todas las muestras de EVA, a excepción de la muestra JCG23002 (grado HVA18G, lote VA-06481), observándose una mejora de la extracción a concentraciones de NaCl $\geq 100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Figura 8). No obstante, es importante tener en cuenta que en algunos casos la adición de sal también puede causar una coextracción de compuestos no deseados e interferencias de la matriz, e incluso disminuir la cantidad de analito extraído, especialmente de aquellos muy polares (Merck, 2020).

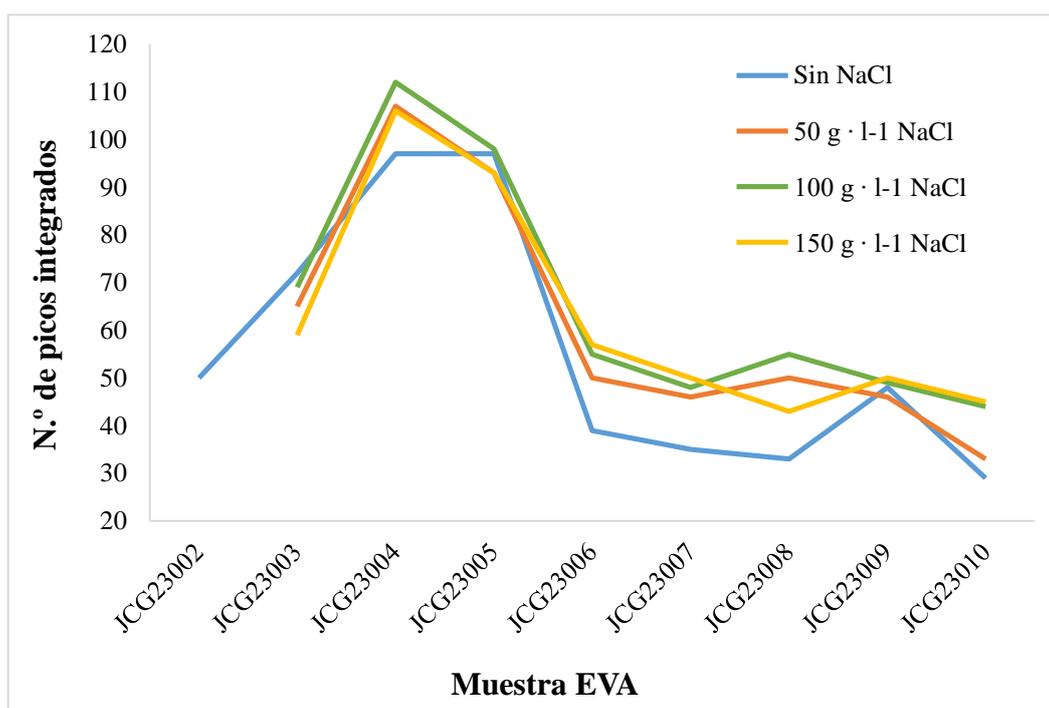


Figura 8. Variación del número de picos cromatográficos integrados en función de la concentración de NaCl. En la mayoría de las muestras, concentraciones elevadas de NaCl favorecen el proceso de extracción, lo que se traduce en un aumento del número de picos.

4.1.3. Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos.

Se evalúan los diferentes compuestos orgánicos detectados por medio del método optimizado de SPME-GC-MS y su potencial importancia en la conformidad de los grados EVA estudiados con las exigencias de la USP 661.1. Para realizar la cuantificación, en

primer lugar, se integran los cromatogramas correspondientes a las 3 réplicas de la disolución patrón $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de n-tridecano en etanol (Figura 16, Anexo 7.3.1), obteniéndose un valor medio de área de pico para el n-tridecano de 27020645. El factor de respuesta y la concentración de los compuestos en las muestras se calculan empleando las ecuaciones (7) y (8), respectivamente. Para finalizar, el cálculo de la concentración en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (ppm) se realiza de acuerdo con la ecuación (10):

$$C_{im}(\text{ppm}) = \frac{C_{im}(\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}) \cdot V_e(\mu\text{l})}{\text{Peso de muestra (g)}} \quad (10)$$

donde C_{im} es la concentración del compuesto i en la muestra y V_e es el volumen de la disolución de extracción.

En cuanto al método de identificación, se fija una puntuación mínima de coincidencia entre los espectros de masas experimentales y los espectros de la biblioteca de 70. De este modo, compuestos desconocidos con una puntuación relativa inferior a 70 no se identifican, evitándose, así, posibles conclusiones erróneas. Los cromatogramas obtenidos para las diferentes muestras y un ejemplo de los resultados de concentración de los compuestos orgánicos identificados se recogen en los Anexos 7.3.2 a 7.3.10.

Además de interpretar los cromatogramas relativos a las propias muestras de material EVA, es importante tener en cuenta los cromatogramas del blanco (agua ultrapura Milli-Q), en los cuales se observan numerosos picos asociados a siloxanos procedentes de la degradación de la fase estacionaria de la columna de GC y/o de la fibra de SPME. Este fenómeno de degradación o sangrado contribuye al ruido, reduce la velocidad de estabilización del instrumento y disminuye la integridad espectral, la vida útil de la columna y la reproducibilidad de los análisis. Por lo general, independientemente del porcentaje teórico de VA, las disoluciones de extracción de los grados EVA contienen hidrocarburos alifáticos y aromáticos (tolueno), ésteres, éteres alifáticos, cíclicos y aromáticos, y en menor medida, alcoholes y aldehídos, con algunas muestras presentado ácidos carboxílicos (ácido hexanoico y ácido nonanoico). Puesto que los grados analizados en el presente trabajo no cumplen la especificación de la USP 661.1 relativa al contenido de carbono orgánico total (TOC), resulta especialmente interesante conocer los compuestos orgánicos que se encuentran en mayor concentración en cada una de las muestras (Tabla 5, Anexo 7.3). El TOC es una medida indirecta de las moléculas orgánicas presentes en las aguas farmacéuticas. Este tipo de moléculas se pueden introducir en el agua a partir de los

materiales de los sistemas de purificación y distribución, de la formación de biopelículas o del propio envasado de aguas estériles y no estériles. La medición de TOC no sustituye al control microbiológico ni a la prueba de endotoxinas (Bisutti et al., 2004). En este caso, debido a la ausencia de equipos adecuados, la evaluación del TOC se externaliza (Laboratorio MicroBios, Sant Joan Despí, Barcelona). El método consiste en la oxidación de las moléculas orgánicas presentes en el agua para producir dióxido de carbono, seguida de la medición de la cantidad de dióxido de carbono generado.

Analizados los resultados de cuantificación, se observa que el único compuesto orgánico que aparece en todas las muestras en una concentración significativa es el tolueno. Como ya se ha señalado anteriormente, suponiendo que la fabricación de EVA por parte de Repsol Química S.A. siga la técnica de polimerización en solución, método que implica la polimerización mediante iniciador de radicales libres, la separación de los monómeros del copolímero producido y la recuperación y eliminación de disolventes, entre los que destacan tolueno, benceno y mezclas de alcohol y agua, es posible atribuir la presencia de este compuesto a su potencial uso como disolvente en el proceso industrial. Por el contrario, si la fabricación de EVA se realiza por polimerización en masa a alta presión, es posible que el tolueno detectado proceda de los flujos de agente iniciador, ya que en esta técnica no se utilizan disolventes. En ambos casos, el tolueno residual presente en los grados EVA puede contribuir a sobrepasar el valor de TOC fijado en la USP 661.1.

Es importante destacar que un cambio en el disolvente puede alterar el rendimiento de este proceso y la masa molar de polímero final por medio de efectos físicos y químicos, como la solubilidad del etileno o las reacciones de transferencia de cadena que generan radicales estabilizados. En muchos disolventes, las cadenas poliméricas en crecimiento son capaces de captar un átomo de hidrógeno de una molécula de disolvente, originando un polímero inactivo y un radical libre derivado del disolvente. Si este radical reinicia la polimerización, no se produce una disminución generalizada de radicales activos y el rendimiento obtenido es relativamente alto. Sin embargo, si el radical del disolvente es estable, y el monómero tiene una reactividad baja, este puede reaccionar con otros radicales activos en una reacción de terminación que conducen a rendimientos bajos. En ambos casos, la interrupción del crecimiento de la cadena polimérica reduce la masa molar (Wisotsky & Kober, 1972). Algunos compuestos, como el benceno, no experimentan fácilmente la reacción de captación de hidrógeno, lo que resulta fundamental a la hora de seleccionar un nuevo disolvente. No obstante, el rendimiento de polimerización en benceno suele ser bajo debido a otras

interacciones con las especies radicales, generalmente interacciones de formación de complejos.

Por otra parte, llama la atención la ausencia de acetato de vinilo y ácido acético residuales en todas las muestras analizadas. Dicha ausencia se puede explicar por la elevada volatilidad de ambos compuestos, lo que hace imposible su detección por inmersión directa de la fibra de SPME, siendo más adecuada la técnica de HS.

4.2. Método de HS-GC-FID.

Los cromatogramas y las tablas de resultados analíticos se recogen detalladamente en el apartado “Anexos”.

4.2.1. Identificación y cuantificación de acetato de vinilo y ácido acético residuales.

Se evalúan los niveles de acetato de vinilo y ácido acético detectados por medio del método optimizado de HS-GC-FID. Para realizar la cuantificación, en primer lugar, se integran los cromatogramas correspondientes a las 3 réplicas del patrón de acetato de vinilo y ácido acético, preparado sobre material EVA desgasificado (Figura 35, Anexo 7.4.1), obteniéndose un valor medio de área de pico para el acetato de vinilo y el ácido acético de 909428 y 17977463, respectivamente. El factor de respuesta de cada compuesto se calcula de acuerdo con la ecuación (7) y su concentración en las diferentes muestras aplicando la ecuación (8). A diferencia de SPME-GC-MS, el método de identificación se basa en el tiempo de retención al que aparecen los picos de acetato de vinilo (en torno a 2.6 min) y de ácido acético (en torno a 6.3 min) en los cromatogramas del patrón.

Tabla 2. Concentración de acetato de vinilo y ácido acético residuales en las muestras analizadas.

Grado EVA	Ref. muestra	Contenido VA (%)	VA_{res.} (ppm)	ÁA_{res.} (ppm)
HVA08G	JCG23010	7.5-9.5	10	282
HVA18G	JCG23002	17.0-19.0	252	283
HVA18G	JCG23005	17.0-19.0	36	404
HVA18G	JCG23006	17.0-19.0	55	420
HVA18G	JCG23007	17.0-19.0	26	338
HVA18G1	JCG23003	16.0-19.0	208	174
HVA18G1	JCG23008	16.0-19.0	42	599
HVA28G1	JCG23004	26.0-28.0	404	71
HVA28G2	JCG23009	26.5-29.5	29	60

Tras analizar los resultados obtenidos (Tabla 2), se observa que no existe ninguna correlación aparente entre el porcentaje teórico de acetato de vinilo en los grados EVA y la

concentración de acetato de vinilo y ácido acético residuales. Asimismo, se aprecia una importante variación en las concentraciones calculadas para diferentes lotes de un mismo grado, lo que puede ser indicativo de inconsistencias en el proceso de producción. No obstante, debido a la naturaleza volátil de ambos compuestos, esta variación también se puede atribuir a pérdidas de los analitos durante el transporte y el procesamiento de las muestras.

El ácido acético es uno de los principales productos de la degradación térmica del EVA, generado por la desacetilación y la hidrólisis de los monómeros de acetato de vinilo en el copolímero (Wang et al., 2013). La mayor parte del acetato de vinilo y del ácido acético que se encuentran libres en el producto final se eliminan durante la etapa de venteo en el silo de desgasificación. En consecuencia, como medida encaminada a reducir la concentración de ambos compuestos en los grados EVA analizados, se propone el aumento del tiempo de venteo de la granza y/o la instalación de un sistema de ventilación en la zona de extrusión. Esta última opción requiere un estudio más exhaustivo, ya que supone una inversión aproximada de 2 millones de euros.

5. Conclusiones.

El EVA representa el copolímero de etileno con mayor volumen de mercado y el polímero sintético con el espectro de aplicaciones más amplio, empleándose en *films* de envasado, capas de coextrusión, adhesivos, moldeo y extrusión, aislamientos y espumas. A mayores, supone un importante impulsor de la innovación en las industrias farmacéutica y de dispositivos médicos, en las cuales destaca en campos como la terapia con células madre o la liberación controlada de fármacos.

En un análisis comparativo, se comprueba que la fibra de SPME de DVB/CAR/PDMS es más adecuada que las fibras de CAR/PDMS o PEG para extraer un amplio rango de compuestos orgánicos en disolución acuosa. El método de SPME-GC-MS se optimiza adicionando NaCl a las muestras y ajustando los principales parámetros que afectan a la eficiencia de la extracción (inmersión directa de la fibra de SPME durante 60 min a 40 °C y 250 rpm y desorción térmica durante 5 min a 250 °C). Entre los diferentes compuestos detectados, el tolueno es el único presente de las 9 muestras de EVA analizadas en una concentración significativa (100-500 ppm). Este tolueno puede proceder del disolvente utilizado en el proceso de fabricación de EVA, suponiendo una polimerización en solución, o de los flujos de agente iniciador, en caso de polimerización en masa a alta presión. Debido

a su naturaleza volátil, no es posible detectar acetato de vinilo y ácido acético residuales mediante SPME-GC-MS, por lo que se aplica un método optimizado de HS-GC-FID. Los resultados obtenidos indican que el tolueno, el acetato de vinilo y el ácido acético pueden ser los compuestos responsables de que los grados EVA estudiados sobrepasen el valor de TOC especificado en la USP 661.1.

6. Bibliografía.

- Bartle, K. D., Myers, P. (2002). History of gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* 21: 547–557.
- Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M. (2004). Determination of total organic carbon - An overview of current methods. *Trends Anal. Chem.* 23: 716–726.
- Camacho, J. A. (2015). Estudio termodinámico del proceso de separación del copolímero de Etileno-Vinil Acetato (EVA) en disolución. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Chanda, M., Roy, S. K. (2008). *Industrial Polymers, Specialty Polymers, and Their Applications*. Florida, US: CRC Press.
- Chhabil, D. (2007). *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. New Jersey, US: John Wiley & Sons, Inc.
- Chien, I. L., Kan, T. W., Chen, B.-S. (2007). Dynamic simulation and operation of a high pressure ethylene-vinyl acetate (EVA) copolymerization autoclave reactor. *Comput. Chem. Eng.* 31: 233–245.
- Council on Health Care Technology. (1988). *Medical Technology Assessment Directory: A Pilot Reference to Organizations, Assessments, and Information Resources*. Washington D.C., US: National Academies Press.
- Genina, N., Holländer, J., Jukarainen, H., Mäkilä, E., Salonen, J., Sandler, N. (2016). Ethylene vinyl acetate (EVA) as a new drug carrier for 3D printed medical drug delivery devices. *Eur. J. Pharm. Sci.* 90: 53–63.
- Hacker, M. C., Krieghoff, J., Mikos, A. G. (2018). Synthetic Polymers. En: Atala, A., Lanza, R., Mikos, T., & Nerem, R. (Eds). *Principles of Regenerative Medicine*. Massachusetts, US: Elsevier Inc., pp 559–590.
- Henderson, A. M. (1993). Ethylene-vinyl acetate (EVA) copolymers: a general review. *IEEE Electr. Insul. Mag.* 9: 30–38.
- Jabali, Y., Millet, M., El-Hoz, M. (2019). Optimization of a DI-SPME-GC-MS/MS method for multi-residue analysis of pesticides in waters. *Microchem. J.* 147: 83–92.
- Karasek, F. W., Clement, R. E. (1988). *Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry: Principles and Techniques*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V.
- Károly, V. (2001). Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr. A.* 921: 227–236.
- McNair, H. M., Miller, J. M., Snow, N. H. (2019). *Basic gas chromatography*. New Jersey, US: John Wiley & Sons, Inc.
- Merck. (2020). SPME for GC Analysis. Getting Started with Solid Phase Microextraction. Recuperado el 3 de junio de 2023 de <https://www.sigmaaldrich.com/spme>.
- Odian, G. (2004). *Principles of Polymerization*. New Jersey, US: John Wiley & Sons, Inc.
- Pan, L., Adams, M., Pawliszyn, J. (1995). Determination of Fatty Acids Using Solid Phase Microextraction. *Anal. Chem.* 67: 4396–4403.
- Patel, R. M. (2016). Polyethylene. En: Wagner, J. R., Jr. (Ed). *Multilayer Flexible Packaging*. Oxford, UK: Elsevier Inc., pp. 17–34.

