

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE
MIGRACIÓN ESPECÍFICA DE CAPSAICINA Y COLORANTE EN UN EMPAQUE
BIODEGRADABLE ACTIVO UTILIZANDO TÉCNICAS ANALÍTICAS COMO
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) Y
ULTRAVIOLETA VISIBLE.**

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Químico**

**ANA MARÍA PERDOMO CALAMBÁS
VICTORIA EUGENIA PIZO PERAFAN**

**DIRECTOR
Fernando José Hernández Blanco. M.Sc.
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS BIOACTIVOS**

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

Nota de Aceptación

Director

Fernando José Hernández Blanco

M.Sc.

Jurado

Jurado

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	págs.
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ANEXOS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GENERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	19
3.1. EMPAQUE	19
3.1.1. Clasificación de los empaques	19
3.2. COMPONENTES POLIMÉRICOS DEL EMPAQUE	22
3.2.1. Ácido poliláctico	22
3.3. ADITIVOS DEL EMPAQUE	23
3.3.1. Masterbatches colorantes o pigmentos	23
3.4. EMPAQUES ACTIVOS	24
3.4.1. Composición del material del empaque activo	24
3.4.1.1. Capsaicina	24
3.5. FUNDAMENTOS Y MECANISMOS DE LA MIGRACIÓN	26
3.5.1. Migración	26
3.5.2. Migración química y los principales factores que la controlan	27
3.5.2.1. La base mecánica de la migración	28
3.6. REGULACIÓN DE MIGRACIÓN QUÍMICA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS	29
3.6.1. Regulación en Estados Unidos EE.UU.	29
3.6.1.1. FFDCA	29
3.6.1.2. Información química	30
3.6.2. Regulación en la Unión Europea EU	32
3.6.2.1. La legislación comunitaria	32
3.6.2.2. Reglamento marco	32
3.6.2.3. Verificación de los límites de migración	33
3.6.2.4. Empaques activos e inteligentes	34
3.7. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS MIGRANTES	34
3.7.1. Preparación de la Muestra	35

3.7.2.	Métodos Cromatográficos	35
3.8.	PARÁMETROS DE CALIDAD PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS	35
3.8.1.	Precisión	36
3.8.1.1.	Repetibilidad	36
3.8.1.2.	Precisión intermedia	36
3.8.2.	Evaluación de la linealidad	36
3.8.3.	Límite de detección y cuantificación	36
3.9.	EVALUACIÓN PRÁCTICA DE LA MIGRACIÓN	37
4.	METODOLOGÍA	39
4.1.	REACTIVOS, EQUIPOS Y SOLVENTES	39
4.2.	DISEÑO DE EXPERIMENTOS	40
4.2.1.	Obtención de películas poliméricas	41
4.2.2.	Acondicionamiento del material polimérico	42
4.3.	ENSAYO DE MIGRACIÓN ESPECÍFICA	43
4.3.1.	Determinación de parámetros antes del ensayo	43
4.3.2.	Montaje para el método de inmersión total	44
4.3.3.	Rotulado de las muestras	4
4.4.	IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR CLAR PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPSAICINA	45
4.4.1.	Pruebas preliminares a la estandarización del método	46
4.4.1.1.	Optimización del modo de elución y la fase móvil	46
4.4.1.2.	Optimización de la eficiencia de la columna	46
4.4.2.	Preparación de soluciones estándar y estándares de calibración	46
4.4.3.	Parámetros de calidad para la estandarización de la técnica analítica	47
4.4.3.1.	Método de cuantificación	47
4.4.3.2.	Evaluación de la linealidad	47
4.4.3.3.	Límite de detección y cuantificación	47
4.4.3.4.	Precisión	48
4.5.	IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR UV PARA LA DETERMINACIÓN DE COLORANTE	48
4.5.1.	Selección de la longitud de onda por UV	48
4.5.2.	Preparación de soluciones estándar y estándares de calibración	48
4.5.3.	Parámetros de calidad para la estandarización de la técnica analítica	49
4.5.3.1.	Método de cuantificación	49
4.5.3.2.	Evaluación de la linealidad	49
4.5.3.3.	Límite de detección y cuantificación	49
4.5.3.4.	Precisión	49
4.6.	DETERMINACIÓN DE MIGRACIÓN GLOBAL PARA COLORANTE POR GRAVIMETRÍA	50
4.7.	ESTUDIO DE MIGRACIÓN ESPECÍFICA DE CAPSAICINA Y COLORANTE	50

4.7.1.	Análisis de blancos	51
4.7.2.	Cuantificación de capsaicina por CLAR	51
4.7.2.1.	Diseño experimental de la optimización del procedimiento	52
4.7.3.	Cuantificación de colorante por UV	52
4.7.3.1.	Diseño de experimentos y manejo estadístico de los datos	52
5.	DATOS Y RESULTADOS	54
5.1.	IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR CLAR PARA DETERMINACIÓN DE CAPSAICINA	54
5.1.1.	Pruebas preliminares a la estandarización del método	54
5.1.1.1.	Optimización del modo de elución y la fase móvil	54
5.1.1.2.	Optimización de la eficiencia de la columna	57
5.1.2.	Preparación de soluciones estándar y estándares de calibración	58
5.1.3.	Parámetros de calidad para la estandarización de la técnica analítica	59
5.1.3.1.	Método de cuantificación	59
5.1.3.2.	Evaluación de la linealidad	59
5.1.3.3.	Límite de detección y cuantificación	61
5.1.3.4.	Precisión	62
5.2.	IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR UV PARA LA DETERMINACIÓN DE COLORANTE	64
5.2.1.	Selección de la longitud de onda por UV	65
5.2.2.	Parámetros de calidad para la estandarización de la técnica analítica	65
5.2.2.1.	Método de cuantificación	65
5.2.2.2.	Evaluación de la linealidad	65
5.2.2.3.	Límite de detección y cuantificación	68
5.2.2.4.	Precisión	69
5.3.	DETERMINACIÓN DE MIGRACIÓN GLOBAL PARA COLORANTE POR GRAVIMETRÍA	71
5.4.	ESTUDIO DE MIGRACIÓN ESPECÍFICA DE CAPSAICINA Y COLORANTE	72
5.4.1.	Análisis de blancos	73
5.4.2.	Cuantificación de capsaicina por CLAR	77
5.4.2.1.	Diseño experimental de la optimización del procedimiento	79
5.4.3.	Cuantificación de colorante por UV	80
5.4.3.1.	Diseño de experimentos y manejo estadístico de los datos	81
6.	CONCLUSIONES	86
7.	BIBLIOGRAFÍA	87
	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	págs.
Tabla 1. Polímeros sintéticos y sus diferentes usos	21
Tabla 2. Clasificación de los tipos de alimentos y simulantes de alimentos recomendados	31
Tabla 3. Condiciones temporales de la temperatura de uso	31
Tabla 4. Datos de los factores escogidos para el diseño de experimentos	41
Tabla 5. Parámetros medidos en la materia prima	43
Tabla 6. Parámetros establecidos para el inicio del ensayo de migración específica	43
Tabla 7. Diseño experimental evaluado para el estudio de migración específica de capsaicina	52
Tabla 8. Diseño experimental evaluado para el estudio de migración específica de colorante	53
Tabla 9. Parámetros curva de Van Deemter	57
Tabla 10. Velocidad lineal y altura de plato teórico	58
Tabla 11. Curva de calibración para capsaicina	59
Tabla 12. Pruebas estadísticas para la linealidad de capsaicina	60
Tabla 13. Límites de confianza para el intercepto y la pendiente	61
Tabla 14. Parámetros para determinar LD y LC (capsaicina)	61
Tabla 15. LD y LC para capsaicina	62
Tabla 16. Estadístico de Shapiro-Wilk para repetibilidad y precisión intermedia (capsaicina)	62
Tabla 17. Prueba t student para repetibilidad y precisión intermedia	64
Tabla 18. Condiciones cromatográficas para la determinación de capsaicina	64
Tabla 19. Curva de calibración para colorante	66
Tabla 20. Pruebas estadísticas para la linealidad de colorante	67
Tabla 21. Límites de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen	68
Tabla 22. Parámetros para determinar LD y LC (colorante)	68
Tabla 23. LD y LC para colorante	68
Tabla 24. Estadístico de Shapiro-Wilk para repetibilidad y precisión intermedia (colorante)	69
Tabla 25. Prueba t student para repetibilidad y precisión intermedia	71

Tabla 26.	Condiciones espectrométricas para la determinación de colorante	71
Tabla 27.	Porcentaje de migración global en PLA	71
Tabla 28.	Porcentaje de migración global en PB	72
Tabla 29.	Señal del cloroformo	76
Tabla 30.	Señales del blanco de Sim "A"	76
Tabla 31.	Señales de blanco de matriz de Sim "A"	76
Tabla 32.	Porcentaje de recuperación para la extracción líquido-líquido de capsaicina en las muestras dopadas	79
Tabla 33.	Resultados de la migración del colorante en PLA con el Sim "A".	80
Tabla 34.	Resultados de la migración del colorante en PLA con el Sim "B".	80
Tabla 35.	Factores y dominio experimental	81
Tabla 36.	ANOVA para Sim "A"	81

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS

		págs.
Figura 1.	Clasificación de los empaques	19
Figura 2.	Estructura química del ácido poliláctico	22
Figura 3.	Estructuras químicas de los capsaicinoides	25
Figura 4.	Interacciones del empaque con su contenido	27
Figura 5.	Equipo de extrusión por tornillo simple, Laboratorio de Reología – Facultad de Ciencias Agropecuarias	42
Figura 6.	Diferentes cortes de polímero en forma de pelet y película	42
Figura 7.	Montaje para el método de inmersión total	44
Figura 8.	Rotulo de los experimentos de migración específica del colorante y capsaicina	45
Figura 9.	Cromatograma elución isocrática ACN/Agua (70:30 v/v)	54
Figura 10.	Cromatograma elución con gradiente ACN/Agua al 1% Ac. Acético (80:20 v/v)	55
Figura 11.	Cromatograma elución con gradiente ACN/Agua al 1% Ac. Acético (80:20 v/v)	56
Figura 12.	Cromatograma elución isocrática ACN/Agua al 1% Ac. Acético (80:20 v/v)	56
Figura 13.	Cromatograma del blanco de fase móvil	73
Figura 14.	Cromatogramas de los blancos de los simulantes acuosos a T° ambiente	74
Figura 15.	Cromatogramas de los blancos de los simulantes acuosos a 50 °C	74
Figura 16.	Cromatograma del blanco de matriz (PLA) de los simulantes acuosos a T° ambiente	75
Figura 17.	Cromatograma del blanco de matriz (PLA) de los simulantes acuosos a 50 °C	75
Figura 18.	Cromatograma de los simulantes acuosos saturados con capsaicina	77
Figura 19.	Sim “A” para PLA, a dos niveles de concentración (T° ambiente)	78
Figura 20.	Sim “A” para PLA, a dos niveles de concentración (50 °C)	78
Figura 21.	Extracción de capsaicina en Sim “D”, en los dos niveles de concentración para PLA	79
Figura 22.	Polímero PLA sometido al ensayo de migración a 50° C	83

Gráfica 1.	Curva de Van Deemter	58
Gráfica 2.	Linealidad para capsaicina	60
Gráfica 3.	Coeficientes de variación para repetibilidad y precisión intermedia (capsaicina)	63
Gráfica 4.	Obtención de longitud de onda de mayor absorbancia para el colorante	65
Gráfica 5.	Linealidad para colorante	66
Gráfica 6.	Coeficientes de variación para repetibilidad y precisión intermedia (colorante)	70
Gráfica 7.	Homogeneidad de la materia prima obtenida	72
Gráfica 8.	Contraste de temperaturas	82
Gráfica 9.	Contraste de niveles de concentración	83
Gráfica 10.	Gráficas de interacción del PLA en Sim "A"	84
Gráfica 11.	Gráficas de interacción del PLA en Sim "B"	84

LISTA DE ANEXOS

		págs.
ANEXO A	Perfiles empleados en el proceso de extrusión de las muestras poliméricas utilizadas.	92
ANEXO B	Parámetros directos e indirectos medidos para cada lote de experimentos.	93
ANEXO C	Ecuaciones y parámetros utilizados para la determinación de la Curva de Van Deemter.	95
ANEXO D	Longitudes de onda utilizados para la obtención de longitud de onda de mayor absorbancia para el colorante.	96
ANEXO E	Concentraciones reales de las soluciones utilizadas en la cuantificación de capsaicina.	97
ANEXO F	Curva de calibración utilizada para la determinación del límite de detección y cuantificación para capsaicina.	98
ANEXO G	Curvas de calibración realizadas con el material polimérico obtenido con el colorante como aditivo.	99
ANEXO H	Cromatogramas de los blancos de matriz (PB y MB) a las dos temperaturas.	101
ANEXO I	Señales de absorbancias de los blancos de simulantes de los tres polímeros.	103
ANEXO J	Cromatogramas obtenidos de la cuantificación de capsaicina en las matrices poliméricas con los simulantes acuosos.	104
ANEXO K	Cuantificación del colorante por Ultravioleta–Visible en las tres matrices poliméricas.	110
ANEXO L	ANOVA para el colorante en los diferentes matrices poliméricas y los 4 simulantes.	112
ANEXO M	Graficas de interacción de los polímeros PLA PB MB con los distintos simulante.	118

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>a</i>	Intercepto
ACN	Acetonitrilo
<i>b</i>	Pendiente
CAS	<i>Chemical Abstract Services</i>
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
COL	Colorante
CV	Coefficiente de variación
CXT	Interacción concentración y temperatura
H	Altura de plato teórica
<i>D</i>	Coefficiente de difusión
EE.UU	Estados Unidos
EU	Unión Europea
F_c	Flujo de la fase móvil
FCS	<i>Food contact substances</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FFDCA	<i>Food additives amendment to the federal food, drug, and cosmetic act</i>
FID	Detector de ionización de llama
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IDT	Ingesta diaria tolerable
<i>J</i>	Flujo difusivo
L	Longitud de la columna
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LD ₅₀	<i>Lethal dose, 50%</i>
LME	Límite de migración específica
LMG	Límite de migración global
MB	Mezcla binaria
MS	Detector de masas
N	Número de platos teórico
NC	Nivel de concentración

NEPA	<i>National environmental policy act</i>
OLE	Oleoresina
PE	Polietileno
PHB	Polihidroxitirato
PLA	Ácido poliláctico
PCL	Policaprolactona
PS	Poliestireno
s	Desviación estándar
Sim "A"	Simulante A
Sim "B"	Simulante B
Sim "C"	Simulante C
Sim "D"	Simulante D
T _g	Temperatura de transición vítrea
t _r	Tiempo de retención
TXC	Interacción temperatura y concentración
UV	Ultravioleta
W	Ancho de pico
Δc	Diferencia de concentraciones molares
λ	Longitud de onda
δ	Espesor de la membrana
μ	Velocidad lineal

RESUMEN

Los envases plásticos han sido por largo tiempo los encargados de proteger los productos alimenticios de la propagación y el deterioro por parte de microorganismos, sustancias tóxicas y sus toxinas, mejorando así de esta forma, la calidad en cuanto a seguridad y calidad de vida de los consumidores. La consecuencia negativa de todo este desarrollo en empaques plásticos, es el enorme problema ambiental, debido a la no biodegradabilidad que presentan los desechos que se generan; aparte de los altos costos que se requieren para la fabricación de los productos plásticos y polímeros sintéticos derivados del petróleo, éstos son tan estables, que su degradación puede tardarse en promedio 150 años, lo que contribuye a una enorme contaminación. Adicionalmente, la incineración de determinados tipos de plástico, genera problemas ambientales más severos como son la lluvia ácida que ha dejado serios problemas ecológicos en los bosques.

