

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA CLAR
(CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN), PARA LA
DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN PROCESOS DE
BIODEGRADACIÓN**

JONATHAN EDUARDO CORAL SARRIA



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2011**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA CLAR
(CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN), PARA LA
DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN PROCESOS DE
BIODEGRADACIÓN**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Químico**

JONATHAN EDUARDO CORAL SARRIA

DIRECTOR

OLGA LUCÍA HOYOS S., Ph.D

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

ASESORES

MAITE DEL PILAR RADA M., Ph.D

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA, CALIDAD
MEDIOAMBIENTAL Y SEGURIDAD AGROALIMENTARIA**

ZULLY ADRIANA HURTADO, Qca.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2011**

Nota de Aceptación.

Director _____
PhD. Olga Lucia Hoyos Saavedra

Jurado _____
PhD. Ricardo Benítez Benítez

Jurado _____
Dr. Edier Humberto Pérez

Fecha de sustentación: Popayán, 22 de diciembre de 2010

DEDICATORIA

A Dios, por colocarme en este magnífico y misterioso mundo de las ciencias; a toda mi familia, ya que fueron mi apoyo incondicional para lograr esta etapa de mi vida; a mis amigos, compañeros y profesores, por compartir estos valiosos conocimientos

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Olga Lucía Hoyos, por la dirección en el trabajo.

A los Profesores del grupo de investigación QPN: Dr. Ricardo Benítez, Dr. Jaime Martín y Dr. Luís Lenis por sus consejos y ayuda, por su amistad.

A la Unidad de Análisis Industrial, a su coordinador el M.Sc. Fernando Hernández, por facilitar el préstamo de los equipos.

Al departamento de química.

A la Universidad del Cauca.

Al Centro Regional de Productividad por la financiación del proyecto.

A mi familia, por permitirme tomar este camino.

A mis amigos y compañeros...gracias por todo.

A Dios, por ser mi guía espiritual...mi fuerza.

Gracias

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN.....	16
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	18
1.1 POLÍMEROS.....	18
1.1.1 Termoplásticos.....	18
1.1.2 Materiales naturales para empaques biodegradables.....	19
1.2 BIODEGRADACIÓN DE POLÍMEROS	21
1.2.1 Factores Abióticos.....	21
1.2.2 Factores Bióticos.....	21
1.2.2.1 Biodeterioro.....	22
1.2.2.2 Biofragmentación.....	23
1.2.2.3 Asimilación.....	23
1.3 SEGUIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN	25
1.3.1 Fermentación (liberación de sustancias orgánicas).....	29
1.4 ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	29
1.4.1 Determinación de ácidos orgánicos.....	33
1.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	35
1.5.1 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa.....	37
1.5.1.1 Detección y fases estacionarias en CLAR de fase reversa.....	39
1.5.1.2 Análisis cuantitativo por CLAR en fase reversa.....	40
1.6 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
1.6.1 Sensibilidad analítica.....	40
1.6.2 Intervalo lineal.....	41
1.6.3 Precisión.....	41
1.6.4 Exactitud.....	42
1.7 ESTADÍSTICA PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO	42
1.7.1 Estadística descriptiva.....	42

1.7.2	Contrastes de significación.....	43
2.	METODOLOGÍA.....	44
2.1	MATERIALES Y REACTIVOS.....	44
2.1.1	Equipos	44
2.1.2	Reactivos.....	44
2.1.3	Solventes grado HPLC	45
2.2	MUESTRAS	45
2.2.1	Simulación del proceso de biodegradación	45
2.2.1.1	Preparación de la solución mineral (SM):.....	46
2.2.1.2	Adición del material polimérico	46
2.2.2	Proceso de elaboración de ensilaje.....	48
2.2.2.1	Tratamiento de la muestra.....	48
2.3	IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA	48
2.3.1	Preparación de soluciones	49
2.3.2	Preparación de la fase móvil	49
2.3.2.1	Preparación de las soluciones stock	49
2.3.3	Condiciones cromatográficas para la implementación del método.....	50
2.3.3.1	Selección de la longitud de onda.....	50
2.3.3.2	Selección de la columna.....	50
2.3.3.3	Composición de la fase móvil.....	51
2.3.3.4	Velocidad de flujo	51
2.3.3.5	Tiempos de retención	51
2.3.4	Figuras de merito para el método analítico	51
2.3.4.1	Linealidad	52
2.3.4.2	Sensibilidad	52
2.3.4.3	Precisión.....	52
2.3.4.4	Exactitud.....	53
2.4	CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS GENERADOS EN PROCESOS DE BIODEGRADACIÓN	54
2.5	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS EN PROCESOS DE ELABORACIÓN DE ENSILAJES	55

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
3.1	TRATAMIENTO DE MUESTRA	56
3.1.1	Proceso de biodegradación.....	56
3.1.2	Proceso de elaboración de ensilaje.....	58
3.2	IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA	58
3.2.1	Condiciones cromatográficas para la implementación del método.....	58
3.2.1.1	Selección de la longitud de onda.....	58
3.2.1.2	Selección de la columna.....	58
3.2.1.3	Elección de la fase móvil	60
3.2.1.4	Selección del flujo óptimo.....	63
3.2.1.5	Tiempos de retención	65
3.2.2	Figuras analíticas de mérito para el método (análisis estadístico)	65
3.2.2.1	Linealidad	66
3.2.2.2	Sensibilidad	67
3.2.2.3	Precisión.....	68
3.2.2.4	Exactitud.....	70
3.3	CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS GENERADOS EN PROCESOS DE BIODEGRADACIÓN	72
3.4	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS EN PROCESOS DE ELABORACIÓN DE ENSILAJES	76
4.	CONCLUSIONES.....	80
	BIBLIOGRAFÍA	82

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1	Formas de estudiar la biodegradación en materiales poliméricos biodegradables.	27
Tabla 2	Estándares utilizados para las pruebas de resistencias de polímeros	28
Tabla 3	Algunos ácidos orgánicos, producidos en los procesos de fermentación (propiedades fisicoquímicas)	31
Tabla 4	Clasificación de cromatografía líquida según su fase estacionaria	35
Tabla 5	Partes esenciales de un cromatógrafo líquido de alta resolución	38
Tabla 6	Principales ventajas del uso de una fase estacionaria en fase reversa en una separación	39
Tabla 7	Muestras de elaboración de ensilaje, tratamientos y tiempos de fermentación	48
Tabla 8	Cantidades requeridas de los estándares, para la preparación de soluciones de 1000 ppm	49
Tabla 9	Volúmenes de la solución madre de 1000 ppm y concentraciones de las soluciones estándar obtenidas con la dilución a 10 mL	50
Tabla 10	Cambio del pH en las muestras de biodegradación a los 14, 28, 42 días de incubación	56
Tabla 11	Parámetros óptimos para la determinación de los ácidos orgánicos láctico, acético, propiónico y butírico por CLAR	64
Tabla 12	Tiempos de retención de los ácidos láctico (HLac), acético (HAc), propiónico (HPr) y butírico (HBut) analizados por CLAR (columna μ -Bondapack C ₁₈ 10 μ m x 3,9 x 150 mm y fase móvil de ácido fosfórico a pH 3,5 – MeOH (99:1) a un flujo de 0,85mL/min)	65
Tabla 13	Parámetros de calibración para los ácidos orgánicos analizados por CLAR con una columna μ -Bondapack C ₁₈ y fase móvil ácido fosfórico pH 3,5–MeOH (99:1) a flujo de 0,85 mL/min	67

Tabla 14	Coeficientes de correlación y test estadístico t, como indicador de significancia de la correlación lineal entre del área de pico y la concentración del estándar	67
Tabla 15	Límites de detección y cuantificación establecidos para los ácidos: láctico, acético, propiónico y butírico	67
Tabla 16	Medidas para determinar la repetibilidad en a) áreas y b) tiempos de retención, expresados como porcentaje del coeficiente de variación (%CV)	63
Tabla 17	Coeficientes de variación de las áreas reportadas de dos estándares (11 y 19 ppm) medidos por 10 días consecutivos	60
Tabla 18	Áreas para los estándares de 11 y 19 ppm medidos aleatoriamente durante dos meses	70
Tabla 19	Porcentaje de error relativo para los ácidos, a) acético y b) butírico formados en la simulación de biodegradación del polímero de almidón	71
Tabla 20	Porcentajes de recuperación del arrastre de vapor para ácido acético, propiónico y butírico	72
Tabla 21	Concentraciones de los ácidos acético y butírico de la simulación de biodegradación del polímero de almidón a los 14, 28 y 42 días de incubación	74
Tabla 22	Cuantificación del ácido propiónico de la muestra de biodegradación del polímero de almidón por dopaje de la muestra con estándar (11 ppm), a los 14,28 y 42 días de biodegradación	74
Tabla 23	Concentraciones encontradas por el método en las muestras de ensilaje constituidas por vísceras y residuos de pescado, a partir de tratamientos con yogurt y <i>plantarum sp.</i>	78

LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1	Formas de organización de algunos termoplásticos (cristalitos del polietileno en círculos punteados)	19
Figura 2	Biodegradación de polímeros (acción en condiciones ambientales)	22
Figura 3	Mecanismo general de una hidrólisis enzimática para un poliéster	24
Figura 4	Toma de la decisión para seguir la biodegradación	26
Figura 5	Ciclo del ácido cítrico	30
Figura 6	Metabolismo microbiano en condiciones ambientales. Posibles vías de formación de los ácidos orgánicos mediante rutas anaerobias	32
Figura 7	Cromatogramas de CLAR obtenidos en la determinación de ácidos orgánicos en: a) proceso de fermentación de residuos de camarón y b) estándares. Picos: 1) ácido láctico, 2) ácido acético y 3) ácido cítrico	33
Figura 8	Determinación de ácidos glicólico (pico 1) y láctico (pico 2) liberados en un medio de incubación después de: a) 1 día, b) 7 días y c) 14 días de degradación, en el seguimiento a la fragmentación de poli-D,L-láctico-co-glicólico (PLGA)	34
Figura 9	Reacción general para la obtención de un tipo de relleno para cromatografía (diferenciación del tipo de fase estacionaria)	36
Figura 10	Esquema de un aparato de CLAR (o HPLC)	37
Figura 11	Cromatograma típico de una elución por CLAR	38
Figura 12	Material polimérico sometido a biodegradación anaerobia. a) Polímero biodegradable, b) polímero de almidón y c) polímero no biodegradable	46
Figura 13	Material polimérico acondicionado y puesto en botellas Winkler, listo para someter a la biodegradación	47
Figura 14	Cromatogramas para las diferentes columnas evaluadas. Picos HLac: Láctico, HAc: Acético y HPr: Propiónico y HBut: Butírico	59

- Figura 15 Comparación de los cromatogramas obtenidos por CLAR en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm), con cambios de pH en la fase móvil de a) 2,5, b) 3,0 y c) 3,5 61
- Figura 16 Cromatograma CLAR para los ácidos: Láctico (HLac) y Acético (HAc) en fase móvil de H₃PO₄ a pH 4,0 en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) 61
- Figura 17 Influencia del tipo de solvente y variación del pH en la elución de los ácidos: láctico (HLac), acético (HAc) y propiónico (HPr) por CLAR, cambiando la fracción orgánica en: a) acetonitrilo (ACN) y b) metanol (MeOH), en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) 62
- Figura 18 Elución de los ácidos láctico (HLac), acético (HAc), propiónico (HPr) y butírico (HBut) con ácido a fosfórico pH 3,5-MeOH (99:1) en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) a un flujo de 0,7 mL/min 63
- Figura 19 Curva de Van Déemter para la determinación del flujo óptimo con una columna μ -Bondapack C₁₈ - 10 μ m x 3,9 x 150 mm y fase móvil compuesta por ácido fosfórico pH 3,5 – MeOH (99:1) 64
- Figura 20 Cromatograma de los patrones de ácidos orgánicos (HLac) láctico, (HAc) acético, (HPr) propiónico y (HBut) butírico obtenidos por CLAR- UV-Vis, en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) y fase móvil ácido fosfórico pH 3,5 –MeOH (99:1), con flujo de 0,85 mL/min 64
- Figura 21 Curvas de calibración para la determinación los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico, por CLAR (μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) y fase móvil ácido fosfórico pH 3,5–MeOH (99:1) a flujo de 0,85mL/min) 66
- Figura 22 Cromatogramas de las soluciones de biodegradación de los polímeros estudiados a los 28 días de incubación. Picos: HAc: Acético, HPr: Propiónico, HBut: Butírico, D: Desconocido 73
- Figura 23 Cromatogramas de la muestra de vísceras fermentadas con yogurt a) antes del arrastre, b) después del arrastre de vapor y c) solución nativa después del arrastre, para una mejor cuantificación de las sustancias. Picos: HAc: Ácido acético, HLac: láctico HPr: Ácido Propiónico 76

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	86
Anexo B. PROTOCOLO: DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS (VFA`s) POR CLAR	88
Anexo C. CALIBRADO DEL MATERIAL	92
Anexo D. CONTRASTES ESTADÍSTICOS	94
Anexo E. DATOS Y RESULTADOS COMPLEMENTARIOS	96
Anexo F. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS	106

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de varianza
ASTM	American Society for Testing and Materials
BS	British Standards Institute
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CV	Coefficiente de variación
DIN	German Standards Institute
%ER	Porcentaje de error relativo
H₀	Hipótesis nula
HAc	Ácido acético
HBut	Ácido butírico
HLac	Ácido láctico
HPr	Ácido propiónico
ISO	International Standards Organisation
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
min	Minutos
NFX	French Standards Institute
µL	Microlitro
n	Numero de muestra
nm	Nanómetro
p	Probabilidad o riesgo de rechazar H ₀ equivocadamente
ppm (mg/L)	Partes por millon
r	Coefficiente de correlación
r²	Coefficiente de determinación
%R	Porcentaje de recuperación
s	Desviación estándar
UV - Vis	Ultravioleta – Visible
\bar{x}	Media o promedio

RESUMEN

Los plásticos son sustancias de alto peso molecular conocidas como polímeros, las cuales son estructuras ligadas mediante enlaces repetitivos de unidades más pequeñas ó monómeros. La mayoría de las estructuras químicas de los polímeros sintéticos no son amigables con el medioambiente, debido a su propiedad de baja degradabilidad en las condiciones de la biosfera.

La problemática ambiental por los residuos sólidos, principalmente por el uso de plásticos desechables en Colombia, planteará en un futuro muy cercano, la necesidad de optar por alternativas de reciclaje ó de formulaciones que cumplan con las condiciones de degradabilidad biológica y/o fotoquímica.

La determinación de los ácidos orgánicos producidos principalmente en el metabolismo primario de los organismos vivos y segregados como material de desecho, brinda una alternativa para el seguimiento de la biodegradación de materiales poliméricos, ya que esta liberación sustenta su acople ambiental. Para su cuantificación se han empleado diversas técnicas analíticas siendo la cromatografía líquida en fase reversa la que ha mostrado resultados óptimos. En el presente trabajo, se estandarizó la técnica mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa con detector UV, para identificar y cuantificar cuatro ácidos orgánicos (acético, propiónico, butírico y láctico), la cual demostró ser lineal, ($r = 0,998, 0,997, 0,999, 0,999$, para los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico respectivamente), presentó buena precisión con coeficientes de variación inferiores al 5%, exactitud representada con errores sistemáticos pequeños, por debajo del 5%, buena sensibilidad basada en límites de detección de 1,5, 1,9, 1,0, 0,8 ppm y límites de cuantificación de 3,0, 3,9, 2,0 y 1,7, para los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico, respectivamente. El método se estandarizó considerando ensayos de biodegradación anaerobia, según protocolos realizados por el grupo de investigación en química de productos naturales (Q.P.N.), con la formación por cada gramo de un polímero de almidón de 11,5 mg de ácido acético, 0,37 mg de ácido propiónico y 2,87 mg de ácido butírico pasados 28 días de biodegradación.

El método estandarizado también se replicó en el análisis de muestras de un proceso de ensilaje (producido a partir de residuos de pescado) obtenidas a diferentes tiempos durante su fermentación. Los ácidos acético, propiónico y butírico se analizaron después de extraerlos por arrastre con vapor y el ácido láctico en la solución no destilada, detectando y cuantificando los ácidos acético, propiónico y láctico. La técnica de cuantificación de ácidos orgánicos por CLAR, mostró ser una herramienta útil en el análisis de estas sustancias, ya que permitió seguir el proceso de biodegradación de un material polimérico a base de almidón y la fermentación de un proceso de ensilaje, mostrando así la diversidad de aplicaciones analíticas.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos orgánicos son sustancias que se encuentran principalmente en el metabolismo primario de los organismos vivos y son segregados como material de desecho durante sus procesos catabólicos, siendo aprovechados por la naturaleza en cualquier otra ruta, ya sea de nutrición (de algunos microorganismos), degradación, mineralización, etc.; si una sustancia es degradada por medio de estos procesos de descomposición, se dice que es biodegradable [Lucas, N. et al., 2008]. Materiales como los polímeros sintéticos, ampliamente utilizados en la industria por sus diversas características físicas [Mcmurry, J., 2000], se creía que podrían ser degradados en rellenos sanitarios; hoy se sabe que se degradan muy poco en estos ambientes, debido a la falta de luz, aire, suficiente humedad y nutrientes necesarios para mantener la acción microbiana encargada de los procesos de biodegradación, dando paso a la contaminación por residuos sólidos [Chandra, R. y Rutsgi, R. 1998]. Esta propiedad de descomposición por rutas metabólicas, ausente en los polímeros sintéticos, caracteriza a los materiales que a través de los ciclos naturales sufren cambios en su estructura, transformándose en compuestos más simples y amigables con el medio ambiente como son el dióxido de carbono, metano, ácidos orgánicos, etc., las cuales reciben el nombre de sustancias biodegradables.

Actualmente, varios grupos de investigación de la Universidad del Cauca, trabajan en la elaboración de materiales termoplásticos biodegradables a partir de fuentes naturales renovables (como harinas y almidones de yuca); no obstante, para sustentar su aplicación y bajo impacto ambiental, es necesario estudiar si realmente estos materiales sufren un proceso de biodegradación.

Existen varios parámetros empleados como indicadores de la biodegradabilidad de los materiales plásticos, como son los implementados por las normas ASTM (American Society for Testing and Materials), las cuales mediante diferentes procesos y teniendo en cuenta variables como son los cambios en el peso molecular de la sustancia, producción y cuantificación de gases (CO_2 y CH_4), incremento en la biomasa, entre otras, logran la evaluación de materiales biodegradables. Estos indicadores representan una forma de estudiar el seguimiento y comportamiento de un material termoplástico biodegradable, sin embargo, una alternativa mas sencilla y que demanda menos tiempo en su evaluación, es la determinación de ácidos orgánicos (acético, láctico, propiónico y butírico), ya que con la liberación de estas sustancias debidas a los microorganismos, se demuestra el acople de los materiales poliméricos al medioambiente [Lucas, N. et al., 2008]. Considerando lo anterior, la determinación y cuantificación de ácidos orgánicos representa una herramienta útil para estudiar este tipo de materiales.

Técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección UV [Bidartl, M. et al., 1993; Kordis-Krapes, M. et al., 2001; Sánchez-Machado, D. et al., 2008], permiten obtener resultados confiables para el análisis de ácidos orgánicos; su alta sensibilidad y selectividad, y la simple preparación de muestra, la hacen una de las técnicas más ampliamente utilizadas, incluso al compararse con la cromatografía de gases e iónica [Giunchedi, P. et al., 1998].

Durante la biodegradación de polímeros y dependiendo de las condiciones establecidas, podrían encontrarse una infinidad de compuestos como resultado del proceso entre los cuales los ácidos acético, butírico, propiónico y láctico estarían presentes [Chandra, R. y Rutsgi, R., 1998; Lucas, N. et al., 2008]; un ejemplo de ello, es que estas sustancias también hacen parte de la descomposición de macromoléculas de carácter biológico (proteínas, lípidos, polisacáridos, etc.) que se encuentran en los alimentos [Swadesh, J., 2001], lo que indica que su determinación puede sustentar el estado y calidad de estos [Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

Dentro de este contexto, el método de análisis de ácidos orgánicos aparte de sustentar la biodegradación de un material polimérico, proporciona otras alternativas de estudio haciéndolo una herramienta útil en el campo analítico, pues estas sustancias pueden encontrarse en cualquier otro proceso natural en el que su secreción, producción y/o adición sean una variable de medida, como por ejemplo la calidad en vinos, en procesos de ensilajes, estudios en fluidos biológicos, etc. [Schneider, A. et al., 1987; Bidartl, M. et al., 1993; Chantragan, S. et al., 1999; Kordis-Krapes, M. et al., 2001; Karadeniz, F., 2004; Copes, J. et al., 2006 y Fei, L. et al., 2009].

En este proyecto se plantea un método para la determinación de ácidos orgánicos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en procesos de biodegradación, con el objetivo de dejar normalizada una técnica de análisis (de estas sustancias) útil en el laboratorio. Con el método implementado, se seguirá un proceso de biodegradación de materiales termoformados, elaborados en el proyecto **PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMPAQUES TERMOFORMADOS BIODEGRADABLES A PARTIR DE HARINA DE YUCA, FIBRA DE FIQUE Y PLASTIFICANTE (ID 2254)**, realizado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

La contaminación debida a los materiales termoplásticos sintéticos, aumenta cada día más, debido a su baja degradabilidad en el ambiente, cualidad que ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas, para mitigar este problema medioambiental, mediante la elaboración de nuevos materiales biodegradables; sin embargo, es preciso citar por que estos materiales no son biodegradados en el ambiente, para luego centrarse en la biodegradación de polímeros y en su seguimiento mediante la determinación de ácidos orgánicos.

1.1 POLÍMEROS

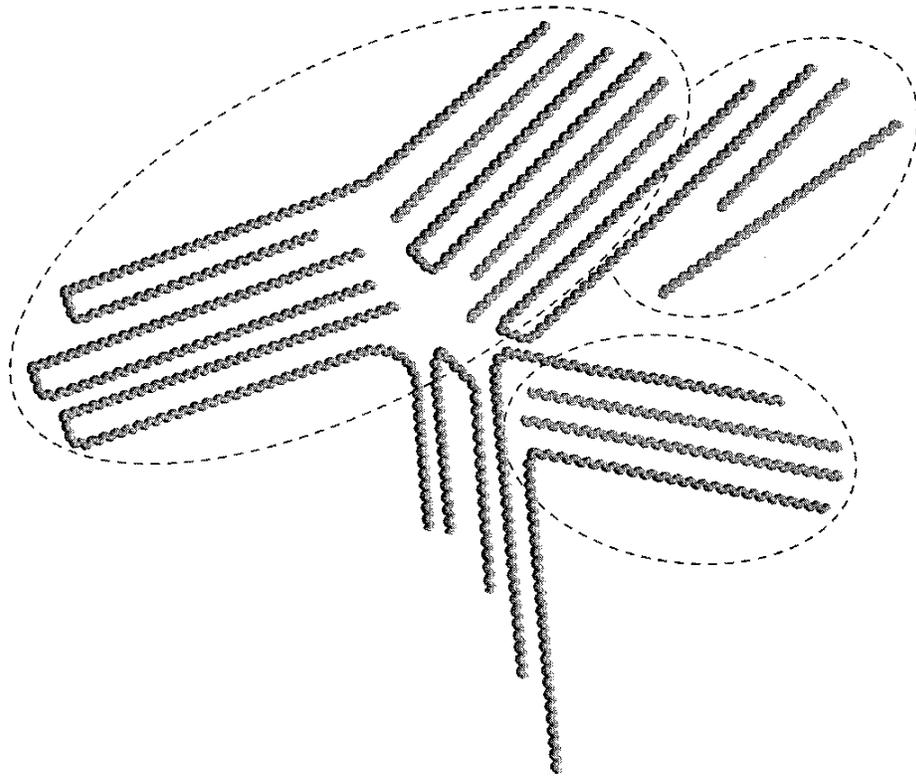
Son conocidos como sustancias de gran peso molecular, constituidas por unidades más pequeñas mediante enlaces repetitivos o monómeros. Estas macromoléculas se diferencian principalmente por sus propiedades físicas, y de acuerdo con estas, son clasificadas como: fibras, elastómeros, resinas de termofraguado y termoplásticos [Mcmurry, J., 2000]. Los últimos presentan gran versatilidad y son ampliamente utilizados, y por ello se hará énfasis sobre estos.

1.1.1 Termoplásticos

Son materiales muy apetecidos industrialmente puesto que presenta la propiedad de que son maleables con un cambio en la temperatura, permitiendo así la elaboración de artículos de uso diario para la población. Estos materiales deben sus características de maleabilidad a su estructura química y forma de organización de las cadenas poliméricas (figura 1), ya que aportan diferentes propiedades físicas que se ven afectadas con la temperatura.

El cambio de estado de estos materiales del sólido al líquido mediante un aumento en la temperatura, toma el nombre de **temperatura de fusión (T_m)**, debido a que las zonas cristalinas se hacen vulnerables con este aumento de energía y esto permite la obtención de un líquido viscoso y maleable; cuando el cambio en la temperatura solo afecta las regiones amorfas del material, tiene lugar la **temperatura de transición vítrea (T_g)**, la cual permite que tenga cierta maleabilidad [Mcmurry, J. 2000]. Estos polímeros se caracterizan por tener una T_g alta, por lo que son duros a temperatura ambiente, permitiendo que se conserve la forma como ha sido fabricado.

Figura 1. Formas de organización de algunos termoplásticos (cristalitos del polietileno en círculos punteados)



Fuente: Mcmurry, J., 2000, cap. 31

La química de estos polímeros sintéticos, no presenta afinidad con el medio ambiente, ya que no presentan una descomposición acelerada, poniendo de manifiesto su baja degradabilidad, lo cual es uno de los principales factores de contaminación por residuos sólidos. Como consecuencia de ello, se buscan materiales nuevos que cumplan ciertas características tales como resistencia y longevidad controlada, similares a las de las sustancias sintéticas [Lucas, N. et al., 2008], pero que no contaminen; estas características están en función de la biodegradabilidad del polímero y esta a su vez depende de la copolimerización de sustancias artificiales con naturales [Kister, G. et al., 2000]. Por estas razones, es preciso hablar de biodegradación y su comportamiento en el ambiente.

1.1.2 Materiales naturales para empaques biodegradables

El reemplazo total de los plásticos sintéticos por materiales biodegradables para la elaboración de empaques, no se ha logrado hasta el presente; no obstante, sí se han sustituido algunos polímeros sintéticos por otros naturales en aplicaciones específicas, lo que ha permitido el desarrollo de productos con características específicas, relacionadas con las propiedades de barrera, mecánicas y térmicas

de determinados empaques como películas, protectores, espumas, envolturas, platos, tasas, cucharas, bolsas, etc. [Villada, H. et al., 2007]

Entre las sustancias biodegradables, encontramos polipéptidos de origen natural, tales como la gelatina ó el colágeno, poliésteres bacterianos como el ácido poliláctico (PLA), polihidroxicanoatos y los polisacáridos como el almidón [Chandra, R. y Rutsji, R. 1998].

Los polipéptidos conformados generalmente por secuencias de α -aminoácidos, son susceptibles a rupturas de enlace por la hidrólisis de sus uniones peptídicas (hidrólisis de amidas), principalmente por el uso de enzimas proteolíticas poco específicas, deseadas para una biodegradación dirigida.

Los poliésteres también se hidrolizan, pero a diferencia de los anteriores, son aptos para reaccionar en medio básico, ácido y enzimático, ya que en su estructura química encontramos enlaces vulnerables a este tipo de ataques; aprovechando esta característica y con la copolimerización de estas sustancias, puede lograrse un material polimérico biodegradable [Chandra, R. y Rutsji, R., 1998; Araújo, M. et al., 2004; Lucas, N. et al., 2008].

Una de las materias primas en abundancia para llevar a cabo este tipo de procesos de copolimerización, es el almidón, específicamente el que proviene del maíz, ya que tiene propiedades termoplásticas cuando se realiza la disrupción estructural a nivel molecular, lo que resulta de una disminución de los cristales durante el proceso de maleabilidad o extrusión y de la acción de sustancias que vuelven flexible a la película como son los plastificantes, emergiendo así un nuevo tipo de material conocido como almidón termoplástico (TPS).

La fuerza y flexibilidad de una película también puede atribuirse a la presencia de amilosa (un componente del almidón 1,4- α -D-glucano) en un 70% en almidones, llamados amilo-maíz. La estructura ramificada de la amilopectina (otra forma estructural del almidón), generalmente le confiere a la película pobres propiedades mecánicas [Villada, H. et al., 2007].

La adición de polímeros naturales como el almidón, al interior del polietileno (polímero sintético) en forma granular entre un 6 y 30%, es otra aproximación en la fabricación de los empaques biodegradables. Las películas de almidón y polietileno de baja densidad (LDPE) contienen hasta un 30% de almidón, mostrándose como un material parcialmente biodegradable y así conservan sus características físicas, necesarias dentro del tiempo de uso, y los cuales son fácilmente degradados cuando se desechan.