- Pawliszyn, J. (2012). *Handbook of Solid Phase Microextraction*. London, UK: Elsevier Inc.
- Peñalver, A. M. (2002). *Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental*. Tarragona, España: Universitat Rovira i Virgili.
- Pereira, A., Silva, E., Cerejeira, M. J. (2014). Applicability of the new 60 μm polyethylene glycol solid-phase microextraction fiber assembly for the simultaneous analysis of six pesticides in water. *J. Chromatogr. Sci.* 52: 423–428.
- Prosen, H., Zupančič-Kralj, L. (1999). Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* 18: 272–282.
- Reyes, J. D. (2014). *Innovative Uses of Ethylene Vinyl Acetate Polymers for Advancing Healthcare*. Texas, US: Celanese.
- Ronca, S. (2017). Polyethylene. En: Gilbert, M. (Ed). *Brydson's Plastics Materials*. Oxford, UK: Elsevier Ltd., pp. 247–278.
- Schneider, C., Langer, R., Loveday, D., Hair, D. (2017). Applications of ethylene vinyl acetate copolymers (EVA) in drug delivery systems. *J. Control. Release.* 262: 284–295.
- Shin, S., Lee, D., Oh, J. Y., Kim, Y., Park, M. J., Lee, W. B. (2023). CFD modeling of the ethylene-vinyl acetate copolymerization autoclave reactor: Effects of comonomer ratio on reactor dynamics and copolymer properties. *Chem. Eng. Sci.* 268: 1–10.
- Thomson, W. A. (2013). The International Pharmacopoeia. *WHO Drug Inf.* 27: 119–128.
- Wang, E., Yang, H. E., Chi, S., Wang, C., Peng, C. Y., Tsai, C. C., Chou, I. (2013). Determination of Acetic Acid Content in Ethylene-Vinyl Acetate (EVA) Based PV Modules. Taipei, Taiwan: 23th International Photovoltaic Science and Engineering Conference.
- Whiteley, K. S. (2012). Polyethylene. En: Elvers, B., & Ley, C. (Eds). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, pp. 1–38.
- Wisotsky, M. J., Kober, A. E. (1972). Copolymerization of Ethylene with Vinyl Acetate. Effect of Solvent on Polymer Yield and Molecular Weight. *J. Appl. Polym. Sci.* 16: 849–854.
- Young, R. J., Lovell, P. A. (2011). *Introduction to Polymers*. Florida, US: CRC Press.

7. Anexos.

7.1. Comparación de diferentes fibras de SPME.

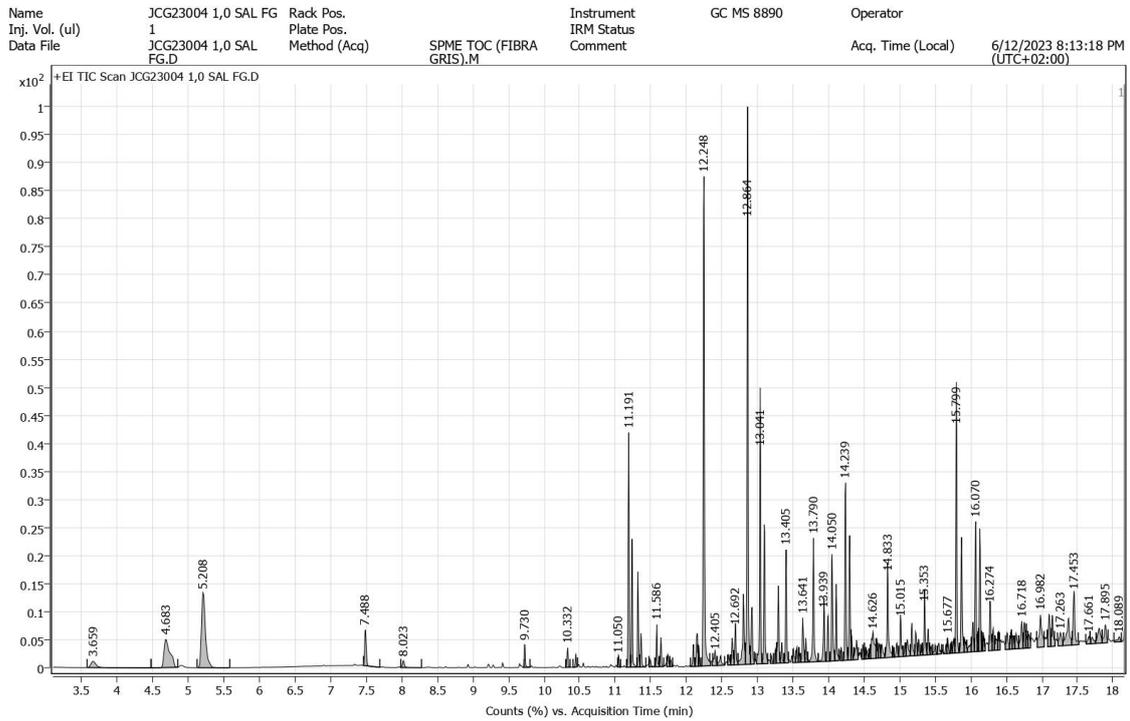


Figura 9. Cromatograma de la muestra JCG23004 obtenido por GC-MS utilizando la fibra de SPME 50/30 µm DVB/CAR/PDMS.

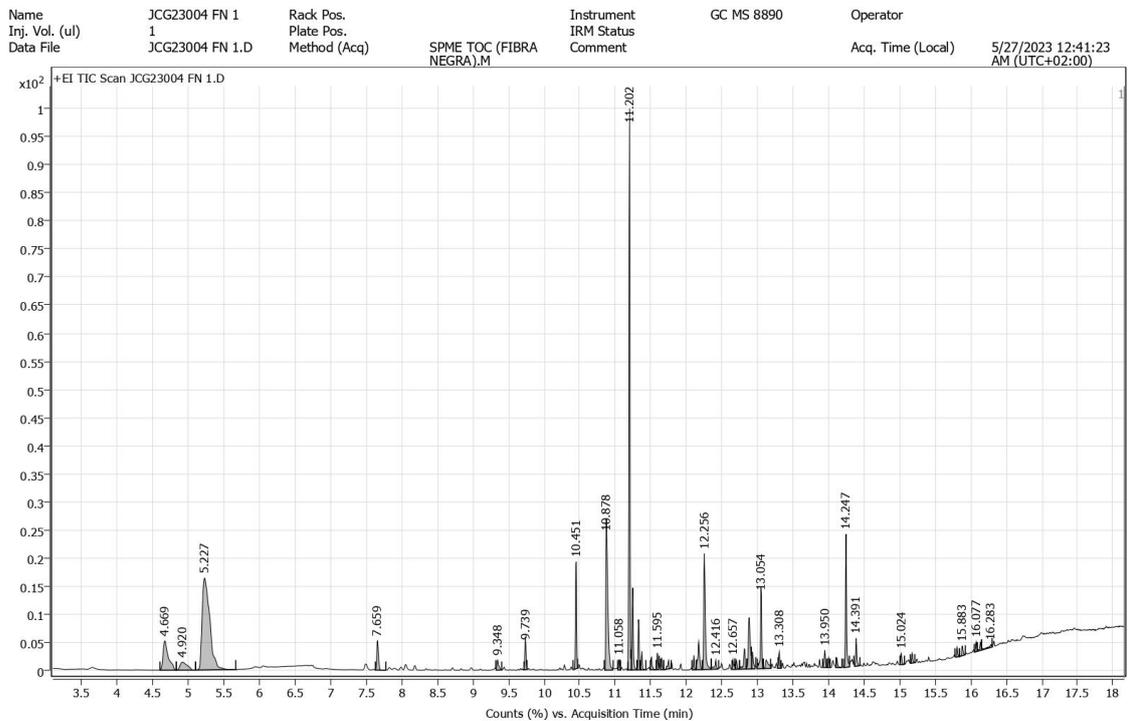


Figura 10. Cromatograma de la muestra JCG23004 obtenido por GC-MS utilizando la fibra de SPME 85 µm CAR/PDMS.

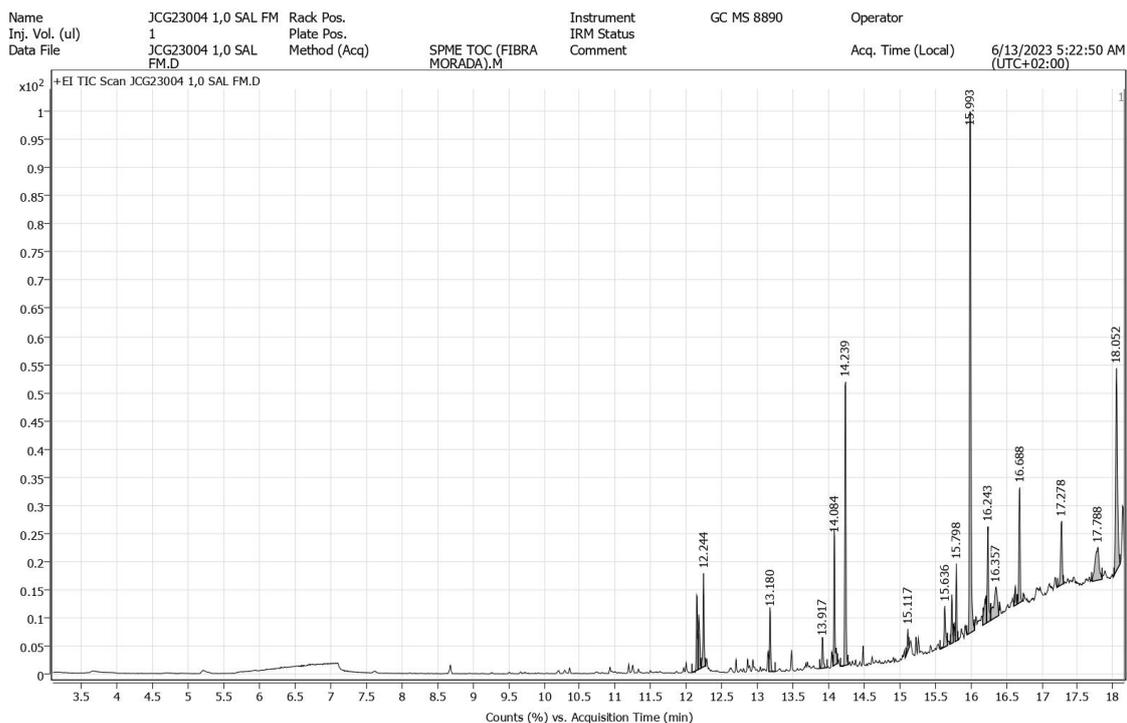


Figura 11. Cromatograma de la muestra JCG23004 obtenido por GC-MS utilizando la fibra de SPME 60 μm PEG.

Tabla 3. Comparativa del número de picos cromatográficos integrados y compuestos orgánicos identificados en la muestra JCG23004 con cada una de las fibras de SPME estudiadas.

Tipo de fibra de SPME	N.º picos integrados	N.º compuestos identificados
DVB/CAR/PDMS	112	28
CAR/PDMS	41	21
PEG	20	9

7.2. Optimización de la concentración de NaCl.

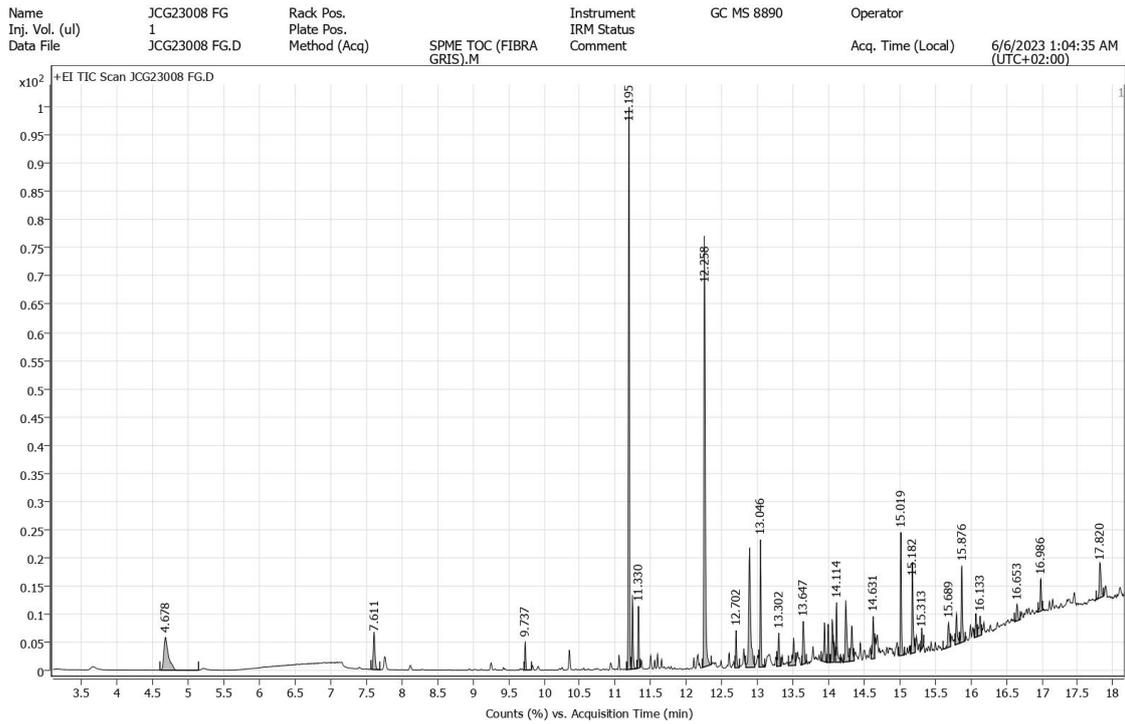


Figura 12. Cromatograma de la muestra JCG23008 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS sin adición de NaCl.