Con la finalidad de crear empaques que sean menos nocivos con el ambiente, se ha incrementado el desarrollo de empaques plásticos que sean altamente biodegradables o también llamados bioplásticos, que de acuerdo con Bioplásticos Europeos (ver www.european-bioplastics.org) [1] representan una clase relativamente nueva de materiales que tienen mucho en común con los plásticos convencionales, pero que se diferencian en el uso de los recursos renovables para su fabricación, en la biodegradabilidad y la compostabilidad [2]; ejemplo de ellos tenemos tres tipos de biopolímeros en el mercado: basados en almidón, ácido poliláctico (poliéster) y derivados de celulosa. En el desarrollo de este proyecto utilizaremos Ácido Poliláctico (PLA), un Polímero Biodegradable (PB) y la mezcla de estos dos, la cual llamaremos Mezcla Binaria (MB).

En el presente trabajo se pretende implementar las técnicas de cuantificación de dos aditivos (capsaicina y colorante) para la evaluación de la posible migración de estos hacia el simulante alimenticio y realizar una metodología que permita encontrar las concentraciones óptimas para lograr la menor migración desde el empaque hacia el alimento, además utilizar un diseño de experimentos para evaluar las concentraciones de los aditivos del empaque, todo esto con el fin de establecer las condiciones de trabajo para futuras investigaciones. Una de las sustancias a estudiar “capsaicina” es la que actúa como agente antimicrobial y por tal razón centraremos la mayor atención de nuestro estudio, en la evaluación de la técnica para la cuantificación de este compuesto. La determinación de migración es de acuerdo a la metodología establecida para el estudio de migración global y específica en empaques plásticos. Este proyecto se enmarca dentro de la parte inicial de un proyecto macro que pretende la obtención de un empaque activo para plátano a partir de almidón de yuca, capsaicina por extrusión soplado.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se entiende por empaque todo elemento fabricado con materiales de cualquier naturaleza que se utilice para contener, proteger, manipular, como barrera contra gases y humedad, contaminación química o biológica hacia el contenido y presentar un producto alimenticio. La mayoría de estos empaques por tener bases poliméricas sintéticas, han traído consecuencias desastrosas para el medio ambiente debido a su baja degradabilidad.

Nuevas investigaciones en tecnología para empaques alimenticios, han desarrollado alternativas para producir empaques amigables con el medio ambiente, generando así el mínimo impacto ambiental [3]. Paralelamente, investigaciones en esta área, han buscado crear un empaque más que biodegradable, un empaque activo, el cual ofrece mejorar la calidad del producto empacado.

El envasado óptimo de cualquier producto, requiere un estudio previo para conseguir la adecuación de las características de ambos componentes, de forma que envase y producto se combinen de la mejor manera posible, siendo el grado de compatibilidad entre ellos, máximo.

Los materiales utilizados como materia prima en envases, no constituyen con el producto que contienen sistemas totalmente estáticos desde el punto de vista de la transferencia de masa, sino que forman sistemas dinámicos caracterizados por un intercambio de compuestos de bajo peso molecular entre el envase, su contenido y el entorno que los rodea.

Por otra parte, la interacción más importante entre empaque y alimento es la migración, la cual puede tener efectos favorables en el desarrollo de empaques activos y efectos desfavorables donde la migración de sustancias de interés toxicológico puede producir efectos adversos en la salud del consumidor y en la calidad sensorial del alimento.

Existe una problemática, en Colombia, al no estar al nivel de los requisitos de calidad, en el campo de estudios de migración, que deben cumplir los empaques plásticos biodegradables y aditivos, destinados a estar en contacto con los alimentos, por lo cual se crea la necesidad de realizar estudios para evaluar la calidad de un nuevo empaque e impulsa a desarrollar un trabajo investigativo, para establecer una metodología adecuada en el análisis de migración específica

de aditivos, como son el colorante y la capsaicina, en matrices poliméricas biodegradables, cumpliendo con los requisitos legislativos vigentes tanto a nivel Europeo (Directivas 82/711/CEE [4], 85/572/CEE [5] y 97/48/CE [6]) como en Colombia (NTC 5022 [7] y 4606 [8]) y conseguir una migración óptima de la capsaicina para que cumpla un papel activo en el empaque. Esta investigación contribuirá a la implementación de técnicas analíticas para la cuantificación de migración de capsaicina y colorante como aditivos en el desarrollo de empaques biodegradables activos, utilizados en el campo agroindustrial, para ser utilizada en estudios relacionados con migración de aditivos en empaques biodegradables.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GENERAL

- Implementar una metodología adecuada en el estudio de la migración específica de aditivos y sus concentraciones óptimas en diferentes polímeros biodegradables, utilizando técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y ultravioleta visible (UV/VISIBLE).

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar una metodología adecuada, en la cuantificación de la migración del colorante por medio de la técnica analítica UV-VISIBLE, y la capsaicina por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).
- Establecer los parámetros de calidad límite de cuantificación y detección, linealidad, repetibilidad y precisión intermedia para capsaicina y colorante.
- Seleccionar las condiciones óptimas para la realización del ensayo de migración específica, tales como tiempo, temperatura y método de ensayo, destinadas a estar en contacto con las matrices poliméricas; siendo estas determinadas por el uso del empaque y las normas establecidas en la legislación.
- Identificar y evaluar, los diferentes factores que pueden influir en el resultado de los ensayos por medio de un diseño de experimentos y al mismo tiempo establecer las condiciones óptimas de concentración de la capsaicina, para que el empaque se comporte como un empaque activo.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1. EMPAQUE

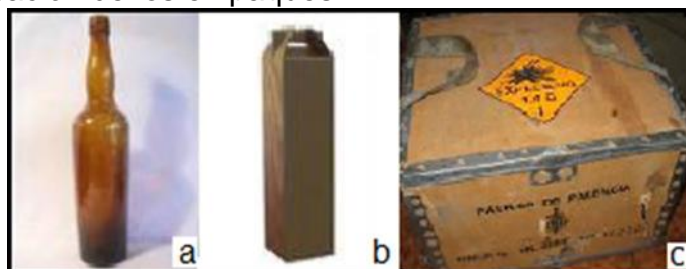
El principal objetivo del empaque para los alimentos es proteger del daño mecánico, de la contaminación química y microbiana, del oxígeno y del vapor de agua y la luz, en algunos casos. El tipo de empaque utilizado para este fin juega un papel importante en la vida del producto, ya que le brinda una barrera simple a la influencia de factores, tanto internos como externos.

3.1.1. Clasificación de los empaques. Se clasifican por sus características en:

- a. *Empaque primario:* Es aquel recipiente o envase que contiene el producto.
- b. *Empaque secundario:* Es aquel que contiene al empaque primario y tiene como finalidad brindarle protección, servir como medio de presentación y facilitar la manipulación del producto para su aprovisionamiento en los estantes o anaqueles en el punto de venta. Este empaque puede separarse del producto sin afectar las características del mismo.
- c. *Empaque terciario:* Es aquel que puede agrupar varios empaques primarios o secundarios y tiene como finalidad facilitar la manipulación y el transporte de los productos

En la Figura 1 se representa la clasificación de los empaques: a) empaque primario: botella de vino, b) empaque secundario: caja que contiene la botella de vino, c) empaque terciario: caja de madera o de cartón que contiene un conjunto de empaques secundarios, que a su vez contienen las botellas de vino.

Figura 1. Clasificación de los empaques



En el mercado se conocen seis tipos de materiales básicos de empaques: metal, cartón, papel, plástico, madera y vidrio y un séptimo que se obtiene de la mezcla

de dos o más de los materiales anteriormente mencionados, los cuales son conocidos como envases complejos. Todos los siete envases anteriormente mencionados presentan ventajas y desventajas, es por eso que no existe el envase perfecto [9].

- **Empaques de madera.** Las cajas fabricadas con madera son conocidas como cajas gasolineras y guacales. Presentan el inconveniente de no manejar tamaños estándar y generalmente, en nuestro país, no se desechan después de su uso, por lo que se pueden considerar como una posible fuente de transmisión de enfermedades post cosecha.
- **Empaques de cartón.** La mayoría se fabrican con tres o más capas de cartón, resultado de un proceso de pulpa de madera o papel sin blanquear, por eso, su color tostado, obteniendo un producto de una gran fortaleza. Las láminas para la construcción de cajas se fabrican en diferentes espesores y estilos diferentes y debido a su relativa versatilidad y bajo costo, son el material dominante para la fabricación de empaques, los cuales se creen que permanecerán en el futuro próximo, ya que su fortaleza y funcionalidad ha ido mejorando en los últimos años.
- **Empaques de papel.** Los empaques hechos de papel y almidón se usan principalmente para empaques pequeños de producto fresco. Se encuentran disponibles en una gran variedad de formas y tamaños, a un costo relativamente bajo, siendo biodegradables y fabricados a partir de materiales reciclados y reciclables. Este tipo de empaque puede absorber la humedad de superficie del fruto, lo que es un beneficio para las pequeñas frutas que son alteradas fácilmente por el agua.
- **Empaques de vidrio.** Se fabrican con ingredientes básicos de arena, ceniza de soda y piedra caliza, a los cuales se agregan otros materiales que modifican sus propiedades, por ejemplo, alúmina (Al_2O_3), que se agrega para aumentar su dureza y durabilidad. El vidrio se caracteriza por su inercia química, sus excelentes propiedades protectoras, su transparencia, su brillo exterior, su rigidez y su resistencia al calor. Aunque es una materia prima de bajo costo, está conceptuado como envase de primera calidad. Una gran desventaja del vidrio es su peso, que aumenta las consecuencias relacionadas con su transporte y manipulación.
- **Empaques sintéticos o plásticos.** Los empaques sintéticos son formados por polímeros orgánicos, sintéticos o derivados de compuestos naturales, a los cuales se pueden agregar varios tipos de aditivos, pigmentos o colorantes, y que pueden ser moldeados para obtener diversas formas, normalmente mediante calor y presión. Comprenden los materiales termoplásticos y los

materiales termorrígidos. En la Tabla 1 se presentan diferentes polímeros sintéticos con algunos de sus usos.

Tabla 1. Polímeros sintéticos y sus diferentes usos ^[10]

POLIOLEFINAS	SIGLAS	USOS
POLIETILENO	PE	Envases para distintos tipos de fontanería, tuberías flexibles, prendas textiles, contenedores de basura, papeles.
POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD	LDPE	Bolsas para vegetales en supermercados, para pan, envolturas de alimentos y botellas para mostaza exprimibles.
POLIETILENO DE ALTA DENSIDAD	HDPE	Recipientes para leche, bolsas para basura, botellas para detergente o blanqueadores, y para aspirinas.
POLIPROPILENO	PP	Envases para yogurt, botellas para champú, potes, botellas para almíbar y recipientes para margarina.
POLÍMEROS RADICALES	SIGLAS	USOS
POLIESTIRENO	PS	Espuma plástica. Tazas para bebidas calientes, envase para comidas rápidas, cartones para huevos y bandejas para carnes.
CLORURO DE POLIVINILO	PVC	Botellas para aceite de cocina y empaques para carnes.
POLÍMEROS DE CONDENSACIÓN	SIGLAS	USOS
POLIETILENTEREFTALATO	PET	Botellas para bebidas, bolsas de hervir ahí mismo el alimento congelado y bandejas para comidas calentadas en microondas.
POLIAMIDAS	PA	Filamentos

- **Empaques biodegradables.** Los empaques biodegradables se han desarrollado a partir de materias primas renovables, derivadas de plantas y bacterias. Estos productos no son sólo biodegradables, sino también compostables, lo cual significa que se descomponen biológicamente por la acción de microorganismos y acaban volviendo a la tierra en forma de productos simples que pueden ser reutilizados por los seres vivos, es decir, que reingresan al ciclo de la materia.

Los polímeros biodegradables de uso comercial se pueden clasificar en:

a. Polímeros naturales: como la celulosa, el almidón y las proteínas.

b. Polímeros naturales modificados: como el acetato de celulosa.

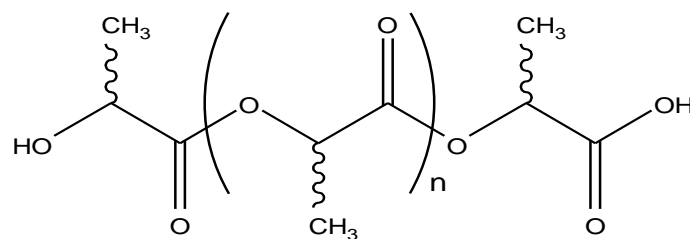
Así mismo, también se pueden clasificar por su constitución química ya que pueden ser derivados de azúcares, poliésteres y alcohol polivinílico. Los materiales biodegradables ofrecen una posible alternativa a los polímeros tradicionales no biodegradables, especialmente por el corto tiempo de vida media y por su reciclaje difícil y costoso [11].

3.2. COMPONENTES POLIMÉRICOS DEL EMPAQUE

Numerosos estudios en todo el mundo se están realizando con materiales poliméricos, basados en los recursos fósiles no renovables para la industria del empaque. Debido a la creciente preocupación por la preservación de los sistemas ecológicos, es cada vez más importante reconocer que el uso de polímeros de larga duración para aplicaciones de corta duración no es del todo justificado. Los plásticos convencionales que persisten en el medio ambiente debido a la eliminación inadecuada son una fuente importante de contaminación y un problema de gestión de residuos; es por esto que nace la necesidad del desarrollo de mezclas de polímeros que han dado lugar a nuevos materiales [12].