Los empaques biodegradables que se obtienen de recursos naturales renovables, pueden mejorar las propiedades de un material polimérico, ya que son amigables al medio ambiente, además les otorgan la ventaja de biodegradación con respecto

a los polímeros sintéticos usados a diario [Chandra, R. y Rutsgi, R. 1998, Villada, H. et al., 2007].

1.2 BIODEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

La biodegradación es definida como el proceso de descomposición de las sustancias por la acción de microorganismos, la cual lleva al conocido ciclo del carbono, a la mineralización (CO₂, H₂O y sales) de compuestos orgánicos y a la generación de nueva biomasa [Kolybaba, M. et al., 2003; Premraj, R. y Mukesh, D., 2005]. El término “biodegradación” hace referencia a actividad biológica, sin embargo, en la naturaleza, factores bióticos y abióticos actúan sinérgicamente para descomponer la materia orgánica [Lucas, N. et al., 2008]. Adicionalmente, varios estudios han demostrado que estos factores preceden la asimilación microbiana [Proikakis, C. et al., 2006], lo que afirma que los factores abióticos aceleran o activan el proceso de biodegradación.

1.2.1 Factores Abióticos

Son aquellos con los cuales los materiales poliméricos que están expuestos a condiciones medioambientales, pueden sufrir transformaciones más o menos importantes; se utilizan como factor sinérgico, ó como iniciadoras de la biodegradación. Estos factores conducen a la degradación por parte de las transformaciones ocurridas en la biosfera (en las que no intervienen reacciones metabólicas), es decir, operan acciones mecánicas, térmicas, químicas y por radiación, las cuales hacen que las propiedades físicas y químicas (como elasticidad, dureza, cambios en el peso molecular, etc.) del material sean modificadas, proporcionando la vulnerabilidad de la sustancia para una degradación dirigida [Proikakis, C. et al., 2006; Lucas, N. et al., 2008].

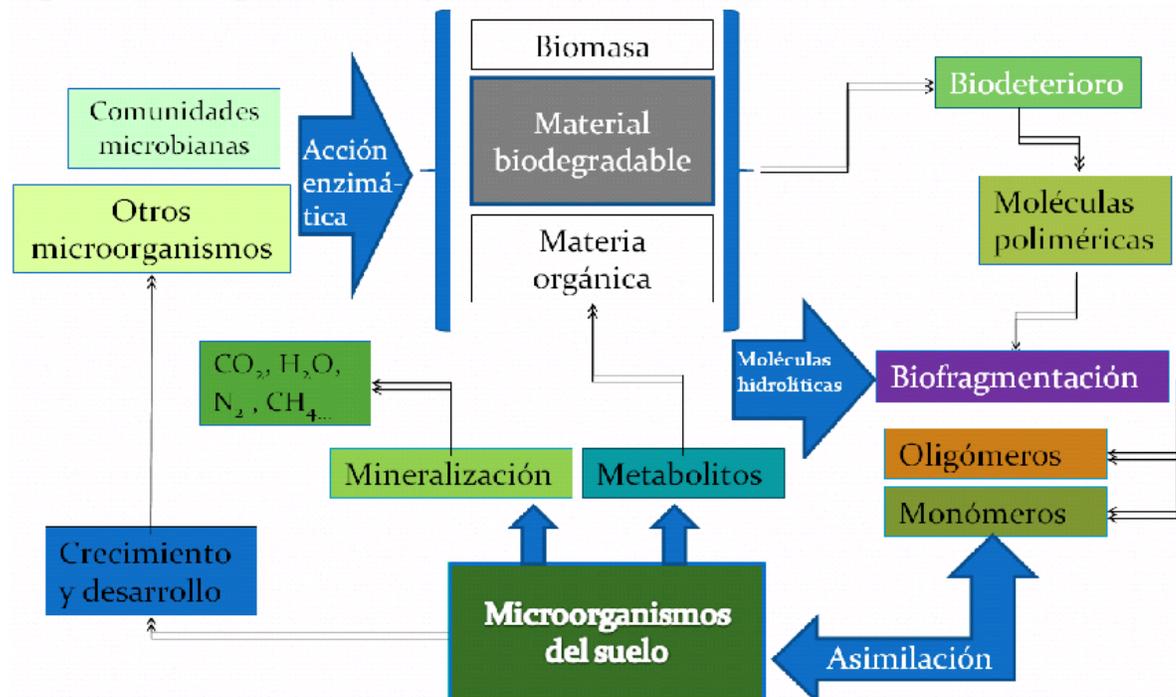
1.2.2 Factores Bióticos

Son aquellos referentes a seres vivos y a su metabolismo, una maquinaria química compleja idónea para degradar material de desecho. Este tipo de degradación depende de la composición química de los residuos sólidos generados por basuras de materiales. Los principales autores de este tipo de procesos son los microorganismos, bacterias y hongos, que buscan suplir sus necesidades energéticas por medio de la ruptura de enlaces. Por estas rutas metabólicas y en sinergia con otros factores (como los abióticos), el proceso de biodegradación se hace menos complejo y puede originarse la transformación a estructuras más sencillas [Kolybaba, M. et al., 2003; Premraj, R. y Mukesh, D., 2005; Lucas, N. et al., 2008].

Las sustancias logran la biodegradación mediante tres fases: biodeterioro, biofragmentación y asimilación [Lucas, N. et al., 2008], dando lugar a la

descomposición de residuos sólidos, y liberando al ambiente sustancias que no presentan toxicidad alguna (figura 2).

Figura 2. Biodegradación de polímeros (acción en condiciones ambientales)



Fuente: Lucas, N. et al., 2008.

1.2.2.1 Biodeterioro

La acción microbiana actúa mediante diferentes vías (física, química, enzimática), para dar inicio a la primera fase de la biodegradación [Lucas, N. et al., 2008].

Vía física: La proliferación de microorganismos se da por la segregación de sustancias viscosas que están compuestas principalmente de polisacáridos y proteínas, que actúan como una especie de pegamento, el cual adhiere los microorganismos al material, los protege contra condiciones desfavorables, e inicia su deterioro mediante la formación de ápices (estructuras con picos) que proporcionan un daño físico.

Vía química: La secreción de sustancias microbianas en la superficie del material, actúa como surfactante y que facilita el intercambio de sustancias con el medio, dando mayores posibilidades de proliferación. Estos microorganismos pueden clasificarse como quimiolitotróficos, los cuales procesan materia inorgánica (liberando ácidos minerales que incrementan la erosión del material) y quimioorganotróficos, que liberan ácidos orgánicos que pueden ser asimilados por otros microorganismos aumentando su crecimiento.

Vía enzimática: El deterioro de los polímeros termoplásticos está dado por dos mecanismos de acción conocidos como erosión por superficie y erosión por tamaño. Se ha demostrado que estos mecanismos son interconvertibles [Von Burkersroda, F. et al., 2002], e independiente de cual prime, las enzimas pueden dar paso a un (bio)deterioro.

1.2.2.2 Biofragmentación

Para que las sustancias sean asimiladas, deben sufrir una serie de transformaciones químicas que lleven a una fragmentación molecular del material para la obtención de oligómeros y monómeros que tengan acceso a la matriz celular. Esto se logra mediante la hidrólisis o ruptura de ciertos enlaces encontrados en el material biodegradable, ya sea por vía química o enzimática (encontrando: oxidación enzimática, oxidación vía radicales e hidrólisis enzimática), siendo esta última mas específica [Lucas, N. et al., 2008].

Oxidación enzimática: En los lugares en donde las reacciones son poco viables, como por ejemplo en zonas muy cristalinas, hidrofóbicas e impedidas estéricamente, las enzimas deben actuar de otra manera, dando origen a la formación de enlaces hidroxilo o peroxilo que son más susceptibles a la fragmentación; este tipo de reacciones se llevan a cabo por oxidoreductasas.

Oxidación vía radicales: Esta reacción se da en procesos de putrefacción, en donde actúan principalmente hongos capaces de liberar peróxido de hidrógeno, el cual conduce a la formación del radical hidroxilo que inicia la propagación de la descomposición de materia orgánica.

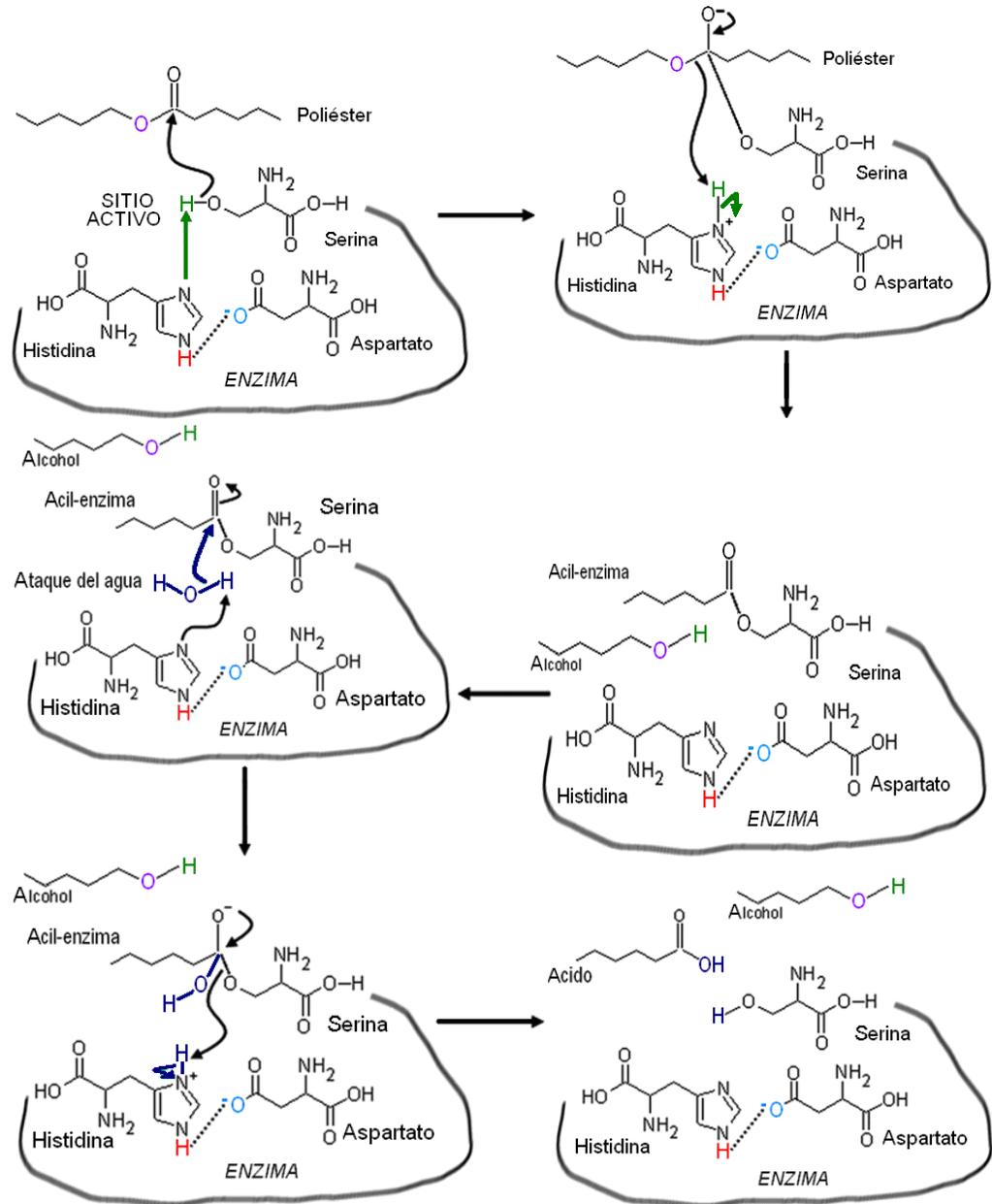
Hidrólisis enzimática: Este proceso químico de fragmentación molecular se da por medio de polimerasas (en este caso, su mayoría son hidrolasas y oxidoreductasas) que son capaces de romper enlaces específicos [Chandra, R. y Rutsgi, R. 1998; Lucas, N. et al., 2008]. En la figura 3 se esquematiza el mecanismo de reacción enzimática de un poliéster, obteniendo como productos de esta, un alcohol y un ácido orgánico.

1.2.2.3 Asimilación

Esta última fase de la biodegradación se lleva a cabo por la necesidad de los microorganismos de tomar fuentes de nutrientes. Implica una previa (bio)deterioración y/o (bio)fragmentación de la materia orgánica ó el material polimérico. Estas transformaciones facilitan el metabolismo por diferentes vías catabólicas, resultando en la secreción de sustancias orgánicas de menor peso molecular (como por ejemplo los ácidos orgánicos). Dependiendo de las habilidades microbianas de crecimiento en condiciones aerobias o anaerobias, existen tres vías catabólicas esenciales para la producción de energía,

manteniendo la actividad celular, reproducción y estructura: respiración aerobia, respiración anaerobia y fermentación [Kolybaba, M. et al., 2003; Lucas, N. et al., 2008].

Figura 3. Mecanismo general de una hidrólisis enzimática para un poliéster.



Fuente: Lucas, N. et al., 2008.

Respiración aerobia: En esta ruta metabólica, los microorganismos procesan sustratos orgánicos que son catabolizados por diferentes vías (glucólisis, β -oxidación, catabolismo de proteínas, etc.) y que obtienen energía de la fosforilación oxidativa en donde utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones, para su posterior reducción a agua.

Respiración anaerobia: Los microorganismos con este tipo de rutas metabólicas son incapaces de utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones; en vez de ello, utilizan un cierto grupo de moléculas (NO_3^{2-} , SO_4^{2-} , CO_2 etc.), con producción de altas cantidades de energía.

Fermentación: Es una vía de oxidación incompleta y es la única forma de producción energética. Moléculas orgánicas endógenas sintetizadas por la célula son usadas como aceptores finales de electrones. Los productos de fermentación pueden ser sustancias orgánicas y/o inorgánicas excretadas al ambiente (CO_2 , lactato, acetato, etanol). (Se dará énfasis a esta etapa mas adelante, ya que es donde hay segregación de ácidos orgánicos, sección 1.3.1).

1.3 SEGUIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN

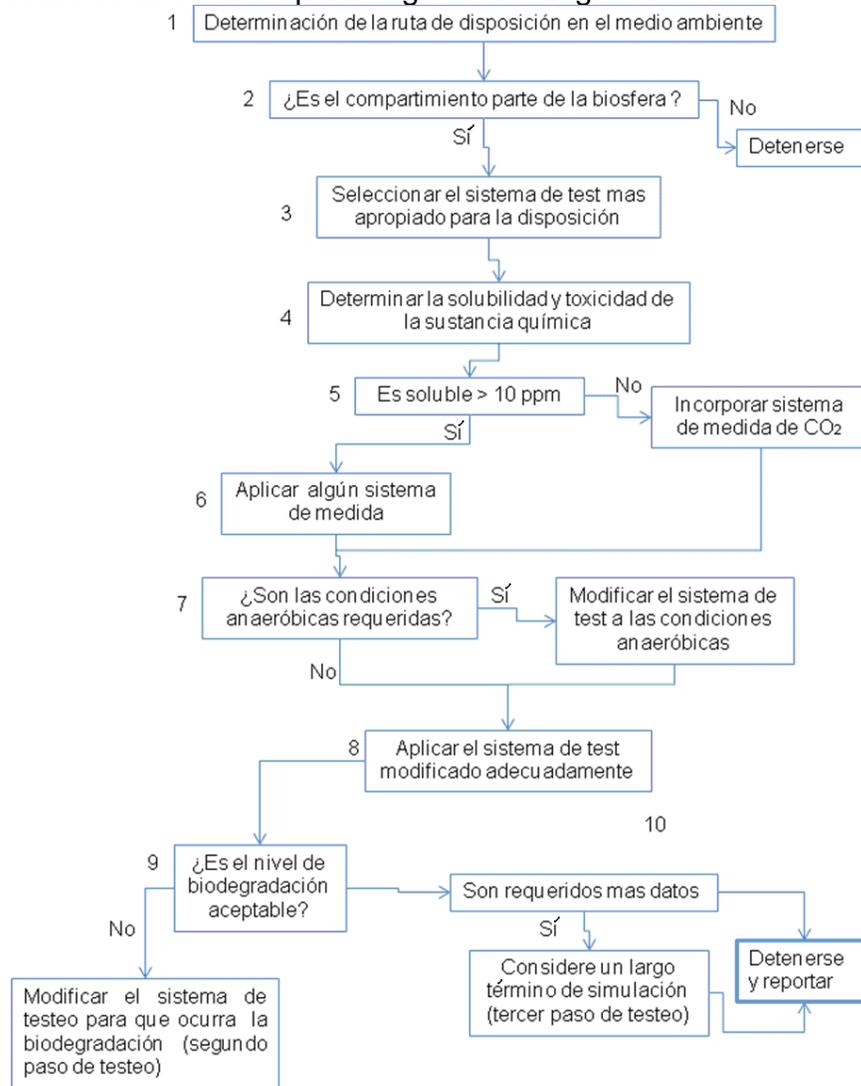
La degradación de un material polimérico biodegradable depende del tipo del medioambiente en donde sea desechado al completar su ciclo de uso. Debido a la gran diversidad de ambientes que se encuentran en la biosfera, la evaluación de la biodegradabilidad debe tener en cuenta el fin de uso del polímero y el ambiente en donde este se desarrolle [Chandra, R. y Rutsgi, R. 1998].

Una secuencia para tomar una decisión acerca de cómo seguir la biodegradación, se muestra en la figura 4; esta expone dos rutas alternativas a seguir que están basadas en la adquisición previa y la interpretación de los datos arrojados por el test de biodegradación.

Según el esquema de la figura 4, en la toma de la primera decisión son requeridos los datos de la concentración liberada y el compartimiento del ambiente en el cual el producto es generado; un ejemplo de ello sería si el material se va a estudiar por medio de sustancias producidas bajo condiciones anaerobias (como los ácidos orgánicos), ya que sus determinaciones miden la biodegradación del material, o mediante la liberación de gases (principalmente CO_2) producidos a partir de la descomposición del mismo en condiciones aerobias [Gil, A. et al., 2006]. Si no hay probabilidad de que el polímero alguna vez entre en contacto con la biosfera, entonces es insensato seguir una medida de la biodegradabilidad. Esto es, por supuesto, una situación hipotética, ya que la distribución de polímeros biodegradables en la biosfera es muy probable y deben definirse una o más rutas de exposición.

De lo anterior, puede escogerse una metodología conveniente para el primer paso de testeo, por ejemplo, si es necesario medir la biodegradación de un determinado material polimérico cuando las condiciones de biodegradación de la sustancia se llevan a cabo vía anaerobia (etapa 7); una alternativa de seguir su biodegradación es la determinación de ácidos orgánicos, teniendo en cuenta que son uno de los principales productos desprendidos en estos procesos [Chandra, R. y Rutsgi, R. 1998]. Su producción implica acople con el ambiente y además garantiza que la descomposición será mas rápida cuando el material sea desechado, entonces se puede clasificar como un material biodegradable. Lo anterior puede aplicarse más específicamente en las etapas 6 y 7 del esquema, en donde la medición de este tipo de sustancias podría resolver si las condiciones de biodegradación son aceptables.

Figura 4. Toma de la decisión para seguir la biodegradación



Fuente: Chandra, R. y Rutsgi, R. 1998

Si el polímero “pasa” este primer test (se biodegrada), entonces no es necesario hacer una prueba más extensa. “Fallando” la prueba (no se biodegrada), se toma la decisión para pasar a la siguiente etapa [Chandra, R. y Rutsigi, R. 1998]. Por lo tanto, dependiendo del comportamiento del material polimérico, se realizan varias formas de biodegradación en una serie de pasos (llevándolo en secuencias de testeo), hasta que se pruebe la hipótesis de si el polímero es biodegradable o no.

En la tabla 1 se listan algunas de las pruebas mas utilizadas para este tipo de procesos, según Chandra, R. y Rutsigi, R. 1998, y basadas en las normas propuestas en Estados Unidos (ASTM), Alemania (DIN) y los estándares internacionales (ISO).

Tabla 1. Formas de estudiar la biodegradación en materiales poliméricos biodegradables

Pruebas para polímeros biodegradables	Parámetro de biodegradabilidad
Sturm modificada	Medición de CO ₂ (por titulación al CO ₃ ²⁻)
Contenedor cerrado	D.Q.O. (demanda química de oxígeno)
Cajas de Petri	Proliferación microbiana en superficie del material
Entierro en suelo	Caracterización física al material, Proliferación microbiana en superficie del material

Fuente: Chandra, R. y Rutsigi, R. 1998

En la tabla 2 se muestran los estándares utilizados para seguir la resistencia a materiales poliméricos en medios de cultivo, usados por algunas de las pruebas de la tabla 1. El común denominador, exceptuando por su estado sólido a la última prueba mostrada en la tabla 1 (entierro en suelo), es utilizar el material polimérico como única fuente de carbono e inocularlo con un grupo de hongos y/o bacterias en un medio líquido constituido por una solución mineral de nutrientes y una incubación a temperaturas cercanas al ambiente por alrededor de cuatro semanas (entre 21 y 28 días en la mayoría).

Tabla 2. Estándares utilizados para las pruebas de resistencias de polímeros

Titulo	Autoridad estándar y miembro
Plásticos: Determinación del comportamiento bajo la acción de hongos y bacterias	ISO 846
Prueba medioambiental básica para equipamiento electrónico.	BS2011 (parte 2.1)
Resistencia de plastificantes al ataque de microorganismos	NFX41-513
Determinación de la resistencia de plásticos a hongos y bacterias	DIN53-739
Practica estándar para la determinación de la resistencia de material polimérico sintético a hongos.	ASTM G21-70
Practica estándar para la determinación de la resistencia de material polimérico sintético a bacterias.	ASTM G22-76
Practica estándar para la determinación de la resistencia de material polimérico sintético a algas.	ASTM G29-75

Nota: BS-British Standards Institute, DIN-German Standards Institute, ISO-International Standards Organisation, NFX-French Standards Institute, ASTM-American Standard Testing Methods.

Fuente: Chandra, R. y Rutsgi, R. 1998

Los parámetros que se miden son respectivamente: CO₂, DQO, crecimiento de microorganismos y caracterización física del material, que son buenos indicadores de la biodegradación.

La mayoría de estas pruebas usan condiciones (aunque modificables) de biodegradación aerobia, que se encuentran en zonas donde hay buena aireación, sin embargo, en lugares donde el oxígeno no alcanza a migrar, se crean condiciones anaerobias y según la norma ASTM D 5526 – 94 (diseñada para la biodegradación anaerobia de materiales plásticos bajo condiciones aceleradas de relleno), esto hace que ciertos microorganismos sean capaces de convertir los residuos sólidos en gases (como metano y dióxido de carbono) que son estudiados para demostrar la biodegradación del material bajo estas condiciones. Otra alternativa para probar la descomposición de materiales bajo condiciones anaerobias de forma más rápida, es la determinación de ácidos orgánicos liberados en procesos de fermentación, ya que su secreción sustenta el acople ambiental. Por lo anterior, se hará énfasis en este proceso ya que es donde ocurre

la segregación de ácidos orgánicos que serán estudiados como propósito del análisis de la biodegradación del material polimérico.

1.3.1 Fermentación (liberación de sustancias orgánicas)

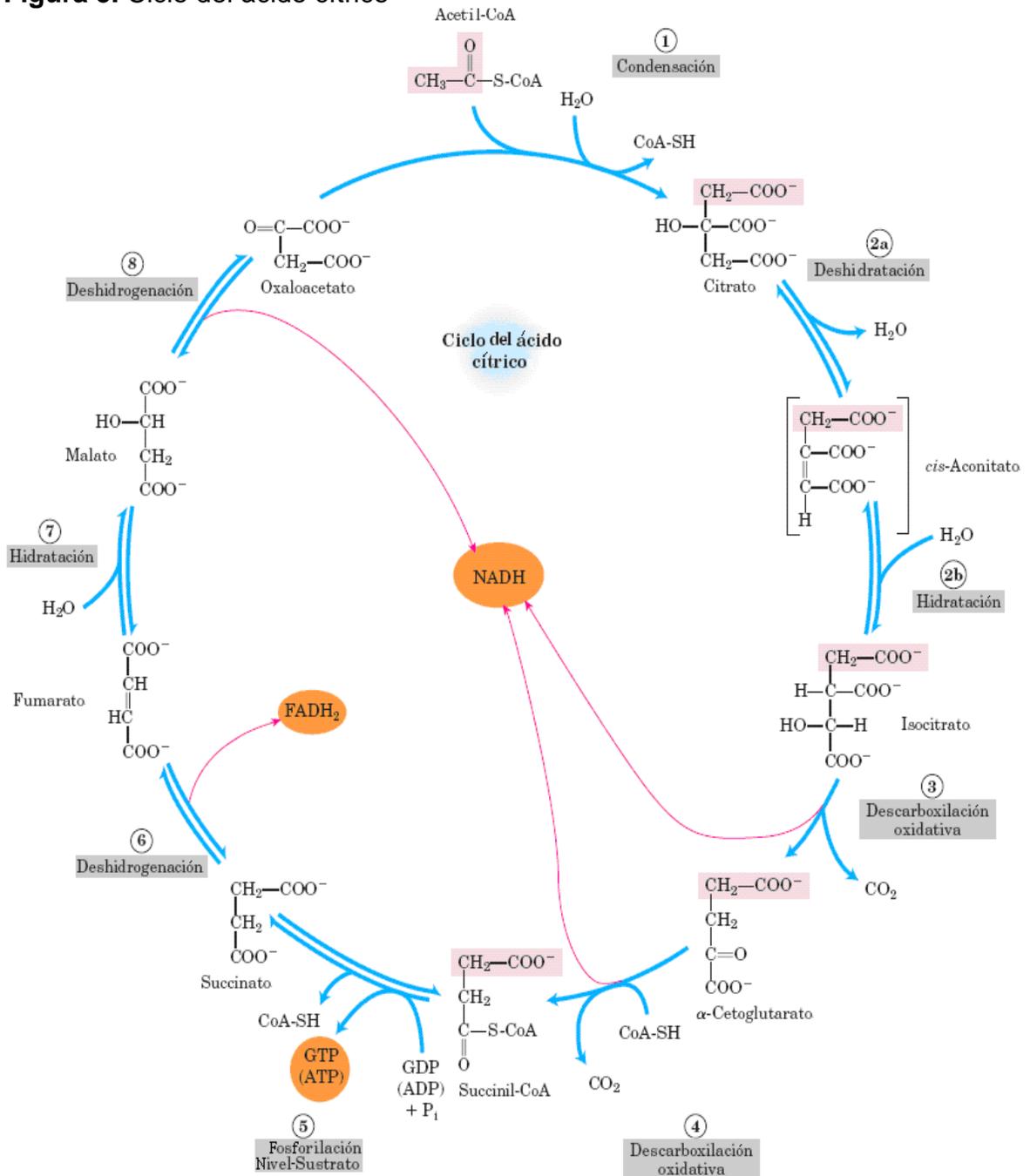
La fermentación es una ruta catabólica que se presenta en microorganismos que carecen de un sistema de transporte de electrones, los cuales tienen una oxidación incompleta totalmente anaeróbica, siendo el producto final un compuesto orgánico y su única posibilidad de producción de energía [Lucas, N. et al., 2008]. Teniendo en cuenta esta definición y la necesidad de nutrición microbiana existente en las zonas de rellenos sanitarios en donde el oxígeno del aire no alcanza a difundir, la fermentación es idónea para el seguimiento de la biodegradación de un material en condiciones anaerobias, ya que puede ser sustentado en la determinación de ácidos orgánicos liberados por microorganismos que no tienen otra forma de nutrirse, más que de la descomposición del material biodegradable, para suplir su demanda energética y la secreción de sustancias al medioambiente. Una forma experimental de fermentación para seguir la producción de ácidos orgánicos, se lleva a cabo mediante la adición del material de prueba (polímero biodegradable este caso) en medio líquido, al cual se le agrega una solución nutriente de azúcar que es inoculada con microorganismos a temperatura cercana al ambiente, y se ajusta el pH para su monitoreo. Para una determinación más específica, se toma una alícuota de la mezcla fermentada y se somete a ultrasonido, se filtra e inyecta en el cromatógrafo líquido (para un análisis por CLAR), con el objetivo de determinar los compuestos formados en el proceso, entre los cuales encontramos ácidos orgánicos, alcoholes, etc [Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

Por otra parte, el proceso de fermentación tiene muchas aplicaciones en la industria; una de las más interesantes es la producción de nuevos materiales a partir de productos derivados de polisacáridos, entre ellos, los de almidón tales como dextrinas o glucosa. Estos son extensamente usados como materias primas de medios fermentativos, en donde la glucosa, por ejemplo, puede ser fermentada y convertida a ácido láctico, el cual es polimerizado a una sustancia de alto peso molecular como el ácido poliláctico (PLA), cuyo uso como plástico biodegradable es de considerable interés y demanda [Villada, H. et al., 2007]. Entre las diversas aplicaciones de la fermentación, las mejores son la adaptación de procesos en el cuidado del medioambiente.