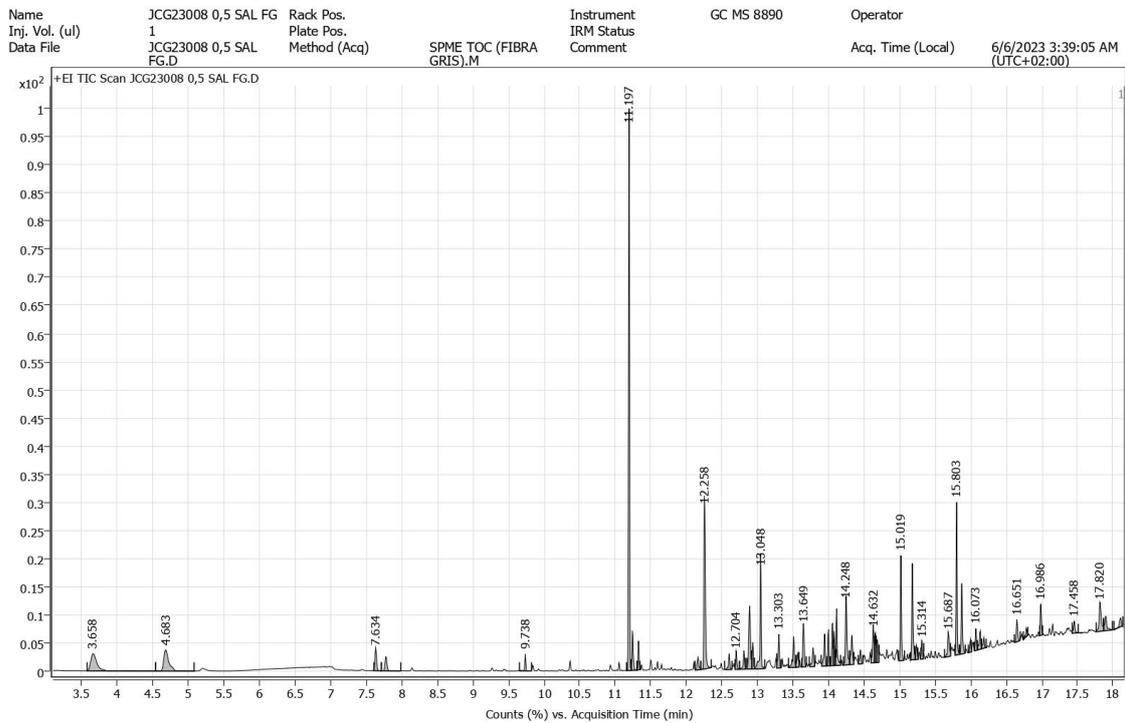


Figura 13. Cromatograma de la muestra JCG23008 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 50 g \cdot l⁻¹ de NaCl.

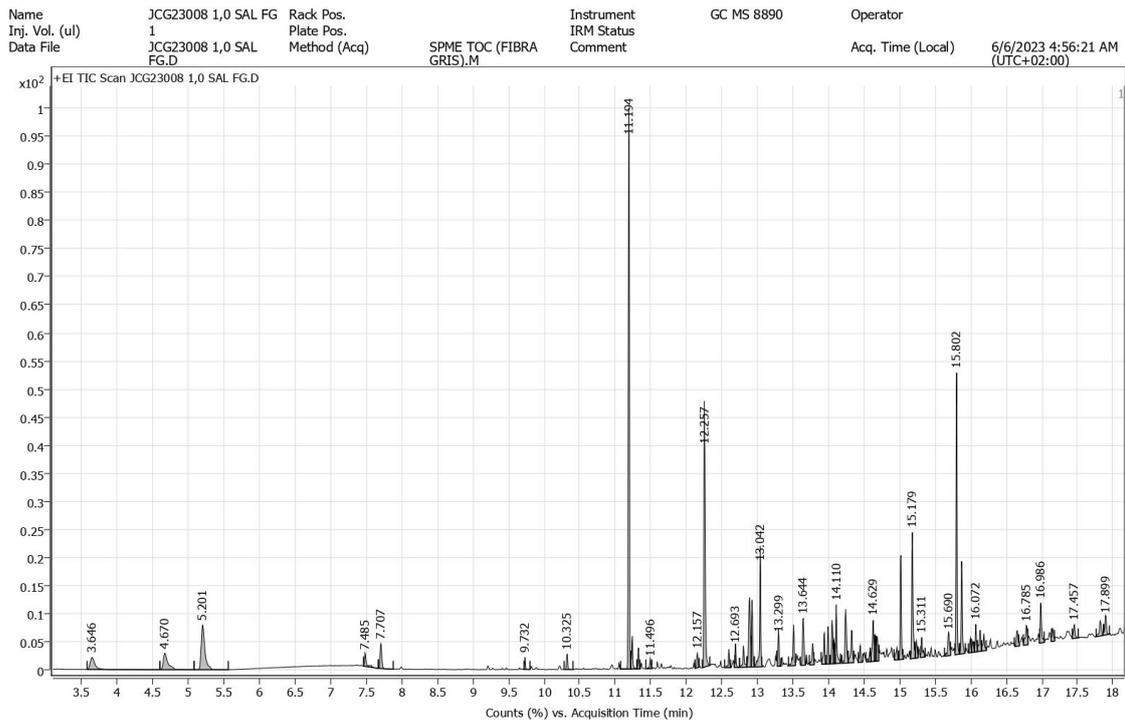


Figura 14. Cromatograma de la muestra JCG23008 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 100 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

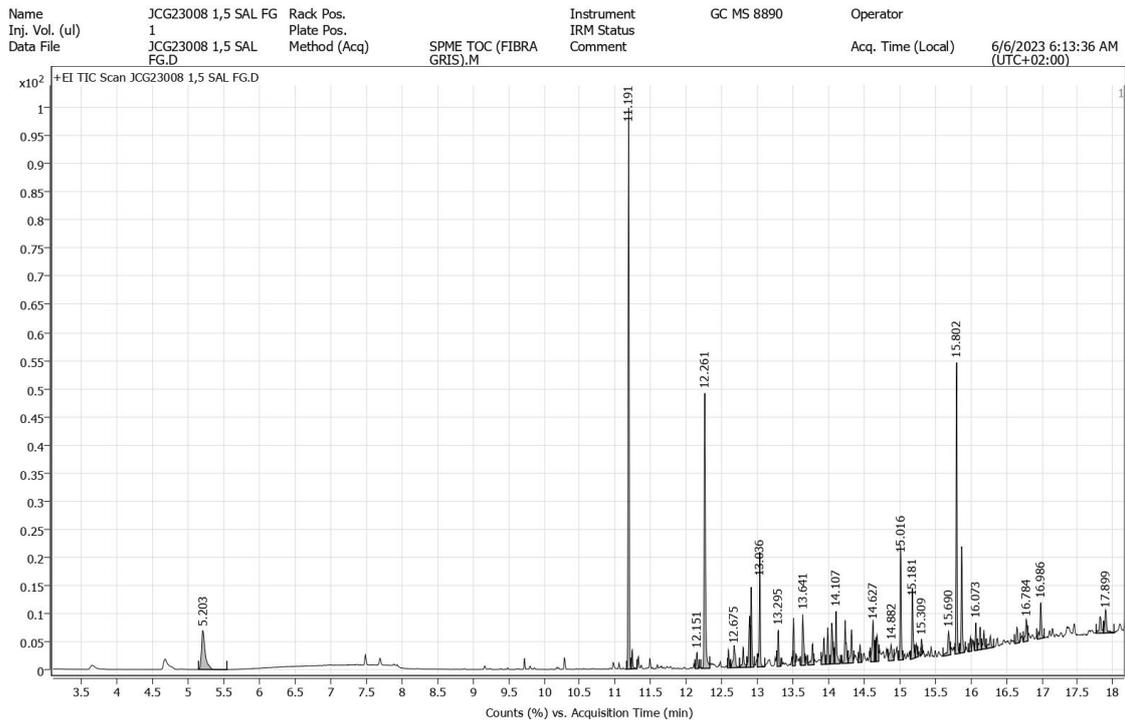


Figura 15. Cromatograma de la muestra JCG23008 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 150 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

7.3. Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos por SPME-GC-MS.

7.3.1. Patrón de n-tridecano.

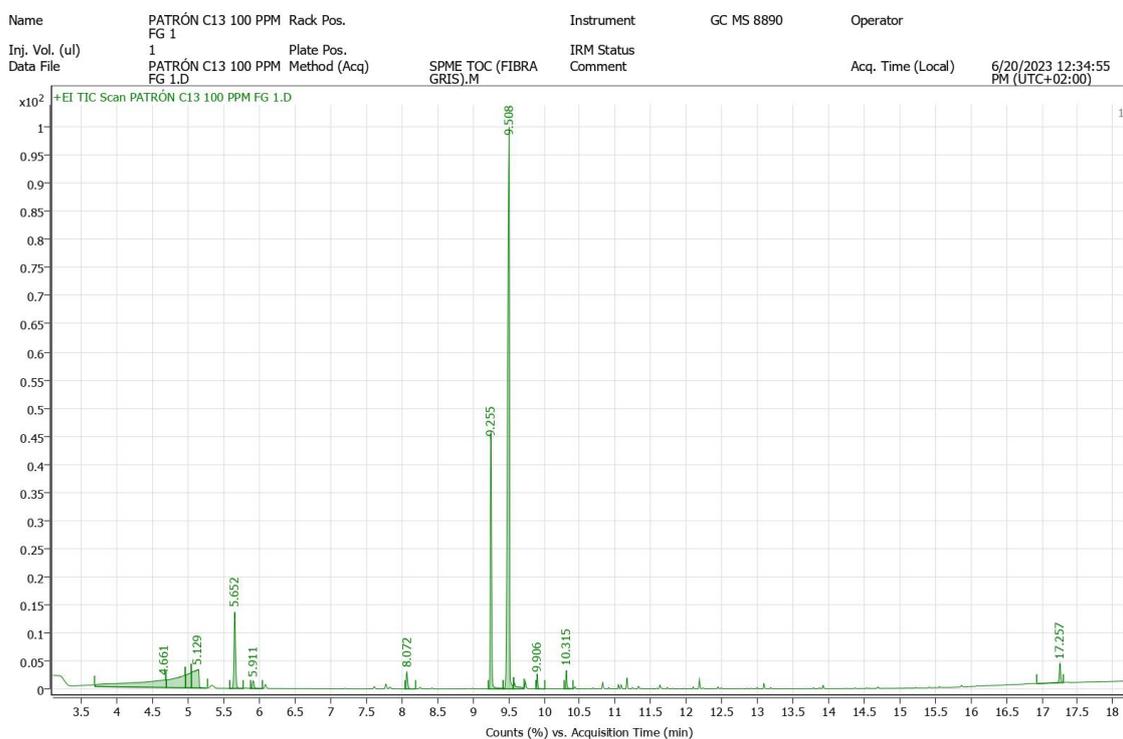


Figura 16. Cromatograma del patrón $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de n-tridecano en etanol obtenido por SPME-GC-MS. El pico cromatográfico de mayor intensidad (tiempo de retención 9.5 min) se corresponde con el n-tridecano.

7.3.2. Muestra JCG23002.

Name	BLANCO 240523 1	Rack Pos.		Instrument	GC MS 8890	Operator	
Inj. Vol. (ul)	1	Plate Pos.		IRM Status		Acq. Time (Local)	5/24/2023 5:12:28 PM
Data File	BLANCO 240523 1.D	Method (Acq)	SPME TOC (SOLO ACONDICIONAMIENTO).M	Comment		(UTC+02:00)	

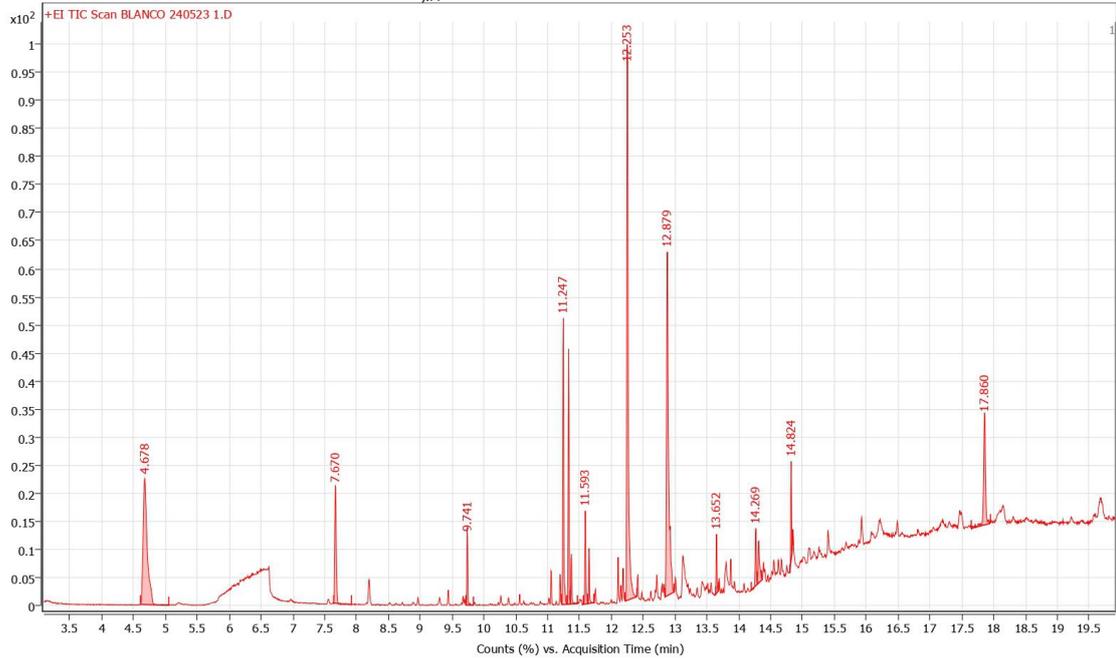


Figura 17. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23002 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

Name	JCG23002 1	Rack Pos.		Instrument	GC MS 8890	Operator	
Inj. Vol. (ul)	1	Plate Pos.		IRM Status		Acq. Time (Local)	5/24/2023 1:20:40 PM
Data File	JCG23002 1.D	Method (Acq)	SPME TOC (SOLO ACONDICIONAMIENTO).M	Comment		(UTC+02:00)	

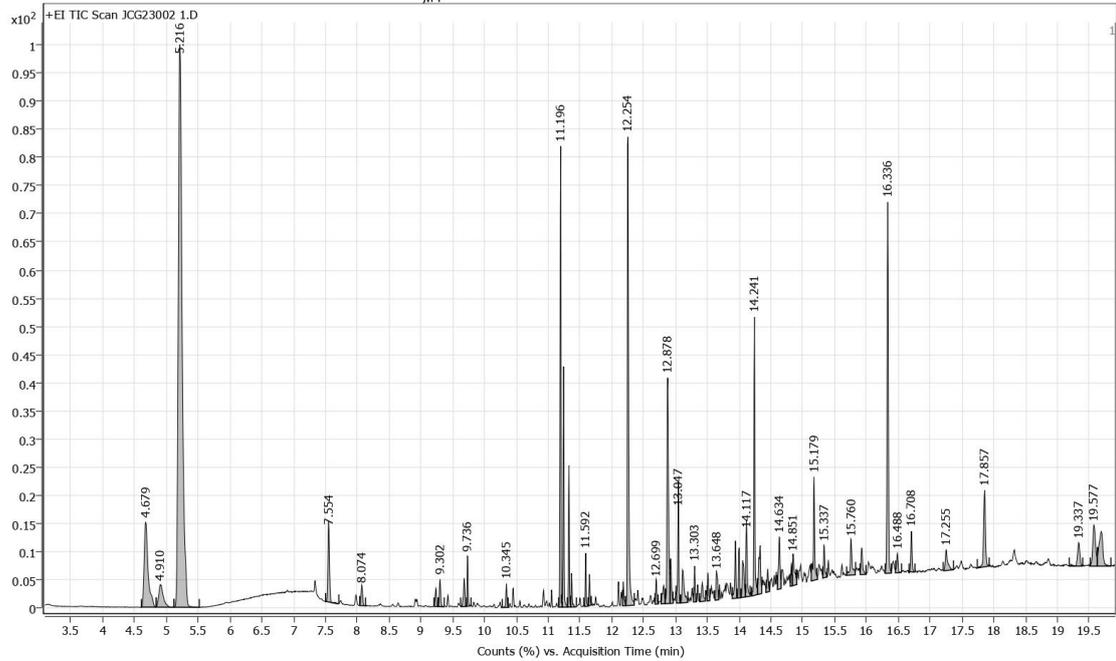


Figura 18. Cromatograma de la muestra JCG23002 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS sin adición de NaCl.