3.2.1. Ácido poliláctico. El ácido poliláctico (PLA) es un polímero resultante de la polimerización del ácido láctico por la apertura del anillo de su dímero cíclico, lactido. La unidad de repetición en la cadena del polímero es el ácido láctico. La estructura química de PLA está representada en la Figura 2.

Figura 2. Estructura química del ácido poliláctico



La seguridad de los polímeros que están en contacto con los alimentos, se evalúa teniendo en cuenta la identidad, las propiedades toxicológicas y cantidades de las sustancias que migran de los polímeros en los alimentos durante las condiciones de uso previsto.

Las sustancias migrantes del PLA pueden incluir ácido láctico, ácido lactoil láctico (el dímero lineal de ácido láctico), otros pequeños oligómeros de PLA (trímero, etc.), y láctidos (el dímero cíclico del ácido láctico y el monómero utilizado para construir el polímero). El ácido láctico es la sustancia de interés primordial, ya que las otras especies son esperadas al final para hidrolizar al ácido láctico ya sea en medio acuoso o en medio ácido y son comúnmente encontrados en los sistemas de alimentación o en el tracto digestivo humano [13].

3.3. ADITIVOS DEL EMPAQUE

La adición de aditivos en los polímeros es una práctica importante en la industria del plástico, ya que mejoran el procesamiento, optimizan las propiedades mecánicas y físicas de los productos finales, reducen los costos de producción o crean una apariencia atractiva del producto terminado, entre otros.

Cuando los polímeros se someten a un proceso de fabricación específico, tienen que ser transportados, comprimidos, fundidos, mezclados, homogeneizados, enfriados y solidificados antes de que se transforme en un producto diseñado; por tanto, puede preverse que las características dinámicas están involucradas en este proceso de elaboración. Cualquier alteración (incluyendo la adición de aditivos) es un factor de transformación que seguramente provocarán otros factores que será necesario ajustar, si se quiere mantener la calidad del producto.

Dentro de este grupo se encuentran los masterbatches de aditivos, que pueden utilizarse como productos independientes o combinados con color para producir un masterbatch personalizado. Los masterbatches de aditivos más comunes son colorantes o pigmentos, antioxidantes, estabilizadores UV, antimicrobianos, reductores de aminoácidos, retardantes de llama, barreras de oxígeno, aditivos para resistencia al rayado y marcado, agentes deslizantes, antiestáticos, abrillantadores ópticos, espumantes químicos y nucleantes, entre otros [14].

3.3.1. Masterbatches colorantes ó pigmentos. El masterbatch es un compuesto plástico de uno o más aditivos en alta concentración usado en la industria de transformación plástica (soplado, inyección, extrusión, moldeo rotacional, termoformado y laminación), en resinas o mezclas. Los masterbatches concentrados de pigmentos, colorantes o aditivos son dispersos en una resina denominada resina vehículo. Estas resinas pueden ser PE (polietileno), PP (polipropileno), EVA (Etileno Vinil Acetato), PS (poliestireno), PET (polietileno tereftalato), POM (polioximetileno), etc.

Mientras que la adición de colorante en forma de masterbatches de color en el polímero a granel para la creación de una apariencia atractiva ha sido una práctica común, la aplicación de estos compuestos es para casi todas las resinas y en la

mayoría de los procesos de transformación de termoplásticos. En teoría se debe utilizar un master elaborado con una resina vehículo igual a aquella que será utilizada en el producto final, sin embargo, en muchos casos se puede utilizar una resina diferente. Algunos de los problemas relacionados en la utilización del masterbatch son la aparición en el producto final de marcas de flujo, áreas o puntos con mayor concentración de pigmentos, estrías, entre otros. Al mismo tiempo si comparamos las ventajas de este producto como pigmento en estado sólido o líquido con otros métodos, los masterbatches pueden ofrecer grandes beneficios. Al ser este un producto seco, limpio al toque y granulado, se hace menor la contaminación con otras resinas, su almacenamiento es más simple y la absorción de humedad es casi nula o simplemente no existe [15].

3.4. EMPAQUES ACTIVOS

En el marco de empaques biodegradables, se tiene a los empaques activos, los cuales se caracterizan por no cambiar las condiciones del empaque para extender la vida de anaquel o mejorar las propiedades de seguridad o sensoriales mientras se mantiene la calidad del alimento. El empaque activo es uno de los conceptos modernos para el envasado de alimentos que se ha introducido como respuesta a los continuos cambios en las demandas del consumidor actual y las tendencias del mercado. Dentro de las principales técnicas de envasado activo se encuentran las sustancias que absorben oxígeno, etileno, humedad, dióxido de carbono, sabores/olores, liberadores de dióxido de carbono, agentes antimicrobianos, antioxidantes y sabores, entre otros [16,17].

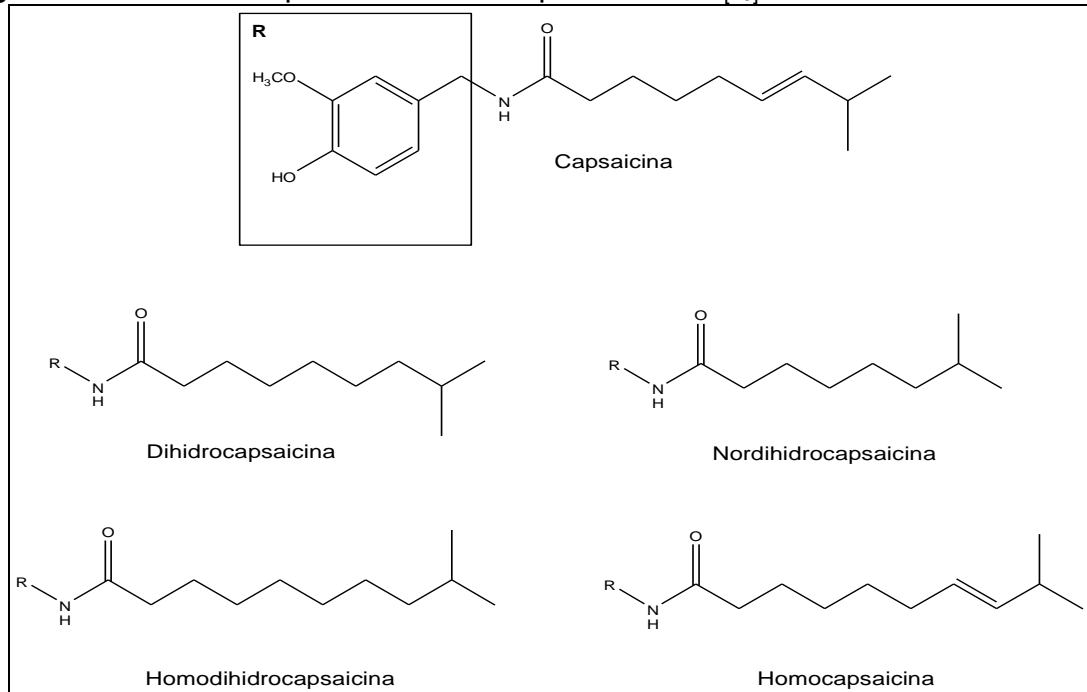
3.4.1. Composición del material del empaque activo. El material del empaque es la fuente de la migración química. El alcance de cualquier migración depende en primer lugar de la concentración del producto químico en éste; los niveles de migración serán mayores si la concentración de los envases se incrementa y viceversa [18].

3.4.1.1. Capsaicina. La capsaicina (trans-8-metil-N-vanillil-6-nonenamida, CAS RN: 404-86-4), presente en la mayoría de sabores picantes, es responsable de la sensación caliente de los alimentos. En dosis alta, puede causar un malestar significativo al estar en contacto con microorganismos, roedores y seres humanos.

La capsaicina pertenece a una familia de compuestos conocidos como capsaicinoides, compuestos relativamente lipofílicos que consisten en una fracción aromática ligada a una amida alquilo, como: dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina (Figura. 3). La oleorresina de capsaicina es una mezcla compleja de una variedad de vanililamidas de alquilo de cadena recta, con capsaicina como su principal

constituyente; hay más de 100 compuestos en esta mezcla, que se extrae de frutos secos y maduros de ají (*Capsicum annuum*).

Figura 3. Estructuras químicas de los capsaicinoides [19].



La capsaicina es soluble en etanol, acetona y aceites grasos, pero es insoluble en agua fría. La bibliografía reporta que la concentración de estos compuestos capsaicinoides en Chile es más pequeña (0,1-1%) que la capsaicina; su distribución aproximada es la siguiente: capsaicina 70%, dihidrocapsaicina 20%, nordihidrocapsaicina 7%, homocapsaicina 1% y monodihidrocapsaicina 1%. Algunos productos repelentes y aerosoles de pimienta pueden contener hasta un 10% de oleorresina de capsaicina, así como otros capsaicinoides, debido a que los productos basados en capsaicina están ganando un uso generalizado dentro del mercado de repelentes para animales e insectos [20].

Información toxicológica de la capsaicina

Toxicidad Aguda:

- LD₅₀ Oral - ratas - macho - 161.2 mg/kg
- LD₅₀ Oral - ratas - hembra - 148.1 mg/kg
- LD₅₀ Dérmico - ratones - > 512 mg/kg [21].

3.5. FUNDAMENTOS Y MECANISMOS DE LA MIGRACIÓN

La migración química de los materiales del empaque hacia alimentos tiene una larga historia. Sin embargo, hoy en día, este tema está siendo estudiado por las agencias gubernamentales responsables de la seguridad de los alimentos, por el público en general y por investigadores que trabajan en el campo.

3.5.1. Migración. El empaque protege el producto alimenticio envasado del deterioro por agentes externos, como las plagas, olores, microorganismos, luz y oxígeno. Sin embargo, la transferencia de sustancias químicas de los empaques a los alimentos puede tener un impacto negativo en la calidad de los mismos. Esta es la razón por la cual la migración en empaques y materiales en contacto con otros alimentos, justifica estudio y control. Ningún material en contacto con los alimentos es completamente inerte y por lo tanto es posible que sus componentes químicos puedan migrar a los alimentos envasados.

Los metales, vidrio, cerámica, plástico, goma y papel pueden liberar todas las cantidades minuciosas de sus componentes químicos cuando están en contacto con ciertos tipos de alimentos; esta liberación de sustancias químicas a los alimentos se conoce técnicamente como “migración” y esta puede ser definida científicamente como “la transferencia de masa de sustancias desde una fuente externa como el empaque a los alimentos”.

La migración química en los alimentos es importante porque puede tener dos efectos positivos en estos:

- Seguridad alimentaria: algunas sustancias utilizadas para fabricar materiales de empaque pueden ser perjudiciales si migran a los alimentos y se ingieren en cantidades suficientemente grandes.
- Calidad de los alimentos: las sustancias que migran pueden impartir sabor u olor a los alimentos y reducir el atractivo para el consumidor [18].

Los empaques tienen diferentes interacciones con el alimento contenido y sus consecuencias, como se muestra en la Figura 4. Entrada y salida de CO₂, O₂, entre otros, pueden ocurrir entre el ambiente y el alimento pasando a través de la película, dejando como consecuencia oxidación y aromas indeseables en el alimento; así mismo, dos tipos de interacciones también se pueden presentar con la película y el alimento: el fenómeno de absorción que va desde los alimentos hacia la película y el de mayor interés para nosotros, la migración que ocurre desde la película hacia los alimentos siendo esta la que trae mayores consecuencias para los diferentes productos que se encuentran en contacto con los empaques, como la pérdida del sabor, cambio en el color y aroma.

Figura 4. Interacciones del empaque con su contenido.



Estas interacciones pueden traer efectos favorables o desfavorables, tales como:

Efectos favorables: La migración de algún componente activo puede contribuir a extender la vida útil. Los factores que influyen en la migración son la temperatura de contacto envase y producto, tiempo de contacto envase-producto, naturaleza del alimento y espesor del empaque.

Efectos desfavorables: La migración de sustancias de interés toxicológico puede producir efectos adversos en la salud del consumidor. La migración de sustancias sensorialmente activas puede producir efectos adversos en la calidad sensorial del alimento.

En la determinación de la migración entre el empaque y el alimento, se deben tener en cuenta dos parámetros de la misma:

Migración global: Representa la cantidad total de componentes, conocidos o no, del material de envase que son transferidos al alimento en las condiciones de preparación y almacenamiento menos favorables. Límite de migración global (LMG) 10 mg/dm² o 60 mg/Kg.

Migración específica: Se refiere a la cantidad de una sustancia concreta e identificable que es transferida al alimento. Los límites de migración específica (LME) de toxicidad dependen de la sustancia concreta.

3.5.2. Migración química y los principales factores que la controlan

A continuación se detalla un de los principales factores por los cuales se desarrolla dentro del proceso de migración.

3.5.2.1. La base mecánica de la migración. La liberación de sustancias químicas es un proceso de difusión sometido a control cinético y termodinámico que puede ser descrito por la ley de Fick, que describe el proceso de difusión en función del tiempo, temperatura, espesor del material, la cantidad de químicos en el material y coeficiente de reparto y de distribución.

La dimensión cinética de la migración expresa que tan rápido se produce el proceso de migración y la dimensión termodinámica trata ampliamente sobre como será la transferencia de sustancias cuando la migración haya terminado o cuando el sistema está en equilibrio [18].

3.5.2.1.1. Ley de fick. El proceso de difusión molecular (o transporte molecular) puede definirse como la transferencia de moléculas individuales a través de un fluido por medio de los desplazamientos individuales de las mismas.

Cuando en un sistema termodinámico multicomponente hay un gradiente de concentraciones, se origina un flujo irreversible de materia, desde las altas concentraciones a las bajas. A este flujo se le llama difusión. La difusión tiende a devolver al sistema a su estado de equilibrio, de concentración constante. La ley de Fick nos dice que el flujo difusivo que atraviesa una superficie (J) es directamente proporcional al gradiente de concentración. El coeficiente de proporcionalidad se llama coeficiente de difusión (D). Para un sistema discontinuo (membrana que separa dos cámaras) esta ley se escribe:

$$J = D \cdot \frac{\Delta c}{\delta} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde, Δc es la diferencia de concentraciones molares y δ el espesor de la membrana [22].