1.4 ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos orgánicos se originan principalmente en el metabolismo primario de los organismos vivos, en donde la principal ruta de su formación es el ciclo de Krebs o el ciclo del ácido cítrico (figura 5).

Figura 5. Ciclo del ácido cítrico

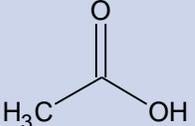
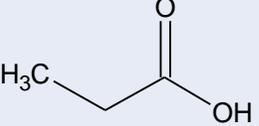
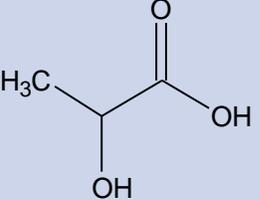
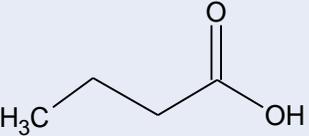


Fuente: Lehninger, A. et al., 2008 Cap. 16

Estos también son encontrados en los alimentos como resultado del metabolismo de moléculas de alto peso molecular (proteínas, lípidos, polisacáridos, etc.) [Sánchez-Machado, D. et al., 2008], lo que indica que su determinación puede sustentar el estado y calidad de los alimentos.

En diversos procesos de fermentación se liberan estas sustancias como producto del metabolismo de microorganismos quimiolitotróficos, que degradan la materia orgánica tomándola como fuente de carbono, electrones y energía [Lucas, N. et al., 2008]. Estas sustancias pueden ser liberadas en formas químicas no tan complejas (es decir los ácidos de cadena corta), ya que ha ocurrido una oxidación incompleta del sustrato. Algunas de estas sustancias se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Algunos ácidos orgánicos, producidos en los procesos de fermentación (propiedades fisicoquímicas)

Estructura	Nombre	Índice de refracción (±0,02)	Densidad (g/mL)±0,06	P.M. (g/mol)
	Ácido acético	1,375	1,069	60,052
	Ácido propiónico	1,397	1,019	74,078
	Ácido láctico	1,451	1,276	90,077
	Ácido butírico	1,411	0,987	88,105

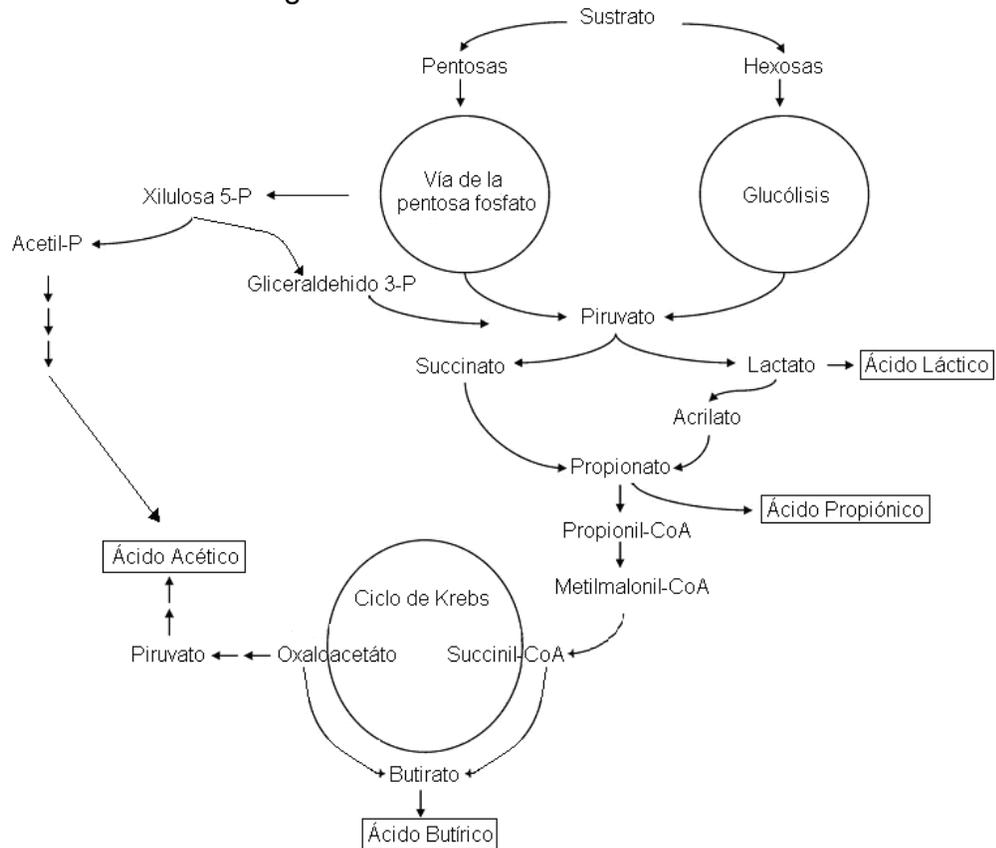
Fuente: chemSketch Window, 2009.

Los ácidos orgánicos son estudiados como parámetros para el análisis de alimentos, ya que estos juegan un papel importante en el sabor y aroma de productos de consumo y algunos autores utilizan el nivel de ácidos orgánicos para monitorear cuando se inicia la actividad y crecimiento bacteriano. Adicionalmente el tipo de ácidos indica el tipo de fermentación [Sánchez-Machado, D. et al., 2008]. Adicionalmente, cumplen con un parámetro muy importante en el análisis de vinos, ya que de las concentraciones y tipo de estas sustancias depende la calidad del producto [Kordis-Krapes, M. et al., 2001].

Producción de ácidos orgánicos por biodegradación de polímeros de almidón

La principal vía por la que ocurre la producción de estas sustancias orgánicas, es por la fermentación sobre moléculas de alto peso molecular como proteínas, lípidos, polisacáridos, etc. [Avancini, S. et al., 2007; Altaf Md. et al., 2008; Al-Lahham, S. et al., 2010] ya que sucede por la acción catabólica de los microorganismos, que liberan metabolitos como los ácidos acético, propiónico y butírico. El proceso de descomposición de las moléculas del polisacárido, empieza con la hidrólisis de los enlaces glucosídicos por la acción de enzimas (α -amilasa, β -amilasa, isoamilasa y glucoamilasa), dejando moléculas de azúcar (principalmente glucosa) libres en la solución [Araujo, M. et al., 2004; Lehninger, A. et al., 2008]; lo anterior da paso a que se activen las vías alternas de la descomposición, como se observa en la figura 6, en donde la formación de los ácidos acético y láctico se da principalmente por la conversión del piruvato a acetato o lactato respectivamente; la formación del ácido propiónico se da por dos rutas: la vía de descarboxilación del succinato y por la producción de acrilato como precursor, y la formación de butirato a partir de compuestos (como succinil-CoA y Oxaloacetato) formados en el ciclo de Krebs.

Figura 6. Metabolismo microbiano en condiciones ambientales. Posibles vías de formación de los ácidos orgánicos mediante rutas anaerobias



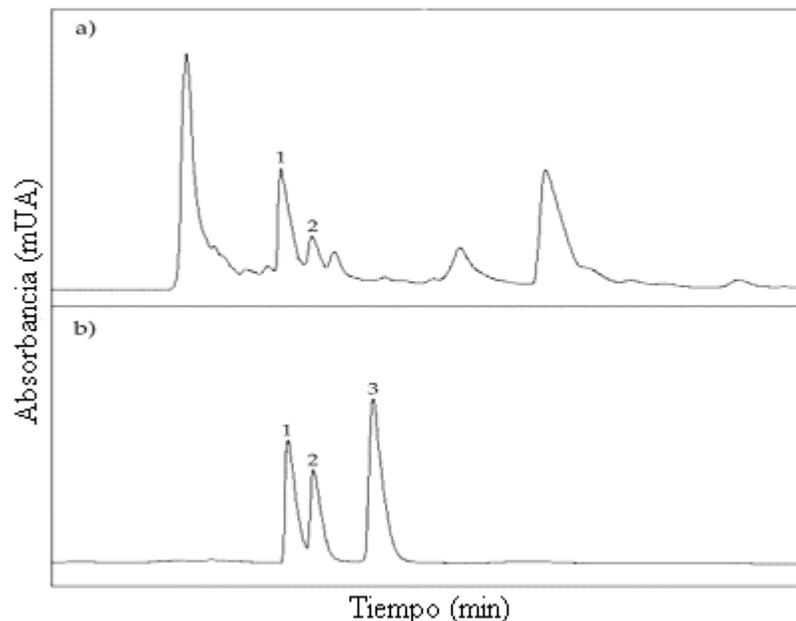
Fuente: Al-Lahham, S., et al., 2010; Altaf, Md., et al., 2008

1.4.1 Determinación de ácidos orgánicos

La evaluación de ácidos orgánicos ha sido utilizada en diferentes tipos de análisis como son en el control de calidad de vinos [Schneider A., et al 1987; Kordis-Krapes, M. et al., 2001], en el análisis de derivados de frutas frescas [Karadeniz, F. 2004; Fei, L. et al., 2009], en estudios de orina [Bidartl, M. et al., 1993; Chantragan, S. et al., 1999], entre otros.

En términos generales y como ya se ha mencionado, el estudio de ácidos orgánicos constituye una herramienta importante en el seguimiento de procesos de biodegradación [Lucas, N. et al., 2008]; como un ejemplo, podría citarse la fermentación en residuos de animales marinos [Sánchez-Machado, D. et al., 2008], en donde la evaluación de estas sustancias por CLAR (o HPLC), particularmente la de ácido láctico, arrojan resultados que superan las deficiencias de otras técnicas, haciendo posible su cuantificación de forma específica, como se observa en la figura 7.

Figura 7. Cromatogramas de CLAR obtenidos en la determinación de ácidos orgánicos en: a) proceso de fermentación de residuos de camarón y b) estándares. Picos: 1) ácido láctico, 2) ácido acético y 3) ácido cítrico



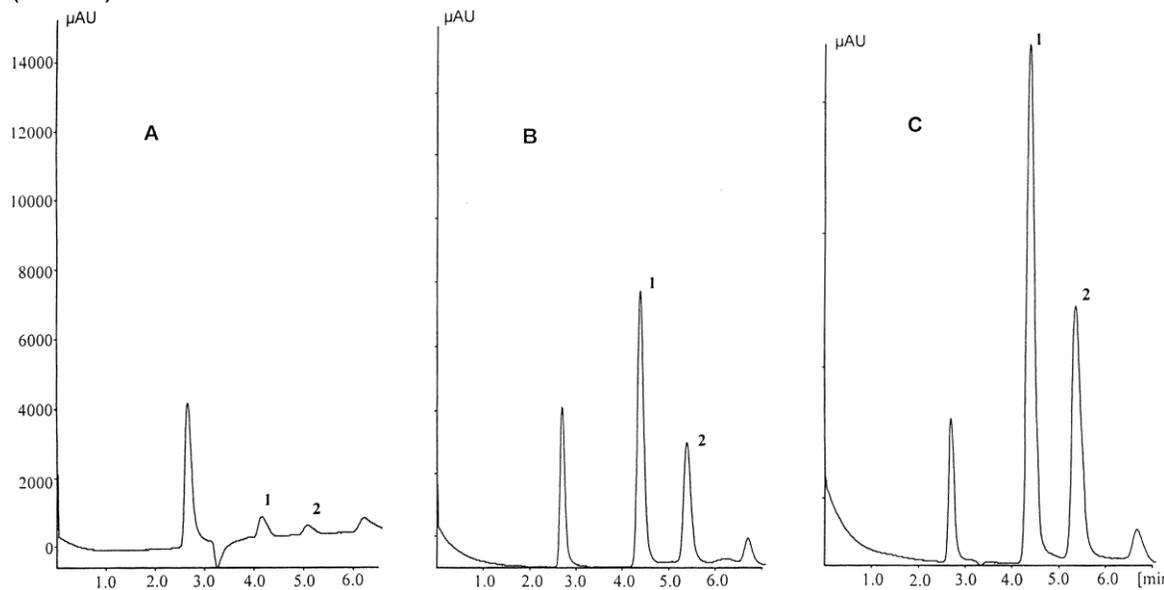
Fuente: Sánchez-Machado, D. et al., 2008

Una prueba normalmente usada para el estudio de ácidos presentes en una muestra, es la valoración alcalina utilizando un indicador visual apropiado como forma cualitativa. Sin embargo, las titulaciones en general no son selectivas ni suficientemente sensibles ó precisas para detectar pequeñas cantidades.

Los métodos instrumentales como los de cromatografía de gases y líquida de alta resolución (CLAR) han ganado importancia en este tipo de análisis. Debido a la rapidez, selectividad, sensibilidad y fiabilidad que involucra la CLAR, es una de las técnicas más ampliamente usadas. Su acople a diferentes tipos de detectores como índice de refracción, detección por UV y pulsación electroquímica [Kotani, A. et al., 2001], la hacen hoy en día, uno de los métodos analíticos más adecuados en análisis de estas sustancias orgánicas (más específicamente la CLAR en fase reversa) [Llorente, M. et al., 1991; Demiate, I. et al., 1999; Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

En el campo de la biodegradación de polímeros, la CLAR también muestra una forma muy práctica de testear la fragmentación molecular de sustancias como los poliésteres, estudiando la liberación de ácidos orgánicos como monómeros así como lo muestran Giunchedi, et al. en 1998. A diferencia de otros estudios por otras técnicas instrumentales como gravimetría, viscosimetría, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido, microscopía diferencial de barrido, espectroscopía de resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$) entre otras, esta muestra una gran ventaja ya que permite una cuantificación más sencilla y específica de un determinado compuesto [Giunchedi, P. et al., 1998]. La figura 8 muestra la biodegradación *in vitro* de un poliéster, en donde se observa que la concentración de ácidos orgánicos aumenta con el tiempo de incubación, demostrando así la fragmentación molecular del polímero.

Figura 8. Determinación de ácidos glicólico (pico 1) y láctico (pico 2) liberados en un medio de incubación después de: a) 1 día, b) 7 días y c) 14 días de degradación, en el seguimiento a la fragmentación de poli-D,L-láctico-co-glicólico (PLGA)



Fuente: Giunchedi, P. et al 1998

1.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La cromatografía líquida consiste en la separación basada en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles entre sí, una fija (en la mayoría de los casos sólida, ya que puede ser un líquido retenido sobre un gel o un sólido) y otra móvil que se encuentra en estado líquido [Quattrocchi, O. et al., 1992]. Su clasificación puede darse en diversas formas, dependiendo del estado y composición de las fases estacionarias con las que se pretende realizar la separación, tal como se resume en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de cromatografía líquida según su fase estacionaria

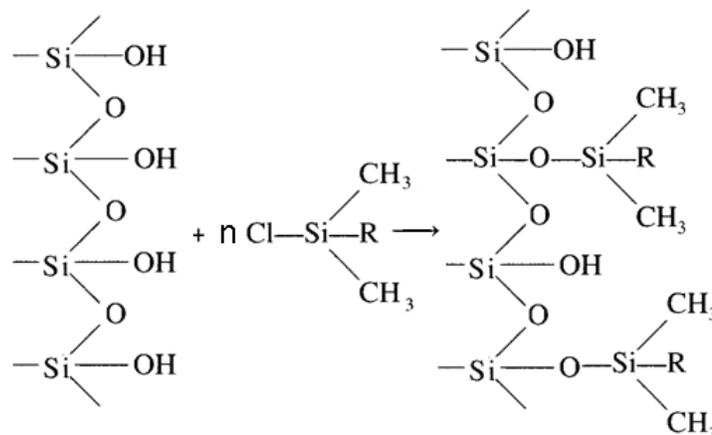
Clases de cromatografía		Características de la fase estacionaria
Cromatografía líquido-sólido (CLS) o de adsorción		Utiliza fases estacionarias polares, típicamente silicagel, y fases móviles apolares como hexano
Cromatografía de reparto	Cromatografía líquido-líquido (CLL)	La fase estacionaria es un líquido homogéneamente disperso en un soporte sólido
	Cromatografía de fase ligada (CFL)	La fase estacionaria está unida de forma química covalente a su soporte.
Cromatografía de intercambio iónico (CII)		Rellenos constituidos por polímero ó silicagel, sustituidos con grupos sulfónico o amonio cuaternarios
Cromatografía de exclusión por tamaño (CE)		La fase estacionaria consiste en materiales de porosidad controlada

De las modalidades cromatográficas clasificadas en la tabla anterior y teniendo en cuenta la naturaleza química de los analitos que son ácidos carboxílicos de cadena corta, las cromatografías de reparto representan una buena alternativa, destacándose la cromatografía ligada químicamente [Giunchedi, P. et al., 1998; Sánchez-Machado, D. et al., 2008]. Estas técnicas de fase ligada predominan actualmente frente a la cromatografía líquido-líquido, ya que estas últimas presentan ciertas desventajas, principalmente la pérdida de fase estacionaria por dilución en la fase móvil, lo que hace necesario un periódico recubrimiento de las partículas del soporte. Por otra parte, este problema impide el uso de los rellenos de fase líquida en la elución con gradiente.

La cromatografía de reparto unida químicamente, presenta mejores alternativas, ya que se subdivide según el tipo de relleno que utilice la fase estacionaria y a su

vez depende de los grupos sustituidos en la cadena de silicatos como se observa en la figura 9 [Skoog, D. et al., 2001].

Figura 9. Reacción general para la obtención de un tipo de relleno para cromatografía (diferenciación del tipo de fase estacionaria)



Fuente: Skoog, D. et al., 2001 Cap. 28

Como se observa en la figura, dependiendo de la polaridad de los grupos R se puede clasificar el tipo de relleno y la clase de cromatografía. Este paso es importante, ya que de ello depende también la elección de la fase móvil con la que se piensa hacer la elusión.

Cromatografía de fase normal: Consiste en el uso de fases fijas cuyas sustituciones del grupo R del siloxano son grupos funcionales polares como el caso de los grupos ciano ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$), diol ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), amino ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$) y los dimetilaminopropil ($\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$). Este tipo de cromatografía usa fases móviles de polaridades bajas como hexano, isopropileter, entre otras, sustancias de polaridad similar.

Cromatografía de fase reversa: Esta técnica usa fases fijas de bajas polaridades, debidas a sustituciones del grupo R del siloxano por sustancias de naturaleza apolar como *n*-octadecilo (C_{18}) o *n*-octilo (C_8). Las fases móviles son de naturaleza polar tales como metanol, acetonitrilo y agua. Tal vez las tres cuartas partes de toda la cromatografía de líquidos (y la de alta resolución, como se expone mas adelante, sección 1.5.1), se llevan a cabo actualmente en columnas con rellenos de fase reversa.

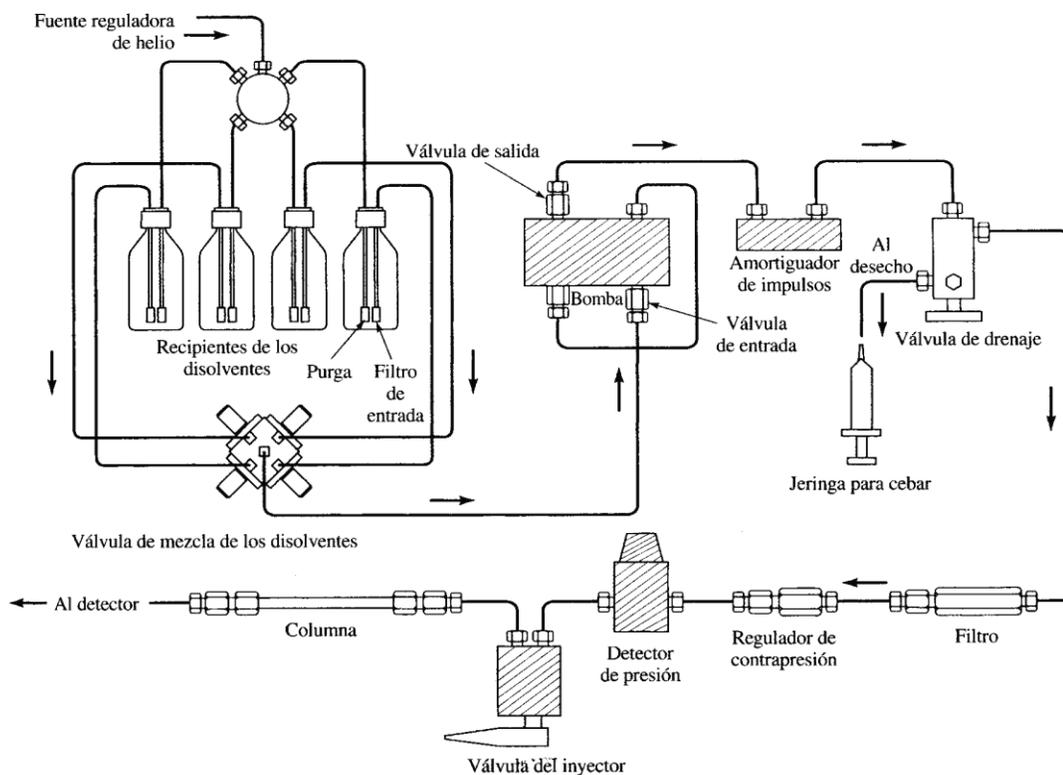
Las aplicaciones de la cromatografía en fase reversa ligada químicamente, han aumentado de gran manera en los últimos años, debido al desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a estas técnicas, ya que satisfacen las necesidades crecientes por parte de la comunidad científica de mejorar los métodos para la

caracterización de mezclas complejas, entre las cuales se encuentra la separación de ácidos orgánicos presentes en múltiples matrices. Una de las técnicas más ampliamente usadas por su versatilidad y aplicación es la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), la cual se ha convertido en una herramienta eficaz frente a este tipo de análisis y hoy representa uno de los instrumentos más empleados en el laboratorio analítico moderno, ya sea que esté dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológica o bromatológica [Quattrocchi, O. et al., 1992; Harris, D., 2003; Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

1.5.1 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa

La separación se lleva a cabo por la inyección de muy poco volumen de la muestra en un puerto o loop (válvula del inyector, según la figura 10), ubicado en la parte superior de la columna y utilizando altas presiones para lograr que esta fluya. De esta manera, la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas, con el objetivo de mejorar la resolución en las separaciones y permita así identificar y cuantificar solutos de manera confiable [Skoog, D. et al., 2001].

Figura 10. Esquema de un aparato de CLAR (o HPLC)



Fuente: Skoog, D. et al., 2001, Cap. 28

La cromatografía líquida como método cromatográfico, tiene su centro en la parte que hace posible la separación: la columna, que puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad (fig. 10). La tabla 5 muestra algunas de las partes esenciales para una separación.

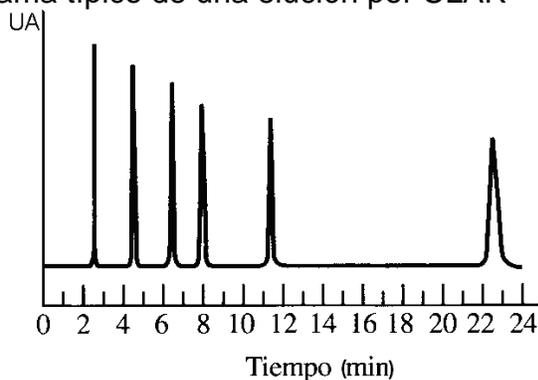
Tabla 5. Partes esenciales de un cromatógrafo líquido de alta resolución

Parte	Descripción
Reservorio de solvente	Alimenta el sistema con la fase móvil
Inyector	Sistema que permite la introducción de la muestra
Bomba	Sistema para forzar el paso de la muestra y de la fase móvil a través de la columna
Detector	Sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna
Software	Sistema de registro de datos provenientes del detector procesados por una computadora.

Fuente: Quattrocchi O. et al 1992

Como resultado del análisis se obtiene un cromatograma, el cual es un gráfico que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de retención, por medio de señales en forma de picos, estos proporcionan la información necesaria para poder identificar y cuantificar las sustancias que fueron eluidas de la columna. Un cromatograma típico de CLAR se muestra en la figura 11.

Figura 11. Cromatograma típico de una elución por CLAR



Fuente: Skoog, D. et al., 2001 Cap. 28

Es importante tener en cuenta que los picos que aparecen en éste grafico (identificando específicamente, bajo condiciones estrictas, a las sustancias eluídas) deben presentar características de un pico normal (gaussiano), como los de la figura 11, con simetría y resolución, además de una altura apreciable, evitando problemas comunes como el fronting o asimetría anterior, que es cuando el pico presenta una leve desviación a la derecha y tailing o asimetría posterior, una de las “deformaciones” mas comunes, y es cuando el pico muestra una asimetría a la izquierda conocida también como colas del pico [Quattrocchi, O. et al., 1992].

1.5.1.1 Detección y fases estacionarias en CLAR de fase reversa

Un sistema conformado por un grupo carboxilo conocido como cromóforo es el rasgo estructural distintivo de los ácidos orgánicos. Este grupo es el responsable de la capacidad de absorción de luz en la región ultravioleta debida a transiciones electrónicas características de los electrones no apareados y del doble enlace del carbonilo (transición $n \rightarrow \pi^*$ a los 204 nm) [Skoog, D. et al., 2001]. Por esta característica se emplean para su detección los detectores espectrofotométricos en CLAR, por la alta sensibilidad y precisión, y porque son capaces de seleccionar una sola longitud de onda durante la separación cromatográfica [Llorente, M. et al., 1991; Demiate, I. et al., 1999; Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

La mayoría de las separaciones de ácidos orgánicos reportada en la literatura, involucra el uso de CLAR en fase reversa, en lugar de fase normal, debido a que las interacciones con la fase estacionaria de este tipo de cromatografía dan mejores tiempos de retención y la separación es mejor en la fase móvil que esta técnica utiliza [Kordis-Krapes, M. et al., 2001; Karadeniz, F., 2004; Sánchez-Machado, D. et al., 2008; Fei, L. et al., 2009]. Las ventajas de la cromatografía en fase reversa son resumidas en la tabla 6.

Tabla 6. Principales ventajas del uso de una fase estacionaria en fase reversa en una separación.

Características del uso de fase reversa	Compuestos iónicos, no iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna con la misma fase móvil.
	La fuerza de atracción superficie no polar-soluto, es débil.
	El modificador orgánico predominante, metanol, es adsequible en calidad y precio.
	El orden de elución es predecible según la hidrofobicidad del analito.
	Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.
	La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.

Fuente: Quattrocchi, O. et al., 1992

Así, CLAR en fase reversa representa una buena alternativa para el análisis de sustancias orgánicas como son los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico, ya que los parámetros enunciados en la anterior tabla determinan que estos analitos, compuestos ionizables con grupos polares en su estructura, pueden ser separados fácilmente en una fase estacionaria apolar, con la elución de fase móvil de polaridad relativa media.

1.5.1.2 Análisis cuantitativo por CLAR en fase reversa

Las ventajas de la cuantificación por CLAR, con respecto a otras técnicas, radica en que puede realizar determinaciones de concentraciones en mezclas con un alto grado de confiabilidad, cumpliendo con niveles de precisión tan bajos como el 0,5% y aun menores. En el análisis cuantitativo influyen factores como el muestreo, preparación de la muestra, inyección de la muestra, separación cromatográfica, detección, integración de la señal y/o cálculo de la concentración del analito [Quattrocchi, O. et al., 1992].

Hasta ahora se ha mencionado que los tipos de cromatografía líquida representan una herramienta muy útil en el laboratorio, sin embargo la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) (o *High Performance Liquid Chromatographic* (HPLC)), es mucho más utilizada debido a su idoneidad para separar sustancias no volátiles o termolábiles además de su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, facilitando la estandarización de métodos analíticos [Quattrocchi, O. et al., 1992; Skoog, D. et al., 2001; Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

1.6 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La necesidad de obtener información soportada y confiable hace que la estandarización de un método analítico sea un proceso riguroso, que depende de la técnica analítica, la matriz, el analito y la cantidad de parámetros necesarios para obtener una información completa. La estandarización busca tipificar sus variables, optimizar los resultados y soportar la información para que una vez establecido, pueda empezar a reportar datos con un alto grado de confianza.

Los criterios en los que se basa la confianza de un método analítico se sustentan mediante la medición de diferentes parámetros establecidos bajo condiciones experimentales estrictas que han sido determinadas; estos parámetros son sensibilidad, linealidad, precisión y exactitud [Miller, J. et al., 2000; Skoog, D. et al., 2001; González, G. et al., 2006].

1.6.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad de un instrumento o de un método es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito; los

parámetros empleados para determinar la sensibilidad son los límites de detección y cuantificación [Skoog, D. et al., 2001].

1.6.1.1 Límite de detección

Es la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y en un nivel de confianza dado; es aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. Se expresa en unidades de concentración.

1.6.1.2 Límite de cuantificación

Es la menor concentración de analito que puede cuantificarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Se expresa en unidades de concentración.

1.6.1.3 Sensibilidad de Calibración

La sensibilidad de calibrado se define como la pendiente de la curva de calibración (m) [Skoog, D. et al., 2001].