7.3.3. Muestra JCG23003.

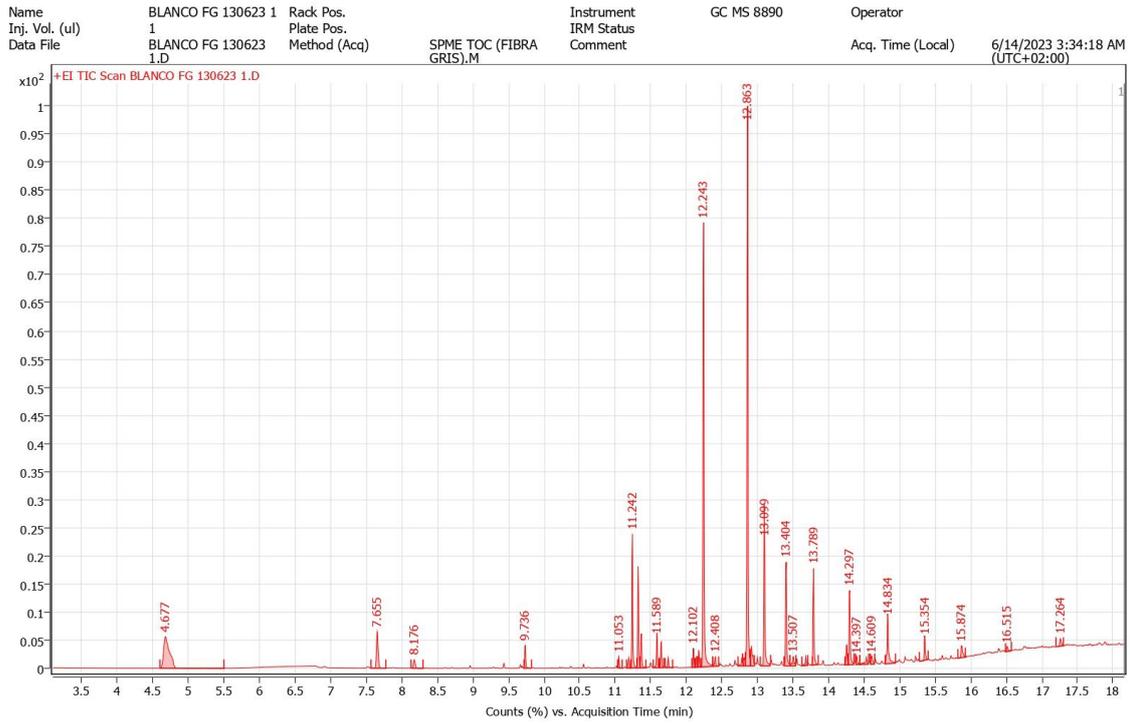


Figura 19. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23003 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

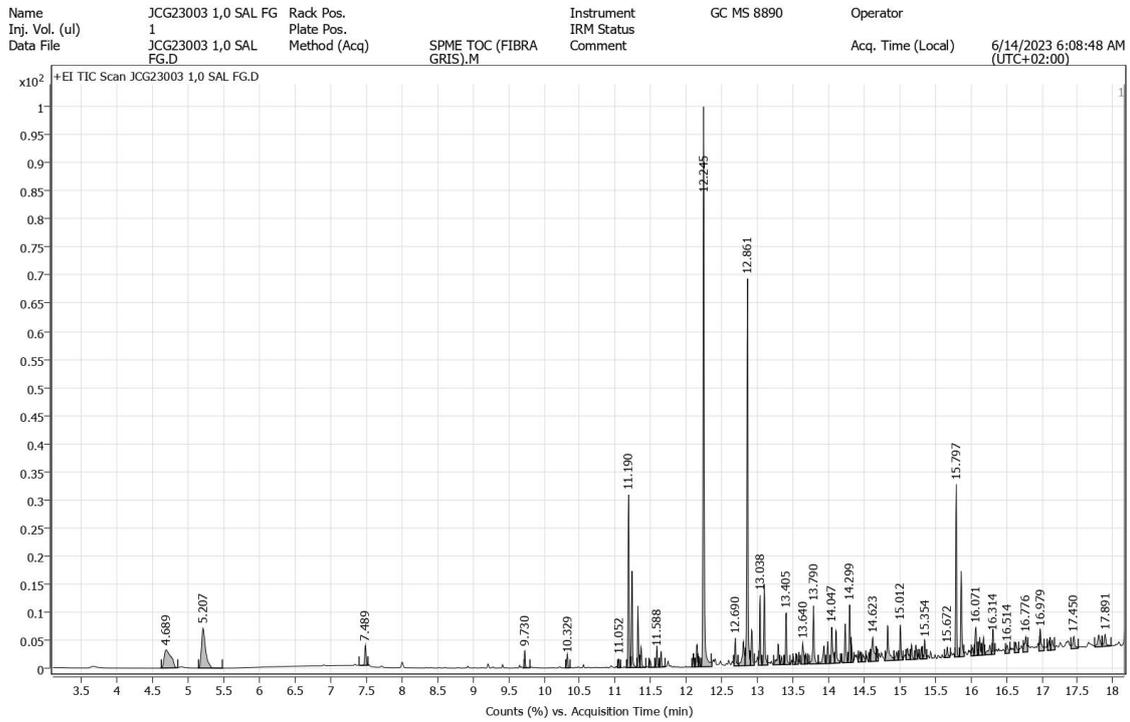


Figura 20. Cromatograma de la muestra JCG23003 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 100 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

7.3.4. Muestra JCG23004.

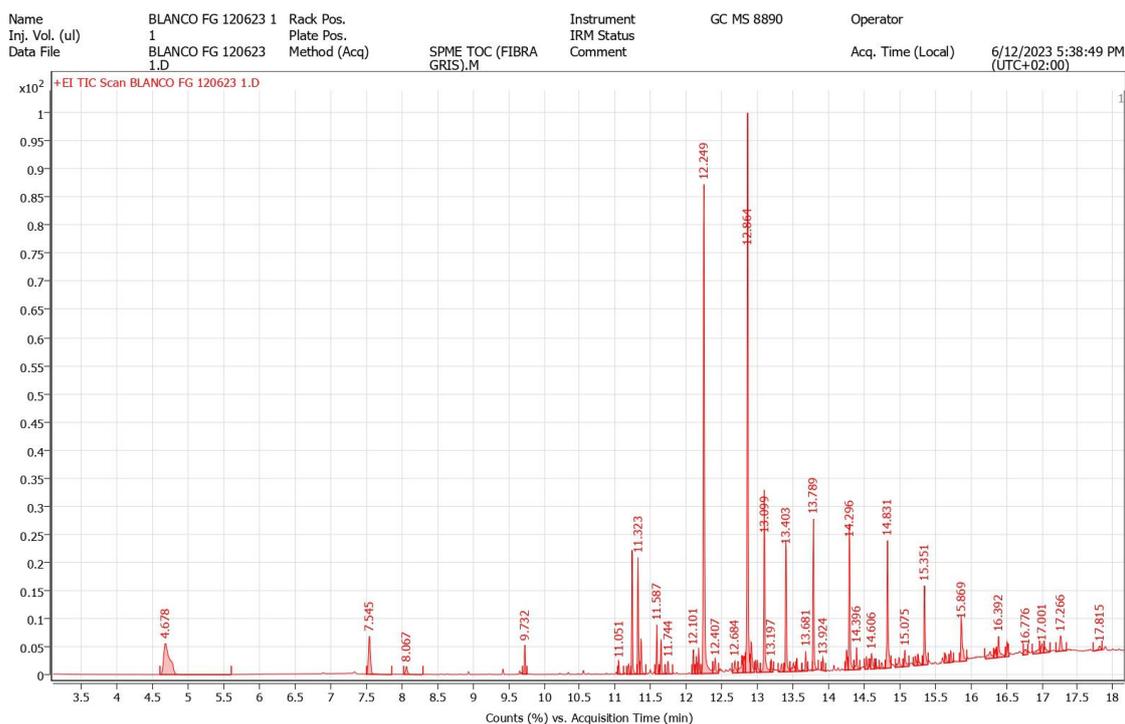


Figura 21. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23004 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

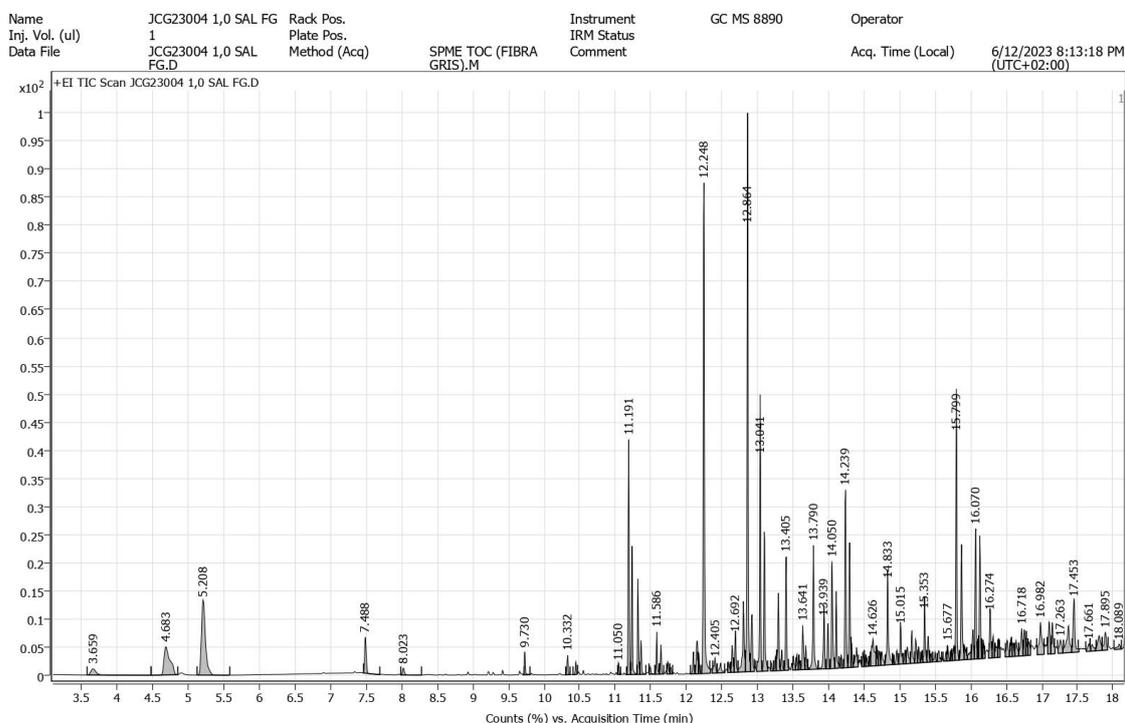


Figura 22. Cromatograma de la muestra JCG23004 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 100 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

7.3.5. Muestra JCG23005.

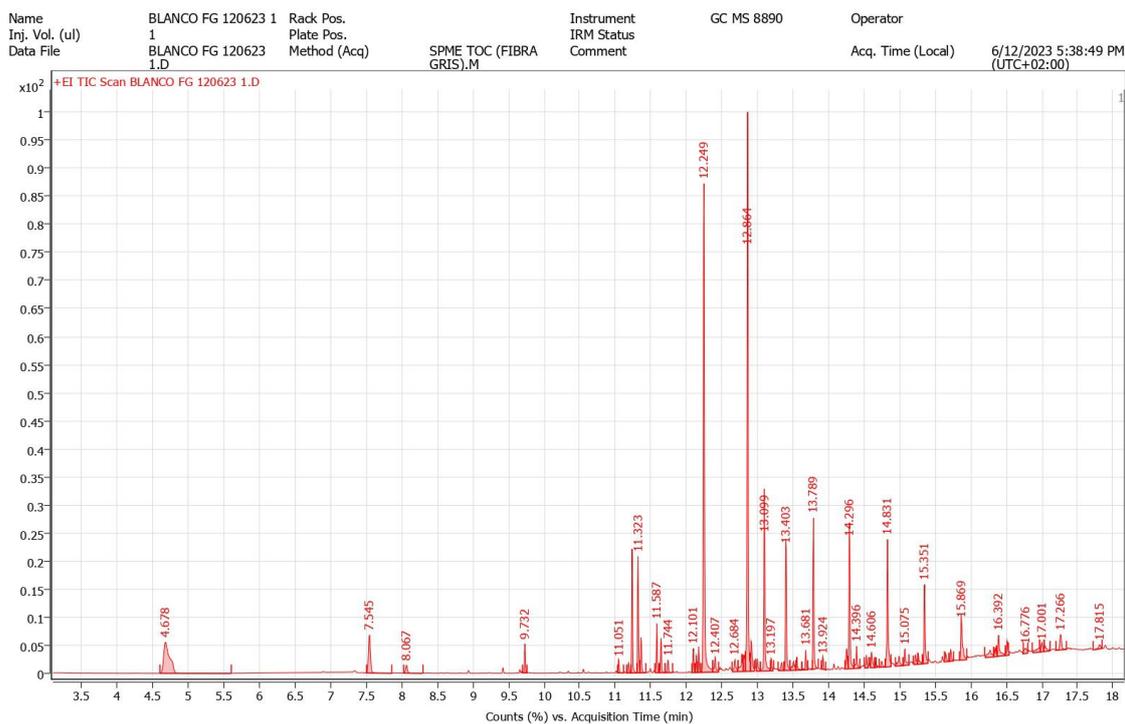


Figura 23. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23005 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

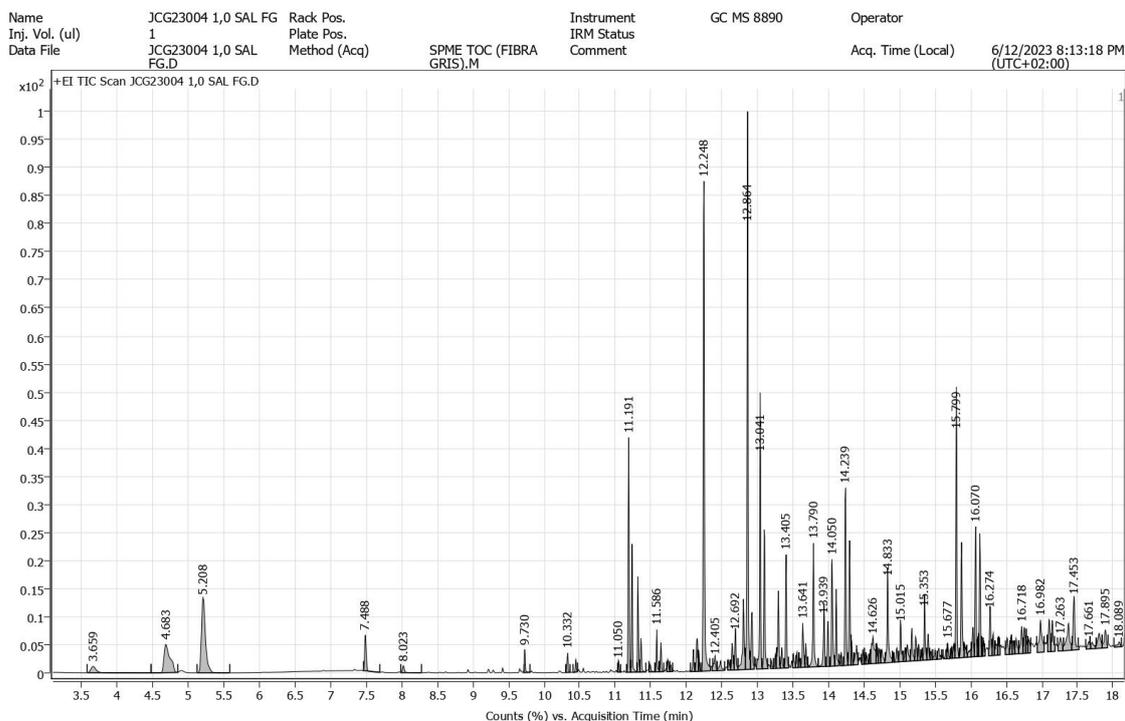


Figura 24. Cromatograma de la muestra JCG23005 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 100 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