- **Difusión en una hoja plana.** Existen varios casos de difusión en una sola dimensión dentro de un medio unido por dos planos o caras. En la práctica si se consideran los dos planos, esto aplica para la difusión que se da a través de las caras planas de un material tan delgado que se considera que la mayoría de la sustancia que se difunde, entra al medio a través de la caras planas y una cantidad despreciable ingresa al medio a través de los bordes

En el estado estacionario se considera el caso de difusión a través de una hoja plana o membrana de espesor ℓ y coeficiente de difusión D , cuyas superficies, $x = 0$, $x = \ell$, se mantienen en concentraciones constantes C_1 , C_2 , respectivamente. Después de un tiempo, un estado de equilibrio es alcanzado,

en el cual la concentración se mantiene constante en todos los puntos de la hoja.

El cambio en la concentración se va a dar linealmente de C_1 a C_2 a través de la hoja. Así mismo, la tasa de transferencia de la sustancia que se difunde es la misma en todas las secciones de la membrana.

- **Difusión en un cilindro.** Se considera un cilindro en el cual la difusión se produce según la dirección radial del mismo, siendo despreciable la cantidad de sustancia que pueda difundirse a través de las caras perpendiculares al eje. La concentración es función únicamente del radio r y tiempo t . Si en el estado estacionario, el medio es un cilindro hueco cuyo interior y exterior son los radios a y b , respectivamente y el coeficiente de difusión es constante, la concentración varía de acuerdo al tamaño de los radios y longitud del cilindro.

3.6. REGULACIÓN DE MIGRACIÓN QUÍMICA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS

En este momento la regulación de migración química en productos alimenticios, se ha concentrado en Estados Unidos y la Comunidad Europea.

3.6.1. Regulación en Estados Unidos EE.UU. Dos autoridades regulatorias están dentro de la discusión sobre la regulación de materiales en contacto con los alimentos en los EE.UU. Estos son *Food Additives Amendment to the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* (FFDCA) de 1958 y *National Environmental Policy Act* (NEPA) de 1969, donde se otorgó autoridad sobre la *Food and Drug Administration* (FDA) para regular los aditivos alimentarios de la Enmienda de 1958 de la FFDCA [18].

3.6.1.1. FFDCA. La historia de la regulación de empaques alimenticios en Estados Unidos comenzó con la aplicación de la Enmienda de Aditivos Alimentarios de 1958. Antes de esta fecha, los fabricantes de materiales de empaques y productos terminados estaban regulados fundamentalmente por sus clientes, donde muchas veces se insistía en que se garantizara la seguridad de un empaque, así como su utilidad, solicitando la intervención de la Administración de Alimentos y Medicamentos (*FDA por sus siglas en inglés*) o el Departamento de Agricultura para indicar que no hay objeción alguna al material del empaque.

Desde la aprobación de la Enmienda de los Aditivos Alimentarios, se definió el término aditivo de alimentos, donde se habla de cualquier sustancia que afecte a las características de cualquier alimento (incluyendo cualquier sustancia destinada

para el uso en empaques o conservación de alimentos). El término "aditivo alimentario" incluye no sólo las sustancias añadidas a los alimentos directamente, sino también sustancias, como algunos materiales de empaques, que al estar en contacto, puede esperarse que migren a los alimentos, a menos que esas sustancias sean "generalmente reconocidas como seguras" (GRAS) o priori sancionados [23].

3.6.1.2. Información química. Debido a que la FDA combina la reglamentación con información química, toxicológica y ambiental, consideraremos las estimaciones de exposición para *Sustancias en Contacto con Alimentos (FCS por sus siglas en Inglés)* y sus componentes, estos por lo general consisten en la combinación de diferentes niveles de migrantes en los alimentos con parámetros basados en la información sobre el uso de artículos que puedan contener los FCS.

La FDA clasifica los artículos en contacto con los alimentos como de un solo uso u objetos de uso repetido. De un solo uso describe a un artículo que se utilizará un tiempo, como porque una botella de plástico para bebidas, mientras que los artículos de uso repetido se utilizarán durante un período prolongado y en contacto con alimentos en varias ocasiones, como un anillo, una banda transportadora, los utilizados en una planta de procesamiento de alimentos, o una bandeja de comida.

En general, los niveles de migrantes en los alimentos son fijados por uno o varios de los métodos siguientes:

- i. Estudios de migración acelerada con simulantes de alimentos en las condiciones previstas más severas de uso
- ii. La asunción de un 100% de la migración a los alimentos mediante real uso o niveles de residuos
- iii. Un modelo matemático de la migración en los polímeros, basados en un escenario de tratamiento térmico prolongado de almacenamiento, mediante el uso real o niveles de residuos.

Las condiciones de uso previsto de la FCS (es decir, el nivel de utilización, tipos de alimentos y condiciones de tiempo/temperatura) son cruciales para la determinación de parámetros de la prueba (es decir, toma de muestra (s), simulantes de alimentos, y la aceleración del tiempo/temperatura de protocolos) y los factores aplicables de envases, por lo menos para las aplicaciones de un solo uso; en otras palabras, el uso previsto de las FCS determina los tipos de alimentos adecuados y clasificaciones como lo especifica la Tabla 2, así como el tiempo acelerado y condiciones de temperatura que nombran en la Tabla 3, los cuales deben utilizarse para determinar los niveles de migrantes en los alimentos [11].

Tabla 2. Clasificación de los tipos de alimentos y simulantes de alimentos recomendados.

TIPO	DESCRIPCIÓN	CLASIFICACIÓN
I	No ácidos , productos acuosos; puede contener sal, azúcar o ambos (pH > 5)	Acuosos
II	Ácidos , productos acuosos; puede contener sal, azúcar o ambos, incluidas las emulsiones de aceite en agua de bajo o alto contenido en grasa.	Ácidos
III	Acuosos , ácidos o no ácidos, productos que sean libre de aceite o grasa; pueden contener sal, inclusive emulsiones de agua en aceite con un contenido bajo o alto en grasas	Grasos
IV	Leche y productos lácteos	
	A. Emulsiones de agua en aceite, alta o baja en grasa B. Emulsiones de aceite en agua, alta o baja en grasa	Grasos Acuosos
V	Grasas y aceites con baja humedad	Grasos
VI	Bebidas	
	A. Con un contenido de hasta 8% de alcohol	Bajo contenido alcohólico
	B. No alcohólica	Acuosas
	C. Con un contenido de alcohol superior al 8%	Alto contenido alcohólico
VII	Artículos de panadería	
	Productos de panadería húmedos, con superficies libres de grasa o aceite	Acuosos
	Productos de panadería húmedos, con superficies que contengan grasa o aceite	Grasos
VIII	Residuo sólido , con una superficie que no contenga grasa o aceite	Seco
IX	Residuo sólido , con una superficie que contenga grasa o aceite	Grasos

Tabla 3. Condiciones temporales de la temperatura de uso.

DESIGNACIÓN	DESCRIPCIÓN	PROTOCOLO
Uso individual		
A	Una alta temperatura, el calor esterilizado o por encima de 100°C	120°C/2h, 40°C/238h
B	Hervir el agua esterilizada	100°C/2h, 40°C/238h
C	Llenado en caliente o pasteurizada por encima de 66°C	100°C/0.5h, 40°C/239,5h o 66°C/2h, 40°C/238h
D	Llenado en caliente o pasteurizados por debajo de 66 °C	66°C/0.5h, 40°C/239,5h

Tabla 3. Continuación.

DESIGNACIÓN	DESCRIPCIÓN	PROTOCOLO
E	Llenado y almacenado a temperatura ambiente (Sin tratamiento térmico en el envase)	40°C/240h
F	Almacenamiento en refrigerador (sin tratamiento térmico en el envase)	20°C/240h
G	Congelados (sin tratamiento térmico en el envase)	20°C/120h
H	Almacenamiento refrigerado o congelado Alimentos previamente elaborados destinados a recalentarse en un contenedor en el tiempo de uso	100°C/2h

3.6.2. Regulación en la Unión Europea (EU). En la Unión Europea existen dos tipos de legislación para materiales en contacto con alimentos: la legislación comunitaria que ha sido adoptada por la EU y la legislación nacional adoptada por los Miembros de Estado. En el área de materiales en contacto con alimentos, la primera legislación comunitaria fue adoptada en 1976, donde se establecen los principios generales en la Directiva Marco. La adopción de la Directiva Marco es un primer paso en la armonización de la legislación de los materiales en contacto con alimentos. Mientras tanto la legislación comunitaria específica sobre los materiales en contacto con los alimentos ha sido aprobada pero no en todas las áreas.

3.6.2.1. La legislación comunitaria. La legislación comunitaria contiene normas generales aplicables a todos los materiales y artículos establecidos en el Reglamento Marco y las normas específicas aplicables sólo a ciertos materiales o sustancias determinadas. Desde 2005, la legislación comunitaria se puede adoptar en forma de una directiva, un reglamento o una decisión [18].

3.6.2.2. Reglamento marco. El Reglamento Marco (EC) No. 1935/20042 es la legislación comunitaria básica que cubre todos los materiales en contacto con alimentos y artículos. Define lo que se entiende por el término "materiales en contacto con alimentos y objetos" y, establece los requisitos básicos para estos materiales. Esta incluye los siguientes productos: materiales que ya están en contacto con los alimentos tales como el empaque de los alimentos pre empacados, los materiales que estén destinados a entrar en contacto con alimentos, tales como tazas, platos, cubiertos y empaques de alimentos que todavía no están en uso.

Los tres requisitos básicos que se establecen para garantizar alimentos seguros y proteger los intereses de los consumidores son:

Los materiales en contacto con alimentos no deben poner en peligro la salud humana, tampoco no deberán cambiar la composición de los alimentos, no cambiaran el sabor, olor o la textura de los mismos.

La Directiva 2002/72/EC de plásticos se refiere a una sola capa de plástico y estructuras de capas múltiples que son exclusivamente de plástico. Una estructura puede ser una sola capa de polietileno (PE), una estructura de múltiples capas, una bandeja de plástico para los alimentos pre empacados que consiste en diferentes capas de plástico. Los revestimientos de plástico, adhesivos y resinas epoxi sólo están cubiertos en parte por una legislación comunitaria específica en los plásticos. En el caso de los biopolímeros y polímeros biodegradables, como el ácido poliláctico (PLA), polihidroxibutirato (PHB), policaprolactona (PCL) o almidón, están cubiertos por la legislación comunitaria sobre plástico.

Los principios generales establecidos en el Reglamento Marco son los principios de inercia y la seguridad del material. El principio de inercia se traduce en un "Límite de Migración Global" (LMG). La migración global comprende la cantidad total de sustancias transferidas del material en contacto con alimentos de plástico para la comida. Si es necesario, para la seguridad de un material se establece "Límite de Migración Específico" (LME); la migración específica es la cantidad de una sustancia única que puede ser transferida desde el material en contacto con alimentos de plástico para la comida. El LME se realiza individualmente y se basa en la evaluación toxicológica de la sustancia. Una ingesta diaria tolerable (IDT) se traduce en un LME basado en un sistema convencional [18].

3.6.2.3. Verificación de los límites de migración. El análisis de migración de los materiales en contacto con los alimentos, puede realizarse siguiendo varios protocolos.

- En el propio alimento, en caso de que la comida ya está en contacto con el empaque.
- En simulantes de alimentos, generalmente en el caso de empaques que no hayan entrado todavía en contacto con alimentos.

La legislación prevee cuatro simulantes de alimentos que representan las posibles propiedades de extracción de productos alimenticios (Directiva 82/711/CEE). Estos cuatro simulantes son:

- Agua para alimentos acuosos
- Ácido acético (3%) para alimentos ácidos

- Etanol (15%) para alimentos alcohólicos
- Aceite de oliva para alimentos grasos.

La verificación de la migración deberá llevarse a cabo en un tiempo de contacto previsible y la temperatura para la aplicación prevista. Un almacenamiento a largo plazo en la temperatura ambiente es, por ejemplo, representada por el almacenamiento de diez días a 40°C.

3.6.2.4. Empaques activos e inteligentes. En el pasado se consideraban como principales funciones de los envases la protección de los alimentos de la contaminación, el deterioro y facilitar el transporte de los alimentos. Desde este momento en adelante los principios básicos de los empaques en contacto con alimentos han tenido legislaciones que se derivan en: los empaques deben ser inertes, no deben liberar sustancias en los alimentos que representan un riesgo para la salud humana, o que cambien el sabor y la composición de los alimentos.

Los recientes desarrollos tecnológicos no sólo han hecho posible asignar nuevas funciones a los empaques, sino que podrían informar al consumidor sobre la condición de su contenido e incluso pueden interactuar con los alimentos mediante la liberación ó absorción de sustancias. Por ello, se han introducido en la legislación dos nuevos conceptos: materiales inteligentes y materiales activos en contacto con los alimentos.

Los empaques inteligentes son los que proporcionan al consumidor información sobre el estado de los alimentos envasados o la atmósfera en el envase. Los empaques activos son los que cambian la composición del alimento o su ambiente circundante; dos de estos son los absorbedores y liberadores; Los absorbedores son las que funcionan por absorción de sustancias de todo el alimento o el ambiente en el empaque. Los liberadores son lo contrario, liberan sustancias en los alimentos para mejorar los alimentos o su condición. La nueva característica de los envases permite que la sustancia activa se agregue al material en que se liberan intencionadamente a los alimentos [18].

3.7. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS MIGRANTES

Los métodos de análisis relacionados a la determinación de migración de materiales desde empaques a productos alimenticios, parece estar todavía en fase de investigación y desarrollo. En este momento no se encuentran estudios que hayan utilizado el mismo procedimiento para determinar un compuesto dado en un tipo de muestra en particular. Sin embargo, la evaluación de los migrantes siguen

una línea en el procedimiento como: 1. Preparación de la muestra y 2. Métodos cromatográficos para la determinación de los migrantes.

3.7.1. Preparación de la muestra. En este paso lo que se busca es la separación de los compuestos migrantes de la matriz, utilizando métodos de extracción con solventes, extracción líquido-líquido, (continua o discontinua), ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos, destilación continua con vapor y evaporación del simulante por secado, todo esto utilizando solventes apropiados para los compuestos estudiados. Esta fase también incluye fases de limpieza como extracción y microextracción en fase sólida, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de permeación en gel.