1.6.2 Intervalo lineal

El intervalo lineal de un método analítico va desde la concentración más pequeña a la que se pueden realizar medidas cuantitativas (límite de cuantificación) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (límite de linealidad) y dentro del cual se puede efectuar la cuantificación por interpolación en una curva de calibración [Skoog, D. et al., 2001].

1.6.3 Precisión

Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra ó patrón, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas; usualmente se expresa en términos de desviación estándar (s). Se evalúa a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, los cuales se describen a continuación:

1.6.3.1 Repetibilidad

Es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos cortos de tiempo (mismo día), por el mismo analista, sobre la misma muestra homogénea, usando los mismos equipos.

1.6.3.2 Precisión Intermedia

Es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos de tiempo diferentes (mínimo cinco días diferentes) por el mismo analista y sobre la misma muestra homogénea, usando los mismos equipos.

1.6.3.3 Reproducibilidad

Expresa la precisión entre resultados obtenidos mediante la aplicación del mismo método por diferentes operadores y usando diferentes equipos, sobre réplicas de porciones analíticas ó tiempos diferentes (mínimo un mes).

1.6.4 Exactitud

La exactitud de un método es la aproximación más estrecha a un resultado o el promedio de una serie de resultados que se aproximan al valor verdadero o aceptado como real. Normalmente se expresa en términos de error teniendo como referencia los patrones preparados en el laboratorio y un patrón externo certificado.

1.7 ESTADÍSTICA PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

1.7.1 Estadística descriptiva

La estadística descriptiva es una herramienta simple y fácil, pero muy importante, que nos permite tener una idea preliminar de los datos, antes de pasar a realizar un tratamiento más complejo de los mismos [González, G. et al., 2006]. Aquí se incluyen las medidas de posición, como la media aritmética, armónica, ponderada, la moda y la mediana, y medidas de dispersión o variabilidad de la muestra como la varianza, la desviación típica (llamada también desviación estándar) y el coeficiente de variación. De las medidas de posición, la más utilizada es la media aritmética (simbolizada con μ cuando es de una población y \bar{x} cuando es muestral), debido a que es la que tiene un error estándar más pequeño, es más fácil de estimar, tiende hacia una distribución normal y por último es más sensible a cambios en la distribución de los datos.

La media aritmética es conocida comúnmente como promedio, y relaciona la suma de todos los datos con el número de estos, lo cual lo hace un cálculo muy sencillo (ver ecuación en anexo A). Determinar este parámetro es importante para el método, ya que en él se basan la mayoría de medidas realizadas para la estandarización.

Para dar una mejor fiabilidad de la distribución de los datos que han sido obtenidos en el método, las medidas de posición se ven acompañadas por las medidas de dispersión; estas tienen como función mostrar hasta qué punto las

medidas de posición representan bien el conjunto de datos en la distribución. Es necesario conocer parámetros como la desviación estándar (s), la varianza (s^2) y el coeficiente de variación (CV) (ver ecuaciones en anexo A), para completar la información que se obtiene a partir de la media. Estos últimos parámetros son indispensables para la estimación de la precisión en un método analítico.

1.7.2 Contrastes de significación

Aparte de la estadística descriptiva, las pruebas de contrastes de significación para los datos, soportan fuertemente la distribución que estos manejen. Para lograr la estandarización de un método analítico, los resultados deben basarse en la aplicación de ciertas hipótesis, denominadas como nulas y denotadas como H_0 [Millar, J. et al., 2000]. Esta hipótesis es rechazada o aceptada al ser comparada con un cierto valor crítico tabulado (que debe ser un estadístico de contraste apropiado al análisis), el cual se denomina como una variable aleatoria que sigue una función de probabilidad [González, G. et al., 2006; Miller, J. et al., 2000].

Para realizar un contraste de hipótesis para el caso de variables cuantitativas, se cuenta con dos tipos de análisis conocidos como paramétricos (que requieren que se cumplan los supuestos de normalidad de distribución y la homogeneidad de varianza dentro de cada población a comparar) y los no paramétricos, que no exigen supuestos para poder ser aplicados. La normalidad de una distribución de muestra, es ampliamente estudiada mediante la prueba de Shapiro-Wilk, la cual es muy recomendada sobre todo si se trabaja con un número pequeño de datos ($n < 30$). Esta prueba calcula un estadístico W que contrasta el ajuste a una recta probabilística normal (ver ecuación anexo A).

Para evaluar la homogeneidad de varianza, se utiliza la prueba de Levene, debido a que este test aplica para el contraste de la hipótesis nula (H_0) de la homogeneidad de las varianzas, y además permite rechazar la H_0 si la significación de su estadístico es $<$ que 0,05.

Entre las distribuciones de datos más utilizadas se encuentran la de distribución normal, t de student, chi-cuadrado, f -fisher-snedecor. De estas se escoge la que sea más propia al análisis y se hace la comparación de significancia del dato con la distribución (en el análisis estadístico de este trabajo se escogió la t -student, por su aplicación sencilla y versátil).

De los parámetros estadísticos más utilizados, están las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) [González, G. et al., 2006]. Este es un método que sirve para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas de los valores promedio entre las muestras de poblaciones estudiadas.

2. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

La estandarización del método de determinación de ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico y butírico) por CLAR en fase reversa y su aplicación en un proceso de biodegradación, utilizó reactivos y solventes grado analítico. A continuación, se listan los equipos y reactivos empleados para las diferentes determinaciones.

2.1.1 Equipos

- Balanza analítica Mettler, AJ-150
- Bomba para vacío ROC-R
- Campana de extracción C4
- Conductímetro ORION modelo 105
- Centrífuga HEMLER, Z-200A
- Cromatógrafo de líquidos HEWLETT PACKARD 1100, desgasificador G 1322A, bomba cuaternaria G 1311A, detector UV-VIS G1314A, columnas: μ -Bondapak C₁₈ (3,9 x 150mm), Hypersil ODS C₁₈ (5 μ m x 4,0 x 250mm), Agilent Zorbax SB C₁₈NH₂ (5 μ m x 4,6 x 250).
- Deionizador D&E
- Destilador Schott Gerate
- Equipo de destilación marca BUCHI
- Espectrofotómetro Ultravioleta-visible GENESIS 6
- Incubadora PRECISA modelo 815
- Micropipeta BRAND 25-250 μ L
- Micropipeta BRAND 0,5-10 μ L
- Mini vap- Supelco con pipa de nitrógeno
- Nevera HACEB
- pH-metro FISHER SCIENTIFIC accumet BASIC AB15
- Planchas CORNING PC-420

2.1.2 Reactivos

- Ácido fosfórico, 85%
- Estándar ácido acetic, Sigma-Aldrich 3050 Spruce Street (SAINT LOUIS MO 63103 USA)
- Estándar ácido butírico, Sigma-Aldrich 3050 Spruce Street (SAINT LOUIS MO 63103 USA)

- Estándar ácido L-(+)-láctico, Sigma-Aldrich 3050 Spruce Street (SAINT LOUIS MO 63103 USA)
- Estándar ácido propiónico, Sigma-Aldrich 3050 Spruce Street (SAINT LOUIS MO 63103 USA)
- Gas nitrógeno, 99,999%
- Hidróxido de sodio, 99,9%
- Hipoclorito de sodio comercial, 5%
- Sales minerales (KH_2PO_4 , 99%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$, 99,9%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 99,9%, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99,9%, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 99,5%, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99,9%)

2.1.3 Solventes grado HPLC

- Metanol, 99,98%
- Acetonitrilo, 99,99%

2.2 MUESTRAS

El método se aplicó a la determinación de ácidos orgánicos formados en procesos de biodegradación anaerobia de materiales poliméricos y en muestras de un proceso de formación de ensilaje, obtenidas según se describe a continuación:

2.2.1 Simulación del proceso de biodegradación

Se realizó a tres materiales poliméricos (oxo-biodegradable, no biodegradable y un polímero a base de almidón (Fig. 12)), bajo condiciones establecidas en el laboratorio (ver anexo B), para obtener una matriz simulada; ya que las muestras del material termoformado biodegradable a base de almidón de yuca del proyecto: PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMPAQUES TERMOFORMADOS BIODEGRADABLES A PARTIR DE HARINA DE YUCA, FIBRA DE FIQUE Y PLASTIFICANTE, no se encontraban disponibles para el análisis.

Para ello, se aplicó la metodología reportada en la literatura [Owens, J. et al., 1993; Christodoulatos, C. et al., 1997; Chandra, R. y Rutsgi, R., 1998; Massardier-Nageotte, V. et al., 2006] y la norma ASTM D 5526-94 del año 2000, a la descomposición de materiales poliméricos (descritos en la sección 2.2.1.2).

Acondicionamiento de material de vidrio: Con el propósito de controlar la proliferación de microorganismos encargados de la degradación de los materiales poliméricos, el material de vidrio se sometió a lavados con diluciones de hipoclorito de sodio al 5,25%, agua deionizada y esterilizada (a 90°C) y secado a 105°C en estufa.

2.2.1.1 Preparación de la solución mineral (SM):

Con el fin de obtener un medio de cultivo constituido por minerales nutrientes, se pesaron: KH_2PO_4 (5,75 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ (12,9 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,500 g), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,205 g), $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,015 g), $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,008 g), se disolvieron y se aforaron a 1000 mL con agua deionizada y esterilizada en un balón volumétrico previamente esterilizado con hipoclorito de sodio al 5,25%. El pH se ajustó entre 7,0 – 7,1 con hidróxido de sodio al 10%, para acondicionar la solución, se burbujeó gas nitrógeno y se almacenó a 35°C en incubación por 24 horas.

2.2.1.2 Adición del material polimérico

El proceso que se describe a continuación se realizó a diferentes materiales de prueba, (figura 12).

Figura 12. Material polimérico sometido a biodegradación anaerobia. a) Polímero biodegradable, b) polímero de almidón y c) polímero no biodegradable



Los materiales se clasifican como se listan a continuación (según normas de estudio de biodegradación anaerobia [ASTM D 5526, 2000]):

- a) Polímero oxo-biodegradable (como control negativo, para controlar condiciones anaerobias)
- b) Polímero de almidón (material de prueba copolimerizado con etileglicol)
- c) Polímero no biodegradable (polímero sintético como control negativo, a base de polietileno PE)
- d) Blanco (para controlar el proceso)

Preparación del inoculo: El inoculo de microorganismos fue tomado de un suelo, al cual se controló condiciones de inundación por una semana, con la adición de 5 L de agua diarios (divididos en diferentes horas del día). Se tomó una fracción del líquido resultante y se filtró por un embudo de caña corta de plástico con papel filtro corrugado. El líquido filtrado se burbujeó con gas nitrógeno de alta pureza

(99,999%) y se dejó decantar en incubación a 35°C por aproximadamente 24 horas.

Acondicionamiento de los materiales de prueba: El material polimérico fue cortado en pequeños trozos con tijeras (fig. 12) [Chandra, R. y Rutsgi, R., 1998], de los cuales se tomaron $2,000 \pm 0,001$ g que fueron transferidos a botellas Winkler de 300 mL, previamente lavadas con agua deionizada y esterilizadas con hipoclorito de sodio al 5,25 % (fig. 13) [Owens, J. et al., 1993]. Se tomaron 10 mL de inóculo y se adicionó a las botellas Winkler, junto con la solución mineral (SM) con la cual se llenó hasta el tope, con cuidado de no rebasar el borde; adicionalmente a la mezcla resultante se le controló el pH como se indica a continuación.

Control de la acidez: además del acondicionamiento del medio para controlar el crecimiento microbiano, el pH se fijó entre 7,0 – 7,1 también para monitorear el proceso de formación de los ácidos orgánicos [Christodoulatos, C. et al., 1997], mediante la adición de NaOH al 10 % corroborando la lectura en el pH-metro.

Posteriormente, la solución resultante se burbujeó gas nitrógeno para controlar las condiciones anaerobias y se incubó a 35°C por 14, 28 y 42 días [Massardier-Nageotte, V. et al., 2006], por triplicado; considerando el día 28 como culminación del proceso de fermentación. Después de la incubación, las muestras líquidas fueron almacenadas en punto de congelación hasta su análisis.

Figura 13. Material polimérico acondicionado y puesto en botellas Winkler, listo para someter a la biodegradación



2.2.2 Proceso de elaboración de ensilaje (fermentación de residuos de pescado)

El método también se replicó en el seguimiento de la fermentación de un ensilaje formado con restos de pescado (viseras y residuos de tejidos), trabajado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, mediante la cuantificación de ácidos orgánicos en muestras de ensilaje en los días 0, 6, 12 y 18 del proceso. Para su determinación se planteó la extracción de los analitos con arrastre de vapor con el objetivo de tener una mejor limpieza de la matriz.

Las muestras de ensilajes fueron entregadas por parte de la Facultad de Ciencias Agropecuarias trituradas y congeladas; constituidas por residuos (como escamas, tejido óseo etc.) y vísceras de pescado, con tratamientos distintos en el proceso de fermentación. Las muestras entregadas se muestran a continuación (tabla 7):

Tabla 7. Muestras de elaboración de ensilaje, tratamientos y tiempos de fermentación

Muestras (tratamientos)	Día			
	0	6	12	18
Vísceras tratadas con Yogurt	VY0	VY6	VY12	VY18
Vísceras tratadas con alga (<i>plantarium sp</i>)	VP0	VP6	VP12	VP18
Residuos tratadas con Yogurt	RY0	RY6	RY12	RY18
Residuos tratadas con alga (<i>plantarium sp</i>)	RP0	RP6	RP12	RP18

2.2.2.1 Tratamiento de la muestra

Antes del análisis, su conservación se llevo a cabo en tubos para centrífuga plásticos a una temperatura de 0°C. Para realizar el estudio de los ácidos orgánicos, se descongeló y se siguió con el tratamiento descrito en el apartado 2.5.

2.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA

Se estandarizaron los parámetros cromatográficos y estadísticos para la determinación de ácido láctico acético propiónico y butírico. La optimización de estos parámetros se llevó a cabo teniendo en cuenta la preparación de soluciones con estándares de alta pureza de los analitos, la determinación de las mejores condiciones de separación cromatográfica y el soporte estadístico necesario para el análisis.

2.3.1 Preparación de soluciones

A continuación se describen los procedimientos de preparación de las soluciones con las que se realizó la estandarización del método analítico, teniendo en cuenta una previa calibración del material de vidrio con el que fueron preparadas (ver anexo C).

2.3.2 Preparación de la fase móvil

La fase móvil se preparó con ácido fosfórico al 85%, diluido en agua deionizada con 0,4 μS de conductividad, a pH 3,5. Para ello, se tomó 21,5 μL de ácido al 85% y se aforó con agua deionizada a 1 L (1000 mL). De manera similar fueron preparadas soluciones para pH de 2,5, 3,0 y 4,0, tomando 215, 67,9 y 6,78 μL respectivamente.

2.3.2.1 Preparación de las soluciones stock

Para cada estándar de ácido se tomó la cantidad correspondiente para la preparación de una solución madre de 1000 ppm, como lo muestra la tabla 8.

Tabla 8. Cantidades requeridas de los estándares, para la preparación de soluciones de 1000 ppm

Estándar	Cantidad
Ácido acético, 99,8%	10,0 μL
Ácido butírico, 99,5%	10,5 μL
Ácido láctico, 98%	10,0 mg
Ácido propiónico, 99,8%	10,1 μL

Las cantidades anteriores fueron transferidas a un balón volumétrico de $10 \pm 0,07$ mL y aforadas con agua deionizada. Las soluciones patrón resultantes fueron almacenadas a una temperatura de 8°C . De estas soluciones de trabajo se realizaron las diluciones correspondientes para su posterior análisis, principalmente las que se usaron en las curvas de calibración, tomando 30-250 μL , que se aforaron a 10 mL, para los niveles de 3-25 ppm (tabla 9).

Tabla 9. Volúmenes de la solución madre de 1000 ppm y concentraciones de las soluciones estándar obtenidas con la dilución a 10 mL

Volumen de estándar de 1000 ppm (μL) $\pm 0,0133$	Concentración de la solución (ppm) $\pm 0,0833$
30	3
40	4
70	7
110	11
150	15
190	19
250	25

2.3.3 Condiciones cromatográficas para la implementación del método

Los parámetros cromatográficos para la determinación de los cuatro ácidos, fueron optimizados por medio de ensayos experimentales, en donde se estudió la longitud de onda en el detector de UV, el tipo de columna, la composición de la fase móvil, la velocidad de flujo, y los tiempos de retención.

2.3.3.1 Selección de la longitud de onda

La longitud de onda de máxima absorción se identificó mediante un barrido en el espectrofotómetro con soluciones patrón de 100 ppm de los ácidos acético, láctico, propiónico y butírico, desde 190 hasta 250 nm, teniendo en cuenta valores reportados en la literatura [Kordis-Krapes, M. et al., 2001; Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

2.3.3.2 Selección de la columna

Se evaluaron tres columnas cromatográficas, Hypersil ODS C₁₈ (5 μm x 4,0 x 250 mm), Agilent Zorbax SB C₁₈ NH₂ (5 μm X 4,6 X 250 mm) y μ -Bondapack C₁₈ (10 μm x 3,9 x 150 mm), escogiendo la más pertinente para el análisis, teniendo en cuenta que el tipo de fase estacionaria C₁₈ ha dado buenos resultados en la separación de ácidos orgánicos [Sánchez-Machado, D. et al., 2008]. Fueron también estudiados la influencia del empaquetamiento y tamaño de partícula en la simetría y resolución de picos cromatográficos, aprovechando las diferencias que presentan las columnas.

2.3.3.3 Composición de la fase móvil

Se optimizó mediante la variación del pH del ácido fosfórico al 85% desde valores de pH de 2,5 hasta 4,0 [Kordis-Krapes, M. et al., 2001; Sánchez-Machado, D. et al., 2008]; se tuvieron presentes también las proporciones, y el tipo de solventes orgánicos como metanol y acetonitrilo. Para ello se realizaron ensayos con las siguientes fases móviles; para evaluar la simetría y resolución de los picos cromatográficos:

H₃PO₄, pH 2,5 – solvente orgánico* (99:1)

H₃PO₄, pH 3,0 – solvente orgánico (99:1)

H₃PO₄, pH 3,5 – solvente orgánico (99:1)

H₃PO₄, pH 4,0 – solvente orgánico (99:1)

* Solvente orgánico: Metanol o acetonitrilo.

Los ensayos también se realizaron con las soluciones acuosas sin la fracción de solvente orgánico, con el objetivo de buscar diferencias en los tiempos de retención. No se consideró evaluar relaciones diferentes de fracción orgánica, es decir mayores al 1%, ya que los tiempos de retención para estos analitos puede disminuir bajo estas proporciones, generando solapamiento entre los picos cromatográficos [Quattrocchi, O. et al., 1992; Swadesh, J. 2001].

2.3.3.4 Velocidad de flujo

Su determinación se llevó a cabo con una solución patrón de 11 ppm, constituida por una mezcla de los cuatro ácidos (láctico, acético, propiónico y butírico), variando la velocidad de flujo (desde 0,7 hasta 1 mL/min, cada inyección por quintuplicado); con este método fue posible determinar el flujo a la mínima altura de plato de la columna escogida.

2.3.3.5 Tiempos de retención

La medición se llevó a cabo mediante la inyección de soluciones patrón con los cuatro analitos mezclados e individuales, bajo las condiciones cromatográficas que se escogieron como óptimas.

2.3.4 Figuras de merito para el método analítico

Con las condiciones experimentales establecidas, es indispensable buscar fundamentos estadísticos que den la fiabilidad necesaria para el método de determinación de los ácidos orgánicos de interés en muestras que los contengan; para ello se estudió la linealidad, precisión, sensibilidad y exactitud del método analítico.

2.3.4.1 Linealidad

Se determinó evaluando el intervalo de concentración en el que la señal del detector es lineal y se reportó como el cuadrado del coeficiente de determinación. El rango lineal para el método se determinó empleando curva de calibración con patrón externo, realizada en un intervalo de 3 a 25 ppm (omitiendo el punto 4 de la tabla 9), para los ácidos butírico, láctico y propiónico, y de 4 a 25 ppm para ácido acético (tabla 9). Cada solución estándar (es decir, cada punto de la curva) se realizó con mezclas de los cuatro patrones, cada uno con la concentración correspondiente a cada nivel. Estas soluciones se prepararon en la fase móvil que resultó óptima (ver la sección 3.2.1.3); seguidamente se microfiltraron a través de una membrana de tamaño de poro de 0,45 μm y se inyectaron en el cromatógrafo, registrando las áreas de los picos obtenidos.

2.3.4.2 Sensibilidad

Se estimó por medio de los límites de detección y cuantificación, calculados a partir de la recta de regresión obtenida en el método de cuantificación (curva de calibración por patrón externo), mediante el estadístico $S_{y/x}$ (anexo D) [Miller, J. et al., 2000], tal como se describe a continuación:

Límite de detección. Se encontró calculando el área límite de detección por medio de $3S_{y/x} + a$, donde a es la ordenada de origen. Usando las curvas de calibración de los ácidos orgánicos en los niveles de 3, 7, 11, 15, 19 y 25 ppm para ácido láctico, propiónico y butírico y 4, 7, 11, 15, 19 y 25 ppm, para ácido acético, se encontró la concentración límite de detección, para cada uno de los ácidos orgánicos.

Límite de cuantificación. Se definió de forma similar al límite de detección, con el uso de $6S_{y/x} + a$ para encontrar el área límite de cuantificación, la cual se substituyó en las ecuaciones de las curvas de calibración para encontrar la concentración límite de cuantificación [Miller, J. et al., 2000].

La sensibilidad de calibración se reportó como las pendientes de las cuatro rectas de regresión obtenidas a partir de la linealidad a un nivel de confianza del 95%.

2.3.4.3 Precisión

Para observar la concordancia entre los datos en el método, se evaluaron los estadísticos de desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV). La medida de la precisión se dividió en tres pasos (diferenciados por el tiempo de medición de las soluciones) repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Este proceso se realizó con los estándares de alta pureza, según se describe a continuación:

Repetibilidad. Se determinó mediante la lectura de las seis soluciones estándar de la curva de calibración (3, 7, 11, 15, 19, 25 ppm, para ácido láctico, propiónico, butírico, y 4, 7, 11, 15, 19, 25 ppm, para ácido acético), cada una medida por quintuplicado en lapsos de tiempo cortos (el mismo día), de donde se evaluó el coeficiente de variación (CV) del tiempo de retención y del área de pico de las soluciones de estándar.

Precisión intermedia. Como otra alternativa de estimar la precisión del método, se determinó la variación de los datos en lapsos de tiempo diferentes; para ello, se realizó la medida de las áreas de dos niveles de la curva de calibración (de 11 y 19 ppm), por quintuplicado en diez días consecutivos. Estos se preparaban diariamente con los estándares de ácidos láctico, acético, propiónico y butírico. Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico respectivo, promediando las áreas diariamente. Cada media fue promediada nuevamente para reportar un único valor que las relacionara y se le determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Reproducibilidad. Se midió de forma análoga a la precisión intermedia, con la única diferencia de que las inyecciones en el cromatógrafo se realizaron de forma aleatoria a lo largo de dos meses; fueron medidas las áreas de los patrones de 11 y 19 ppm, reportando los datos de los días 2, 26, 37 y 48. Con los resultados obtenidos se estudió el comportamiento de los datos y se estimaron posibles variaciones en el tiempo de los mismos. Finalmente se realizó un análisis de varianza de la precisión intermedia con la reproducibilidad, mediante la prueba del estadístico F, para comparar si existían diferencias en la precisión de forma significativa (ver anexo D).

2.3.4.4 Exactitud

Se define como la diferencia entre los resultados obtenidos aplicando el mismo método con respecto a un valor aceptado como referencia [Miller J., et al. 2000]. El dopaje con soluciones estándar de las muestras en la simulación de la biodegradación y la extracción de los analitos a partir de soluciones estándar por medio del método de arrastre con vapor (para la extracción en las muestras de ensilaje), se tomaron como referencia y como criterio para determinar la exactitud.

Exactitud en la simulación de biodegradación. Se midió en términos de exactitud del equipo mediante el dopaje de una alícuota de 200 μL de las soluciones resultantes del proceso de biodegradación, estimando un porcentaje de error relativo. A cada alícuota se le adicionó, por separado, 30, 70 y 110 μL de mezcla de estándares (concentraciones de los niveles de la curva de 3, 7, y 11 ppm, respectivamente) y se aforó a 10 mL. La solución dopada se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, se filtró por 0.45 μm e inyectó en el cromatógrafo; cada una de estas muestras dopadas se preparó e inyectó por triplicado.

Exactitud en la extracción de estándares por arrastre de vapor (para el proceso de ensilaje). El criterio que se tomó como referencia para su determinación, fue la extracción de los analitos en una solución de mezcla de los cuatro estándares en un equipo de destilación; estimando la concentración resultante mediante la extrapolación en la curva de calibración y reportando un porcentaje de recuperación. Se realizó el t-student como prueba estadística de significancia, el proceso se describe a continuación:

Teniendo en cuenta la volatilidad de tres de los ácidos orgánicos estudiados (ácido acético, propiónico y butírico), fueron sometidos a arrastre con vapor soluciones de mezclas de los estándares de 400 ppm (de los cuatro analitos), de las cuales se tomó una alícuota de 2 mL que se adicionó en un balón de tres bocas (solución nativa), acoplándolo a un montaje de destilación por arrastre de vapor (ver montaje en [García, M., 2002]); por triplicado. Se evaluó tiempos de destilación de 30, 45 y 60 minutos.

El destilado se recogió en un balón de 100 mL y se aforó con agua destilada (*solución destilada*); posteriormente, se filtró por 0,45 μm . La solución anterior se inyectó al cromatógrafo líquido para el análisis de los ácidos acético, propiónico y butírico. La porción que quedó en el balón de tres bocas (la *solución no destilada*), fue aforada con agua destilada a 100 mL, se filtró por poro de 0,45 μm y se inyectó al cromatógrafo para el análisis del ácido láctico.

2.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS GENERADOS EN PROCESOS DE BIODEGRADACIÓN

La evaluación de estas sustancias en las muestras de la simulación de biodegradación anaerobia, se determinó utilizando como parámetro de análisis las áreas de los picos cromatográficos que resultaron de inyectar las muestras de biodegradación de los tres materiales poliméricos (ver sección 2.2.1.2, figura 12).

Las muestras congeladas se llevaron a temperatura ambiente, posteriormente, se siguió con el proceso de preparación para el análisis en el cromatógrafo, como se enuncia a continuación:

Las soluciones obtenidas, fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 min; seguidamente, fueron filtradas por papel filtro Watman N°1, y microfiltradas por tamaño de poro de 0,45 μm . Del filtrado se tomaron alícuotas de 200 μL y se llevaron a 10 mL con fase móvil (H_3PO_4 pH 3,5). Las soluciones resultantes nuevamente se microfiltraron por filtro de PTFE (de 0,45 μm de tamaño de poro) y finalmente se inyectaron en el cromatógrafo líquido.

La determinación se realizó por comparación de los tiempos de retención de los picos cromatográficos correspondientes de cada uno de los estándares de ácidos orgánicos con los de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas

de cada prueba. Las soluciones de las muestras fueron dopadas con concentraciones conocidas de cada patrón y, de esta manera, mediante la diferencia de áreas observadas en los cromatogramas de las muestras, se logró la identificación de las sustancias de estudio. La cuantificación se realizó por extrapolación en las curvas de calibración de las áreas de los picos de cada muestra.

2.5 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS EN PROCESOS DE ELABORACIÓN DE ENSILAJES

Las muestras de ensilaje recibidas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca (tabla 7), fueron analizadas mediante la extracción de los analitos por el método de arrastre con vapor y la extrapolación en las curvas de calibración de las áreas de pico resultantes de las inyecciones realizadas después del siguiente tratamiento:

Se pesó 1,0000 g de muestra y se adicionó en un balón volumétrico de 10 mL aforándolos con agua destilada. Se traspasaron a un tubo para centrifuga de 20 mL limpio y seco. Se centrifugó por 20 min a 5000 rpm, filtrando al vacío el sobrenadante con papel filtro whatman N° 1. Se tomó una alícuota de 2 mL exactamente medida (solución nativa) y se adicionó en un balón de tres bocas, acoplándolo al montaje de destilación por arrastre de vapor. Las soluciones fueron inyectadas como se indicó en el apartado 2.3.4.4 (*solución destilada*: análisis de ácido acético, propiónico y butírico; *solución no destilada*: análisis de ácido láctico). Para la identificación del pico de ácido láctico, la solución no destilada fue dopada con una concentración estándar de 11 ppm, para luego inyectarla al cromatógrafo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se llevara a cabo la interpretación y el análisis de los datos registrados durante el desarrollo experimental, iniciando por el análisis de la preparación de las muestras, seguido por la implementación de la técnica cromatográfica, y la determinación de los analitos encontrados en las diferentes matrices analizadas.