7.3.6. Muestra JCG23006.

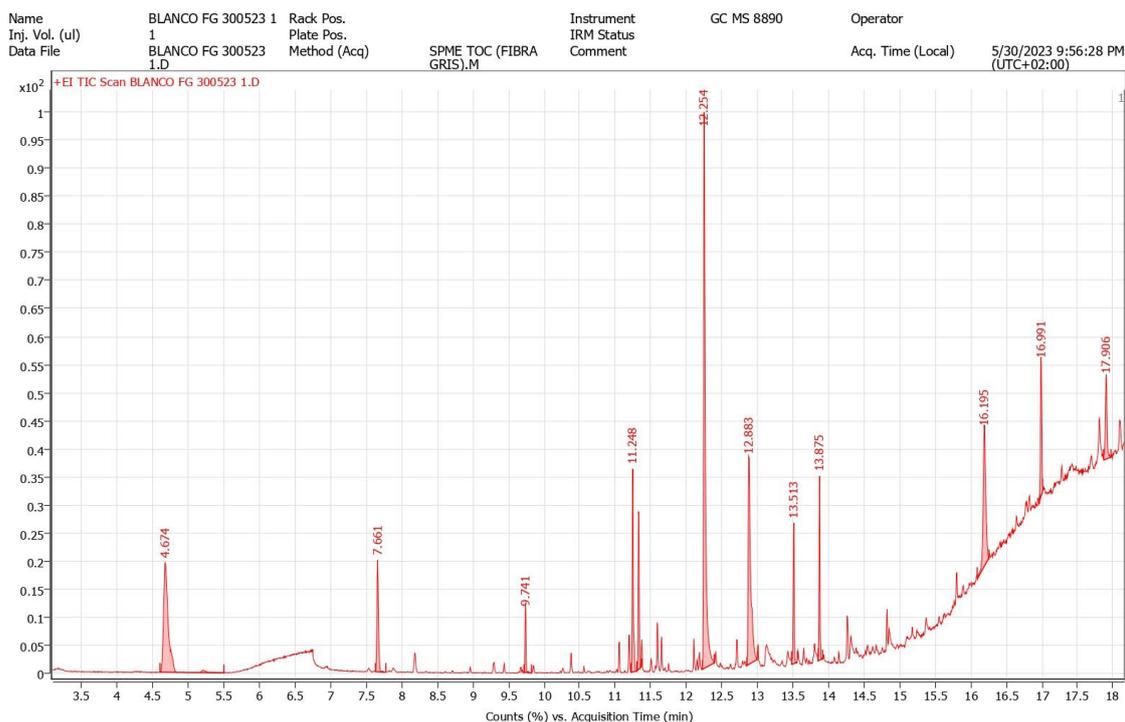


Figura 25. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23006 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

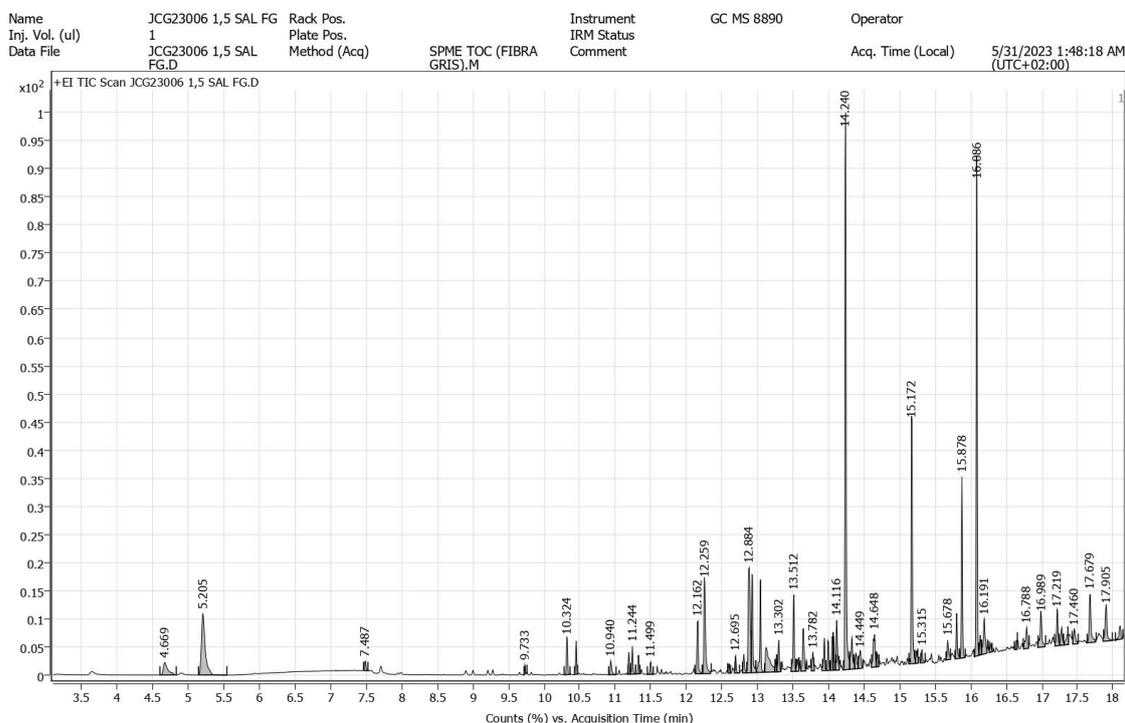


Figura 26. Cromatograma de la muestra JCG23006 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 150 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

7.3.7. Muestra JCG23007.

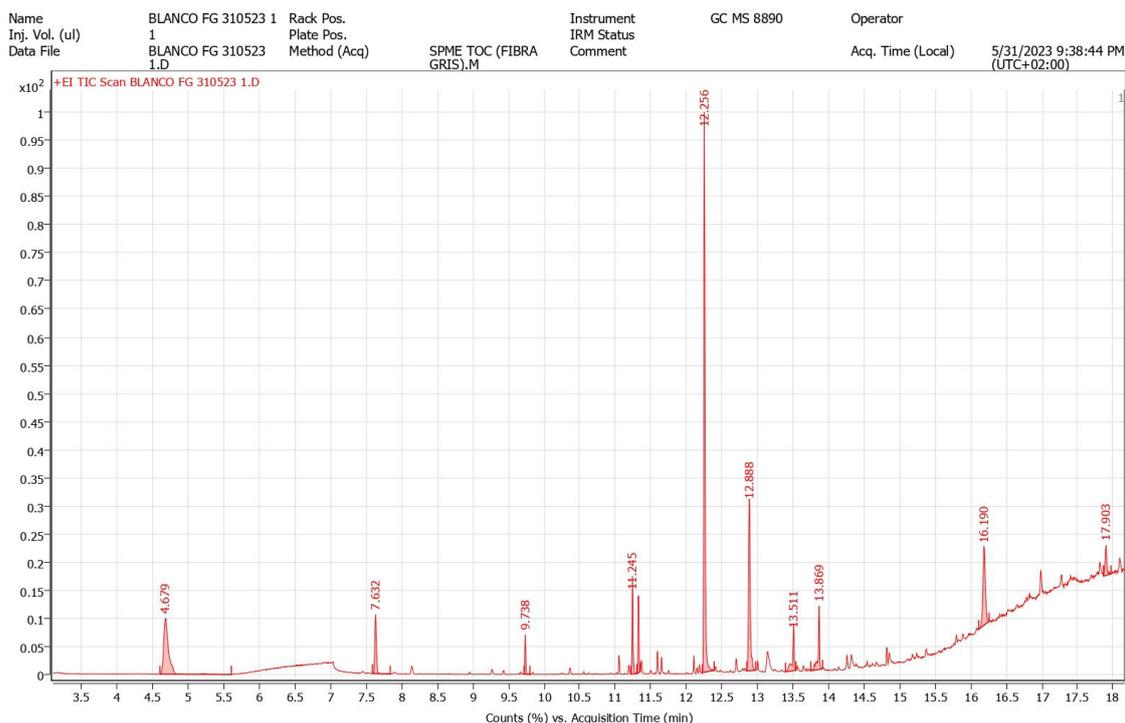


Figura 27. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23007 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

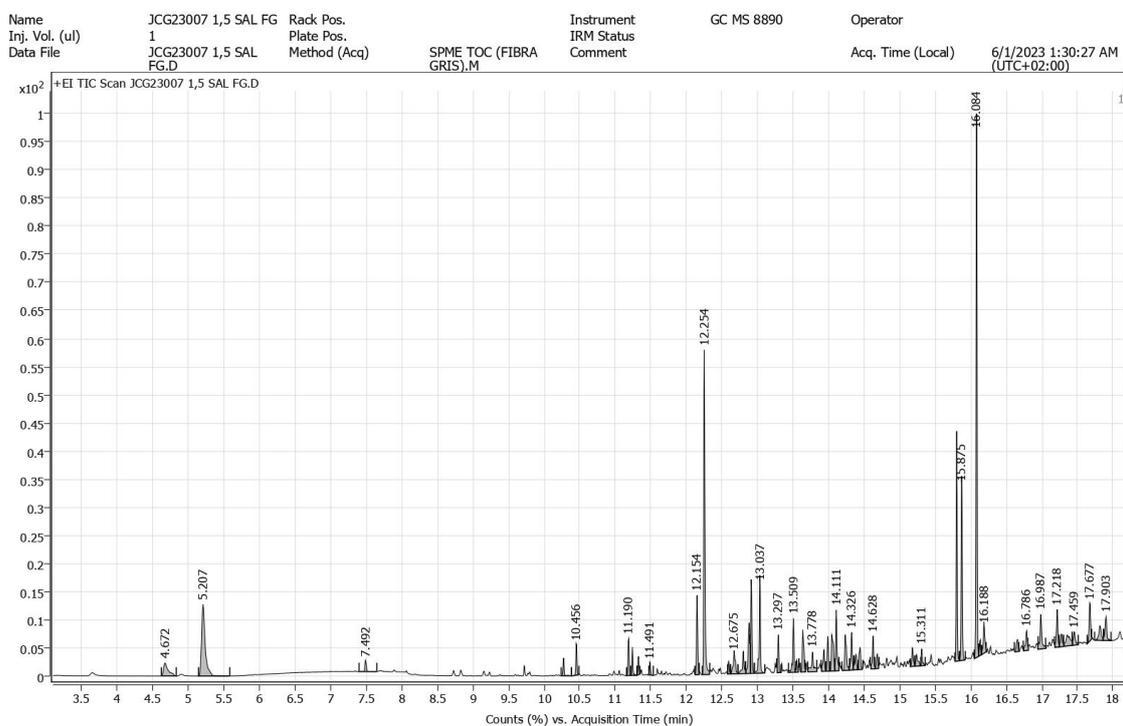


Figura 28. Cromatograma de la muestra JCG23007 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 150 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

7.3.8. Muestra JCG23008.

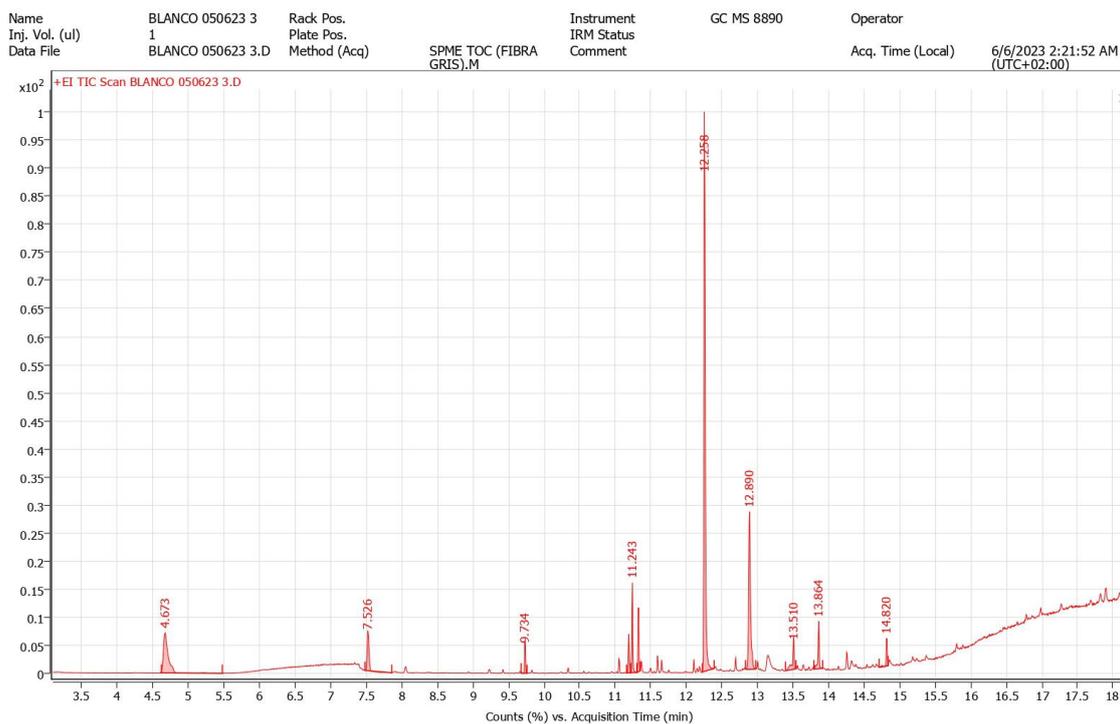


Figura 29. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23008 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