3.7.2. Métodos Cromatográficos. Al hablar sobre las posibles sustancias migrantes que pueden estar presentes en los alimentos de consumo debido al material de empaque se puede hablar de tres grandes grupos, aditivos en el empaque polimérico, monómeros y oligómeros y contaminantes, los cuales han sido ampliamente estudiados con técnicas de cuantificación altamente específica tales como cromatografía de gases acoplada a MS, FID, ECD, headspace y también cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección en UV y fluorescencia [24]. Pasando al estudio de la migración en empaques en contacto con muestras de alimentos se encuentra el análisis de sustancias migrantes en películas de PVC (*polyvinyl chloride*) y LDPE (*low density polyethylene*), donde utilizan GC-FID y HPLC-UV, respectivamente [25, 26]. En general en la mayoría de estudios de migración estas dos técnicas aparecen como las más utilizadas, con la diferencia que algunas veces se utilizaran equipos capaces de analizar trazas ya que los niveles de migración son muy bajos dependiendo de la muestra, como en el caso de migración específica de aceites esenciales como agentes activos, donde la concentración de los migrantes encontrada es del orden de ppb [27]. Y por último para enfocar las técnicas utilizadas para el análisis de capsaicina tenemos HPLC en fase reversa con columnas C18, como las más usadas, este último grupo encierra determinación del grupo de capsaicinoides en variadas matrices y migración de capsaicina a través de tubos colectores de miel de maple [28, 29].

3.8. PARÁMETROS DE CALIDAD PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

La validación de un método analítico constituye un proceso importante para garantizar los resultados precisos con un alto grado de seguridad del desarrollo de un método nuevo para la cuantificación de capsaicina con el fin de asegurar la confiabilidad y establecer un procedimiento para futuras investigaciones en este campo. Se debe tener en cuenta que este método se desarrollará desde cero, ya

que hasta ahora no se han reportado estudios de validación de métodos para determinar migración de capsaicina en polímeros biodegradables, se tendrá en cuenta estudios realizados en cuantificación de capsaicina y capsaicinoides en diferentes muestras para establecer así las condiciones cromatográficas del método y también estudios de migración de otros componentes para desarrollar el ensayo de migración específica de capsaicina y colorante.

En el presente trabajo se consideran los parámetros de validación como:

3.8.1. Precisión. La precisión se define como el grado de dispersión o de concordancia entre una serie de medidas múltiples a partir de una muestra homogénea, la precisión es posible determinarla como repetibilidad y precisión intermedia [30].

3.8.1.1. Repetibilidad. Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (mismo analista, equipos) en un mismo laboratorio en un periodo de tiempo corto [30].

3.8.1.2. Precisión intermedia. Los ensayos de precisión intermedia estudian la variabilidad del método sobre la misma muestra pero en diferentes condiciones operativas (diferentes días) en un mismo laboratorio [30].

3.8.2. Evaluación de la linealidad. La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido [30].

3.8.3. Límite de detección y cuantificación. Se entiende como límite de detección, como la mínima concentración o la mínima masa del analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco. Así al aproximarse al límite de detección, la señal analítica y su desviación estándar se aproximan a la señal del blanco (S_{bl}) y a su desviación estándar (s_{bl}). Por tanto la mínima señal analítica distinguible S_m se considera que es igual a la suma de la señal media del blanco \bar{S}_{bl} más un múltiplo k de la desviación estándar del mismo [31].

$$S_m = \bar{S}_{bl} + k s_{bl}$$

Ecuación 2

Siendo $k = 3$, para el límite de detección y $k = 10$ para límite de cuantificación. Finalmente se establece el intercepto y la pendiente de la curva de calibrado y se utilizan para calcular C_m y cuya ecuación es:

$$C_m = \frac{S_m - \bar{S}_{bl}}{m} \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo; C_m = límite de detección o cuantificación
 m = pendiente de la curva de calibrado

3.9. EVALUACIÓN PRÁCTICA DE LA MIGRACIÓN

La migración de sustancias químicas desde los empaques ha sido una gran preocupación muchos años atrás, tanto para los fabricantes de empaques como para los consumidores de los alimentos y es por esta razón que entidades gubernamentales encargadas de la seguridad alimentaria han dedicado gran parte de sus actividades a la regulación de empaques alimenticios, siendo pionero Estados Unidos con la “Enmienda de Aditivos Alimenticios de 1958” y más tarde en 1976 en Europa donde se empezó a manejar el concepto de “migración global”^[16]; desde este momento hasta la actualidad se han venido desarrollando diferentes tipos de empaques que aseguran la calidad del producto que contienen, llegando a lo más nuevo en empaques alimenticios “empaques activos” los cuales están empezando a tomar fuerza en la actualidad, debido a sus propiedades de mantener y mejorar la calidad de los alimentos. Su definición fue dada por “*The European FAIR-project CT 98-4170*” creado en 1999^[17]. De acuerdo a los grandes cambios que han experimentado los empaques con los diferentes tipos de aditivos, se ha demostrado un gran interés por conocer las posibles sustancias que pueden migrar desde los empaques, para establecer la contaminación de las sustancias migrantes^[24, 32]. Los estudios de migración incluyen la determinación de monómeros, oligómeros y aditivos de los materiales de los empaques^[13], los cuales están regulados por las Directivas de la Comunidad Europea en una lista de sustancias permitidas para la manufactura de empaques en contacto con alimentos^[33], estas normas también incluyen parte de la metodología a desarrollar, como es la lista de simulantes a utilizar durante la determinación de migración de sustancias^[5]

Respecto a los materiales del empaque que se utilizaron en el desarrollo del proyecto, la migración de capsaicina y colorante desde el material de contacto hacia los alimentos, es importante desde el punto de vista que cada empaque nuevo genera diferentes aditivos los cuales pueden tener efectos sobre la salud

humana [24]; este es el porque los estudios se deben centrar sobre las sustancias que pueden migrar, donde la exposición a estas generalmente es baja [19] lo que dificulta su análisis, debido a esto se están implementando nuevos procedimientos para la evaluación de la migración como lo son los modelos matemáticos, que están basados en predicciones teóricas de las concentraciones de las sustancias migrantes [34]. Estos datos también pueden ser obtenidos a partir de experimentos reales o mediante el uso de experimentos de migración por medio de simulantes que cubren en un amplio rango la mayoría de alimentos, dichas determinaciones se llevan a cabo bajo específicas condiciones de tiempo y temperatura para acelerar el proceso de migración entre los materiales del empaque y los simulantes alimenticios, siendo este último método el escogido para el desarrollo de este trabajo [26, 27].

En cuanto al uso de un agente repelente o antimicrobial esta la capsaicina, ya que es considerada un pesticida bioquímico [35], con atributos sensoriales de sabor picante, aroma y color, produciendo síntomas que van desde la incomodidad hasta un leve dolor. Diversos autores han utilizado Cromatografía Líquida de Alta resolución para la separación analítica y cuantificación de capsaicina y los otros compuestos conocidos como capsaicinoides, donde se incluyen métodos preliminares de purificación de la muestra, tras su determinación por esta técnica [28, 29, 36, 37].

Serios problemas de contaminación ambiental se empezaron a presentar con el crecimiento de los empaques hechos a base de polímeros convencionales, por lo cual el poder reemplazar estos polímeros se ha convertido en objetivo central de la producción y manejo de polímeros biodegradables [2]. La literatura sobre este tema es la mayoría de las veces escasa y ha puesto más énfasis en los resultados relativos de la migración de los aditivos hacia los simulantes y en los polímeros que en el análisis de alimentos [28]. Por eso se busca resaltar la importancia de este trabajo el cual pretende determinar la migración de sustancias en un polímero completamente biodegradable y poder establecer el uso de este dentro del mercado agroindustrial, cumpliendo con las normas establecidas y mitigando el impacto ambiental.

4. METODOLOGÍA

La metodología del trabajo se desarrolló de la siguiente manera.

4.1. REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS

La metodología en la parte experimental se dividió en tres secciones:

1. Pruebas preliminares de las materias primas, y obtención de las mismas, se determinó el área, volumen y composición de la muestra.
2. Implementación de los ensayos de migración específica de cada polímero biodegradable con el aditivo estudiado, colorante u oleorresina, se realizó el montaje de los ensayos de migración con base en las normas colombianas y europeas establecidas para este estudio.
3. Cuantificación de la migración específica de los aditivos con las técnicas correspondientes, para el colorante se analizó por Ultravioleta Visible, donde se tomó una alícuota del simulante que estuvo en contacto con el polímero durante el tiempo y temperatura establecida y para la oleorresina de capsaicina al 20% de capsaicina se evaluó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

En el desarrollo de la metodología propuesta para el estudio de migración se utilizaron reactivos grado analítico, para la cuantificación de la capsaicina por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), solventes grado HPLC y para la cuantificación de colorante por Ultravioleta Visible, solventes grado analítico.

Equipos

Espectrofotómetro Ultravioleta Visible THERMO, GENESIS 6.

Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución HEWLETT PACKARD 1100, Desgasificador G 1322^a, Bomba Cuaternaria G 1311^a, Detector UV-VIS G1314A, Columna LC Agilent Prep-C18 Scalar; 4.6 x 250 mm, 5 µm.

pH-metro, METTLER TOLEDO, Seven Multi.

Equipo de Absorción Atómica, THERMO Electron Corporation, S Series AA Spectrometer.

Balanza analítica Precisa XT 220^a, (220 g / 0.0001 g)

Incubadora Refrigerada, PRECISION, Modelo 815.

Extrusor, THERMO Scientific, Modelo Haake PolyLab, Serie 19/25.

Digital Caliper, 0 – 150mm, Stainless Hardened.

Reactivos

Acido Acético 99-100% Glacial P.A. (Merck)
Alcohol Etilico Absoluto (Etanol) P.A. (Merck)
Capsaicin \geq 95%, from Capsicum sp. (SIGMA)
Agua al 1% de Ácido Acético, pH = 2,7

Solventes

Acetonitrilo (ACN) grado HPLC (Merck)
Cloroformo Para Análisis (Merck)
Metanol grado HPLC (Merck)

Material Polimérico

Acido Poliláctico comercial (PLA)
Polímero Biodegradable (PB)

Aditivos

Colorante comercial Verde Arcoplast base PS (Poliestireno) 1017, 2868 -
Masterbatch (ARCOLOR LTDA)
Oleorresina de capsicum 20% (CAPSAICIN)

Material de Vidrio y Plástico

Balones aforados clase A, Brand de 50, 100, 500 y 1000 mL
Erlenmeyer de 125 mL
Espátula
Papel absorbente
Pipetas aforadas clase A, Brand de 1, 5, 10, 25 y 50 mL
Pipetas graduadas clase A, Brand de 2, 5 y 10 mL
Micropipetas, 25 -250 μ L y 10 – 1000 μ L
Botellas Winkler, Wheaton 250 mL

4.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

De acuerdo con el posible uso del polímero biodegradable activo se decidió utilizar un diseño factorial de dos factores donde se probaron dos concentraciones (mínimo y máximo) de los aditivos a dos temperaturas (T° amb. y 50 $^{\circ}$ C.). El diseño experimental consistió en un 2 x 2, el cual consta de 4 experimentos por: 4 simulantes (agua, acido acético al 3%, etanol al 15% y aceite de girasol) y tres polímeros (PLA, PB y MB), dos blanco para cada muestra, más 3 repeticiones,

siendo un total de 240 experimentos. Todo esto para encontrar el efecto de la temperatura y la concentración de los aditivos sobre el empaque biodegradable y la migración de los componentes en los simulantes alimenticios de los aditivos a las diferentes concentraciones.

En la Tabla 4 se presentan los datos de los niveles escogidos para el diseño de experimentos que fueron empleados para cada uno de los materiales poliméricos nombrados anteriormente y los dos aditivos utilizados, oleorresina de capsaicina y colorante.

Tabla 4. Datos de los factores escogidos para el diseño de experimentos

Temperaturas (°C)	Concentración de Aditivos ¹ (%p/p)			
	Mínimo		Máximo	
	OLE	COL	OLE	COL
T° amb.	0,025	0,5	0,050	1,0
50 °C				

¹ Aditivos: OLE = Oleorresina, COL = Colorante

Para los diferentes niveles de concentración de los aditivos se les adicionó 100 g de polímero biodegradable, realizando este diseño para ácido poliláctico (PLA), polímero biodegradable (PB) y mezcla binaria (MB) que está compuesta por PLA (70%) + PB (30%).

El tiempo de exposición de las muestras en el diseño fue de 10 días, durante el tiempo que dura el ensayo se observó continuamente el volumen de colorante y el estado de la matriz polimérica, ya que de presentarse cambios se debía realizar el ensayo nuevamente. Las condiciones de tiempo y temperatura fueron determinadas por las normas y por las condiciones a las que se piensa someter el empaque [4, 6].

4.2.1. Obtención de películas poliméricas. Luego de establecer las condiciones para el diseño de experimentos se determinaron las condiciones para la obtención de la materia prima, el proceso de extrusión se realizó usando un extrusor de tornillo simple, en la Figura 5 se muestran fotos de este [Thermo Scientific Poly Lab OS].

Figura 5. Equipo de extrusión por tornillo simple, Laboratorio de Reología - Facultad de Ciencias Agropecuarias



Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Reología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, Popayán – Cauca. Durante el desarrollo de la parte experimental, se efectuaron algunas pruebas para el acondicionamiento de los perfiles para la obtención de las películas poliméricas. En el ANEXO A se encuentran los perfiles utilizados para los tratamientos realizados.

4.2.2. Acondicionamiento del material polimérico. Una vez obtenidas las muestras, se lavaron con agua destilada y se cortaron en trozos de tal forma que se pueda tener una muestra uniforme para cada uno de los experimentos. En la Figura 6 se observan diferentes formas de obtención del polímero.



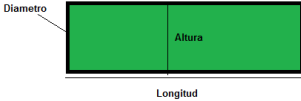
Figura 6. Diferentes cortes de polímero en forma de pelet y película.



La longitud de las diferentes muestras fue diez centímetros (10 cm), cada uno de los pedazos se pesó, se midió el diámetro para determinar el área de contacto donde se analizará el efecto de migración como se especifica en la Tabla 5. Con

el área de contacto establecida se obtuvo el volumen del filamento o cilindro a estudiar.

Tabla 5. Parámetros medidos en la materia prima.

MUESTRA	SUPERFICIE	AREA
PLA	Pelet (cilindro)	$2\pi r \times longitud$ 
PB	Pelet (cilindro)	$2\pi r \times longitud$ 
MEZCLA BINARIA	Película (lámina)	$Longitud \times Altura$ 

4.3. ENSAYO DE MIGRACIÓN ESPECIFICA

La metodología para el ensayo de migración específica de los aditivos utilizados en la matriz polimérica es la siguiente:

4.3.1. Determinación de parámetros antes del ensayo. La determinación de los parámetros mostrados en la Tabla 6 nos ayudó a hacer un seguimiento a las características del polímero antes de someterlo a condiciones extremas de simulación. Para ello se tomaron algunas medidas a cada muestra.