3.1 TRATAMIENTO DE MUESTRA

3.1.1 Proceso de biodegradación

Se esperaba que las condiciones establecidas en el proceso de biodegradación del material polimérico de prueba, terminara en la formación de ácidos orgánicos. El acondicionamiento del material de vidrio; burbujeo de nitrógeno en la solución mineral de nutrientes, que sirvió como medio al proceso y al inóculo del suelo inundado que se utilizó como fuente de microorganismos; acondicionamiento del material polimérico; incubación a una temperatura monitoreada (35°C) y control de pH del medio (entre 7,0 – 7,1) (ver metodología, apartado 2.2.1), acondicionaron la proliferación bacteriana, capaz de utilizar como única fuente de carbono, el material polimérico durante diferentes días de incubación (14, 28 y 42 días, escogidos así para un monitoreo del proceso, considerando al día 28 como culminación del mismo [Owens, J. et al., 1993; Chandra, R. y Rutschi, R. 1998; Massardier-Nageotte, V. et al., 2006]), ya que el resultado fue su descomposición y la producción de ácidos orgánicos liberados en el proceso de fermentación [Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

Determinación de la acidez en las muestras de biodegradación

Los resultados del cambio del pH en las simulaciones de la biodegradación de los polímeros utilizados son mostrados en la tabla 10. En esta se observan los pH's promedio, medidos al inicio del proceso de simulación y al final, es decir, medidos en el día en que se detuvo la incubación (el día 14, o el día 28 ó 42). Con estos resultados fue posible determinar las diferencias significativas entre los cambios del pH a lo largo del proceso de fermentación.

Tabla 10. Cambio del pH en las muestras de biodegradación a los 14, 28, 42 días de incubación

Solución del blanco de biodegradación (BL)			
Muestra	pH promedio inicial \pm s	pH promedio final \pm s	t ₄ * calculada
**BL 14	7,03 \pm 0,01	7,02 \pm 0,01	2,12
BL 28	7,06 \pm 0,05	7,04 \pm 0,01	1,29
BL 42	7,04 \pm 0,05	7,04 \pm 0,01	0,76

Solución del polímero biodegradable (B)			
Muestra	pH promedio inicial $\pm s$	pH promedio final $\pm s$	t_4^* calculada
**B 14	7,05 \pm 0,04	7,05 \pm 0,01	0,13
B 28	7,03 \pm 0,01	7,02 \pm 0,01	1,22
B 42	7,02 \pm 0,02	7,02 \pm 0,01	0,32

Solución del polímero no biodegradable (NB)			
Muestra	pH promedio inicial $\pm s$	pH promedio final $\pm s$	t_4^* calculada
**NB 14	7,05 \pm 0,04	7,03 \pm 0,01	0,92
NB 28	7,02 \pm 0,01	7,03 \pm 0,01	1,51
NB 42	7,03 \pm 0,01	7,03 \pm 0,03	0,45

Solución del polímero de almidón (AL)			
Muestra	pH promedio inicial $\pm s$	pH promedio final $\pm s$	t_4^* calculada
**AL 14	7,08 \pm 0,02	6,26 \pm 0,04	32,58
AL 28	7,07 \pm 0,01	6,16 \pm 0,03	61,04
AL 42	7,05 \pm 0,04	6,08 \pm 0,01	40,22

* t_4 para $p = 0,05$: 2,78, ** BL: Blanco, B: polímero biodegradable NB: polímero no biodegradable, AL: polímero de almidón; los pH promediados son el resultado de las medias de los triplicados de cada solución (el número (14, 28, 42) indica los días de incubación)

Para determinar si hay diferencias significativas, se utilizó la prueba t, y como se observa, la hipótesis nula propuesta se rechaza (ver anexo D) para el polímero de almidón, mostrando que los pH's son significativamente diferentes, por lo tanto, podemos decir que éste ha disminuido (en la solución del polímero de almidón) a diferencia de los otros ensayos, por la presencia de ácidos orgánicos como lo indican varios estudios [Demiate, I. et al., 1999; Sánchez-Machado, D. et al., 2008], en los cuales la disminución del pH evidencia la formación de estas sustancias.

Otras características que presentaron las soluciones obtenidas del proceso de biodegradación del polímero de almidón, muy comunes en los procesos de fermentación [Demiate, I., et al., 1999], son su olor (desagradable) y cambios en la turbidez de la solución, esto debido a la acción microbiana que logró metabolizar el polímero de almidón, similar a como lo indican algunos autores en este tipo de materiales [Chandra, R. y Rutsgi, R., 1998; Lucas, N. et al., 2008]. Estas características no se presentaron en las otras pruebas de los materiales estudiados (polímero oxo-biodegradable, polímero no biodegradable y blanco), siendo coherente con los resultados del pH mostrados en la tabla 10.

3.1.2 Proceso de elaboración de ensilaje (fermentación de residuos de pescado)

Los procesos de fermentación fueron llevados a cabo en la facultad de ciencias agropecuarias de la Universidad del Cauca. Para realizar un seguimiento del proceso de formación de ácidos orgánicos, se evaluaron los días 0, 6, 12, 18, para muestras constituidas por residuos y vísceras de pescado, tratadas con yogurt y el alga *plantarum sp.*, que se utilizaron como fermentos [Garcés, A. et al., 2000; Copes, J. et al., 2006]. Las muestras congeladas, sólidas y trituradas, fueron llevadas a temperatura ambiente, y se realizó el tratamiento de muestra descrito en la metodología (apartado 2.5), ya que las soluciones que se obtenían presentaban turbiedad y partículas en suspensión. Posteriormente fueron sometidas a arrastre con vapor para extraer, identificar y cuantificar los analitos de estudio, mediante los picos cromatográficos. Los resultados son expuestos en la parte 3.4 de este apartado.

3.2 IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA

Los resultados de la optimización de la separación de ácido láctico, acético, propiónico y butírico, y su soporte estadístico, se muestran a continuación.

3.2.1 Condiciones cromatográficas para la implementación del método

3.2.1.1 Selección de la longitud de onda

De los espectros de absorción realizados entre 190 -250 nm de los patrones de ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético, propiónico y butírico) en agua destilada, se seleccionó 210 nm como longitud de onda óptima para la detección cromatográfica de los analitos. Este valor se concuerda con el rango estimado en varios reportes bibliográficos [Schneider, A. et al., 1987; Bidart, M. et al., 1993; Kordis-Krapes, M. et al., 2001; Karadeniz, F., 2004; Marconi, O. et al., 2007; Sánchez-Machado, D. et al., 2008].

3.2.1.2 Selección de la columna

Estudios realizados por Llorente, et al, en 1991; Bidart, et al, en 1993; Giunchedi, et al, en 1998; Kordis-Krapes, et al, en 2001 y Sánchez-Machado, et al, en 2008, muestran que el uso de las fases estacionarias de C₁₈ en la cromatografía ligada en fase reversa, tienen una gran eficacia en la separación de los ácidos carboxílicos, lo cual es debido a la distribución de sus cadenas carbonadas, que permiten la separación de dos solutos de diferente tamaño molecular [Quattrocchi, O. et al., 1992; Swadesh, J. 2001].

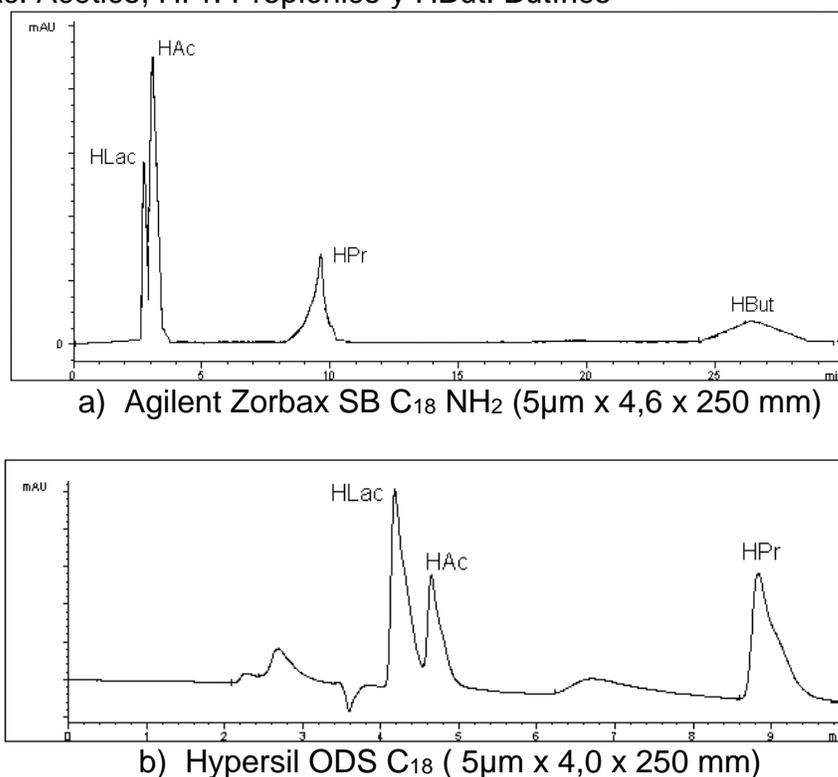
Teniendo en cuenta que el grupo de investigación en Química de Productos Naturales (Q. P. N.) cuenta con tres columnas tipo C₁₈, (apartado 2.3.3.2 de la

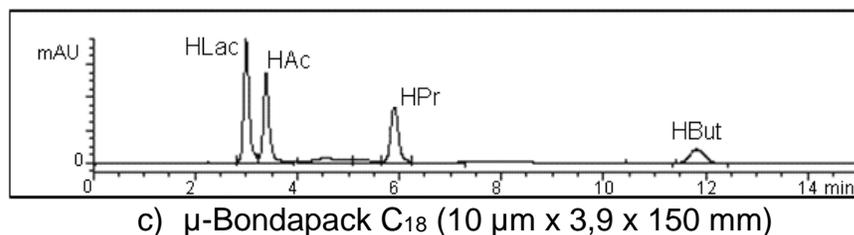
metodología), se evaluó su eficiencia en la separación de los analitos con diferentes fases móviles, por lo que se reporta solamente la que dio los mejores resultados.

La figura 14 muestra los cromatogramas de las soluciones patrón de los ácidos láctico (HLac), acético (HAc), propiónico (HPr) y butírico (HBut), en las 3 diferentes fases estacionarias evaluadas en ácido fosfórico a pH 3,5; buscando la mejor resolución y simetría de pico [Skoog, D. et al., 2001].

El conjunto de cromatogramas agrupados en la figura 14, sirve para comparar la simetría y resolución de los picos que identifican a las sustancias de estudio, bajo diferentes fases estacionarias. El primer cromatograma (fig. 14a), muestra picos con baja simetría y resolución muy pobre, con un grado de solapamiento considerable (en los picos con tiempo de retención menor a los 5 min), además de un tiempo de corrida relativamente extenso (alrededor de los 26 minutos). En el segundo cromatograma (fig. 14b), solo se muestran tres de los cuatro picos a analizar, ya que solo nos interesa por el momento su resolución y simetría, estas aumentaron respecto al primer cromatograma, sin embargo presentaron problemas de tailing (o de colas), que afectan la simetría del pico [Quattrocchi, O. et al., 1992].

Figura 14. Cromatogramas para las diferentes columnas evaluadas. Picos HLac: Láctico, HAc: Acético, HPr: Propiónico y HBut: Butírico





En el tercer cromatograma (fig. 14c), se observan los picos correspondientes a los cuatro analitos de interés, con un aumento notable de simetría y resolución, con tiempos de retención de 3,0, 3,4, 6,0 y 11,9 minutos para los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico, respectivamente. Según lo obtenido en estos ensayos, se escogió la columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) como la más adecuada para la estandarización del método, dejando claro que la fase móvil se analizó con mas detalle en esta columna.

Según reportes literarios en los que comparan tiempos de retención de sustancias de carácter ácido en diferentes fases estacionarias incluidas la Hypersil ODS y algunas Zorbax [Quattrocchi, O., et al., 1992], la retención es menor en columnas μ -Bondapack C₁₈, esto es coherente con los resultados observados en los cromatogramas de la fig. 14; donde es claro que ésta columna puede separar los ácidos de interés con tiempos de análisis relativamente cortos.

3.2.1.3 Elección de la fase móvil

Mientras se seleccionaba la columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) como fase estacionaria para el análisis cromatográfico, de forma simultanea se eligió la fase móvil más adecuada, teniendo en cuenta estudios reportados [Bidart, M. et al., 1992; Kordis-Krapes, M. et al., 2001; Sánchez-Machado, D. et al., 2008; Fei, L. et al., 2009] y ensayos experimentales; buscando la mejor separación de picos con buena simetría [McMaster, C., 2007].

Tal como se observó en la figura 14c, el último pico correspondiente al ácido butírico, tiene un tiempo de retención relativamente alto; y es probable que cambios en la fase móvil no influyan en su resolución con respecto a los demás picos, por esta razón, los siguientes análisis se realizaron sólo con los tres estándares que eluyen a tiempos de retención cercanos (Láctico (HLac), Acético (HAc) y Propiónico (HPr)).

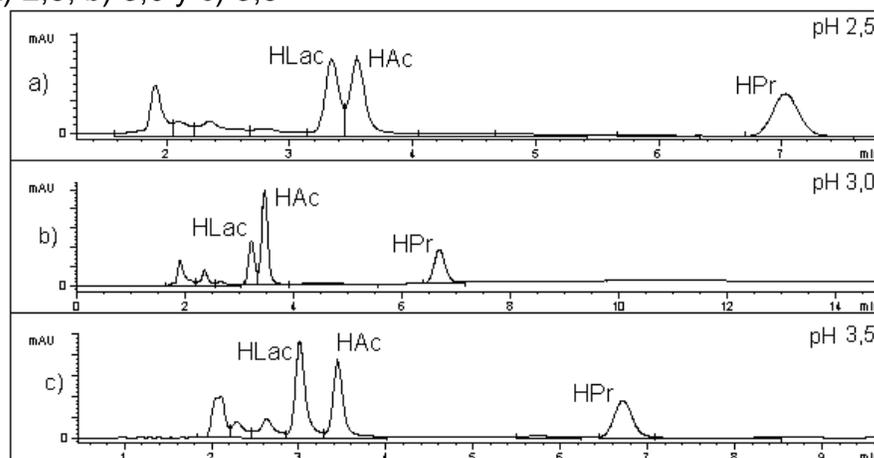
Pruebas para cambio del pH

La elución de los patrones de ácido acético, propiónico y láctico (HAc, HPr, HLac, respectivamente) diluidos en fase móvil de ácido fosfórico a pH de 2,5 ($3,2 \times 10^{-3}$ M), 3,0 ($1,0 \times 10^{-3}$ M) y 3,5 ($3,2 \times 10^{-4}$ M), se registra en la figura 15.

Puede observarse la influencia del aumento del pH (desde 2,5 hasta 3,5, figura 15), encontrando que la separación realizada a pH de 3,5, permite una mejor

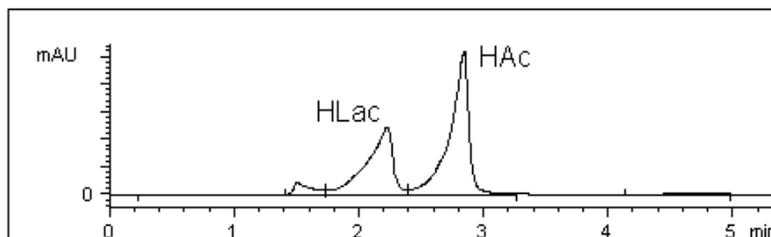
resolución con tiempos de análisis relativamente menores, debido a que los analitos interaccionaron mejor con la fase móvil [Quattrocchi, O. et al., 1992; McMaster, C., 2007].

Figura 15. Comparación de los cromatogramas obtenidos por CLAR en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm), con cambios de pH en la fase móvil de a) 2,5, b) 3,0 y c) 3,5



El análisis de la separación de los analitos con una fase móvil de ácido fosfórico (H_3PO_4) a pH 4 (figura 16), dio como resultado la disminución en la simetría de los picos cromatográficos, por lo tanto un aumento del pH en estas sustancias, probablemente hace que cierto porcentaje de estas pasen a su forma ionizada, eluyendo un poco mas rápido que el resto, generando problemas de fronting [Quattrocchi, O. et al., 1992]. En la figura 16 se observa el cromatograma obtenido bajo estas condiciones para los patrones de ácido acético (HAc) y láctico (HLac).

Figura 16. Cromatograma CLAR para los ácidos: Láctico (HLac) y Acético (HAc) en fase móvil de H_3PO_4 a pH 4 en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm)



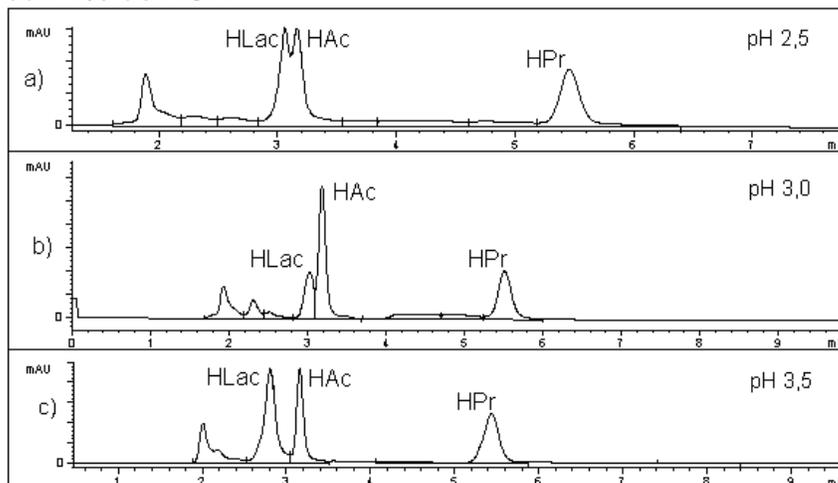
Influencia del solvente orgánico

Se determinó el tipo de fracción orgánica con la variación del pH de la fase móvil (Fig. 17), para estudiar el comportamiento de elución de los de los analitos en los

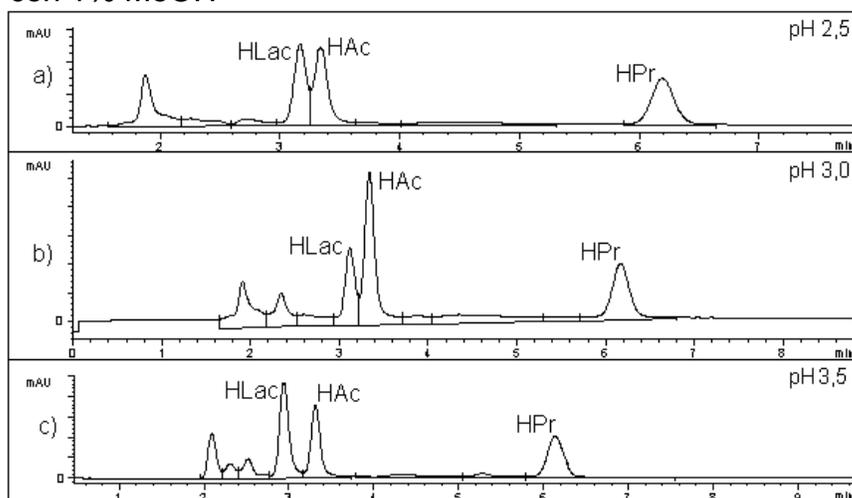
diferentes medios ácidos propuestos (pH 2,5, 3,0 y 3,5). De los ensayos anteriores (Fig. 15) es claro que la mejor simetría y resolución es encontrada con la fase móvil a pH de 3,5, por lo que se consideró buscar condiciones que presenten menores tiempos de retención y que conserven la resolución. Para ello las soluciones acidas (pH 2,5, 3,0 y 3,5) se acondicionaron con 1% de solvente orgánico (metanol o acetonitrilo), teniendo en cuenta que en este tipo de análisis, proporciones mayores de fracción orgánica podrían ocasionar solapamiento de picos [Quattrocchi, O. et al., 1992; McMaster, C., 2007]. Los cromatogramas obtenidos se observan en la figura 17.

Figura 17. Influencia del tipo de solvente y variación del pH en la elución de los ácidos: láctico (HLac), acético (HAc) y propiónico (HPr) por CLAR, cambiando la fracción orgánica en: a) acetonitrilo (ACN) y b) metanol (MeOH), en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm)

a) Pruebas con 1% de ACN



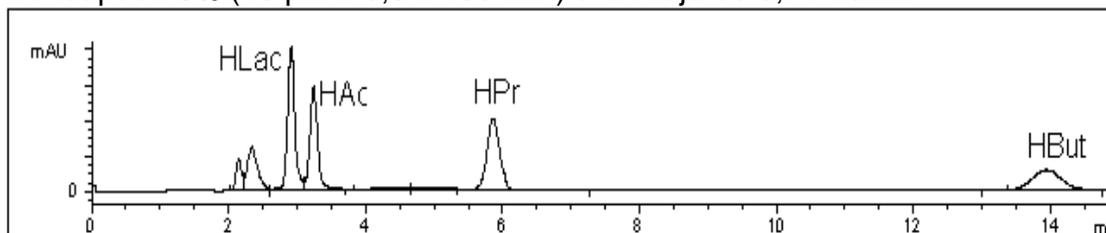
b) Pruebas con 1% MeOH



En la figura 17a, se observa que los tiempos de retención de los ácidos orgánicos, más bajos los tienen las pruebas realizadas con 1% de ACN, sin embargo, el pico de alrededor de 2,8 min (ácido láctico, HLac), presenta un leve problema de fronting, que disminuye su simetría [Quattrocchi, O. et al., 1992; Skoog, D. et al., 2001]. En la figura 17b, se observa que en la proporción de fase móvil a pH 3,5 con 1% de MeOH, la simetría y resolución son mejoradas respecto a este tipo de problemas y los tiempos de retención de los estándares de ácidos orgánicos no se diferencian demasiado de los obtenidos con acetonitrilo. Adicionalmente el metanol es un solvente muy económico y aventaja al acetonitrilo por su mayor poder disolvente de sales y reactivos de apareamiento iónico. Por estas razones se eligió como modificador de la fase móvil.

Con estos resultados se estableció que la separación de los ácidos orgánicos láctico (HLac), acético (HAc) y propiónico (HPr), puede realizarse en la columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) y fase móvil de ácido fosfórico a pH 3,5-MeOH (99:1). En la figura 18 se observa el cromatograma correspondiente a la elución de los cuatro ácidos orgánicos de interés.

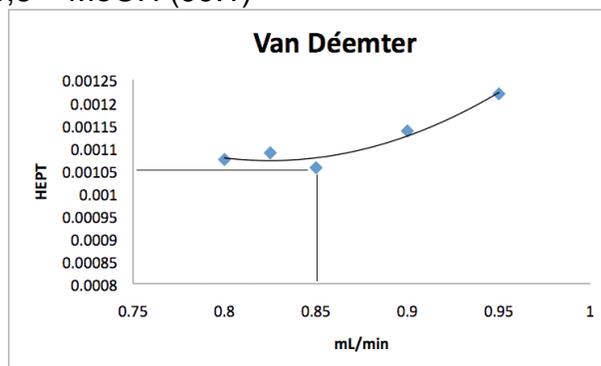
Figura 18. Elución de los ácidos láctico (HLac), acético (HAc), propiónico (HPr) y butírico (HBut) con ácido fosfórico pH 3,5-MeOH (99:1) en una columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) a un flujo de 0,7 mL/min



3.2.1.4 Selección del flujo óptimo

Teniendo en cuenta que el flujo (0,7 mL/min) con el que se establecieron las fases móvil y estacionaria fue un dato tomado por reportes literarios [Kordis-Krapes, M. et al., 2001; Sánchez-Machado, D. et al., 2008], se decidió explorar la eficacia de la columna mediante el análisis del flujo óptimo. Para encontrar la menor altura y el mayor número de platos teóricos, se realizó una curva de van Dée mter (figura 19); encontrando que el flujo a la mínima altura de plato teórico de la columna μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) fue 0,85 mL/min para el patrón con mayor tiempo de retención (ácido butírico).

Figura 19. Curva de Van D emter para la determinaci3n del flujo 3ptimo con una columna μ -Bondapak C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) y fase m3vil compuesta por ácido fosf3rico pH 3,5 – MeOH (99:1)



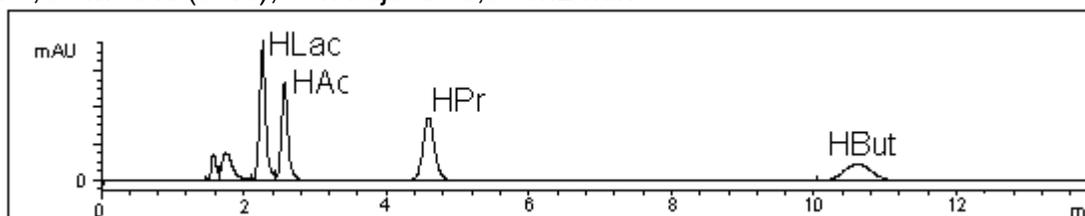
Bajo las condiciones estudiadas, los parámetros 3ptimos para la determinaci3n de los ácidos orgánicos láctico, acético, propi3nico y butírico (ver anexo F), son resumidos en la tabla 11.

Tabla 11. Parámetros 3ptimos para la determinaci3n de los ácidos orgánicos láctico, acético, propi3nico y butírico por CLAR

Parámetro	Condici3n
Fase m3vil	H ₃ PO ₄ a pH 3,5 – MeOH (99:1)
Columna	μ -Bondapak C ₁₈ (10 μ m)
Flujo	0,85 mL/min
Detecci3n	UV a 210nm

Con estas condiciones se obtuvieron picos gaussianos, con anchos de banda menores a $0,33\pm 0,03$ min, demostrando una buena resoluci3n y simetría de los picos para cada uno de los analitos estudiados (ver anexo F), con un tiempo de análisis total de 12 minutos, como se observa en la figura 20.

Figura 20. Cromatograma de los patrones de ácidos orgánicos (HLac) láctico, (HAc) acético, (HPr) propi3nico y (HBut) butírico obtenidos por CLAR- UV-Vis, en una columna μ -Bondapak C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) y fase m3vil ácido fosf3rico pH 3,5 – MeOH (99:1), con flujo de 0,85 mL/min



3.2.1.5 Tiempos de retención

Estos parámetros se determinaron con las soluciones de mezclas de los cuatro patrones a una concertación de 30 ppm, en las condiciones establecidas previamente (tabla 11). Los resultados son mostrados en la tabla 12 acompañados de su respectiva desviación estándar **s**.

Tabla 12. Tiempos de retención de los ácidos láctico (HLac), acético (HAc), propiónico (HPr) y butírico (HBut) analizados por CLAR (columna μ -Bondapack C₁₈10 μ m x 3,9 x 150 mm y fase móvil de ácido fosfórico a pH 3,5 – MeOH (99:1) a un flujo de 0,85mL/min)

Ácido	Tiempo (min) \pm s*
Láctico (HLac)	2,3 \pm 0,01
Acético (HAc)	2,6 \pm 0,03
Propiónico (HPr)	4,6 \pm 0,03
Butírico (HBut)	10,5 \pm 0,17

*s: desviación estándar

Los tiempos de respuesta expuestos en la tabla 12, son coherentes con la longitud de la cadena carbonada de los ácidos orgánicos, observando que a mayor tamaño del grupo apolar, la superficie de contacto con la fase estacionaria será mayor y se retendrá más. Por el contrario, cadenas muy cortas o con un grupo polar, como en el caso de los ácidos acético y láctico, disminuirían la retención al presentar una mejor afinidad con la fase móvil [Quattrocchi, O., et al., 1992; Swadesh, J., 2001].

Aunque los estándares tienen tiempos de retención diferentes al compararlos con otros estudios [Giunchedi, P., et al., 1998; Demiate, I., et al., 1999; Sánchez-Machado, D., et al., 2008], en la mayoría se conserva el orden de elución de la columna; por ejemplo, el ácido láctico se caracteriza por tener el menor tiempo de retención debido a que posee una polaridad relativa mayor, proporcionada por el grupo hidroxilo unido al carbono α (ver estructura en la tabla 3, pag. 31). Para los demás analitos se observa que con el aumento del número de carbonos aumenta su retención en la columna.

3.2.2 Figuras analíticas de mérito para el método (análisis estadístico)

El soporte estadístico necesario para determinar la fiabilidad del método, se realizó por medio de la determinación de parámetros como la linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud, arrojando los siguientes resultados:

3.2.2.1 Linealidad

Se construyó una curva de calibración para cada ácido (láctico, acético, propiónico y butírico) en la que se graficó el área bajo la curva del pico cromatográfico en función de la concentración de cada una de las soluciones estándar bajo las condiciones cromatográficas establecidas (tabla 11), teniendo en cuenta que el área debe ser proporcional a la concentración (figura 21). El criterio de linealidad establecido es: $r > 0,990$; $r^2 > 0,980$, $CV \leq 5\%$; [Miller, J., et al., 2000]

Las curvas de cuantificación de los ácidos orgánicos se encuentran en un rango de concentraciones entre 3 y 25 ppm, y corresponden a niveles adecuados para evitar retenciones en la columna [Quattrocchi O. et al., 1992; Skoog, D. et al., 2001]. Las curvas de calibración para los cuatro ácidos orgánicos se observan en la figura 21.