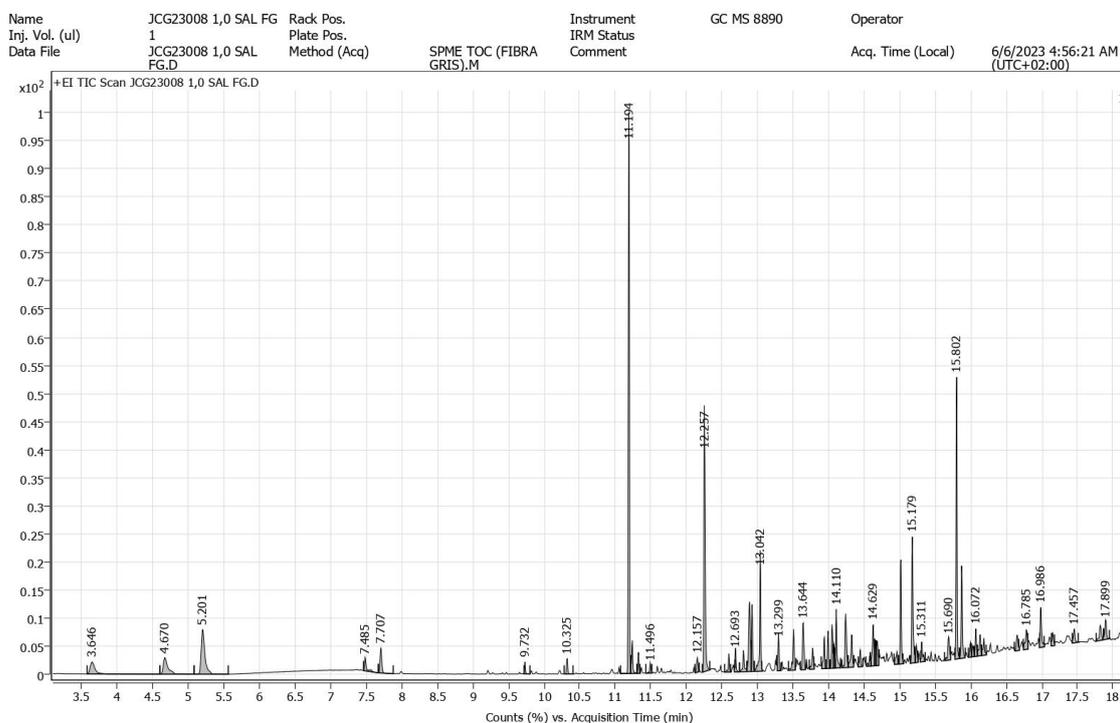


Figura 30. Cromatograma de la muestra JCG23008 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 100 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

7.3.9. Muestra JCG23009.

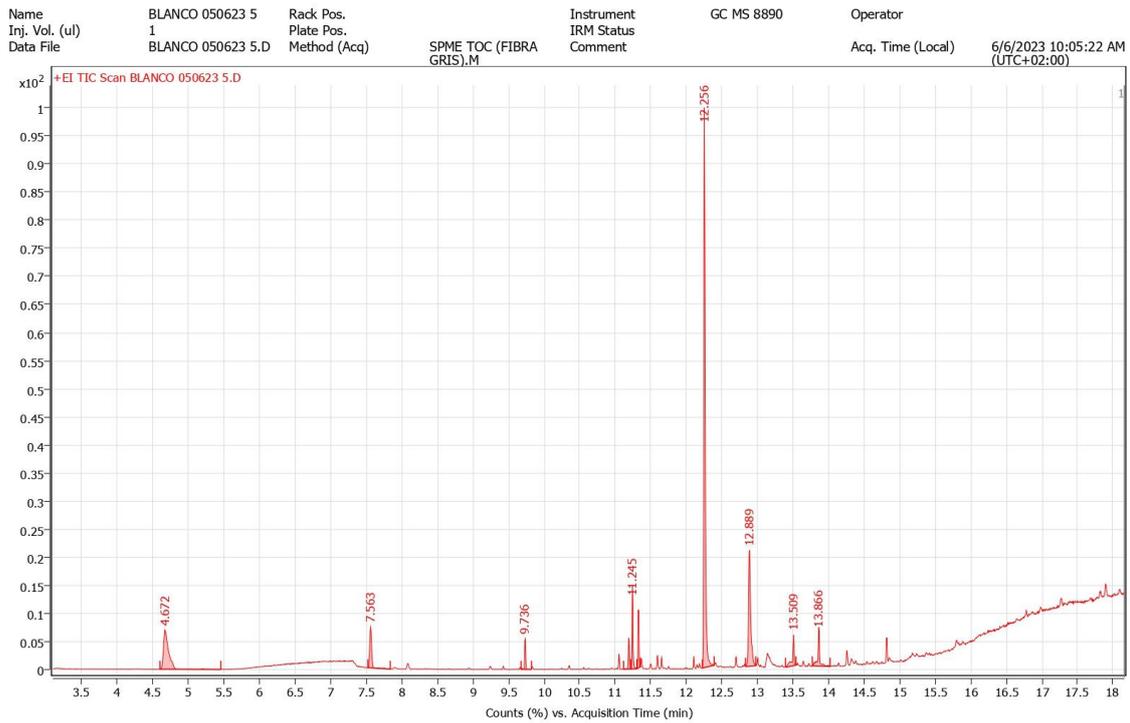


Figura 31. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23009 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

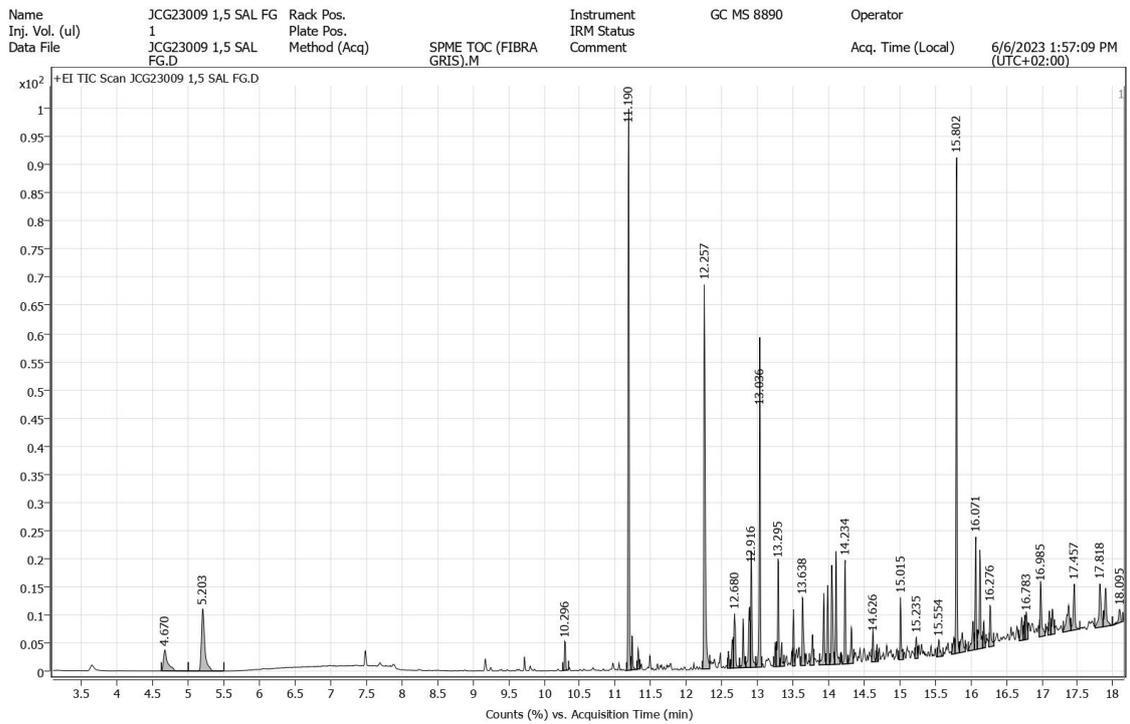


Figura 32. Cromatograma de la muestra JCG23009 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 150 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

7.3.10. Muestra JCG23010.

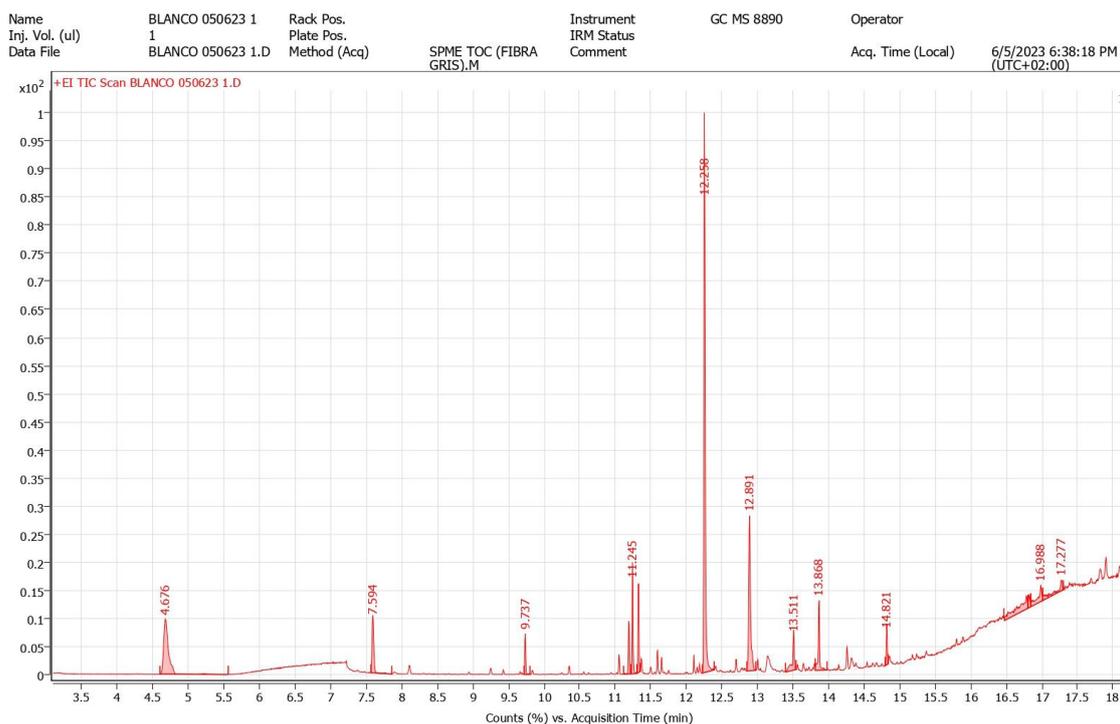


Figura 33. Cromatograma del blanco de análisis para la muestra JCG23010 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.

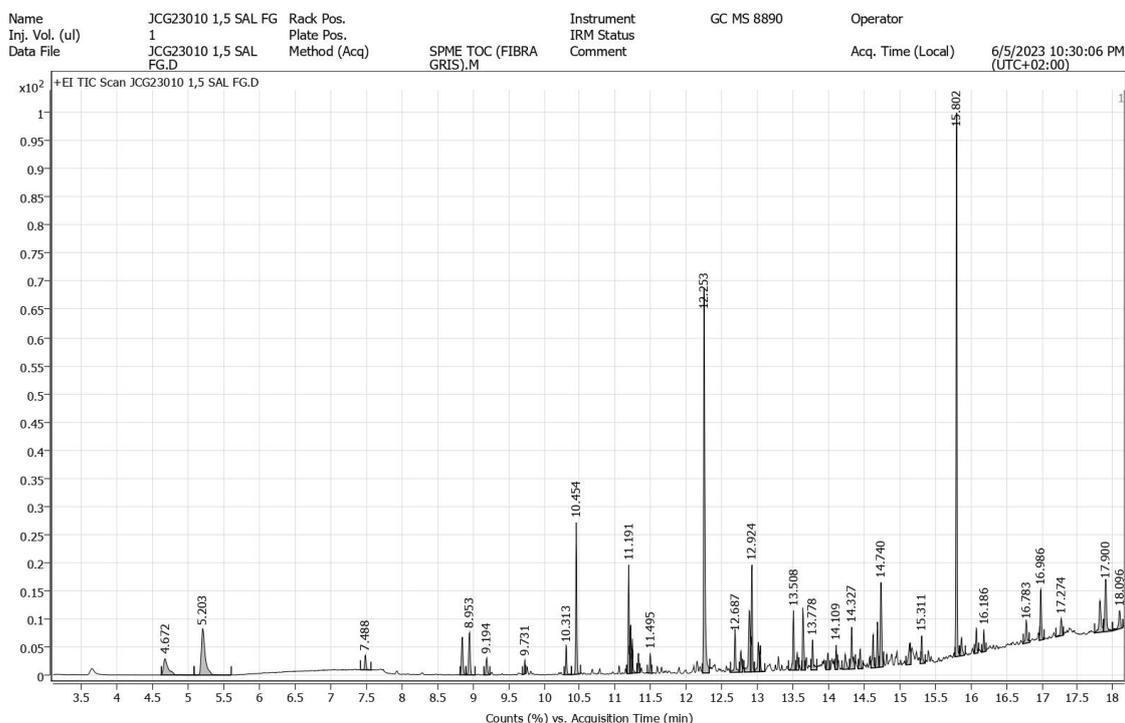


Figura 34. Cromatograma de la muestra JCG23010 obtenido por SMPE-GC-MS utilizando la fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS y adicionando 150 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl.

Tabla 4. Compuestos orgánicos identificados y cuantificados en la muestra JCG23010. Se muestran los valores de tiempo de retención (RT), área de pico cromatográfico, concentración en granza, fórmula y nombre del compuesto, número CAS y puntuación de coincidencia asignada por el software Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0. Se obtiene el mismo tipo de tabla para cada una de las muestras analizadas. Las filas sombreadas se corresponden con los compuestos presentes en el blanco de análisis.

RT	Area	Conc. (ppm)	Formula	Name	CAS ID	Score
4,672	576372	48	C8 H24 O4 Si4	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	556-67-2	89,76
5,203	1327470	111	C7 H8	Toluene	108-88-3	89,32
7,488	147712	12	C10 H30 O5 Si5	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	541-02-6	86,47
8,851	423890	35	C16 H34	Nonane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-	4390-04-9	79,02
8,953	475874	40	C16 H34	Dodecane, 2,2,11,11-tetramethyl-	127204-12-0	78,54
9,194	173514	15	C8 H16 O	Cyclooctyl alcohol	696-71-9	73,41
9,731	86672	7	C12 H36 O6 Si6	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	540-97-6	95,39
10,313	265902	22	C9 H18 O	Nonanal	124-19-6	79,45
10,454	1173385	98	C8 H18 O	2,4,4-Trimethyl-1-pentanol	16325-63-6	82,84
11,191	764327	64	C9 H18 O2	Formic acid, 2-ethylhexyl ester	1000368-94-7	80,47
11,219	368522	31	C10 H20 O	Decanal	112-31-2	80,6
11,243	255937	21	C14 H22 O3 Si	Isovanillin, TBDMS derivative	1000352-85-0	70,49
11,328	136185	11	C13 H22 O3 Si2	2,5-Dihydroxybenzaldehyde, 2TMS derivative	56114-69-3	70,65
11,495	166268	14	C7 H6 O	Benzaldehyde	100-52-7	87,93
12,253	3747549	313	C2 H8 O2 Si	Silanediol, dimethyl-	1066-42-8	87,06
12,687	429289	36	C12 H24 O	Dodecanal	112-54-9	83,5
12,769	226101	19	C17 H34 O2	Hexanoic acid, 3,5,5-trimethyl-, 2-ethylhexyl ester	1000406-82-2	73,16
12,889	788364	66	C8 H9 N O2	Oxime-, methoxy-phenyl-	1000222-86-6	82,52
12,924	940558	79				
13,016	314478	26				
13,04	182365	15				
13,508	490561	41	C10 H20 O4	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-, acetate	124-17-4	70,22
13,561	160063	13				
13,643	582245	49				
13,778	320903	27				

13,993	156841	13				
14,109	197531	17				
14,237	207494	17				
14,327	486206	41				
14,446	177932	15	C9 H16 N2 O	1H-Pyrazole-1-carboxaldehyde, 4-ethyl-4,5-dihydro-5-propyl-	54411-09-5	72,47
14,628	347788	29	C10 H16 O2	2-Cyclohexen-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-6-(1-methylethyl)-	490-03-9	76,19
14,69	398401	33				
14,74	945719	79				
15,14	293019	25				
15,311	283483	24				
15,802	4219195	353	C19 H30 O3	Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	166273-38-7	87,04
15,871	204432	17				
16,081	233338	20				
16,186	172730	14	C12 H14 O4	Diethyl Phthalate	84-66-2	71,01
16,783	277904	23				
16,986	507393	42				
17,274	188298	16				
17,819	495884	41	C22 H42 O10	15,15'-Bi-1,4,7,10,13-pentaoxacyclohexadecane	109773-67-3	70,14
17,9	697326	58				
18,096	267324	22	C20 H38 O10	(2S,2'S)-2,2'-Bis[1,4,7,10,13-pentaoxacyclopentadecane]	95721-96-3	71,62

Tabla 5. Compuestos orgánicos mayoritarios en cada una de las muestras analizadas. Se muestra el nombre del compuesto, su número CAS y la concentración en la granza de EVA.