Tabla 6. Parámetros establecidos para el inicio del ensayo de migración específica

PARAMETROS	1	2	3
DIRECTOS	Diámetro (cm)	Peso (g)	Longitud (cm)
INDIRECTOS	Radio (cm)	Volumen (cm ³)	Densidad (g/cm ²)

Los parámetros directos fueron delimitados, por los equipos pertinentes y los parámetros indirectos son obtenidos por las formulas matemáticas establecidas,

como se muestra en el ANEXO B. Las medidas se tomaron por triplicado, para un análisis de confiabilidad.

4.3.2. Montaje para el método de inmersión total. El montaje de inmersión total está diseñado para poner en contacto la matriz polimérica, sumergiéndola completamente en 120 mL de cada simulante (Agua, Ácido Acético al 3%, Etanol al 15% y Aceite de Girasol), en frascos winkler, como se observa en la Figura 7.

Figura 7. Montaje para el método de inmersión total



El volumen del simulante se marcó para observar que no se presentaran pérdidas por volatilización.

Los experimentos fueron divididos por “LOTES” estos incluían una sola matriz polimérica ya sea PLA, PB y MB, los cuatro simulantes y una sola temperatura, luego de finalizado el tiempo de ensayo se montaba el siguiente lote de experimentos.

4.3.3. Rotulado de las muestras. El rotulado de las muestras permite un manejo ordenado de los resultados, mejorando el análisis de estos, en la Figura 8 se muestra el rótulo utilizado donde se especifica las condiciones, matriz polimérica y fecha del análisis, la nomenclatura de las muestras se realizó de la siguiente manera:

MEC-A-000

- Migración Específica del Colorante o Capsaicina: MEC
- Símbolo del simulante:
 - A = Agua*
 - B = Acido Acético al 3%*
 - C = Etanol al 15%*
 - D = Aceite de Girasol*
- Número de la muestra

Figura 8. Rotulo de los experimentos de migración específica del colorante y capsaicina.

FACENED Departamento de Química ENSAYO DE MIGRACIÓN ESPECÍFICA		COPOLIMERO PELICULA			MEC
FECHA INICIAL		D	M	A	SIMULANTE
FECHA FINAL		D	M	A	
CONDICIONES DE ENSAYO		T° AMBI	50°C		
TIPO DE ANALISIS					
<i>Ana María Perdomo C. -Victoria Eugenia Pizo P.</i>					

Finalmente es importante que se cumpla el tiempo determinado y extraer la matriz polimérica evitando la contaminación del simulante ya que es en este donde se determina la migración específica de los aditivos. Las muestras poliméricas se extrajeron con pinzas, se secaron a temperatura ambiente, se rotularon y guardaron.

4.4. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR CLAR PARA CAPSAICINA

La implementación y estandarización del método por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación y cuantificación de capsaicina se realizó de la siguiente manera.

4.4.1. Pruebas preliminares a la estandarización del método. Las pruebas tuvieron gran importancia dentro del desarrollo de la estandarización del método, las cuales son:

4.4.1.1. Optimización del modo de elución y de la fase móvil. La elección del modo de elución y la fase móvil es una parte muy importante dentro de la estandarización de un método ya que con un cambio efectivo de la fuerza de elución de la fase móvil se puede lograr una buena separación de los picos cromatográficos de interés.

- ✓ Se realizaron diversos ensayos para fijar el modo de elución y la fase móvil a utilizar en la determinación del analito a interés con base en lo reportado en la literatura [13, 30, 31, 39, 40], donde se destacaron varias etapas claves en el proceso, estas se clasificaron en: la primera elución isocrática con ACN/Agua (70:30, v/v), en la segunda se probó cambiando la fase móvil por ACN/Agua al 1% de Acido Acético (pH = 2,7) y también elución con gradiente, finalmente después de diversas pruebas se logró un óptimo tiempo de corrida de 5 min, utilizando elución isocrática con ACN/Agua al 1% de Acido Acético (80:20, v/v) que fue la tercera fase.

4.4.1.2. Optimización de la eficiencia de la columna. La optimización de velocidad lineal o flujo de la fase móvil influye en la separación de los analitos, siendo determinado en las gráficas de Van Deemter, donde se grafica la velocidad lineal (mm/s) contra altura de plato teórico (H).

- ✓ Se evaluó con una solución intermedia de 2,00 mg/L en un rango de flujo que va desde 0,80 mL/min hasta 1,00 mL/min, se realizaron mediciones por triplicado.

4.4.2. Preparación de soluciones estándar y estándares de calibración. Las soluciones preparadas para la implementación del método y cuantificación de capsaicina son descritas a continuación:

- ✓ La solución estándar de capsaicina fue preparada a partir del patrón, Capsaicin $\geq 95\%$, CAS-No. 404-86-4, a una concentración de 1000 mg/L, pesando 0,0106 g. de capsaicina, se aforó a 10 mL en ACN.
- ✓ Una solución intermedia de 50 mg/L fue preparada a partir de una dilución de 500 μ L de la solución estándar de capsaicina y luego se aforó a 10 mL en ACN, esta se preparó por triplicado.

- ✓ Los estándares de calibración se prepararon a partir de diluciones de la solución intermedia, siendo estas: 10, 20, 40, 100, 200, 600 y 1000 µL en ACN/Agua al 1% de Ácido Acético (80:20 v/v), aforado a 10 mL.

4.4.3. Parámetros de calidad para la estandarización de la técnica analítica.

Para la determinación de migración específica de capsaicina en los diferentes simulantes alimenticios utilizados en los ensayos experimentales se utilizó:

- ✓ Cromatografía Líquida de Alta Resolución, CLAR, para la identificación y cuantificación de capsaicina, en fase reversa con detección ultravioleta, a una longitud de onda de 280 nm, utilizando una columna C-18.

4.4.3.1. Método de cuantificación. Para relacionar la concentración de migración de capsaicina y colorante en los simulantes alimenticios con los diferentes niveles establecidos dentro de la curva de calibración se estableció un modelo lineal para estos datos como se representa en la Ecuación 4; en la que y es la señal medida, x es la concentración del analito, a el intercepto y b la pendiente.

$$y = a + bx$$

Ecuación 4

- ✓ Se prepararon soluciones estándar de capsaicina de concentraciones 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 3,00 y 5,00 mg/L. Las soluciones se realizaron por triplicado y a cada una de ellas se les determinó la respuesta cromatográfica 2 veces.

4.4.3.2. Evaluación de la linealidad. La linealidad se desarrolló de la siguiente forma:

- ✓ Se preparó una curva de calibración para capsaicina en el intervalo de concentraciones y condiciones empleadas para el método de cuantificación (4.4.3.1).

Se graficó la curva de calibración para establecer el intervalo lineal del método.

4.4.3.3. Límite de detección y cuantificación. El procedimiento para encontrar el límite de detección y cuantificación de capsaicina y colorante fue de la siguiente manera:

- ✓ Se realizó por medio de medidas repetidas de la curva de calibración de capsaicina estableciendo así el intercepto y la pendiente de cada una de ellas.

4.4.3.4. Precisión

Repetibilidad. El estudio de repetibilidad se realizó de la siguiente manera:

- ✓ Se realizaron mediciones de los estándares de calibración de capsaicina correspondientes a los 7 niveles de concentración, durante el mismo día. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Precisión intermedia. Para evaluar la precisión intermedia se hizo el siguiente procedimiento:

- ✓ Se realizaron mediciones de los estándares de calibración de capsaicina correspondientes a los 7 niveles de concentración, durante 6 días diferentes. Las mediciones se realizaron por triplicado.

4.5. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR UV PARA COLORANTE

La implementación y estandarización del método por ultravioleta visible para la determinación y cuantificación de colorante se realizó de la siguiente manera.

4.5.1. Selección de la longitud de onda por UV. La selección de la longitud de onda para el colorante se hizo con el objetivo de escoger la máxima absorbancia y obtener la longitud de onda a la cual se va a cuantificar.

- ✓ Se realizó una solución intermedia de 500 mg/L, 0,05g de colorante se disolvieron en 20 mL de cloroformo y se aforó a 100 mL. El barrido fue en un rango de 400 a 800 nm.

4.5.2. Preparación de soluciones estándar y estándares de calibración. Las soluciones preparadas para la implementación del método y cuantificación de colorante son descritas a continuación:

- ✓ La solución estándar de colorante se preparó a partir del colorante, a una concentración de 1000mg/L, pesando 0,1 g. de colorante, se aforó a 10 mL en cloroformo.

- ✓ Los estándares de calibración se prepararon a partir de diluciones de la solución estándar, tomando volúmenes de 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 5 mL, aforándolos a 10 mL en cloroformo.

4.5.3. Parámetros de calidad para la estandarización de la técnica analítica.

Para la determinación de migración específica de colorante en los diferentes simulantes alimenticios utilizados en los ensayos experimentales se utilizó:

- ✓ Ultravioleta Visible, UV, a una longitud de 645 nm.

4.5.3.1. Método de cuantificación. Para la cuantificación de colorante, se establecieron los siguientes niveles de concentración para la curva de calibración.

- ✓ Las soluciones estándar de colorante tenían concentraciones de 0, 10, 50, 100, 200, 300 y 500 mg/L. Estas se realizaron por triplicado y a cada una de ellas se les determinó la respuesta en el ultravioleta.

4.5.3.2. Evaluación de la linealidad. La linealidad se desarrolló de la siguiente manera:

- ✓ Se trabajaron con soluciones del colorante comercial asumiendo el 100% de pureza. La curva de calibración se preparó de acuerdo con el método de cuantificación (4.5.3.1).

Se graficó la curva de calibración para establecer el intervalo lineal del método.

4.5.3.3. Límite de detección y cuantificación. El procedimiento para encontrar el límite de detección y cuantificación de capsaicina y colorante fue de la siguiente manera:

- ✓ Se calculó el límite de detección (LD) realizando diferentes soluciones de los blancos de los polímeros (PLA, PCL y MB), se diluyó en 10 mL de cloroformo. Se midió diez veces a 645nm y se obtuvo la desviación estándar de la señal de cada blanco. Para el límite de cuantificación (LC), se multiplicó por 10 el valor encontrado anteriormente para la relación señal/ruido.

4.5.3.4. Precisión

Repetibilidad. El estudio de repetibilidad se realizó de la siguiente manera:

- ✓ Se realizaron lecturas de los estándares de calibración de colorante en un rango de 10 a 500 mg/L, realizando un triplicado durante el mismo día.

Precisión intermedia. Para evaluar la precisión intermedia se hizo el siguiente procedimiento:

- ✓ Se realizaron lecturas de los estándares de calibración de colorante en un rango de 10 a 500 mg/L, durante 6 días diferentes, por triplicado.

4.6. DETERMINACIÓN DE MIGRACIÓN GLOBAL PARA COLORANTE POR GRAVIMETRÍA

- ✓ Para determinar el porcentaje de migración global por gravimetría para colorante en las matrices poliméricas PLA y PCL, se tuvieron en cuenta los parámetros directos nombrados en la Tabla 6 al inicio del montaje de experimentos para compararlos al final de los resultados. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$\Delta P = P_i - P_f$	Ecuación 5
------------------------	-------------------

$\%MG = \frac{\Delta P}{P_i} \times 100$	Ecuación 6
--	-------------------

Donde,
 P_i = Peso inicial
 P_f = Peso final
 ΔP = Diferencia entre pesos
 $\%MG$ = Porcentaje de migración global

También se elaboraron diferentes curvas de calibración a partir de la disolución del polímero con el colorante como aditivo, en 10 mL de cloroformo, utilizando un rango de concentraciones de 50, 100, 150, 200, 300 mg/L, estas curvas determinaron la homogenización de la materia prima.

4.7. ESTUDIO DE MIGRACIÓN ESPECÍFICA DE CAPSAICINA Y COLORANTE

Para el análisis y cuantificación de los aditivos en las muestras se planteó inicialmente el estudio de los blancos de cada muestra a analizar para luego compararlos con cada una de las muestras programadas.

4.7.1. Análisis de blancos. Para determinar que a la longitud de onda establecida para la cuantificación de los compuestos, capsaicina y colorante, no habrían interferencias de los solventes y simulantes utilizados, se estableció el análisis de diferentes blancos involucrados durante el proceso de estandarización de las técnicas y cuantificación de los compuestos.

Capsaicina

- ✓ Blanco de fase móvil: Se hicieron 10 inyecciones de la fase móvil ACN/Agua al 1% de Ácido Acético a las mismas condiciones de análisis.
- ✓ Blanco de simulante: Cada uno de los 4 simulantes se sometió a las mismas condiciones del ensayo de migración para los experimentos.
- ✓ Blanco de matriz: Este blanco consta del simulante + la matriz polimérica sin aditivo, también se sometió a las mismas condiciones de ensayo de migración.

Colorante

- ✓ Blanco de solvente: Se midió cloroformo a la misma longitud de onda establecida para el análisis.
- ✓ Blanco de simulante: Cada uno de los 4 simulantes se sometió a las mismas condiciones del ensayo de migración para los experimentos.
- ✓ Blanco de matriz: Este blanco consta del simulante + la matriz polimérica sin aditivo, también se sometió a las mismas condiciones de ensayo de migración.

4.7.2. Cuantificación de capsaicina por CLAR

- ✓ Cuantificación de capsaicina en los simulantes acuosos

Finalizado el tiempo del ensayo de migración 20 µL de los tres simulantes acuosos fueron inyectados directamente a las condiciones cromatográficas ya establecidas en la implementación del método.

- ✓ Cuantificación de capsaicina en el simulante graso

La extracción de la capsaicina en el aceite de girasol se hizo por medio de extracción líquido – líquido con ACN, con esto se determinaron los porcentajes de recuperación.

Para evaluar los porcentajes de recuperación obtenidos de las extracciones se prepararon muestras preliminares de 0,01 y 0,05% de patrón de capsaicina y

oleorresina de capsaicina en 120 mL de aceite de girasol, se tomaron 10 mL de aceite y se extrajo con 3 mL de ACN, durante 10 minutos de agitación constante. Luego se inyectó en el cromatógrafo de líquidos.

4.7.2.1. Diseño experimental de la optimización del procedimiento. De acuerdo con el diseño de experimentos planteado en 4.2, la Tabla 7 muestra los factores evaluados, en todos los experimentos el volumen de inyección fue de 20 μ L. Este procedimiento se aplicó de igual forma para los cuatro simulantes, 3 polímeros y dos temperaturas estudiadas.

Tabla 7. Diseño experimental evaluado para el estudio de migración específica de capsaicina

Factores		
Experimentos	[]	T°
1	+	+
2	-	+
3	-	-
4	+	-

4.7.3. Cuantificación de colorante por UV. Se tomó una alícuota de cada simulante, el cual estaba en contacto con el polímero biodegradable, en el tiempo y temperatura establecida por la metodología del ensayo de migración, se determinó la absorbancia a la longitud de onda encontrada, realizándolo por triplicado. La determinación de la señal de absorbancia se realizó para cada una de las muestras en los diferentes simulantes y las dos temperaturas.