De acuerdo a las curvas y a los coeficientes de determinación obtenidos ($r^2 > 0,980$) (tabla 13), se demuestra la linealidad que presenta el área registrada en el análisis cromatográfico con el rango de concentraciones trabajadas. Por otra parte, las pendientes de las rectas de regresión (tabla 13), muestran una alta sensibilidad del calibrado y precisión, debido a sus bajas desviaciones estándar (0,034-0,037), indicando que el método puede determinar concentraciones en este rango lineal, dentro de estos márgenes estadísticos.

Figura 21. Curvas de calibración para la determinación los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico, por CLAR (μ -Bondapack C₁₈ (10 μ m x 3,9 x 150 mm) y fase móvil ácido fosfórico pH 3,5–MeOH (99:1) a flujo de 0,85mL/min)

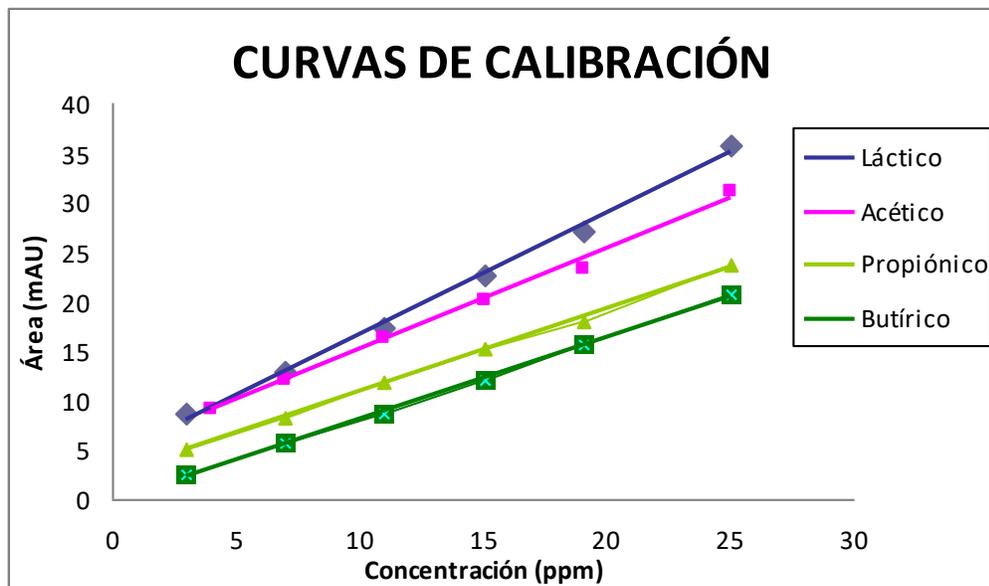


Tabla 13. Parámetros de calibración para los ácidos orgánicos analizados por CLAR con una columna μ -Bondapack C₁₈ y fase móvil ácido fosfórico pH 3,5–MeOH (99:1) a flujo de 0,85 mL/min

Ácido	Ecuación	r ²	b*	s _b *
Láctico	y = 1,2307X + 4,3437	0,9969	1,307	0,343
Acético	y = 1,0169X+ 4,9551	0,9945	1,169	0,376
Propiónico	y = 0,8376X+ 2,5458	0,9986	0,376	0,155
Butírico	y = 0,8263X – 0,1041	0,990	0,263	0,129

*r²: coeficiente de determinación b: pendiente de la recta, s_b: desviación estándar de la pendiente,

Además, se contrastó la prueba t para corroborar la correlación lineal significativa entre dos variables (área versus concentración). En la tabla 14 se observa que la t tabulada es menor que la t calculada para un grado de confianza de 95% y N-2 grados de libertad, y según la definición (ver anexo D), la hipótesis nula se rechaza indicando una correlación lineal significativa.

Tabla 14. Coeficientes de correlación y test estadístico t, como indicador de significancia de la correlación lineal entre el área del pico y la concentración del estándar

Ácido	r	t Calculado	t ₃ Tabulado*
Láctico (HLac)	0,9980	27,33	3,18
Acético (HAc)	0,9970	22,29	3,18
Propiónico (HPr)	0,9990	38,69	3,18
Butírico (HBut)	0,9995	54,74	3,18

*para 95% de confianza, r: coeficiente de correlación

3.2.2.2 Sensibilidad

Este parámetro se relacionó directamente con las pendientes de las curvas de calibración y se determinó mediante el límite de cuantificación y detección del método utilizando S_{y/x} [Miller, J. et al., 2000] (tabla 15).

Tabla 15. Límites de detección y cuantificación establecidos para los ácidos: láctico, acético, propiónico y butírico.

Ácido	Área LD	LD (ppm)	Área LC	LC (ppm)
Láctico (HLac)	6,2	1,5	8,1	3,0
Acético (HAc)	6,9	1,9	8,9	3,9
Propiónico (HPr)	3,4	1,0	4,2	2,0
Butírico (HBut)	0,6	0,8	1,3	1,7

Estos límites de detección fueron similares a los reportados en otros estudios [Demiate, I. et al., 1999; Ewaschuk, J. et al., 2004; Sánchez-Machado, D. et al., 2008], muestran que la metodología propuesta presenta buena sensibilidad en la detección de este tipo de compuestos por UV en cromatografía líquida de alta resolución.

3.2.2.3 Precisión

Este parámetro de confiabilidad, mide la concordancia entre los datos que han sido replicados exactamente de la misma forma [Skoog, D., et al., 2001]. Para su determinación, se estudió la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Repetibilidad. Se realizó bajo las mismas condiciones de operación, en intervalos cortos de tiempo (en el mismo día), por el mismo analista, sobre la misma muestra, usando el mismo equipo. Se determinó por medio del coeficiente de variación (CV) que resultó de la medida de los seis niveles de la curva de calibración por quintuplicado, inyectados en lapsos de 12 minutos entre réplicas. En la tabla 16 (a y b) se observa que los CV para las áreas estimadas y los tiempos de retención de los cuatro ácidos analizados son inferiores al 5%, demostrando así la repetibilidad del método bajo un nivel de confianza del 95%. Para los tiempos de retención, los coeficientes de variación estuvieron entre 0,21 y 0,68 % y para las áreas entre 1,23 y 4,18 %, indicando que el método es repetible ya que el t_R y el área no presentaron desviación considerable (datos de todas las áreas en anexo E).

Tabla 16. Medidas para determinar la repetibilidad en a) áreas y b) tiempos de retención, expresados como porcentaje del coeficiente de variación (%CV)

a) Coeficientes de variación de las áreas de pico para cada uno de los seis niveles de la curva de calibración de los ácidos orgánicos analizados por CLAR*

Ácido \ Nivel (ppm ^{**})	CV ^{**} (%) para cada nivel de la curva					
	3 ^{***}	7	11	15	19	25
Láctico (HLac)	2,23	1,23	2,77	1,94	1,42	0,754
Acético (HAc)	2,28	2,23	3,64	4,09	3,10	3,18
Propiónico (HPr)	1,62	2,88	2,47	3,83	1,90	1,89
Butírico (HBut)	4,18	1,24	2,98	3,63	1,48	2,34

b) Repetibilidad de los t_R de los ácidos orgánicos, analizados por CLAR

Ácido	Tiempo promedio (min)	s**	%CV
Láctico (HLac)	2,33	4,86E-03	0,21
Acético (HAc)	2,54	5,57E-03	0,22
Propiónico (HPr)	4,62	3,14E-02	0,68
Butírico (HBut)	10,60	2,81E-02	0,26

*Para ver los datos y las áreas completas ver anexo E; **ppm: concentración en partes por millón, s: desviación estándar, %CV: porcentaje del coeficiente de variación; *** este nivel es de 4 ppm para ácido acético

Precisión intermedia. En la tabla 17 se muestra que los valores del coeficiente de variación bajo un parámetro de confianza del 95% son bajos, por lo que el método para la cuantificación de los ácidos orgánicos láctico, acético, propiónico y butírico, presentó concordancia de los datos obtenidos bajo las mismas condiciones de operación en lapsos de 24 horas, por el mismo analista, sobre la misma muestra y usando el mismo equipo.

Tabla 17. Coeficientes de variación de las áreas reportadas de dos estándares (11 y 19 ppm) medidos por 10 días consecutivos*

Ácido	Estándar 11 ppm		Estándar 19 ppm	
	X**	%CV	X**	%CV
Láctico (HLac)	16,63	4,70	28,22	4,73
Acético (Hac)	15,89	4,55	23,97	4,21
Propiónico (HPr)	11,54	4,55	17,93	4,54
Butírico (Hbut)	8,91	2,27	15,62	1,35

- Los datos complementarios se encuentran en el apéndice E; **X: media de medias de las áreas reportadas por cada día. %CV: coeficiente de variación

Reproducibilidad. Como se observa en la tabla 18, se reportan los datos de los días 2, 26, 37, 48; los cuales indican que existe reproducibilidad del método de cuantificación de los ácidos orgánicos analizados, ya que presentan un coeficiente de variación (CV) menor al 5% [Miller J., et al. 2000].

Tabla 18. Áreas para los estándares de 11 y 19 ppm medidos aleatoriamente durante dos meses

Estándar de 11 ppm						
Ácido	Día 2	Día 26	Día 37	Día 48	X	%CV
Láctico	16,2	16,0	15,7	17,4	16,3	4,7
Acético	15,3	14,9	15,7	16,3	15,6	3,9
Propiónico	11,3	11,1	11,2	11,8	11,3	2,8
Butírico	8,8	8,7	8,5	8,7	8,7	1,5

Estándar de 19 ppm						
Ácido	Día 2	Día 26	Día 37	Día 48	X	%CV
Láctico	28,5	28,3	28,5	27,1	28,1	2,4
Acético	23,7	23,7	23,5	23,2	23,5	0,9
Propiónico	18,1	16,9	17,0	18,0	17,5	3,5
Butírico	15,6	15,5	14,9	15,6	15,4	2,0

X media de medias, %CV: Coeficiente de variación

De los tres parámetros anteriores, repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, encontramos que las medidas de las áreas de pico para los ácidos: acético, láctico, propiónico y butírico se encuentran dentro del margen estadístico, lo que permite concluir que el método es una herramienta útil para cuantificar con un alto grado de concordancia.

3.2.2.4 Exactitud

Los resultados de los procesos de exactitud, se estudiaron mediante el dopaje de muestra y extracción por arrastre de vapor.

- **Dopaje de muestras de la simulación de biodegradación.** Debido a que fue posible determinar dos de los cuatro ácidos en estas muestras (acético y butírico, Pág. 74), se realizó el dopaje con tres puntos de la curva de diferentes concentraciones (mezcla de 3, 7 y 11 ppm de cada estándar) que permitieron establecer el error relativo relacionado con el equipo. La tabla 19 expone la exactitud estimada por medio de este parámetro.

Tabla 19. Porcentaje de error relativo para los ácidos, a) acético y b) butírico formados en la simulación de biodegradación del polímero de almidón

a) % error para ácido acético

Solución	Media de medias*	s*	CV (%)	[ppm] exp	[ppm] teórica	%error
DP 3ppm	14,51	0,20	1,40	9,40	9,05	3,87
DP 7ppm	18,76	0,22	1,18	13,58	13,05	4,07
DP 11ppm	22,96	0,43	1,87	17,72	17,05	3,93

b) % error para ácido butírico

Solución	Media de medias*	s*	CV (%)	[ppm] exp	[ppm] teórica	%error
DP 3ppm	11,73	0,23	1,99	14,22	14,47	1,77
DP 7ppm	14,81	0,43	2,89	17,94	18,47	2,87
DP 11ppm	17,77	0,21	1,17	21,52	22,47	4,23

* **s**: Desviación estándar, **%CV**: Coeficiente de variación, **[ppm] exp**: concentración en ppm (mg/L) experimentales, **[ppm] teórica**: concentración en ppm (mg/L) teórica

Se observa que el valor obtenido de las concentraciones de tres soluciones de muestras dopadas cada una analizada por triplicado, arroja resultados del porcentaje de error relativo por debajo del 5%, lo que es aceptable para la técnica de cuantificación [Miller J., et al. 2000]. Además las desviaciones estándar (s) entre 0,20 – 0,43 y los coeficientes de variación (CV) menores al 3%, muestran concordancia entre los datos, proporcionando mayor soporte y fiabilidad al método de cuantificación.

- **Extracción de estándares por arrastre de vapor.** La determinación de la exactitud de este procedimiento, se realizó por medio de la extracción de los estándares de soluciones preparadas en el laboratorio. Los resultados y porcentajes de recuperación son mostrados en la tabla 20. En esta también se observa el contraste de significación dado por el test estadístico t student, en el cual es aceptada la hipótesis nula (ver anexo D), cerciorándose de que los porcentajes de recuperación promedio (%R) no difieren significativamente del 100% a un 95% de confiabilidad (incluso se acepta hasta en un 99% confiable con N-1 grados de libertad), indicando que el método de arrastre con vapor es exacto para la extracción de los tres ácidos orgánicos mencionados. Además la desviación estándar (s), como el coeficiente de variación (%CV), muestran que el método de extracción presenta precisión aceptable dentro del margen estadístico [Miller, J., et al., 2000].

Tabla 20. Porcentajes de recuperación del arrastre de vapor para ácido acético, propiónico y butírico

Ácido	%R* promedio	s	%CV	t calculada	Criterio
Acético	91,34	4,58	5,02	3,27	*NDS
Propiónico	93,84	4,35	4,63	2,45	NDS
Butírico	99,28	2,49	2,51	0,50	NDS

t_2 a 95% de confianza = 4,3, * **NDS**: No difiere significativamente al 100%, **%R**: porcentaje de recuperación, **s**: Desviación estándar, **%CV**: Coeficiente de variación

Para optimizar la recuperación de los estándares de ácidos orgánicos, se estudió el tiempo de destilación que tuvo lugar en ensayos de 30, 45 y 60 minutos, mostrando que el tiempo óptimo de extracción fue de 45 minutos, ya que las diferencias de las recuperaciones entre los 45 y 60 min no fueron significativas (ver el test estadístico en el anexo D y su contraste en el anexo E).

Las pruebas estadísticas realizadas a la estandarización del método demuestran que es adecuado para identificar y cuantificar los ácidos orgánicos, acético propiónico y butírico con exactitud y precisión.

3.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS GENERADOS EN PROCESOS DE BIODEGRADACIÓN

Se basó en la determinación de estas sustancias en muestras de simulación de biodegradación anaerobia de diferentes materiales poliméricos puestos a diferentes tiempos de incubación según bibliografía consultada [Owens, J. et al., 1993; Christodoulatos, C. et al., 1997; Chandra, R. y Rutsji, R., 1998; Massardier-Nageotte, V. et al., 2006] como lo indica la parte 2.2.1 de la metodología. La determinación se realizó por medio de la extrapolación de las áreas de pico resultantes en las curvas de calibración.

Las soluciones que resultaron de los procesos de biodegradación fueron centrifugadas para eliminar partículas que se encontraban suspendidas y sedimentadas, posteriormente filtradas por papel whatman N° 1, poro 0,45 μm y filtro de PTFE; como parte final de este proceso se obtuvo una solución traslucida, la cual se diluyó e inyectó una alícuota de 20 μL en el cromatógrafo.

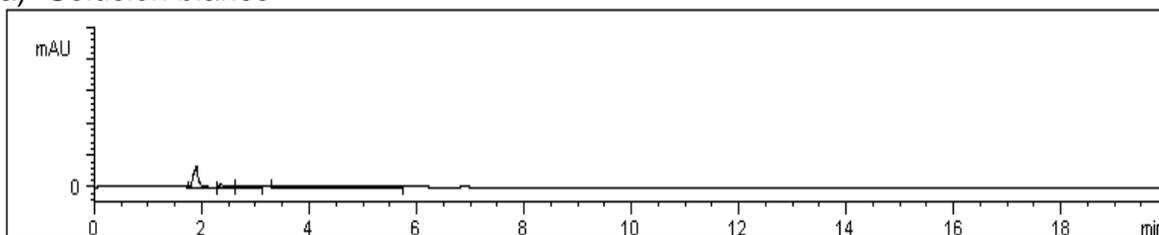
Los picos de cada sustancia se identificaron según su tiempo de retención y por dopaje de la muestra con estándar. La concentración se determinó por medio de la extrapolación de sus áreas en las curvas de calibración, como lo muestran varios estudios [Marconi, O. et al., 2007; Sánchez-Machado, D. et al., 2008], en donde se

usa el mismo método. En la figura 22 se observan los cromatogramas registrados bajo las condiciones indicadas en la tabla 11.

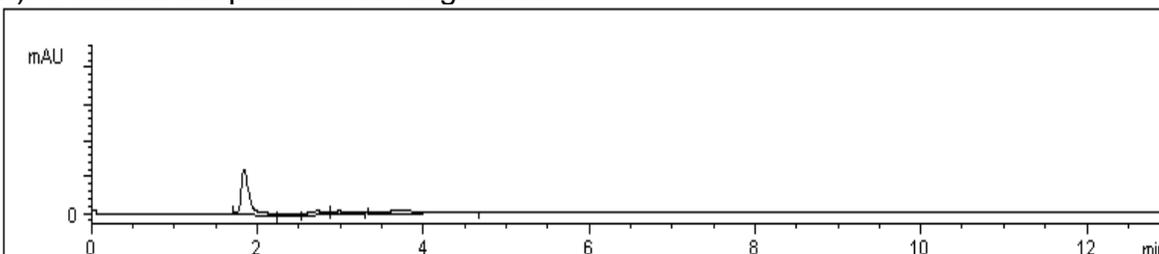
La identificación de tres de los analitos se observa en el cromatograma del polímero de almidón (fig. 22d.), a los tiempos de retención de $2,3 \pm 0,006$, $4,6 \pm 0,01$ y $10,6 \pm 0,02$ min, correspondientes a los ácidos acético, propiónico y butírico respectivamente; el ácido láctico no se identificó en ninguna de las muestras de biodegradación y se observa un pico de una sustancia desconocida. En los demás cromatogramas no aparecen picos a los tiempos de retención con los que se identificaron los analitos.

Figura 22. Cromatogramas de las soluciones de biodegradación de los polímeros estudiados a los 28 días de incubación. Picos: HAc: Acético, HPr: Propiónico, HBut: Butírico, D: Desconocido

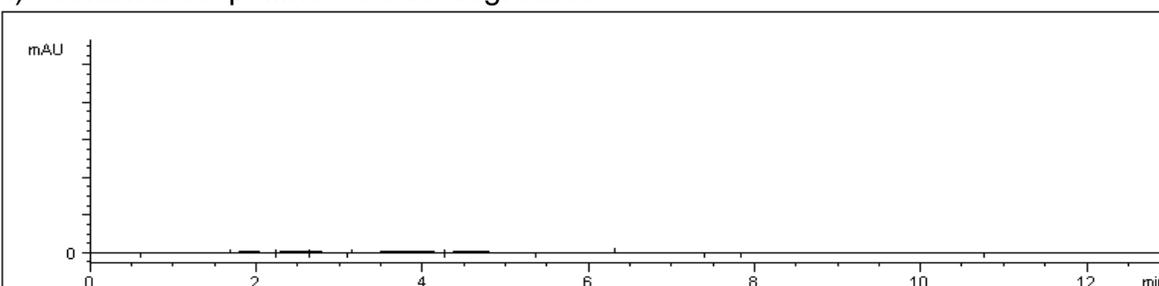
a) Solución blanco



b) Solución del polímero biodegradable



c) Solución del polímero no biodegradable



d) Solución del polímero de almidón

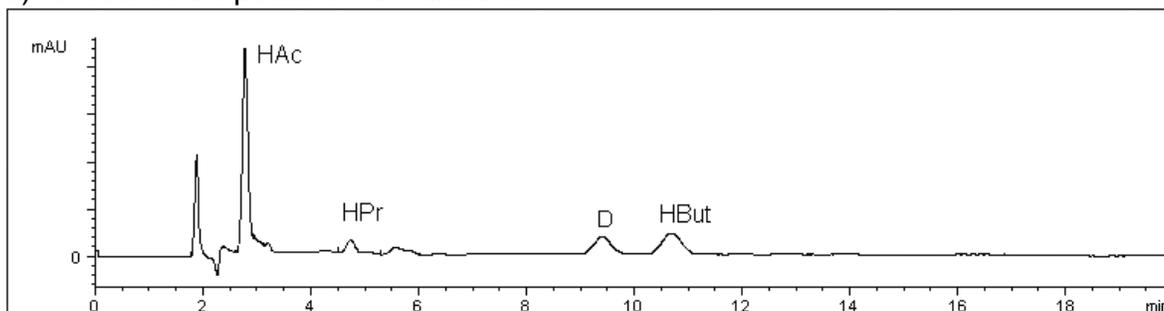


Tabla 21. Concentraciones de los ácidos acético y butírico de la simulación de biodegradación del polímero de almidón a los 14, 28 y 42 días de incubación

Tiempo de biodegradación (días)	mg Acético/g (polímero almidón) $\pm s^*$	mg Butírico/g (polímero almidón) $\pm s^*$
14	1,51 \pm 0,15	1,26 \pm 0,17
28	11,74 \pm 0,47	2,87 \pm 0,23
42	1,64 \pm 0,19	1,86 \pm 0,10

*s: Desviación estándar

En la tabla 21 se observa que en la solución del polímero de almidón, se cuantificaron los ácidos acético y butírico. El ácido propiónico solo se detectó, ya que su área no alcanzó a ser cuantificada. Para una estimación de su concentración, se realizó el dopaje con una cantidad de estándar (11 ppm) conocida, puesto que no se solucionó con disminuir el factor de dilución. El área reportada se extrapoló a la ecuación de la curva de ácido propiónico y por diferencia, se logró su cuantificación; los resultados pueden verse en la tabla 22.

Tabla 22. Cuantificación del ácido propiónico de la muestra de biodegradación del polímero de almidón por dopaje de la muestra con estándar (11 ppm), a los 14, 28 y 42 días de biodegradación

mg Propiónico/g (polímero almidón) $\pm s^*$	
14 días	0,23 \pm 0,02
28 días	0,37 \pm 0,07
42 días	< LC*

*<LC: Menor al límite de cuantificación, Esto indica que la sustancia no alcanzó a cuantificarse con exactitud, por lo que su área no sobrepasó el límite de cuantificación, *s: Desviación estándar.

El análisis de los otros procesos de biodegradación, permitieron establecer que no hay formación de ácidos orgánicos, puesto que su composición no facilita la degradación vía anaerobia. Lo anterior indica que el material no biodegradable cumplió como control negativo a la prueba, ya que su estructura molecular representada de forma mayoritaria por polietileno (PE), no presentó afinidad con los procesos bioquímicos desarrollados en estas condiciones [ASTM D 55-26, 2000; Villada, H., et al., 2007]. De manera similar, el polímero oxo-biodegradable principalmente constituido por la mezcla de polímeros sintéticos y prooxidantes (como por ejemplo polietileno y metil-cetonas [Chiellini, E. et al., 2007]), utilizado como control de las condiciones anaerobias, confirmó que estas se cumplieron, ya que no afectaron su estructura molecular y no se transformó en otras sustancias [ASTM D 55-26, Chandra, R. y Rutsgi, R., 1998]; esto permite concluir que estos materiales no fueron biodegradados bajo las condiciones establecidas por el experimento, cumpliendo con el objetivo propuesto.

Por otra parte, la concentración reportada de los ácidos acético, propiónico y butírico a los 28 días de biodegradación (tablas 20 y 21), es mayor que en los otros ensayos (incubaciones de 14 y 42 días), señalando que las concentraciones de ácidos aumentaron entre los días 14 y 28, y disminuyeron entre los días 28 y 42, ya que el proceso de fermentación ha culminado [Demiate, I. et al., 1999]; Su concentración probablemente disminuyó por volatilización de las sustancias o por degradación de las mismas hasta una mineralización completa, dando residuos como CO₂ y CH₄ [Chandra, R. y Rutsgi, R. 1998; Lucas, N. et al., 2008].

Aunque es posible que la producción de ácido láctico se presentara, no se detectó debido a que la población de bacterias generadoras, se incrementan durante los primeros cinco días del proceso de fermentación [Mestres, C. et al., 1997] y su producción continúa hasta el día 20; al final del proceso, generalmente a los 30 días, la cantidad de bacterias y de ácido láctico es relativamente baja [Demiate, I. et al., 1999]. La producción de ácido láctico también se ve afectada por la temperatura de incubación; a los 20°C, se da como componente mayoritario y a los 35°C prima la producción de ácido butírico [Demiate, I. et al., 1999]. En la metodología, se utilizó una temperatura de 35°C y un inóculo extraído de un suelo inundado bajo condiciones anaerobias; es posible que la sustancia se haya metabolizado por el basto numero de microorganismos que se generan en inóculos como estos [Lucas N. et al., 2008].

Con el método, fue posible la determinación de tres de los cuatro analitos estudiados en una matriz acuosa. Las concentraciones que fueron estimadas por la metodología empleada en las muestras de biodegradación del polímero de almidón demuestran que con el método se puede identificar y cuantificar los ácidos orgánicos de manera confiable, ya que se encuentran dentro de los límites estadísticos.

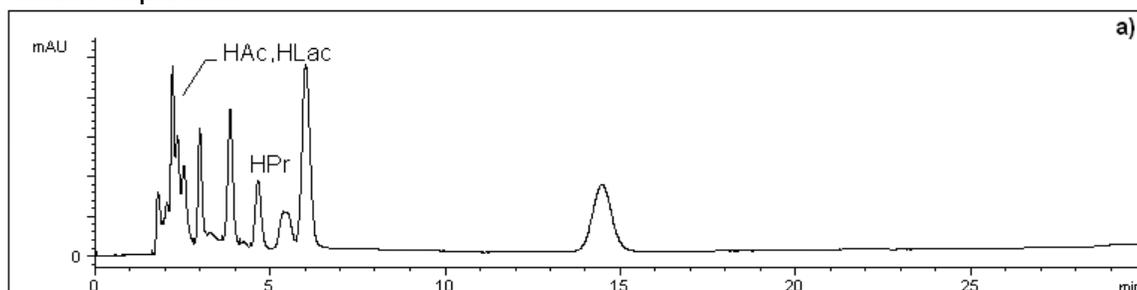
3.4 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS EN PROCESOS DE ELABORACIÓN DE ENSILAJES

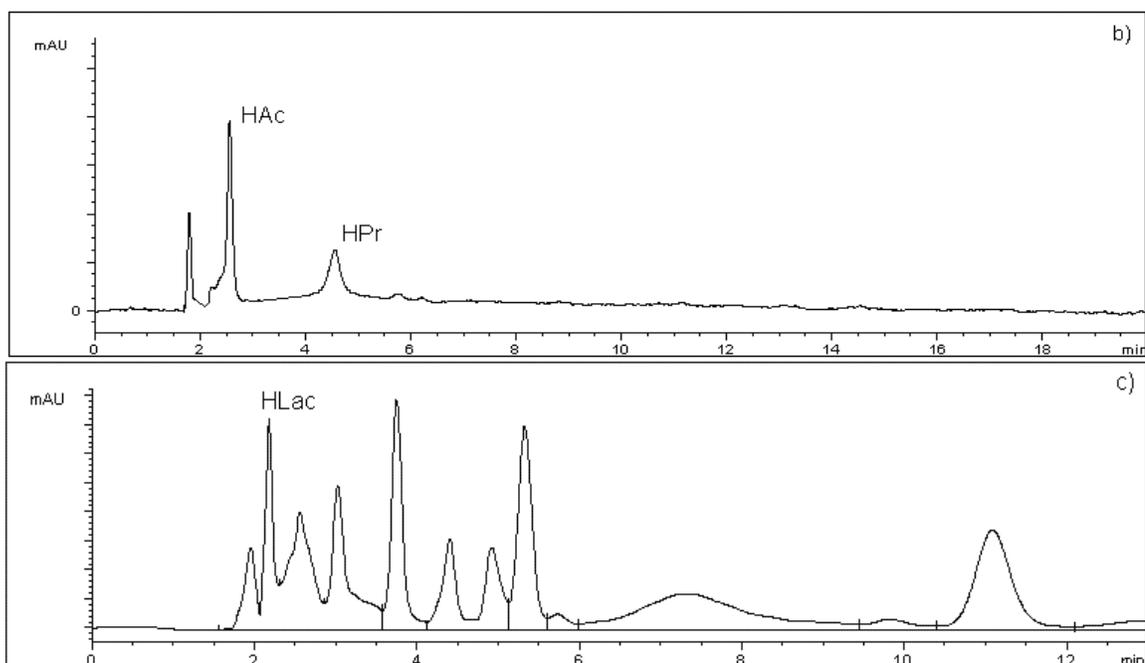
Con el fin de explorar otras aplicaciones del método estandarizado, se cuantificaron los ácidos orgánicos producidos en la elaboración de ensilajes provenientes de residuos de pescado. El ensilaje se obtiene por la fermentación de los carbohidratos solubles por medio de bacterias que producen ácidos orgánicos (como láctico) en condiciones anaeróbicas. Este proceso permite almacenar alimento y su objetivo es lograr la conservación de su valor nutritivo durante la preservación [Garcés, A. et al., 2000; Copes, J. et al., 2006]. Con la determinación de los ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico y butírico) se pretende estudiar el avance de la fermentación durante el proceso de formación del ensilaje para diferentes muestras constituidas por residuos y vísceras de pescado.