Muestra	Compuestos mayoritarios	No. CAS	Concentración (ppm)
JCG23002	Toluene	108-88-3	1401
	Ethane-1,2-diyl diisobutyl dicarbonate	1000378-28-0	298
	Heptane, 1,1'-oxybis-	629-64-1	263
	Hexanoic acid, 3,5,5-trimethyl-	3302-10-1	179
	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	84-69-5	90
JCG23003	2,4-Di-tert-butylphenol	96-76-4	257
	Heptane, 1,1'-oxybis-	629-64-1	245
	Toluene	108-88-3	234
	Vanillin, TBDMS derivative	1000352-84-6	156
	15,15'-Bi-1,4,7,10,13-pentaoxacyclohexadecane	109773-67-3	43
JCG23004	Toluene	108-88-3	591
	Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	166273-38-7	557
	Heptane, 1,1'-oxybis-	629-64-1	442
	Isovanillin, TBDMS derivative	1000352-85-0	247
	15,15'-Bi-1,4,7,10,13-pentaoxacyclohexadecane	109773-67-3	164
JCG23005	Ethane-1,2-diyl diisobutyl dicarbonate	1000378-28-0	831
	Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	166273-38-7	545
	Hexanoic acid, 3,5,5-trimethyl-	3302-10-1	439
	Nonanoic acid	112-05-0	370
	Toluene	108-88-3	223
JCG23006	Hexanoic acid, 3,5,5-trimethyl-	3302-10-1	677
	Nonanoic acid	112-05-0	315
	Toluene	108-88-3	233
	1,4-Benzenediol, diacetate	1205-91-0	196
	Benzene, propoxy-	622-85-5	71
JCG23007	Toluene	108-88-3	216
	2,4-Di-tert-butylphenol	96-76-4	189

	1,4-Benzenediol, diacetate	1205-91-0	178
	Benzene, propoxy-	622-85-5	73
	lilac alcohol epoxide	1000372-68-6	53
JCG23008	2,4-Di-tert-butylphenol	96-76-4	254
	Nonanoic acid	112-05-0	146
	Toluene	108-88-3	145
	Glutaric acid, ethyl 3-heptyl ester	1000359-73-0	105
	Phenol, 4-propoxy-	18979-50-5	99
JCG23009	Heptane, 1,1'-oxybis-	629-64-1	358
	Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	166273-38-7	318
	Toluene	108-88-3	124
	Succinic acid, cyclohexylmethyl (2-methylcyclohex-1-en-1-yl)methyl	1000391-42-0	79
	lilac alcohol epoxide	1000372-68-6	66
JCG23010	Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	166273-38-7	353
	Toluene	108-88-3	111
	2,4,4-Trimethyl-1-pentanol	16325-63-6	98
	15,15'-Bi-1,4,7,10,13-pentaoxacyclohexadecane	109773-67-3	41
	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-, acetate	124-17-4	41

7.4. Identificación y cuantificación de acetato de vinilo y ácido acético residuales por HS-GC-FID.

7.4.1. Patrón de acetato de vinilo y ácido acético.

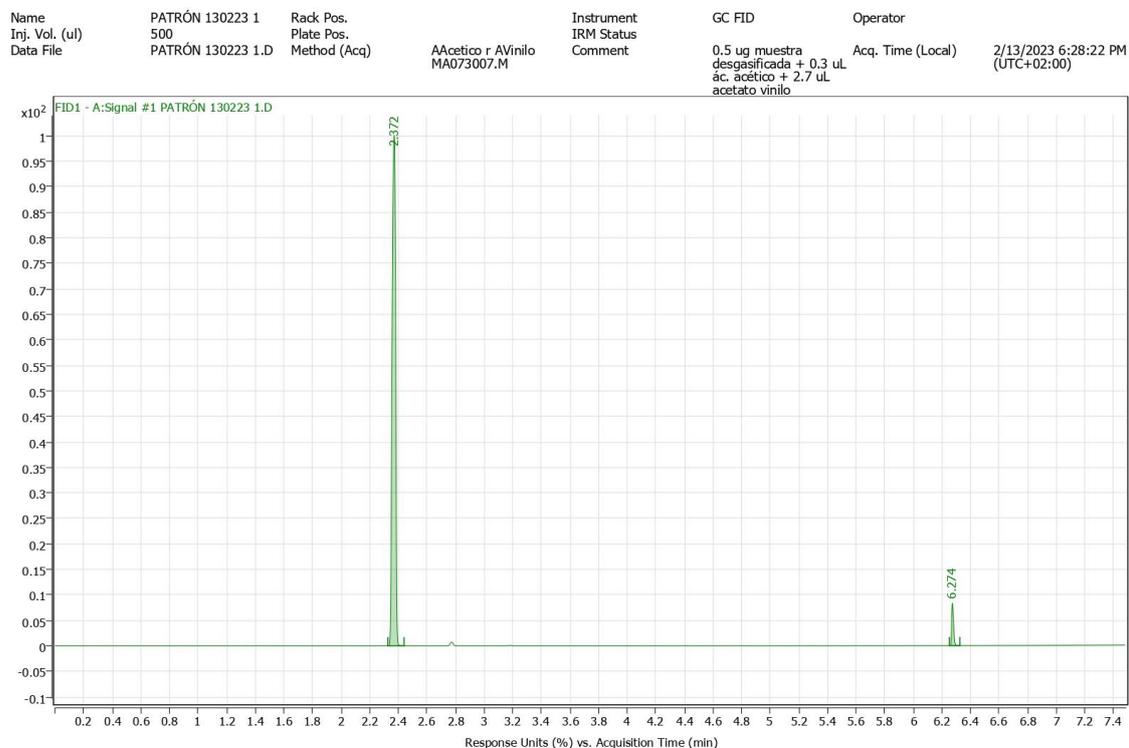


Figura 35. Cromatograma del patrón de acetato de vinilo y ácido acético obtenido por HS-GC-FID. El pico cromatográfico de mayor intensidad a tiempo de retención 2.4 min se corresponde con el acetato de vinilo, mientras que el pico a tiempo de retención 6.3 min se corresponde con el ácido acético.

7.4.2. Muestra JCG23002.

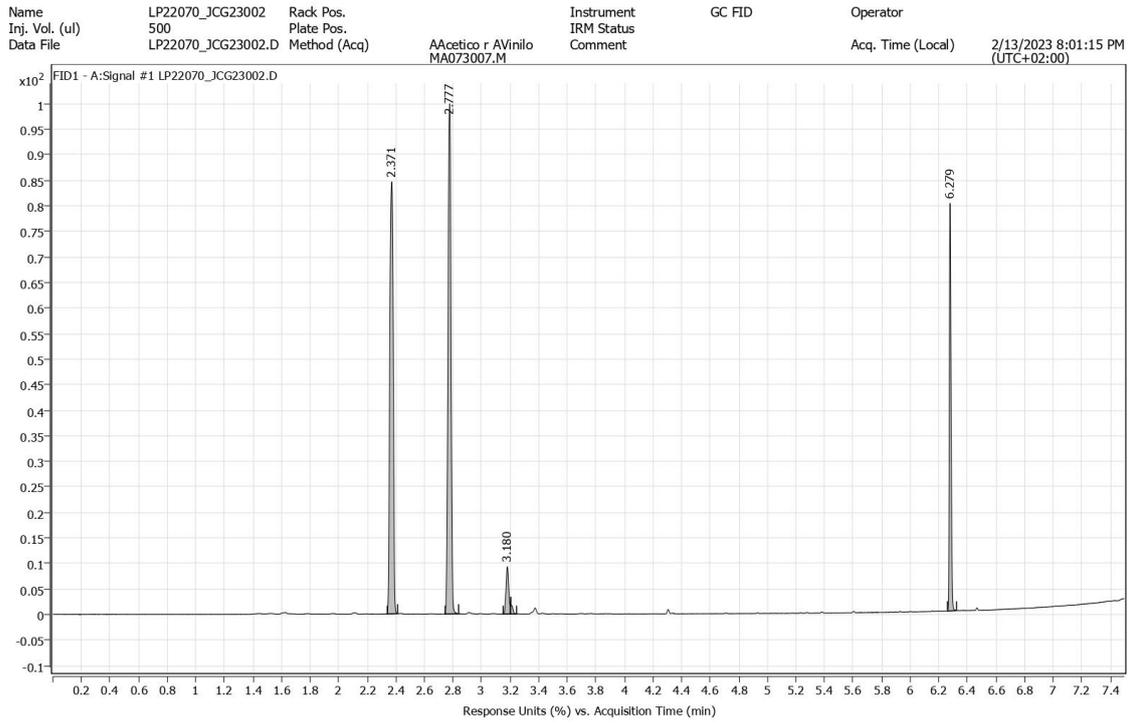


Figura 36. Cromatograma de la muestra JCG23002 obtenido por HS-GC-FID.

7.4.3. Muestra JCG23003.

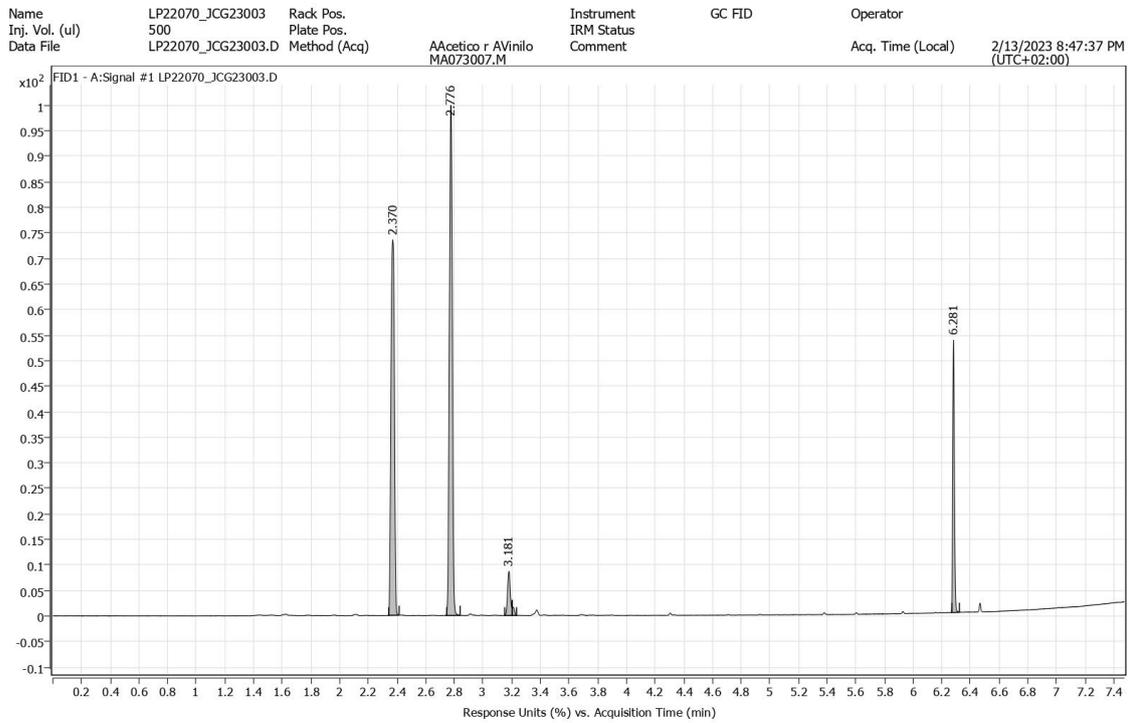


Figura 37. Cromatograma de la muestra JCG23003 obtenido por HS-GC-FID.

7.4.4. Muestra JCG23004.

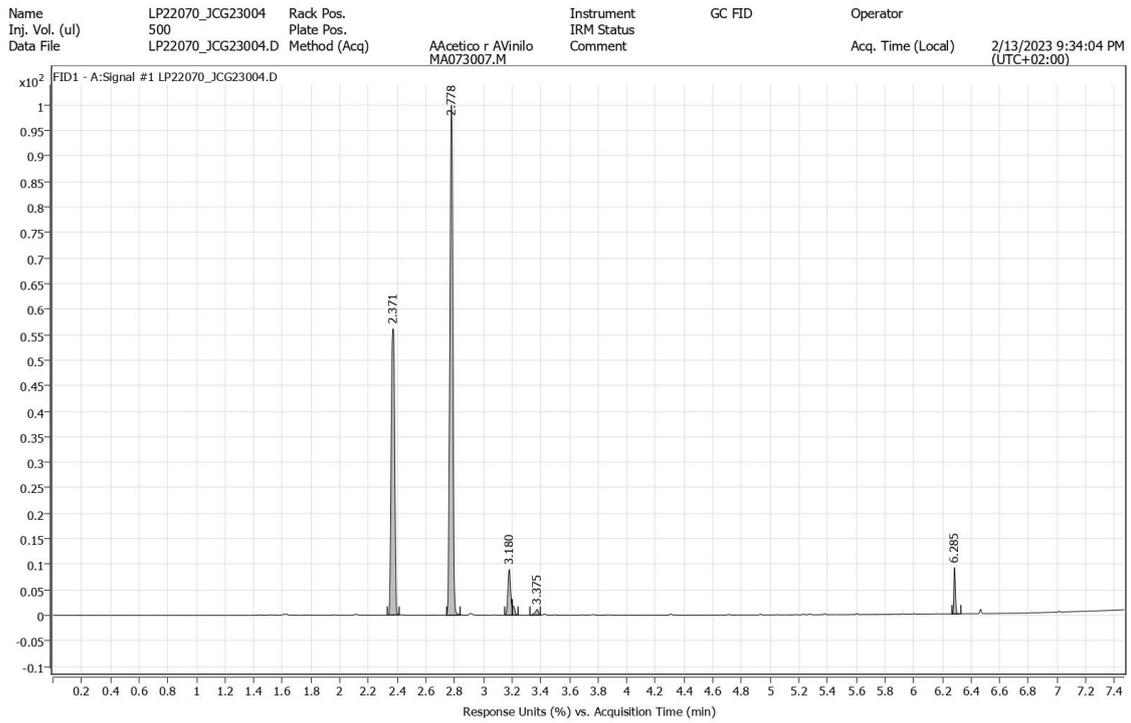


Figura 38. Cromatograma de la muestra JCG23004 obtenido por HS-GC-FID.