Este procedimiento se realizó también a las muestras de los blancos sometidas al mismo ensayo pero sin matriz polimérica, los datos de la absorbancia fueron restados a las muestras.

4.7.3.1. Diseño de experimentos y manejo estadístico de los datos. Se realizó un tratamiento estadístico de datos con las respuestas obtenidas del diseño de experimento planteado en 4.2 para cada muestra de los ensayos de migración específica del colorante, utilizando el programa estadístico SPSS, aplicando ANOVA para cada ensayo, se estudiaron los efectos de los factores de temperatura (T° amb, 50 °C) sobre las absorbancias de las muestras experimentales para encontrar las interacciones con las variables dependientes e

independientes, temperatura y concentración del colorante, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Diseño experimental evaluado para el estudio de migración específica de colorante

Factores		
Experimentos	[]	T°
1	+	+
2	-	+
3	-	-
4	+	-

5. DATOS Y RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto.

5.1. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR CLAR PARA CAPSAICINA

Para la implementación y estandarización del método para la determinación de capsaicina obtuvimos los siguientes resultados.

5.1.1. Pruebas preliminares a la implementación del método. Durante esta fase se logró optimizar el modo de elución y flujo.

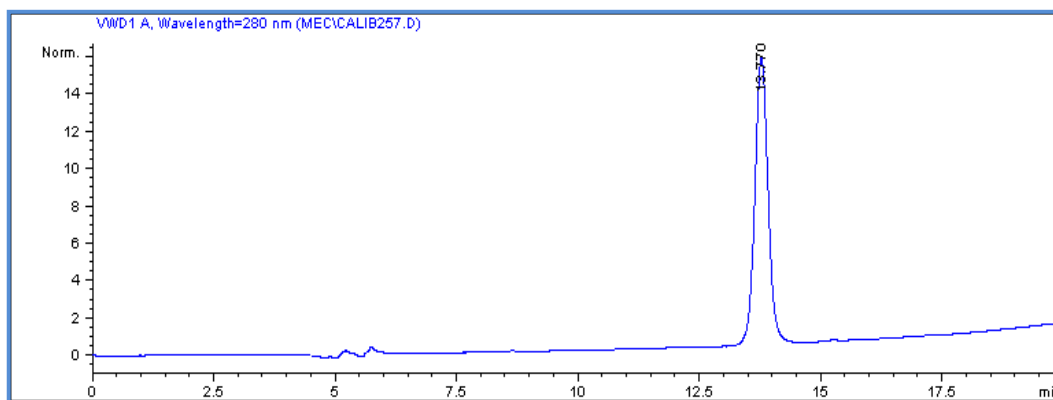
5.1.1.1. Optimización del modo de elución y la fase móvil. Teniendo en cuenta la solubilidad del patrón de capsaicina se trabajaron tres fases experimentales que se tuvieron en cuenta para la elección del modo de elución y la fase móvil, estas fueron elución isocrática ACN/Agua (70:30 v/v), elución con gradiente ACN/Agua al 1% de Ácido Acético y finalmente elución isocrática ACN/Agua al 1% de Ácido Acético (80:20 v/v), pH = 2,7.

✓ **Elución isocrática ACN/Agua (70:30 v/v).** Al trabajar con esta fase móvil se logró un tiempo de corrida de 20 min, con una post-corrida de 10 min. Con esta fase móvil no se logró encontrar un flujo óptimo, ya que los compuestos quedaban atrapados en la columna corrida tras corrida. Los tiempos de retención variaron de 10 a 15 min, Figura 9, dependiendo del flujo utilizado, a flujos pequeños el tiempo de retención tuvo un considerable aumento y a flujos altos el compuesto tuvo poca interacción con la columna, provocando una salida rápida del compuesto a interés y un solapamiento de los picos.

Pero el enorme problema que se encontró al trabajar con esta fase móvil, fue la acumulación de compuestos luego de varias corridas, lo que ocasionó gasto de reactivos en la limpieza de la columna luego de algunas corridas.

Figura 9. Cromatograma elución isocrática ACN/Agua (70:30 v/v)

Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B
1	0	30	70



- ✓ **Elución con gradiente ACN/Agua al 1% de ácido acético.** Para mejorar las condiciones cromatográficas y la elución del compuesto a interés, se disminuyó la polaridad de la fase móvil con agua al 1% de ácido acético cuyo pH era 2,7, la relación fue (80:20 v/v). Al mismo tiempo se implementó la elución con gradiente para lograr un menor tiempo de retención y una mejor separación del compuesto, en la Figura 10 y 11, se observan los gradientes utilizados para la separación del compuesto.

Figura 10. Cromatogramas elución con gradiente ACN/Agua al 1% Ac. Acético (80:20 v/v)

Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B
1	0	40	60
1	1	35	65
1	2	30	70
1	3	25	75
1	6	20	80

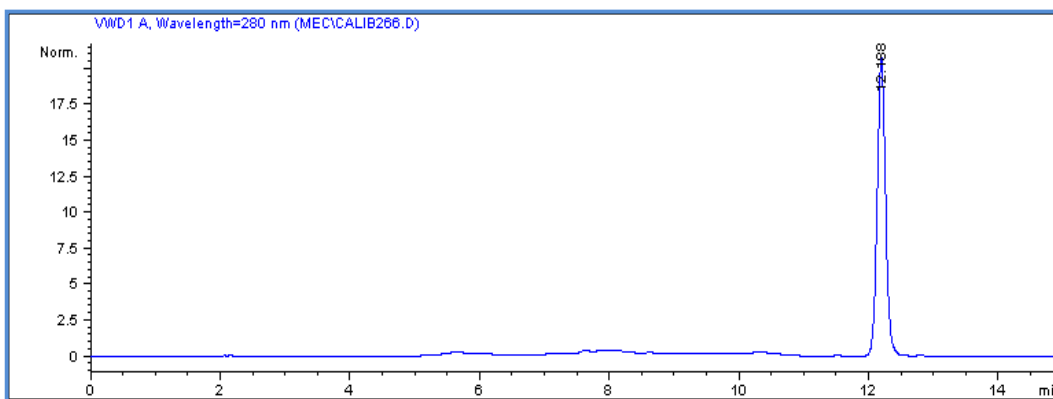
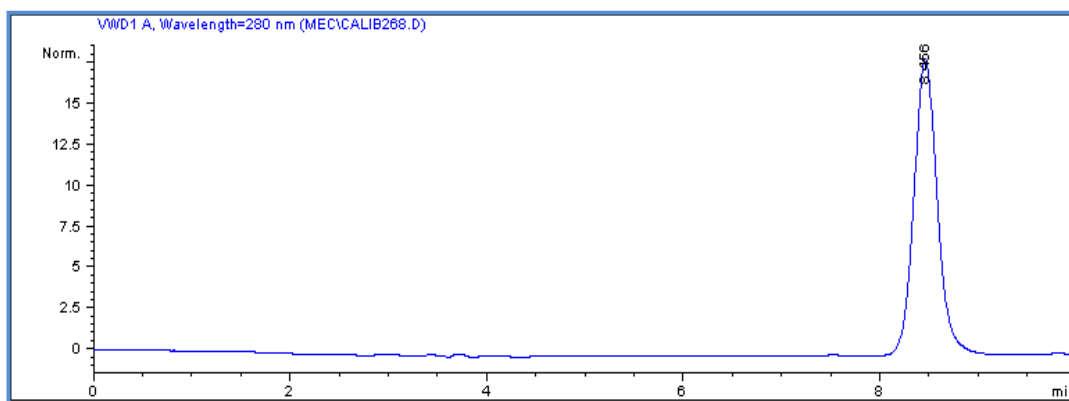


Figura 11. Cromatogramas elución con gradiente ACN/Agua al 1% Ac. Acético (80:20 v/v)

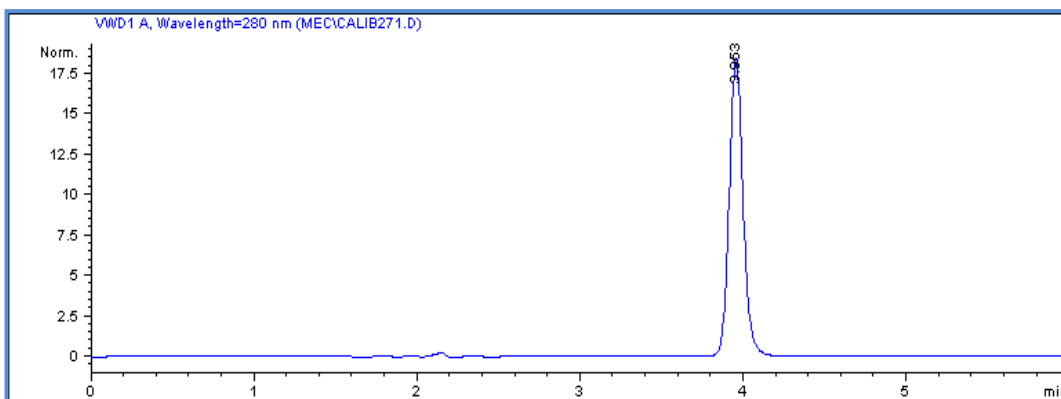
Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B
1	0	20	80
1	6	30	70



- ✓ **Elución isocrática ACN/Agua al 1% de ácido acético (80:20 v/v).** Finalmente se obtuvo un tiempo de corrida óptimo de 5 min con un tiempo de retención de 4,4 min, logrando que los compuestos fueran eluidos completamente al finalizar la corrida, evitando así el gasto de solvente.

Figura 12. Cromatograma elución isocrática ACN/Agua al 1% Ac. Acético (80:20 v/v)

Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B
1	0	20	80



Al analizar el proceso realizado a través de las tres fases de elección del modo de elución y fase móvil, se puede hablar de un gradiente simultáneo de pH y solvente orgánico (off line), donde se aumentó la cantidad de ACN y se disminuyó el pH, ocasionando una disminución en el tiempo de retención del analito. Esto es asumido ya que durante la elución de la forma ionizada de un analito, la retención es muchas veces más baja cuando esta expuesto a un eluyente fuerte (bajo pH, alto contenido de ACN); caso contrario a la elución de un analito en su forma no ionizada, que tienen una retención más grande. Este tema de la influencia del pH en la retención de analitos en cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) ha sido extensivamente estudiado [38, 39, 40].

5.1.1.2. Optimización de la eficiencia de la columna. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para graficar la curva de Van Deemter fueron:

Tabla 9. Parámetros curva de Van Deemter

Parámetro	Unidad	Símbolo
Flujo de la fase móvil	mL/min	F_c
Velocidad Lineal	mm/s	μ
Tiempo de retención	min	t_r
Ancho de Pico	min	w
Número de platos teóricos	-	N
Altura de plato teórico	-	H
Longitud de la columna	mm	L

Inicialmente se comenzó a variar el flujo de la fase móvil desde 0,2 hasta 1,4 mL/min con intervalos de 0,2 mL/min, pero no se logró diferenciar una disminución en el ancho de pico, a flujos pequeños se observó un considerable aumento en el tiempo de análisis y con flujos altos se presentó un gran aumento en la presión de la columna, desestabilizando así los parámetros de separación. A partir de estos resultados se disminuyó el rango de flujo desde 0,8 hasta 1,1 mL/min, haciendo este más cercano a la eficiencia esperada por la columna, también se disminuyeron los intervalos a 0,05 mL/min. Finalmente al graficar velocidad lineal (μ) contra altura de plato teórico (H) se logró determinar que el mínimo corresponde a un flujo de fase móvil de 0,9 mL/min, el cual pertenece a 1,485 mm/s en la curva graficada. En la Tabla 10 están los valores de las velocidades lineales y altura de plato teórico y en la Gráfica 1 la representación de la curva de

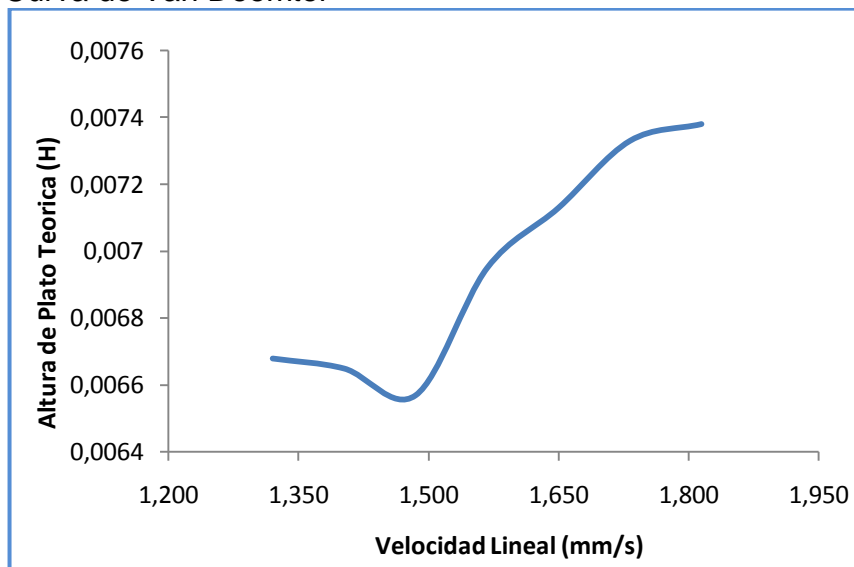
Van Deemter, los cálculos de los resultados experimentales se encuentran en el ANEXO C.

Para graficar la curva de Van Deemter fue necesario encontrar μ y H.

Tabla 10. Velocidad lineal y altura de plato teórico

μ (mm/s)	H	s	% CV
1,320	0,00668	$2,09 \times 10^{-4}$	3,23
1,403	0,00665	$1,33 \times 10^{-5}$	0,19
1,485	0,00657	$6,11 \times 10^{-5}$	0,93
1,568	0,00695	$2,63 \times 10^{-4}$	3,78
1,650	0,00713	$6,13 \times 10^{-5}$	0,86

Gráfica 1. Curva de Van Deemter



5.1.2. Preparación de soluciones estándares y estándares de calibración. La preparación de soluciones estándar y estándares de calibración para colorante y capsaicina con sus concentraciones reales aparecen en el ANEXO E.

5.1.3. Parámetros de calidad para la estandarización de la técnica analítica. A continuación se muestran los parámetros de calidad para la implementación del método.