Debido a la complejidad de la matriz, otros analitos (interferencias) podrían estar presentes y teniendo en cuenta que los ácidos orgánicos estudiados son volátiles, se optó por utilizar arrastre de vapor (ver proceso de extracción en el apartado 2.3.3.4, Pág. 53). Estos son extraídos de otras matrices por este método que aprovechan sus características de volatilidad, un ejemplo de ello son los análisis en vinos [Kordis-krapes M. et al., 2001].

La extracción de los analitos a partir de las muestras de ensilaje, se llevó a cabo por la destilación de las muestras en un tiempo de 45 min, en el arrastre con vapor, como lo indica la metodología (apartado 2.5, Pág. 55). Se estudiaron los días de fermentación 0, 6, 12 y 18, de los procesos de elaboración de ensilaje (ver tabla 7, Pág. 48). Con el método de arrastre con vapor, se observó limpieza de las interferencias en las muestras, como lo muestra la figura 23 (muestra constituida por vísceras de pescado fermentados con yogurt).

Figura 23. Cromatogramas de la muestra de vísceras fermentadas con yogurt a) antes del arrastre, b) después del arrastre de vapor (*solución destilada*) y c) solución nativa después del arrastre (*solución no destilada*), para una mejor cuantificación de las sustancias. Picos: HAc: Ácido acético, HLac: láctico HPr: Ácido Propiónico





En la figura 23, se registran los cromatogramas que resultaron de la extracción de los ácidos orgánicos por arrastre de vapor. La figura 23a representa la muestra nativa, es decir, sin el proceso de extracción. En esta se observan diversos picos desconocidos que pertenecen a sustancias interferentes que solapan algunos analitos (láctico y acético). La figura 23b representa el extracto que resultó del arrastre por vapor (*o solución destilada*); donde se observa una limpieza de la matriz, necesaria para mejorar la cuantificación de las sustancias que fueron identificadas como ácido acético y propiónico. En la figura 23c se observa la solución nativa después del proceso de extracción, es decir la *solución no destilada*, en donde se logró la identificación del pico de ácido láctico.

Los picos identificados en el extracto presentan tiempos de retención de $2,3 \pm 0,01$ y $4,6 \pm 0,03$ min, los cuales corresponden a los estándares de ácido acético y propiónico respectivamente. Para la determinación de ácido láctico, la solución nativa fue dopada después del arrastre (*solución no destilada*) con un estándar de 11 ppm de ácido láctico (ver sección 2.5), para identificarlo por diferencia de áreas y tiempo de retención (fig. 23c).

La recuperación de los ácidos orgánicos por arrastre de vapor, permitió la cuantificación de ácido acético y propiónico con exactitud y precisión, (tabla 20, Pág. 72), en las muestras de ensilaje. El ácido láctico se cuantificó directamente de la solución nativa resultante después del proceso de extracción por medio de extrapolación a la curva. En la tabla 23 se muestran las concentraciones promedio encontradas para estas sustancias.

Tabla 23. Concentraciones de ácidos orgánicos encontradas por el CLAR en las muestras de ensilaje constituidas por vísceras y residuos de pescado, a partir de tratamientos con yogurt y *plantarum sp.*

Muestras	Día	mg acético/g ensilaje ± s*	mg propiónico/g ensilaje ± s	mg láctico/g ensilaje ± s
Vísceras tratadas con Yogurt	0	< LC *	5,45 ± 0,30	< LC*
	6	0,97 ± 0,12	3,89 ± 0,70	< LC
	12	1,41 ± 0,24	2,03 ± 0,17	0,06 ± 0,02
	18	0,90 ± 0,18	0,80 ± 0,18	0,56 ± 0,15
Vísceras tratadas con alga (<i>plantarium sp</i>)	0	< LC	6,12 ± 0,30	< LC
	6	0,47 ± 0,13	1,47 ± 0,13	0,31 ± 0,13
	12	0,70 ± 0,18	0,74 ± 0,13	3,63 ± 0,24
	18	0,48 ± 0,17	0,52 ± 0,17	3,96 ± 0,15
Residuos tratadas con Yogurt	0	< LC	0,10 ± 0,13	5,17 ± 0,30
	6	< LC	0,48 ± 0,15	4,55 ± 0,13
	12	0,19 ± 0,13	0,51 ± 0,24	4,23 ± 0,17
	18	0,22 ± 0,02	0,28 ± 0,13	3,12 ± 0,24
Residuos tratadas con alga (<i>plantarium sp</i>)	0	< LC	< LC	5,63 ± 0,17
	6	0,43 ± 0,18	0,27 ± 0,18	4,23 ± 0,13
	12	< LC	< LC	5,26 ± 0,30
	18	0,50 ± 0,02	< LC	4,54 ± 0,02

*s: desviación estándar, *<LC: Menor al límite de cuantificación (LC: 0,003; 0,04 y 0,002 mg/g para láctico, acético y propiónico respectivamente)

Las muestras de ensilaje formadas a partir de residuos y vísceras de pescado, con tratamiento de yogurt y alga *plantarium sp.*, arrojaron los datos de la tabla 23. Si se comparan los productos de fermentación de las muestras de vísceras (con los tratamientos de yogurt y alga), se observa que la concentración de ácido acético alcanzó un valor mayor en el día 12, seguido por una disminución hasta el día 18; el ácido propiónico, disminuyó su concentración a lo largo del proceso de fermentación, en los dos tratamientos. Estos fenómenos podrían explicarse por volatilización o mineralización de los compuestos, tal y como lo exponen ciertos estudios de biodegradación [Chandra, R. y Rutsji, R., 1998; Lucas, N. et al., 2008].

El ácido láctico se cuantificó a partir de estas muestras en los días 6 y 12, esto es debido a que probablemente la activación de las bacterias que lo generan se da por esta etapa del proceso, tal como lo explican Copes, et al., en 2006 en el estudio de ensilajes de pescado para productores pequeños, en donde se hace un conteo de ciertos microorganismos, encontrando que tienen un asenso desde el día 15, un máximo de crecimiento por el día 20, y empiezan su disminución hasta

los días 30 y 35 del proceso. Este comportamiento, podría explicar que el ácido láctico aumente por estos días hasta el día 18 en el proceso de fermentación.

En las muestras de fermentación de residuos de pescado (con tratamientos de yogurt y alga), se observa que los ácidos cuantificados (tabla 23) tienen un comportamiento variable en la concentración durante el proceso de fermentación, esto podría explicarse a una falta de homogenización en la molienda de los residuos (principalmente constituidos por tejidos óseos, escamas, etc.), ya que esta es una de las etapas mas importantes en la elaboración de un ensilaje [Copes, J. et al., 2006].

La ausencia de ácido butírico probablemente indica que el proceso de fermentación se dio en temperaturas menores al los 30°C como lo reportan también Demiate, I. et al., en 1999, ya que estos procesos normalmente se hacen a temperatura ambiente y no alcanzan una temperatura óptima para la producción de esta sustancia, pues como se observó en las muestras de biodegradación (apartado 3.3.1) el ácido butírico prima en temperaturas alrededor de los 35°C [Demiate, I. et al., 1999].

Con el estudio de estas muestras, se logró implementar un método de recuperación de los ácidos acético, propiónico y butírico exacto con una precisión aceptable (tabla 20, Pág. 72), que permite considerar su aplicación en matrices diferentes, siempre y cuando se consideren como acuosas y no volátiles, ya que podrían generarse interferencias en el proceso de extracción.

4. CONCLUSIONES

Se estandarizó el método para determinar y cuantificar los ácidos orgánicos láctico, acético, propiónico y butírico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en procesos de biodegradación y formación de ensilajes, evaluando la longitud de onda de mayor sensibilidad (210 nm), la fase móvil más eficiente (H_3PO_4 a pH 3,5 – MeOH (99:1)) y el flujo óptimo (0,85 mL/min), en una columna μ -Bondapak C_{18} (3,9x150 mmx10 μm).

El soporte estadístico para el método, refleja linealidad, presentando coeficientes de regresión cercanos a 1, precisión con coeficientes de variación por debajo del 5%, exactitud representada con errores sistemáticos pequeños por debajo del 5% y porcentajes de recuperación mayores al 93% (que no difieren significativamente del 100% de recuperación); además de una buena sensibilidad basada en límites de detección alrededor de 1 ppm para los cuatro ácidos orgánicos. Logrando implementar un método que esta dentro del margen estadístico

La aplicación del método en la solución resultante de la simulación de la biodegradación, permitió cuantificar los ácidos orgánicos acético, propiónico y butírico demostrando la aparición de 11,74, 0,37 y 2,87 mg ácido/g de polímero respectivamente, en el día 28 de la biodegradación de un material polimérico a base de almidón.

La técnica estandarizada permitió seguir el proceso de biodegradación de un material polimérico a base de almidón a lo largo de 42 días, concluyendo que el polímero estudiado tendría un buen acople con el ambiente. Además de ello, el método se controló con los demás ensayos de biodegradación. El blanco, el polímero no biodegradable, ni el material oxo-biodegradable (catalogados como controles negativos) presentaron formación de ácidos orgánicos. Con esto se da a entender que la formación de los ácidos orgánicos se debió a la biodegradación del material a base de almidón.

Las condiciones anaerobias planteadas, fueron estudiadas mediante el ensayo con el polímero oxo-biodegradable. Los resultados indican que probablemente, hubo ausencia de oxígeno, pues según reportes literarios [Chiellini, E. et al., 2007] este material lo requiere (entre otros factores) para lograr su oxo-biodegradación.

La cuantificación de los ácidos láctico, acético y propiónico en las muestras de ensilaje, demuestra que la determinación de ácidos orgánicos podría estudiar

procesos de fermentación o descomposición de sustancias que involucren este tipo de compuestos, dependiendo de la composición de la matriz (que sea acuosa y no volátil).

Adicionalmente con estos resultados se elaboró una norma de determinación de ácidos orgánicos por CLAR para los grupos de investigación en Química de Productos Naturales y en Biotecnología, Calidad Medioambiental y Seguridad Agroalimentaria (ver anexo B).

BIBLIOGRAFÍA

- 1) **AL-LAHHAM, S.; PEPPELENBOSCH, Maikel; ROELOFSEN, Han; VONK, Roel J. and VENEMA, Koen.** Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. En: *Biochimica et Biophysica Acta*. Julio 2010, vol. 1801, p. 1175-1183.
- 2) **ALTAF Md.; REDDY, Gopal;. NAVEENA, B.J; VENKATESHWAR, M.; VIJAY KUMAR, E.** Amyolytic bacterial lactic acid fermentation. En: *Biotechnology Advances*. 2008 , Vol. 26, p. 22–34
- 3) **ARAÚJO, M; CUNHA, A. y MOTA M.** Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in protheses: identification of the degradation products in solution. En: *Biomaterials*. 2004, Vol. 25, p. 2687–2693
- 4) **AVANCINI S.; FACCIN, G.L; VIEIRA, M.A.;; ROVARIS, A. A; PODESTÁ, R.; TRAMONTE, R.; DE SOUZA, N.M.A.; AMANTE, E.R.** Cassava starch fermentation wastewater: Characterization and preliminary toxicological studies. En: *Food and Chemical Toxicology*. 2007. Vol. 45, p. 2273–2278.
- 5) **American Society for Testing and Materials**, ASTM D 55-26. Determining anaerobic biodegradation of plastic materials under accelerated landfill conditions; 2002.
- 6) **BIDARTL, M.; DOREE Ph. y LESGARDS G.** Determination of Urinary Organic Acids by HPLC. En: *Chromatographia*. 1993, vol. 36, p. 53-56.
- 7) **CHANDRA, R. y RUTSGI, Renu.** Biodegradable polymers. En: *Prog. Polym. Sci.* 1998, vol. 23, p. 1273–1335.
- 8) **CHANTRAGAN Srisomsap; WASANT, P; SVASTI, J.; CHOKCHAICHAMNANKIT, D. and LIAMMONGKOLKUL S.** Plasma amino acid and urine organic acid analyses of methylmalonic acidemia in thai infant. En: *Southeast Asian J. Trop. Pub. Health*. 1999, vol. 30, no.2, p. 140-142
- 9) **CHRISTODOULATOS, Christos; BHAUMIK, Syamalendu and BRODMAN, Bruce.** Anaerobic biodegradation of nitroglycerin. En: *Wat. Res.* 1997 vol. 31, no. 6, p 1462-1470.
- 10) **COPES, J.; PELLICER, K.; DEL HOYO, G. y GARCIA, N.** Producción de ensilado de pescado en baja escala para uso de emprendimientos artesanales. En: *Analecta Veterinaria*. 2006; vol. 26 No.1, p. 5-8
- 11) **DEMIATE, I.; BARANA, A.C.; CEREDA, M.P.; WOSIACKI, G.** Organic acid profile of comercial sour cassava strach. En: *Ciencia e tecnología de alimentos*. Enero-abril 1999, vol. 19, no. 1, p. 1-8. ISSN 0101-2061.

- 12) **EWASCHUK J.; NAYLOR, J. M.; BARABASH, W. A.; ZELLO, G. A.** High-performance liquid chromatographic assay of lactic, pyruvic and acetic acids and lactic acid stereoisomers in calf feces, rumen fluid and urine. En: Journal of Chromatography B. Abril 2004, vol. 805, p. 347–351.
- 13) **FEI, Liu y He, Yong.** Application of successive projections algorithm for variable selection to determine organic acids of plum vinegar. En: Food chemistry. Enero 2009, vol.115, No. 4, p. 1430-1436.
- 14) **GARCÉS, A. et al.** Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. En: Lasallista de investigación 2000, vol. 1. No. 1, p.66 – 71.
- 15) **GARCIA M.** Manual de prácticas de química orgánica I. Unidad Iztapalpa Printed México 2002. p. 111.
- 16) **GIL PILONIETA A.; CARDONA, M.; RAMIREZ, M. y GAÑAN, P.** Estudio del comportamiento mecánico de plásticos para amarre en plantaciones bananeras colombianas sometidos a biodegradación. En: Congreso Iberoamericano de Metalurgia y Materiales, Habana, Cuba, Octubre 8 de 2006
- 17) **GIUNCHEDI P.; CONTI, B.; SCALIA, S. y CONTE, U.** In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. En: Journal of Controlled Release. Abril 1998, vol. 56, p. 53–62.
- 18) **GONZÁLEZ GUISANDE Cástor, BARREIRO, A.; MANEIRO, I.; RIVEIRO, I.; VERGARA, A. y VAAMONDE, A.** Tratamiento de Datos, Ediciones Díaz de Santos 2006 impreso en España, p. 15-29, 97-147.
- 19) **HARRIS, DANIEL C.** Quantitative Chemical Analys W.H. 6ed. Freeman And Company 2003, p. 1-100
- 20) **KARADENIZ F.** Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. En: Turk J Agric For. 2004, vol. 28, p. 267-271.
- 21) **KISTER, G.; Cassanas, G.; Bergounhon, M.; Hoarau, D. y Vert, M.** Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of D, L-lactide-co-caprolactone by Raman spectroscopy. En: Polymer 2000, vol. 41, p. 925–932.
- 22) **KOLYBABA, M.; TABIL, L.G.; PANIGRAHI, S.; CRERAR, W. J.; POWEL, T.; WANGM B.** Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future. En: ASAE Meeting Presentation. October 2003. Paper Number: RRV03-0007
- 23) **KORDIS-KRAPES, M.; ABRAM, V.; KAC, M. y FERJANCIC, S.** Organic Acids in White Wines. En: Food technol. biotechnol. 2001, vol. 39 no.2, p. 93–99.

- 24) KOTANI, A.; MYAGUCHI, Y. y KUSU, F.** Determination of organic acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. En: *Analytical sciences*. 2001, vol. 17 p. 141-143.
- 25) LEHNINGER A. L.** Principles of Biochemistry. W.H. 5 ed. Freeman 2008 p. 607
- 26) LUCAS, N.; Bienaime, C.; Belloy, C.; Queneudec, M.; Silvestre, F. y Nava, J.** Polymer biodegradation: Mechanism and estimation. En: *Chemosphere*. Agosto 2008, vol. 73 p. 429-442.
- 27) LLORENTE M.; VILLARROYA, B. y GOMEZ-CORDOVES, C.** Reverse-phase HPLC of organic acids in musts. En: *Chromatographia*. Diciembre 1991, vol. 32, No. 11/12, p. 555-558.
- 28) MARCONI, O.; FLORIDI, S. y MONTANARI, L.** Organic acid profile in tomato juice by HPLC with UV detection. En: *Journal of food quality*. 2007, vol. 30, no. 2 p. 253-266.
- 29) McMASTER Marvin C.** HPLC: a practical user's guide. 2 ed. wiley-interscience a john wiley & sons, inc., publication 2007 Hoboken, New Jersey, p. 56, 90, 160, 209.
- 30) MASSARDIER-NAGEOTTE, V; PESTRE, C.; CRUARD-PRADET, T. y BAYARD, R.** Aerobic and anaerobic biodegradability of polymer films and physico-chemical characterization. En: *Polymer Degradation and Stability*. 2006, vol. 91, p. 620 – 627.
- 31) MESTRES, C. y ROUAU, X..** Influence of natural fermentation and drying condition on the physicochemical characteristics of cassava starch. En: *J. Sci. Food Agric.*1997, vol. 74 p.147-155.
- 32) MILLER, James N. y MILLER, Jane C.** Estadística y quimiometría para química analítica.4 ed. Pearson Educacion, S. A. 2000, versión en español: impreso en España por Lavel, S. A. p. 43-65, 111-151.
- 33) MCMURRY, John.** Química orgánica. 5 ed Thomson international 2000.p.1264-1280.
- 34) OWENS, J. and CHYNOWETH, D.** Biochemical methane potential of municipal solid waste (MSW) components. En: *Wat. Sci. Tech.*1993. vol. 27, p. 1-14.
- 35) PEMRAJ, R. and MUKESH, D.** Biodegradation of polymers. En: *Indian journal of biotechnology*. April 2005. vol. 4, p. 186-193
- 36) PROIKAKIS, C.; MAMOUELOS, J.; TARANTILI, P. y ANDREOPOULOS, A.** Swelling and hydrolytic degradation of poly(D, L-lactic acid) in aqueous solution. En: *Polym.Degrad. Stab.* 2006, vol. 91, no. 3, p. 614–619.

- 37) **QUATTROCCHI, Oscar Alberto; ABELARIA DE ANDRIZZI, Sara Inés y LABA, Raúl Felipe.** Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Artes Graficas Farro SA, California 2750/52, 1992 (1289) Buenos Aires, p. 3-381
- 38) **SÁNCHEZ-MACHADO, Dalia Isabel; LÓPEZ-CERVANTES, Jaime and MARTÍNEZ-CRUZ, Oliviert.** Quantification of Organic Acids by HPLC. En: Food Technol. Biotechnol. 2008, vol.46 no. 4 p. 456–460.
- 39) **SCHNEIDER, A.; GERBI, V. and REDOGLIA, M.** A rapid HPLC method for separation and determination of major organic acids in grape musts and wines. En: J. Enol. Vitic.1987 vol. 38 no.2 p. 151-155.
- 40) **SKOOG DOUGLAS, A.; HOLLER, James F. y NIEMAN, Timothy A.** Principios de análisis instrumental. 5 ed Mc Graw Hill 2001, p. 786-829
- 41) **SWADESH J.** HPLC Practical and Industrial Applications.2 ed. CRC Press 2001, p. 233-236, 292-293.
- 42) **VON BURKERSRODA, F.; SCHEDL, L.; GÖPFERICH, A.** Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. En: Biomaterials. Abril 2002, vol. 23, p. 4221–4231.
- 43) **VILLADA, H.; ACOSTA, H. y VELASCO, R.** Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. En: temas agrarios. 2007, vol. 12, no.2, p. 5 – 13.

ANEXOS

ANEXO A. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Media Aritmética (\bar{x})

Es una medida de posición central que se conoce simplemente como media o promedio, se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

donde x son cada una de los valores i de la variable y n el numero de datos [González, G. et al., 2006].

Desviación Estándar (S) y Varianza (S²)

Son formas de medida de la dispersión de una serie de datos, las cuales comparan a cada uno de ellos con la media de la serie, están definidas por las siguientes ecuaciones:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

donde x son cada una de los valores i de la variable, n el numero de datos y \bar{x} la media de la serie. Generalmente para tener las medidas de las dispersiones en las mismas unidades que la media se suele utilizar la desviación estándar (s), ya que la varianza se usa para evitar valores negativos [González, G. et al., 2006].

Coefficiente de Variación (CV)

Es una medida de dispersión que relaciona la desviación estándar con la media de una serie de datos, calculando el porcentaje que representa la dispersión respecto a la posición. Viene dado por la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \%$$

donde \bar{x} y s son la media y la desviación estándar de la serie de datos, respectivamente.

CONTRASTE DE SHAPIRO WILK

Es la prueba más recomendable para testar la normalidad de una muestra, sobre todo si se trabaja con un número pequeño de datos ($n < 30$). El estadístico de contraste se expresa por medio de la siguiente ecuación:

$$W = \frac{1}{\sum_{j=1}^n (x_j - \mu)^2} \left[\sum_{j=1}^h a_{j,n} (x_{j(n-j+1)} - x_j) \right]^2$$

donde n es el número de datos, X_j es el dato en orden ascendente de muestra que ocupa el lugar j , μ es la media, h es $n/2$ si n es par o $(n-1)/2$ si n es impar y $a_{j,n}$ es un valor tabulado. La hipótesis nula se acepta cuando W calculado es mayor a W tabulado.

ANEXO B. PROTOCOLO: DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS (VFA`s) POR CLAR

OBJETO

Esta norma tiene por objeto establecer los pasos a seguir para la determinación de los ácidos orgánicos acético, láctico, propiónico y butírico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

ALCANCE

Esta norma aplica para muestras originadas en procesos de fermentación anaerobia, en los cuales haya producción de uno o varios de los ácidos orgánicos ya mencionados.

CONTENIDO

Materiales y equipos

- Balones Volumétricos de 10, 100 y 1000mL
- Equipo de filtración al vacío (Erlenmeyer y embudo bunchen)
- Espátula
- Frasco lavador
- Micropipeta
- Montaje arrastre de vapor (Balón de tres bocas, condensador y manguera (ver referencia 3))
- Papel filtro (Watman No 1 y de poro 0.45µm)
- Pipeta graduada de 10 mL
- Tubo para centrifuga
- Vaso de precipitados de 100 mL
- Vidrio reloj

- Balanza analítica (0,0001g precisión)
- Bomba para vacío
- Centrifuga
- Conductímetro
- Cromatógrafo líquido
- Equipo de destilación tipo BUCHI
- Deionizador
- pH-metro

Procedimiento

Acondicionamiento para el cromatógrafo

Tratamiento del agua: Tomar agua destilada y pasarla por un deionizador, de tal forma que su conductividad final sea de 0.4µS. Posteriormente filtrar al vacío por papel de 0.45 µm de tamaño de poro.

Preparación de la fase móvil: Preparar a partir de ácido fosfórico una dilución en agua deionizada con 0.4µS de conductividad, de tal forma que el pH sea 3.5. Para ello, tomar 21,5µL de ácido fosfórico 85% y aforar con agua deionizada a 1L (1000mL). Filtrar la solución resultante por papel de 0.45 µm.

Preparación del metanol: Filtrar el metanol grado CLAR por papel de 0.45 µm.

Condiciones cromatográficas: acondicionar el cromatógrafo bajo los parámetros indicados en la tabla a continuación:

Condiciones para la determinación de ácidos orgánicos

Parámetro	Condición
Fase móvil	H ₃ PO ₄ a pH 3.5 – MeOH (99:1)
Columna	µ-Bondapak C18 3.9x150 mmx10 mµ
Flujo	0.85 mL/min
Detección	UV a 210nm

Preparación para muestra sólida

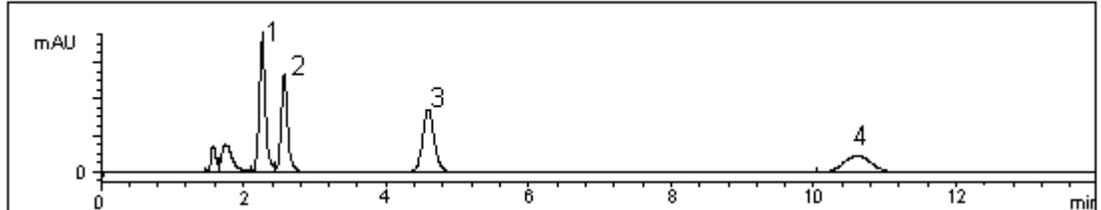
- Pesar 1.0000 g de muestra y adicionarlos en un balón volumétrico de 10 mL, aforar con agua destilada.
- Pasar con cuidado de no desperdiciar, a un tubo para centrifuga limpio y seco, tapar y agitar.
- Centrifugar por 20 min a 5000 rpm, filtrar al vacío el sobrenadante por papel filtro watman N° 1.
- Tomar una alícuota del filtrado de 5 mL, adicionarla en un balón de tres bocas y ponerlo en un montaje de destilación por arrastre de vapor (ver montaje en referencia 3). Se deja destilar por 45 minutos, el destilado se recoge en un balón de 100 mL, se afora y posteriormente se filtra por papel filtro de 0.45 µm.
- La solución anterior se inyecta al cromatógrafo líquido para análisis de los ácidos acético, propiónico y butírico.
- Tomar la parte que queda en el balón de tres bocas, y aforarla con agua destilada a 100 mL, filtrar por poro de 0.45 µm e inyectar al cromatógrafo para el análisis del ácido láctico.

Preparación para muestra líquida

- Centrifugar la muestra como se indicó en el paso 4.3.2.3, si esta trae partículas suspendidas o presenta alta turbiedad.
- Filtrar por papel watman N° 1 y luego por papel filtro de 0.45 µm, de tal forma que quede una solución translúcida libre de turbiedad.
- Diluir si es necesario e inyectar al cromatógrafo líquido. Si la dilución es necesaria, es indispensable volver a filtrar por poro de 0.45 µm antes de la inyección.

Registro de datos

A continuación se muestra el cromatograma obtenido bajo las condiciones de la tabla del apartado anterior, para patrones de alta pureza de los ácidos orgánicos. Cromatograma de los patrones de ácidos orgánicos 1) láctico, 2) acético, 3) propiónico y 4) butírico



- Tomar apunte de las áreas integradas en el cromatógrafo de los picos de acuerdo a los tiempos de retención mostrados en la siguiente tabla. (Tener en cuenta que las áreas correspondientes a las muestras deben ser mayores a los límites que se muestran en la misma).

Tiempos de retención y áreas detectables y cuantificables para los ácidos orgánicos

Patrón	Tiempo (min)	Área de pico Detectable	Área de pico Cuantificable
Ácido láctico	2,3	5.8	8.6
Ácido acético	2,6	6.6	8.2
Ácido propiónico	4,6	3.3	5.2
Ácido butírico	10,5	0.8	2.6

Cálculos

Los cálculos para la cuantificación de los ácidos orgánicos se realizan por la sustitución de las áreas de los picos de las muestras en las siguientes ecuaciones.

Cálculos para porcentaje de ácido acético

$$\% \text{ ácido acético en la muestra} = \frac{\left[\frac{A - 4,972}{1,015} \right] \times 0,1}{\text{Peso de la muestra} \times V}$$

Donde:

V = volumen en mL de la alícuota que se toma para el arrastre de vapor.

A = Área resultante para el pico de ácido acético.

Cálculos para porcentaje de ácido butírico

$$\% \text{ ácido butírico en la muestra} = \frac{\left[\frac{B+0,104}{0,826} \right] \times 0,1}{\text{Peso de la muestra} \times V}$$

Donde:

V = volumen en mL de la alícuota que se toma para el arrastre de vapor.

B = Área resultante para el pico de ácido butírico.

Cálculos para porcentaje de ácido propiónico

$$\% \text{ ácido propiónico en la muestra} = \frac{\left[\frac{P-2,545}{0,837} \right] \times 0,1}{\text{Peso de la muestra} \times V}$$

Donde:

V = volumen en mL de la alícuota que se toma para el arrastre de vapor.