7.4.5. Muestra JCG23005.

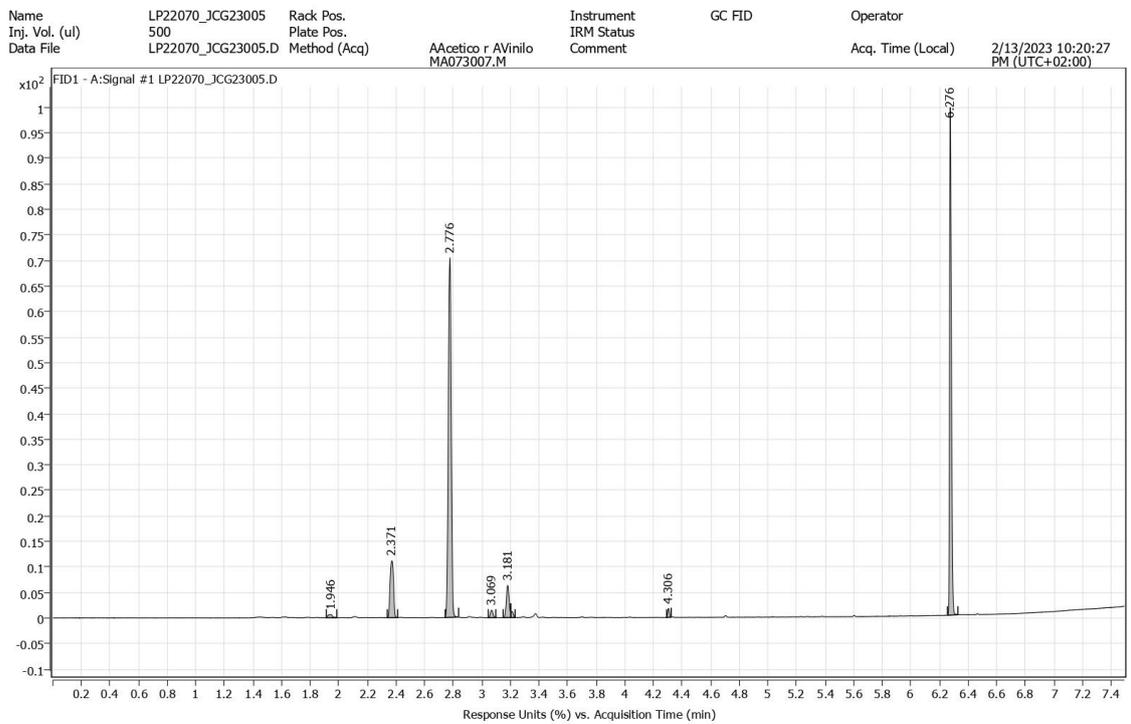


Figura 39. Cromatograma de la muestra JCG23005 obtenido por HS-GC-FID.

7.4.6. Muestra JCG23006.

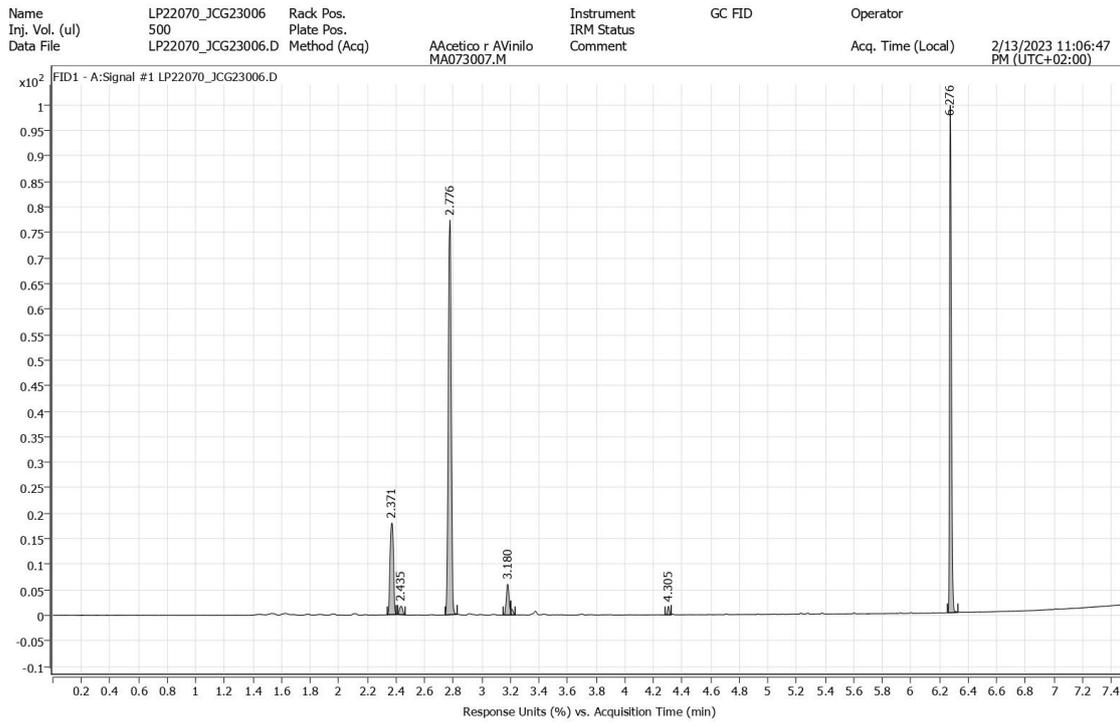


Figura 40. Cromatograma de la muestra JCG23006 obtenido por HS-GC-FID.

7.4.7. Muestra JCG23007.

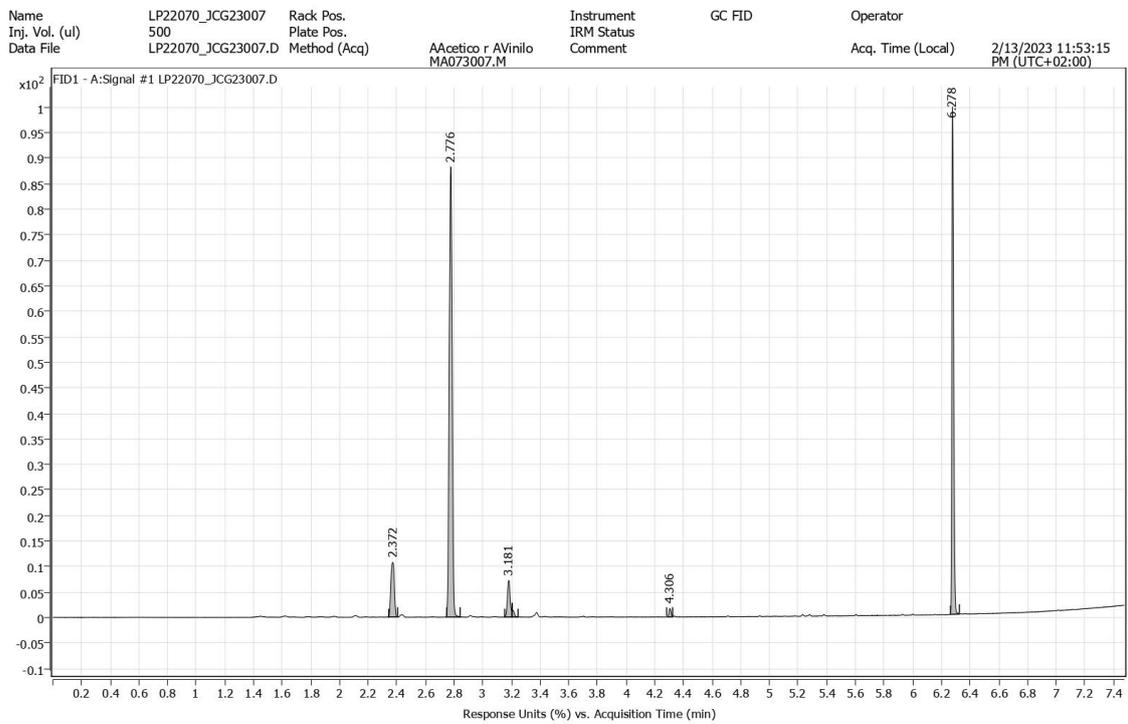


Figura 41. Cromatograma de la muestra JCG23007 obtenido por HS-GC-FID.

7.4.8. Muestra JCG23008.

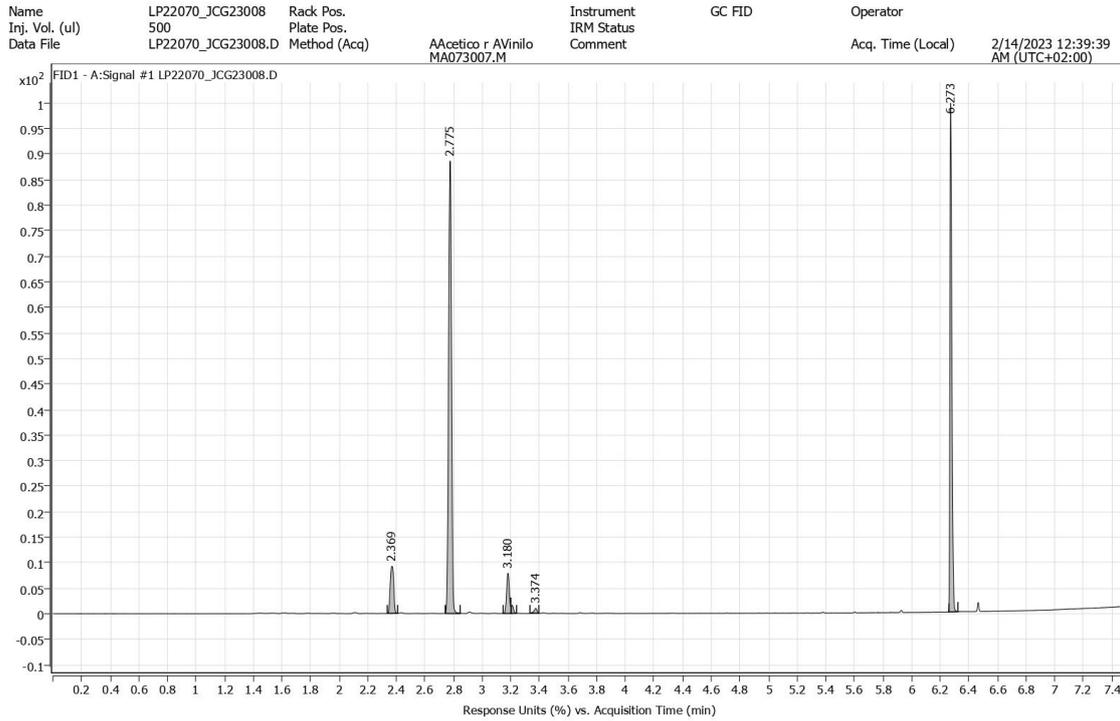


Figura 42. Cromatograma de la muestra JCG23008 obtenido por HS-GC-FID.

7.4.9. Muestra JCG23009.

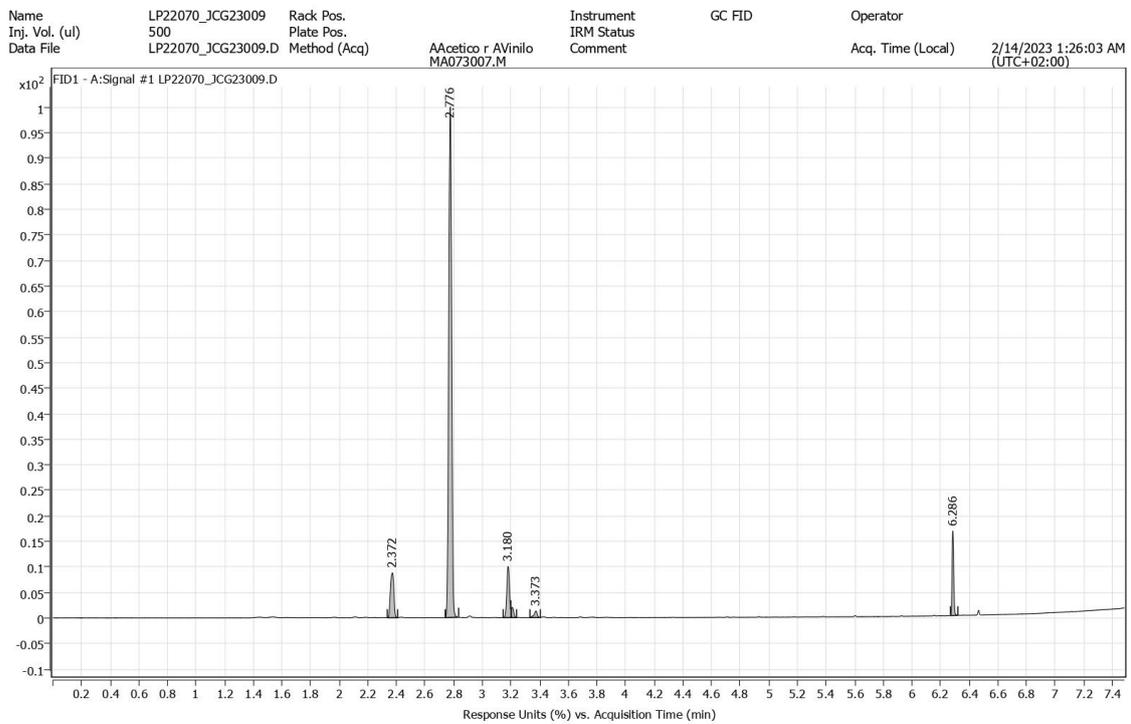


Figura 43. Cromatograma de la muestra JCG23009 obtenido por HS-GC-FID.

7.4.10. Muestra JCG23010.

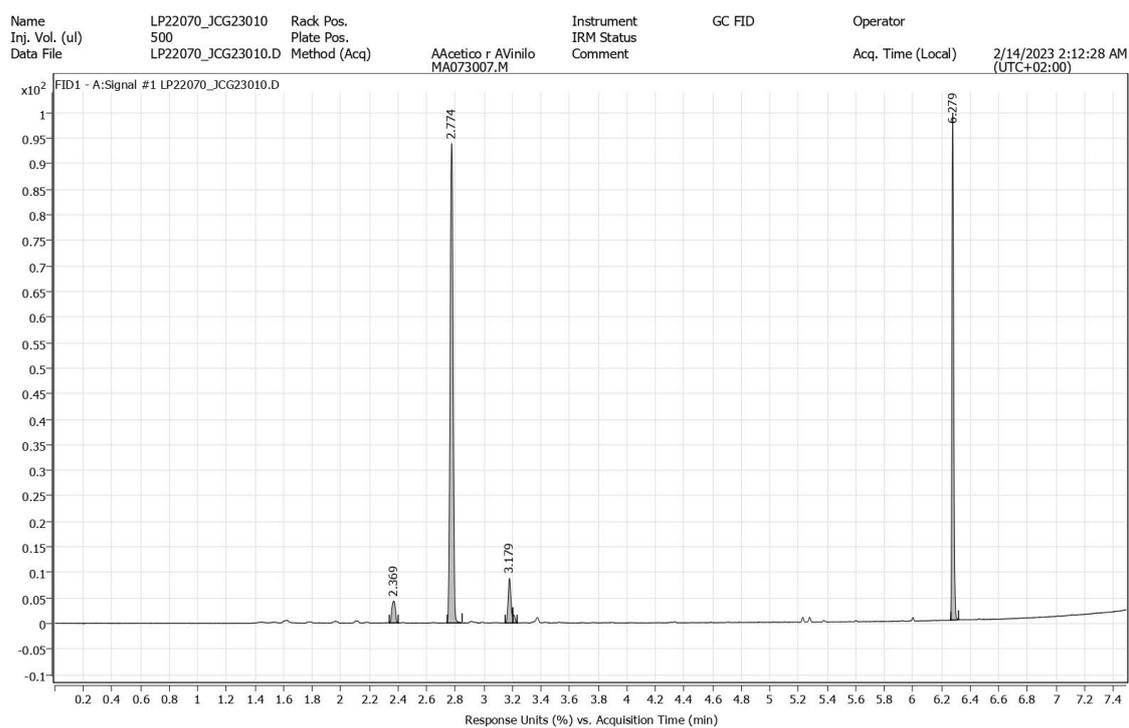


Figura 44. Cromatograma de la muestra JCG23010 obtenido por HS-GC-FID.