P = Área resultante para el pico de ácido propiónico

Cálculos para porcentaje de ácido láctico

$$\% \text{ ácido láctico en la muestra} = \frac{\left[\frac{L-4,343}{1,230} \right] \times 0,1}{\text{Peso de la muestra} \times V}$$

Donde:

V = volumen en mL de la alícuota que se toma para el arrastre de vapor.

L = Área resultante para el pico de ácido láctico.

ANEXO C. CALIBRADO DEL MATERIAL

A continuación se muestran las medidas que se tuvieron en cuenta para estimar los errores sistemáticos del material de laboratorio con el que se trabajó durante la preparación de las soluciones, mediante el cálculo de los parámetros estadísticos pertinentes.

Calibración para balones aforados de 10, 25 y 50 mL

BALON 50mL \pm 0,05 A	x	s	CV	MAS A	DENSIDAD 23°C	V real (mL)
VACIO	$\frac{39,5}{39,5}$	$\frac{39,5}{39,5}$	$\frac{39,5}{39,5}$	39,5	0,00E+00	0,00E+00
LLENO	$\frac{89,4}{89,4}$	$\frac{89,4}{89,4}$	$\frac{89,4}{89,4}$	89,4	1,56E-14	1,74E-14
				49,9	0,9998	49,935

BALON 10 mL \pm 0,06	x	s	CV	MASA	DENSIDAD 23°C	V real (mL)
VACIO	$\frac{16,7}{16,7}$	$\frac{16,7}{16,7}$	$\frac{16,7}{16,7}$	16,7	1,05E-03	6,27E-03
LLENO	$\frac{26,7}{26,7}$	$\frac{26,7}{26,7}$	$\frac{26,7}{26,7}$	26,7	7,53E-04	2,82E-03
				10,0	0,9998	10,002

BALON 25mL + 0,06 B	x	s	CV	MASA	DENSIDAD 23°C	V real (mL)
VACIO	$\frac{23,5}{23,5}$	$\frac{23,5}{23,5}$	$\frac{23,5}{23,5}$	23,5	5,16E-04	2,20E-03
LLENO	$\frac{48,5}{48,5}$	$\frac{48,5}{48,5}$	$\frac{48,5}{48,5}$	48,5	8,37E-04	1,73E-03
				25,0	0,9998	25,000

Calibración para las micropipetas utilizadas. Volúmenes máximos de 10, 250 y 1000 μ L

μ -PIPETA 1000 μ L	x	s	CV	DENSIDAD 23°C	VOLUMEN REAL (μ L)
$\frac{0,99}{0,99}$	0,99	4,10E-03	0,41	0,9998	991,53
$\frac{0,98}{0,99}$					
$\frac{0,99}{0,99}$					
$\frac{0,99}{0,99}$					

0,99	1,00	1,00						
1,00	0,99	0,99						
μ -PIPETA 250 μ L	x	s	CV	DENSIDAD 23°C	VOLUMEN REAL (μ L)			
0,25	0,25	0,26						
0,25	0,23	0,25						
0,23	0,26	0,24	0,25	1,33E-02	5,31	0,9998	250,05	
0,25	0,26	0,25						
0,25	0,28	0,27						
0,24	0,23	0,25						
μ -PIPETA 10 μ L	x	s	CV	DENSIDAD 23°C	VOLUMEN REAL (μ L)			
0,0090	0,0098	0,0097						
0,0100	0,0097	0,0098						
0,0096	0,0110	0,0099	0,010	8,78E-04	8,77	0,9998	10,01	
0,0098	0,0096	0,0099						
0,0099	0,0096	0,0099						
0,0100	0,0098	0,0132						

ANEXO D. CONTRASTES ESTADÍSTICOS

Diferencia significativa entre media experimental y valor conocido

Para decidir si la diferencia entre \bar{x} y μ (media y valor conocido, respectivamente), es significativa, es decir para contrastar H_0 : la media de la población = μ , se calcula el estadístico t :

$$t = (\bar{x} - \mu) \sqrt{n} / s$$

Si $|t|$ calculada es mayor que la t tabulada entonces se rechaza H_0 .

Correlación significativa

Para comprobar si una correlación es significativa, es decir, H_0 = correlación cero, se calcula:

$$t = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Si el valor de t calculado es mayor que el tabulado, entonces se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que si hay correlación significativa.

A continuación se muestran las t calculadas para las curvas de calibración, indicando que en todas hay una correlación significativa.

t calculadas para las correlaciones de las curvas de calibración de los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico

Ácido	r^2	$ r $	$n-2$	$1-r^2$	$\sqrt{n-2}$	$\sqrt{1-r^2}$	t cal	t tab P 0,05
Láctico	0,996	0,998	3,00	0,004	1,73	0,06	27,33	3,18
Acético	0,994	0,997	3,00	0,006	1,73	0,08	22,29	3,18
Propiónico	0,998	0,999	3,00	0,002	1,73	0,04	38,69	3,18
Butírico	0,999	0,999	3,00	0,001	1,73	0,03	54,74	3,18

Comparación de dos medias experimentales

Para decidir si la diferencia de dos medias experimentales muestrales \bar{x}_1 y \bar{x}_2 es significativa, es decir, contrastar H_0 : $\mu_1 = \mu_2$, se calcula:

$$t \hat{=} \frac{(\bar{x}_2 - \bar{x}_1)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde S se calcula a partir de

$$S^2 = \frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{(n_1+n_2-2)}$$

y t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

Si el valor de t calculado es mayor que el tabulado, entonces se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que si hay diferencia significativa.

Límites de detección y cuantificación según el estadístico $S_{y/x}$

Para estimar los errores aleatorios en la dirección del eje y , se calcula

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Donde \hat{y}_i son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores individuales de x .

Para estimar los límites de detección y cuantificación puede utilizarse el estadístico $s_{y/x}$, usándolo como la desviación estándar del blanco y el valor de la ordenada de origen (a) como sustitución de la señal del blanco, para calcular las áreas límites de detección y cuantificación, es decir:

$$\text{AREA LD} = a + 3 s_{y/x}$$

$$\text{AREA LC} = a + 6 s_{y/x}$$

Donde a es la ordenada de origen dada por la regresión de la curva.

El área que resulta de las ecuaciones anteriores, se sustituye en las ecuaciones de las curvas de regresión lineal para poder calcular la concentración límite de detección y cuantificación, respectivamente.

ANEXO E: DATOS Y RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

Diferencias significativas entre medias de los procesos de reproducibilidad y precisión intermedia

A continuación se muestran varias áreas de los picos de los ácidos escogidas de forma aleatoria y se comparan para ver si existen diferencias significativas, obteniendo que en todas, la hipótesis nula se acepta, evidenciando que no hay diferencias significativas entre las medias experimentales.

Prueba de las diferencias significativas entre medias de la reproducibilidad y precisión intermedia del método.

sustancia	X ₁	X ₂	s ₁	s ₂	n ₁	n ₂	1/n ₁	1/n ₂	s ²	s	t _{calc}	t ₈ (tab) p=0,01
L	16,46	16,16	0,60	0,33	5,00	5,00	0,20	0,20	0,24	0,48	0,97	3,36
A	16,43	16,18	0,67	0,42	5,00	5,00	0,20	0,20	0,31	0,56	0,69	3,36
P	11,70	11,60	0,32	0,21	5,00	5,00	0,20	0,20	0,07	0,27	0,59	3,36
B	8,74	8,72	0,30	0,18	5,00	5,00	0,20	0,20	0,06	0,24	0,13	3,36

Se acepta en todas, no hay diferencia significativa

Diferencias significativas entre los pH de la biodegradación

De manera similar se realizó el estudio estadístico para las diferencias significativas entre los pH's obtenidos en la biodegradación.

Prueba de las diferencias significativas entre los pH promedio de las muestras de biodegradación

Sustancia	pH ini	pH final	s inic	s final	s cuadrado	s	t Calc.
BL 14	7,03	7,04	0,01	0,01	3,33E-05	0,01	2,12
BL 28	7,06	7,02	0,05	0,01	1,45E-03	0,04	1,29
BL 42	7,04	7,02	0,05	0,01	1,42E-03	0,04	0,76
AL 14	7,08	6,26	0,02	0,04	9,50E-04	0,03	32,58
AL 28	7,07	6,16	0,01	0,03	3,33E-04	0,02	61,04
AL 42	7,05	6,08	0,04	0,01	8,67E-04	0,03	40,22
B 14	7,05	7,05	0,04	0,01	1,02E-03	0,03	0,13
B 28	7,03	7,02	0,01	0,01	1,00E-04	0,01	1,22
B 42	7,02	7,02	0,02	0,01	1,67E-04	0,01	0,32
NB 14	7,05	7,03	0,04	0,01	9,67E-04	0,03	0,92
NB 28	7,02	7,03	0,01	0,01	1,17E-04	0,01	1,51
NB 42	7,03	7,03	0,01	0,03	3,33E-04	0,02	0,45

* t₄ para p = 0,05: 2,78, ** BL: Blanco, B: polímero biodegradable NB: polímero no biodegradable, AL: polímero de almidón (el numero indica los días de incubación)

Como se observa en la tabla, el único ensayo que rechaza la hipótesis nula es el de los almidones (AL 14, 28 Y 42), mostrando que hay diferencia significativa. Para los demás ensayos, la hipótesis se acepta, lo que explica que no hubo cambio en el pH de forma significativa.

PRUEBA F DE DOS COLAS PARA SIGNIFICANCIA DE LA PRECISIÓN

Concentración 11ppm					
	S ² p	S ² r	F	F(10,1)	Interpretación
Láctico	0,61	0,58	1,05	968,60	N. D. S.
Acético	0,52	0,37	1,42	968,60	N. D. S.
Protónico	0,28	0,10	2,70	968,60	N. D. S.
Butírico	0,04	0,02	2,28	968,60	N. D. S.

Concentración 19ppm					
	S ² p	S ² r	F	F(9,1)	Interpretación
Láctico	1,78	0,58	3,08	963,30	N. D. S.
Acético	1,02	0,05	20,15	963,30	N. D. S.
Protónico	0,66	0,35	1,91	963,30	N. D. S.
				F(2,8)	
Butírico	0,04	0,12	2,65	6,06	N. D. S.

N. D. S. : No Difiere Significativamente

D. S. : Difiere Significativamente

S²p: varianza precisión intermedia

S²r: varianza reproducibilidad

DATOS COMPLEMENTARIOS PARA LA PRECISIÓN DEL MÉTODO

Datos reportados para la **repetibilidad** del método

NIVEL	Ácido Láctico						x	s	CV
3,0	8,7	8,7	8,8	8,6	8,3	8,6	0,2	2,2	
7,0	12,8	12,9	13,0	13,1	12,7	12,9	0,2	1,2	
11,0	17,4	17,8	16,6	17,7	17,6	17,4	0,5	2,8	
15,0	22,9	21,9	22,7	23,0	22,8	22,7	0,4	1,9	
19,0	27,7	27,2	26,9	26,8	26,8	27,1	0,4	1,4	
25,0	36,0	35,9	36,1	35,8	35,4	35,8	0,3	0,8	

Nivel	Ácido acético						x	s	CV
4,0	9,4	9,3	9,2	8,9	9,2	9,2	0,2	2,0	
7,0	12,3	12,5	12,1	12,0	11,8	12,1	0,3	2,2	
11,0	16,1	17,2	15,8	15,9	16,7	16,3	0,6	3,6	
15,0	19,9	19,4	19,2	21,1	20,7	20,1	0,8	4,1	
19,0	23,4	24,1	23,7	22,5	22,5	23,2	0,7	3,1	
25,0	32,0	30,1	30,0	31,9	31,6	31,1	1,0	3,2	

Nivel	Ácido Propiónico						x	s	CV
3,0	5,1	5,2	5,3	5,1	5,2	5,2	0,1	1,6	
7,0	8,3	8,0	8,4	8,1	8,6	8,3	0,2	2,9	
11,0	12,2	11,5	11,6	12,0	11,7	11,8	0,3	2,5	
15,0	15,2	16,3	14,9	15,1	14,9	15,3	0,6	3,8	
19,0	18,2	18,5	17,7	18,0	17,7	18,0	0,3	1,9	
25,0	23,7	24,5	23,5	23,4	23,5	23,7	0,4	1,9	

Nivel	Ácido butírico						x	s	CV
3,0	2,7	2,5	2,5	2,7	2,7	2,6	0,1	4,2	
7,0	5,8	5,7	5,7	5,7	5,6	5,7	0,1	1,2	
11,0	8,8	9,0	8,3	8,8	8,8	8,7	0,3	3,0	
15,0	12,5	11,4	12,3	12,3	11,9	12,1	0,4	3,6	
19,0	15,6	15,6	15,3	15,4	15,9	15,6	0,2	1,5	
25,0	20,5	21,2	21,4	20,5	20,3	20,8	0,5	2,3	

x: media, **s**: desviación estándar, **%CV**: porcentaje del coeficiente de variación;

Datos reportados para **la precisión intermedia** del método

a) Estándar de 11ppm

Día	Réplicas de áreas para ácido láctico					x	s	CV
1	17,30	16,10	16,00	16,00	16,90	16,46	0,60	3,66
2	17,40	17,80	16,60	17,70	17,60	17,42	0,48	2,77
3	16,62	15,80	16,30	16,20	15,90	16,16	0,33	2,03
4	17,50	17,40	17,60	17,30	17,50	17,46	0,11	0,65
5	17,50	17,50	16,80	17,70	17,40	17,38	0,34	1,97
6	17,30	17,80	17,60	17,40	17,70	17,56	0,21	1,18
7	15,50	15,20	15,40	15,40	15,30	15,36	0,11	0,74
8	15,80	15,90	15,60	15,60	15,60	15,70	0,14	0,90
9	16,90	17,00	17,20	16,60	16,80	16,90	0,22	1,32
10	15,70	16,10	16,00	15,30	16,30	15,88	0,39	2,46

Día	Réplicas de áreas para ácido acético					x	s	CV
1	15,7	16	15,7	16,5	15,4	15,9	0,42	2,62
2	16,1	17,2	15,8	15,9	16,7	16,3	0,59	3,64
3	15,9	16,5	16,1	17,1	15,3	16,2	0,67	4,16
4	15,7	15,8	15,8	16,3	15,2	15,8	0,39	2,48
5	15,8	16,1	16	16,4	15,6	16	0,3	1,9
6	16,7	16,1	16,4	16,1	16,7	16,4	0,3	1,83
7	15,9	16	15,6	16,5	16,2	16	0,34	2,1
8	16,3	16,5	16,3	16,3	16,6	16,4	0,15	0,91
9	16	16	16,1	15,7	15,3	15,8	0,33	2,07
10	13,6	14,1	14,1	13,2	14,1	13,8	0,41	2,96

Día	Réplicas de áreas para ácido propiónico					x	s	CV
1	11,2	11,5	12,4	11,7	11,7	11,7	0,44	3,77
2	12,2	11,5	11,6	12	11,7	11,8	0,29	2,47
3	11,9	11,1	11,8	11,5	11,7	11,6	0,32	2,73
4	11,9	11,3	11,8	12,5	12,7	12	0,56	4,68
5	11,7	11,5	11,8	11,5	11,3	11,6	0,19	1,69
6	11,7	11,4	11,6	11,5	11,1	11,5	0,23	2,01
7	11,4	11,8	11,7	12	12,3	11,8	0,34	2,84
8	10,5	10	10,3	10,5	10,3	10,3	0,2	1,99
9	11,6	10,7	11,7	11,6	11,8	11,5	0,44	3,87
10	11,3	10,9	10,7	11,2	10,6	10,9	0,3	2,79

Día	Réplicas de áreas para ácido butírico					x	s	CV
1	8,3	8,7	9,1	8,9	8,7	8,74	0,3	3,39
2	8,8	9,1	8,3	8,8	8,8	8,74	0,26	2,98
3	8,6	9,2	8,8	8,5	8,91	8,76	0,21	2,39
4	8,4	8,8	8,9	9,2	9,5	8,96	0,42	4,64
5	8,3	9,1	9,4	9,1	8,7	8,92	0,43	4,78
6	9,6	9,2	9,1	9,4	9,3	9,24	0,26	2,82
7	9,1	9,5	8,9	9,0	9,1	9,1	0,23	2,58
8	8,5	9,1	8,7	8,7	8,7	8,72	0,18	2,05
9	9	9,2	8,8	8,6	8,9	8,9	0,22	2,51
10	8,9	8,8	8,7	8,2	8,8	8,64	0,36	4,22

b) Estándar de 19 ppm

Día	Réplicas de áreas para ácido láctico					x	s	CV
1	27,7	27,2	26,9	26,8	26,8	27,1	0,38	1,42
2	28,7	29,9	29,5	29,8	29,9	29,6	0,51	1,72
3	29,9	30,7	30,9	30,0	32,0	30,7	0,85	2,75
4	28,2	28,8	26,9	29,9	29,4	28,6	1,16	4,06
5	27,4	28,4	26,8	27,9	26,9	27,5	0,68	2,46
6	26,9	28,2	28,2	26,9	27,6	27,6	0,65	2,36
7	25,8	27,5	26,7	27,5	27,5	27	0,75	2,8
8	25,6	27,2	27,5	27,5	27,6	27,1	0,84	3,1
9	27,1	27,5	27,6	27,5	27,3	27,4	0,2	0,73
10	27,7	27,2	26,9	26,8	26,8	27,1	0,38	1,42

Día	Réplicas de áreas para ácido acético					x	s	CV
1	23,4	24,1	23,7	22,5	22,5	23,2	0,72	3,1
2	24,2	24,8	24,7	24,8	22,7	24,2	0,9	3,7
3	24,0	27	26	26,9	26	26	1,2	4,64
4	23,3	23,5	22,6	23,4	23,8	23,3	0,44	1,9
5	23,6	23,9	23,5	24,1	24,8	24	0,52	2,15
6	24,1	25,1	25,2	24,5	24,7	24,7	0,45	1,82
7	23,5	24,3	24,1	24,8	24,2	24,2	0,47	1,93
8	23,6	24,1	24,7	24,5	24,8	24,3	0,49	2,03
9	22,1	22,3	22,5	22,5	21,7	22,2	0,33	1,51
10	23,1	23,7	23,3	23,4	23,4	23,4	0,22	0,93

Día	Réplicas de áreas para ácido propiónico					x	s	CV
1	18,2	18,5	17,7	18	17,7	18	0,34	1,9
2	19,6	19,1	19,3	19,3	20,6	19,6	0,6	3,05
3	17,9	17,8	17,2	17,8	17,6	17,7	0,28	1,58
4	17,4	18	19,3	18,2	17,3	18	0,8	4,44
5	18,2	18,6	17,9	18,2	18,7	18,3	0,33	1,79
6	17,5	17,1	17,1	17,7	17,3	17,3	0,26	1,5
7	17,5	17,6	17,8	17,2	17,2	17,5	0,26	1,49
8	16,5	16,3	16,6	16,5	16,5	16,5	0,11	0,66
9	17,7	17,7	18,9	17,7	17,4	17,9	0,58	3,27
10	18,3	18	18,6	19,1	19,1	18,6	0,49	2,61

Día	Réplicas de áreas para ácido butírico					x	s	CV
1	15,6	15,6	15,3	15,4	15,9	15,6	0,23	1,48
2	15,6	16,1	15,7	16	15,7	15,8	0,22	1,37
3	16,1	15,6	16	15,5	16,5	15,9	0,4	2,53
4	15,5	16,3	15,4	16,3	15,5	15,8	0,46	2,9
5	15,5	15,8	15,9	15,6	15,4	15,6	0,21	1,33
6	15,1	15,6	16	14,9	15,9	15,5	0,48	3,13
7	14,8	15,8	15,1	15,5	15,3	15,3	0,38	2,49
8	14,6	15,5	15,3	15,6	15,5	15,3	0,41	2,65
9	15,5	15,6	15,8	15,6	15,7	15,6	0,11	0,73
10	15,8	15,7	15,2	15,8	15,7	15,7	0,25	1,58

PRUEBAS DE NORMALIDAD PARA LOS DATOS DE LA PRECISIÓN POR EL PAQUETE ESTADISTICO SPSS.

Significancia de la normalidad para ácido acético.

Acético	11 ppm				19 ppm			
	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk		Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.
DIA								
1	0,25	0,20	0,93	0,62	0,25	0,20	0,88	0,33
2	0,26	0,20	0,89	0,38	0,30	0,17	0,74	0,02
3	0,15	0,20	1,00	0,99	0,31	0,14	0,84	0,17
4	0,26	0,20	0,93	0,61	0,28	0,20	0,91	0,46
5	0,15	0,20	0,99	0,99	0,21	0,20	0,91	0,46
6	0,24	0,20	0,82	0,12	0,20	0,20	0,95	0,73
7	0,15	0,20	1,00	0,99	0,23	0,20	0,96	0,80

8	0,23	0,20	0,94	0,69	0,23	0,20	0,91	0,59
9	0,31	0,13	0,85	0,20	0,20	0,20	0,88	0,31
10	0,35	0,04	0,77	0,05	0,24	0,20	0,90	0,42

Prueba de homogeneidad de la varianza para ácido acético

Basándose en la media

11 ppm		19 ppm	
Estadístico de Levene	Sig.	Estadístico de Levene	Sig.
0,96	0,49	1,21	1,21

Significancia de la normalidad para ácido butírico

BUTIRICO	11 ppm				19 ppm			
	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk		Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
DIA	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.
1	0,25	0,20	0,96	0,78	0,23	0,20	0,94	0,69
2	0,39	0,01	0,80	0,07	0,31	0,13	0,87	0,27
3	0,18	0,20	0,95	0,72	0,20	0,20	0,95	0,71
4	0,16	0,20	0,99	0,98	0,34	0,05	0,75	0,06
5	0,14	0,20	0,99	0,97	0,18	0,20	0,95	0,75
6	0,22	0,20	0,90	0,42	0,20	0,20	0,91	0,46
7	0,30	0,16	0,81	0,10	0,11	0,20	1,00	1,00
8	0,34	0,05	0,86	0,24	0,30	0,16	0,77	0,05
9	0,13	0,20	1,00	1,00	0,24	0,20	0,96	0,81
10	0,37	0,06	0,73	0,06	0,33	0,08	0,78	0,07

Prueba de homogeneidad de la varianza para ácido acético

Basándose en la media

11 ppm		19 ppm	
Estadístico de Levene	Sig.	Estadístico de Levene	Sig.
1,61	0,14	2,06	0,06

Significancia de la normalidad para ácido láctico

LÁCTICO	11 ppm				19 ppm			
	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk		Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
DIA	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.
1	0,32	0,09	0,81	0,09	0,28	0,20	0,82	0,12
2	0,28	0,20	0,82	0,11	0,28	0,20	0,77	0,05
3	0,19	0,20	0,96	0,79	0,21	0,20	0,91	0,47

4	0,24	0,20	0,96	0,81	0,15	0,20	0,96	0,83
5	0,32	0,10	0,83	0,13	0,20	0,20	0,93	0,61
6	0,18	0,20	0,95	0,75	0,24	0,20	0,82	0,12
7	0,24	0,20	0,96	0,81	0,35	0,05	0,77	0,06
8	0,36	0,03	0,77	0,06	0,36	0,04	0,69	0,05
9	0,13	0,20	1,00	1,00	0,29	0,19	0,91	0,44
10	0,22	0,20	0,95	0,76	0,20	0,20	0,92	0,50

Prueba de homogeneidad de la varianza para ácido láctico

Basándose en la media			
11 ppm		19 ppm	
Estadístico de Levene	Sig.	Estadístico de Levene	Sig.
3,64	0,06	1,56	0,16

Significancia de la normalidad para ácido propiónico

Propiónico	11 ppm				19 ppm			
	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk		Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
DIA	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.
1	0,30	0,16	0,92	0,51	0,23	0,20	0,91	0,46
2	0,23	0,20	0,93	0,58	0,29	0,20	0,80	0,08
3	0,22	0,20	0,91	0,48	0,29	0,19	0,85	0,18
4	0,20	0,20	0,95	0,74	0,22	0,20	0,90	0,42
5	0,22	0,20	0,95	0,76	0,24	0,20	0,92	0,54
6	0,20	0,20	0,94	0,69	0,22	0,20	0,90	0,42
7	0,15	0,20	0,99	0,99	0,24	0,20	0,90	0,42
8	0,26	0,20	0,86	0,24	0,37	0,09	0,83	0,14
9	0,41	0,06	0,72	0,07	0,42	0,08	0,73	0,06
10	0,20	0,20	0,92	0,55	0,18	0,20	0,94	0,64

Prueba de homogeneidad de la varianza para ácido propiónico

Basándose en la media			
11 ppm		19 ppm	
Estadístico de Levene	Sig.	Estadístico de Levene	Sig.
1,02	0,44	1,49	0,19

Las tablas anteriores muestran que la significancias de los estadísticos respectivos son mayores a 0,05 (es decir tienen una $P > 0,05$), indicando la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas.

Exactitud del arrastre de vapor

ACETICO			PROPIONICO			BUTIRICO		
[exp	[teorica	%R	[exp	[teorica	%R	[exp	[teorica	%R
4,86	5,18	93,66	8,95	9,27	96,56	10,82	11,22	96,40
4,89	5,18	94,30	8,23	9,27	88,82	11,30	11,22	100,72
4,46	5,18	86,06	8,91	9,27	96,13	11,30	11,22	100,72

ÁCIDO	R promedio	s	%CV	t calc	t2 al 95%	Decisión
A	91,34	4,58	5,02	3,27	4,30	NDS
P	93,84	4,35	4,63	2,45	4,30	NDS
B	99,28	2,49	2,51	0,50	4,30	NDS

NDS: No difiere Significativamente del 100%

Diferencias significativas entre los tiempos de extracción por arrastre de vapor

Diferencias entre los 30, 45 y 60 min de extracción por arrastre de vapor

ÁCIDO	Entre los 30 y 45 min			Entre los 45 y 60 min		
	X ₃₀	X ₄₅	t calc	X ₆₀	X ₄₅	t calc
Acético	3,50	4,73	8,29	4,90	4,73	1,12
	4,04	4,59	3,16	4,83	4,59	1,30
	3,88	4,37	2,90	4,62	4,37	1,47
Propiónico	6,33	8,72	10,31	8,97	8,72	1,08
	7,48	8,63	5,83	8,72	8,63	0,26
	7,45	8,60	8,91	8,83	8,60	1,61
Butírico	8,50	11,14	15,52	11,03	11,14	0,65
	9,90	11,30	6,48	11,38	11,30	0,43
	9,85	11,10	6,53	11,22	11,10	0,80

t 4 para una probabilidad del 0,05% es de 2,134.

MUESTRAS DE ENSILAJE CUANTIFICADAS POR EL METODO

En la siguiente tabla se reportan los datos de las muestras de ensilajes de pescado, mostrando los gramos de ácidos orgánicos encontrados por cada 100 gramos de muestra, en las diferentes etapas del proceso de fermentación (0, 6, 12, 18 días).

MUESTRA	DÍA	ACETICO	PROPIONICO	LACTICO
Vísceras fermentadas con Yogurt	0	>0.019	0.55	>0.015
	6	0.10	0.39	0.01
	12	0.14	0.20	0.16
	18	0.09	0.08	0.33
Vísceras fermentadas con alga	0	>0.019	0.61	>0.015
	6	0.05	0.15	0.31
	12	0.07	0.07	0.36
	18	0.05	0.05	0.40
Residuos fermentados con Yogurt	0	>0.019	0.01	0.49
	6	0.00	0.05	0.45
	12	0.02	0.05	0.43
	18	0.02	0.03	0.45
Residuos fermentados con alga	0	>0.019	>0.01	0.50
	6	0.04	0.03	0.43
	12	>0.019	>0.01	0.50
	18	0.05	>0.01	0.45

ANEXO F. PARAMETROS CROMATOGRAFICOS

Factor de capacidad

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

Donde:

t_R es el tiempo de retención

t_m es el tiempo muerto.

Factor de separación

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Donde k'_2 y k'_1 son los factores de capacidad de los picos 2 y 1 respectivamente.

Resolución (Rs)

$$Rs = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

Donde t : tiempos de retención de los picos 1 y 2, y W : anchos de los picos 1 y 2

A continuación se muestran los resultados de los parámetros cromatográficos calculados con las condiciones mostradas en la tabla 11, en la sección de discusión y resultados

Parámetros cromatográficos calculados bajo las condiciones implementadas (tabla 11)

Ácido	tr (min)	V línea (cm/min)	tm (min)	k	α L	α A	α P	α B
L	2,30	6,52	1,80	0,28	1,00	1,60	5,60	17,80
A	2,60	5,77	1,80	0,44	1,60	1,00	3,50	11,13
P	4,60	3,26	1,80	1,56	5,60	3,50	1,00	3,18
B	10,70	1,40	1,80	4,94	17,80	11,13	3,18	1,00

Resolución

Ácido	tr	w	Rs L	Rs A	Rs P	Rs B
L	2,30	0,12	0,00	2,50	15,33	37,33
A	2,60	0,12	2,50	0,00	13,33	36,00
P	4,60	0,18	15,33	13,33	0,00	23,92
B	10,70	0,33	37,33	36,00	23,92	0,00