5.1.3.1. Método de cuantificación. El método empleado para la cuantificación de capsaicina y colorante fue la curva de calibración:

✓ **Curva de Calibración**

Las concentraciones y sus respectivas áreas para la cuantificación de capsaicina se presentan en la Tabla 11, junto con la desviación estándar y coeficientes de variación para cada nivel.

Tabla 11. Curva de calibración para capsaicina

Nivel de Concentración (NC)	Concentración (mg/mL)	Área Promedio (mAU)	Desviación Estándar (s)	Coefficiente de Variación (% CV)
1	0,05	2,745	0,067	2,454
2	0,10	3,279	0,102	3,118
3	0,20	4,492	0,124	2,756
4	0,50	8,490	0,107	1,256
5	1,00	15,575	0,431	2,765
6	3,00	43,432	0,729	1,679
7	5,00	71,471	1,409	1,971

5.1.3.2. Evaluación de la linealidad. Se midió la linealidad del sistema para relacionar la concentración de capsaicina a los diferentes niveles establecidos con respecto a la respuesta cromatográfica por CLAR y demostrar la capacidad del método para obtener resultados lineales.

Con el fin de establecer si los datos experimentales obtenidos presentan una tendencia gráfica lineal y que el coeficiente de correlación presenta valores diferentes de cero, se determina estadísticamente si se presenta una correlación significativa por medio de una prueba *t student* de dos colas, $\alpha = 0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad. Para este caso tenemos las siguientes hipótesis:

Hipótesis Nula (H_0): No existe correlación lineal entre “x” y “y” ($t_r < t_t$)

Hipótesis Alternativa (H_1): Existe correlación lineal entre “x” y “y” ($t_r > t_t$)

El contraste t demostró que t calculado (211,23) es mayor que t tabulado (1,68), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se concluye que hay correlación entre la concentración y la respuesta cromatográfica.

Gráfica 2. Linealidad para capsaicina

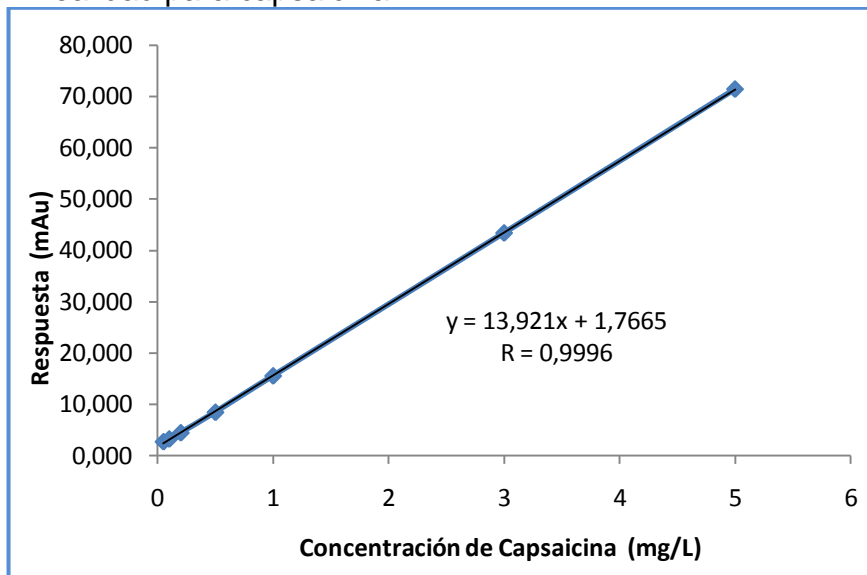


Tabla 12. Pruebas estadísticas para linealidad de capsaicina

Pruebas Estadísticas ⁽¹⁾	Símbolo	Valor
Coeficiente de correlación	r	0,9996
Intercepto	a	0,7148
Pendiente	b	13,9208
Desviación estándar para el intercepto	s_a	0,2597
Desviación estándar para la pendiente	s_b	0,1156
Test estadístico para el coeficiente de correlación ⁽²⁾	t_r	211,23
Test estadístico para el intercepto ⁽²⁾	t_a	2,753
Test estadístico para la pendiente ⁽²⁾	t_b	53,611

¹ Número total de ensayos $N = 42$, número total de niveles $k = 7$, número de réplicas por nivel $m = 6$

² Valor de $t_{tabla} = 1,68$ para $n-2$ gl y 95% de confianza.

Luego de comprobar que los datos presentan una tendencia lineal se busca la recta que minimice las desviaciones de la señal cromatográfica (y) entre los puntos experimentales y los analizados (x), utilizando el método de los mínimos cuadrados. De acuerdo con esto la recta calculada presenta intercepto y

pendiente, para los cuales se establece su significancia estadística. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Para el intercepto se plantean las siguientes hipótesis:

(H₀): El intercepto no es significativamente diferente de cero ($t_a < t_t$)

(H₀): La pendiente no es significativamente diferente de cero ($t_b < t_t$)

Para la pendiente e intercepto el criterio de aceptación establece que el valor de t tabulado debe ser menor que t calculado, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula para los dos casos y se concluye que tanto “a” como “b” son significativamente diferentes de cero.

Tabla 13. Límites de confianza para el intercepto y la pendiente

Resultados de Regresión	Límites de Confianza	
Intercepto “a”	1,152	0,2776
Pendiente “b”	14,1155	13,7261

Los límites de confianza con un nivel de confianza de 95 % para el intercepto y la pendiente en la medición de la linealidad del sistema se muestran en la Tabla 13.

5.1.3.3. Límite de detección y de cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación encontrados para la metodología desarrollada se basan en los datos estadísticos de la curva de calibración encontrados en la Tabla 14.

Tabla 14. Parámetros para determinar LD y LC

Parámetro	Símbolo	Valor
Señal del blanco promedio	\bar{S}_{bl}	1,8538
Desviación estándar del blanco	S_{bl}	0,1855
Múltiplo de la desviación estándar	k	3; 10
Pendiente	m	13,9467

Al reemplazar estos datos en las ecuaciones 2 y 3 se tiene

Tabla 15. LD y LC para capsaicina

Compuesto	Límite de Detección	Límite de Cuantificación
Capsaicina	0,0303 mg/L	0,1011 mg/L

El límite de detección y cuantificación se determinó en un rango de concentraciones desde 0,05 hasta 5 mg/L. El valor del LC está sobre el segundo nivel de concentración de la curva de calibración, lo que indica que el primer nivel de concentración 0,05 mg/L esta fuera del rango dinámico, pero se decidió conservar este nivel para determinar si las muestras analizadas arrojarían resultados por debajo del límite de cuantificación y además la linealidad de la curva permitió conservarlo. Por otra parte si se analizan los dos niveles de concentración de oleoresina de capsaicina en los polímeros 208 y 416 mg/L, se puede concluir que el método es apropiado para cuantificar la migración de capsaicina en los diferentes simulantes alimenticios. En el ANEXO F se encuentran los datos de la curva de calibración utilizada y su tratamiento estadístico, para la determinación del límite de detección y cuantificación.

5.1.3.4. Precisión.

✓ *Repetibilidad y precisión intermedia*

Prueba de Shapiro-Wilk

Se aplicó el estadístico de Shapiro-Wilk para comprobar de la normalidad de los datos, en la Tabla 16 se encuentran los valores encontrados de W_{cal} para repetibilidad y precisión intermedia.

Tabla 16. Estadístico de Shapiro-Wilk para repetibilidad y precisión intermedia

NC	Repetibilidad		Precisión Intermedia	
	Estadístico	Significancia	Estadístico	Significancia
1	0,843	0,139	0,910	0,437
2	0,902	0,384	0,844	0,140
3	0,917	0,484	0,980	0,952
4	0,873	0,240	0,907	0,420
5	0,852	0,164	0,887	0,301
6	0,954	0,769	0,825	0,097
7	0,911	0,445	0,937	0,637

Para lo anterior se plantean las siguientes hipótesis:

(H₀): Los datos provienen de una distribución normal ($W_{\text{calc}} < W_{\text{tab}}$)

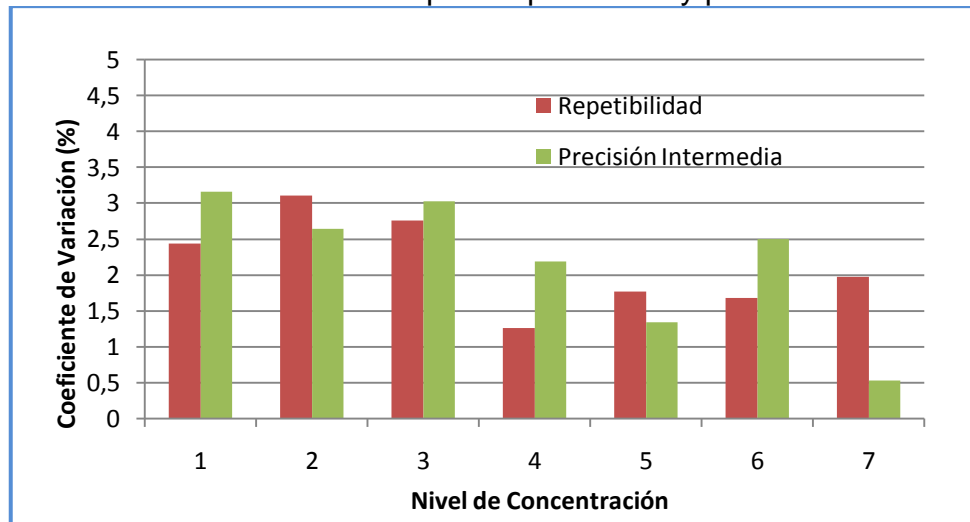
(H₁): Los datos no provienen de una distribución normal ($W_{\text{calc}} > W_{\text{tab}}$)

Siendo el $W_{\text{tab}} = 0,981$ mayor que el W_{calc} para un número de grados de libertad de 6 en todos los niveles de concentración para repetibilidad y precisión intermedia, se acepta la hipótesis de normalidad, con un 95% de confianza.

Luego de determinar la normalidad en los datos se analizaron los coeficientes de variación de las mediciones realizadas para los estudios de repetibilidad y precisión intermedia entre los intervalos de tiempo establecidos.

En la Grafica 3 se presentan los resultados tanto de repetibilidad como de precisión intermedia y se observa los coeficientes de variación para los primeros tres niveles de concentración son mayores que para los otros niveles; este hecho puede ser atribuido a las bajas concentraciones de la curva de calibración, en general la técnica mostró coeficientes de variación por debajo del 5%.

Gráfica 3. Coeficientes de variación para repetibilidad y precisión intermedia



Comparación de dos medias experimentales

Se realizó la prueba t para comparar diferencias significativas entre los resultados obtenidos para repetibilidad y precisión intermedia, para este caso tenemos las siguientes hipótesis:

(H₀): Las dos medias no se diferencian significativamente ($t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$)

(H₁): Las dos medias se diferencian significativamente ($t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$)

Tabla 17. Prueba t student para repetibilidad y precisión intermedia

NC	t _{calc}
1	0,770
2	0,274
3	0,225
4	0,363
5	0,020
6	1,033
7	0,297

El valor de $t_{tab} = 2,18$ para 12 grados de libertad y un 95% de confianza, se acepta la hipótesis nula comprobando que no hay diferencias significativas entre las curvas de calibración para repetibilidad y precisión intermedia.

Condiciones establecidas para la cuantificación de capsaicina

- ✓ En la determinación y la cuantificación de capsaicina, se establecieron las siguientes condiciones experimentales mostradas en la Tabla 18.

Tabla 18. Condiciones cromatográficas para la determinación de capsaicina.

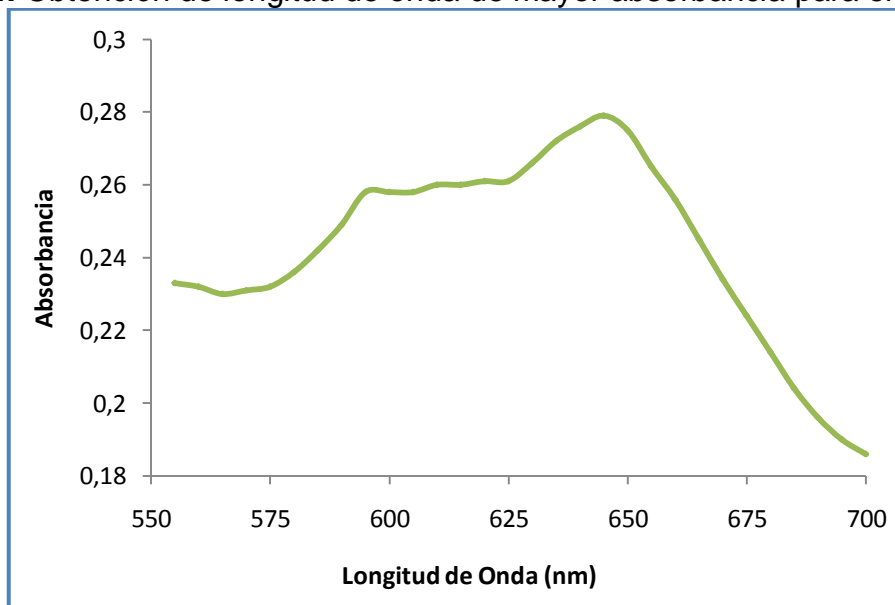
PARAMETRO	CARACTERISTICAS
Detección	Ultravioleta Visible, $\lambda = 280\text{nm}$
Elusión	Isocrática
Temperatura	Ambiente
Flujo	0,9 mL/min
Volumen de Inyección	20 μL
Columna	Agilent Prep-C18 Scalar; 4.6 x 250 mm, 5 μm .
Fase Móvil	ACN : Buffer Acetato 1% pH = 2.713
Tiempo de Retención	4,4 min
Tiempo total de la corrida	5 min

5.2. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO POR UV PARA COLORANTE

Para la implementación y estandarización del método para la determinación de colorante obtuvimos los siguientes resultados.

5.2.1. Selección de la longitud de onda por UV. Los datos del barrido para la determinación de la longitud de onda se muestran en la Tabla D1 presentada en el ANEXO D, la gráfica absorbancia vs longitud de onda nos indica que la longitud de onda apropiada para la cuantificación del colorante es 645nm, por ser la longitud de onda en la que se reporta que hay una máxima absorbancia. (Gráfica 4).

Gráfica 4. Obtención de longitud de onda de mayor absorbancia para el colorante.



5.2.2. Parámetros de calidad para la estandarización de la técnica analítica. A continuación se muestran los parámetros de calidad para la implementación del método.

5.2.2.1. Método de cuantificación. El método empleado para la cuantificación de capsaicina y colorante fue la curva de calibración:

✓ **Curva de Calibración**

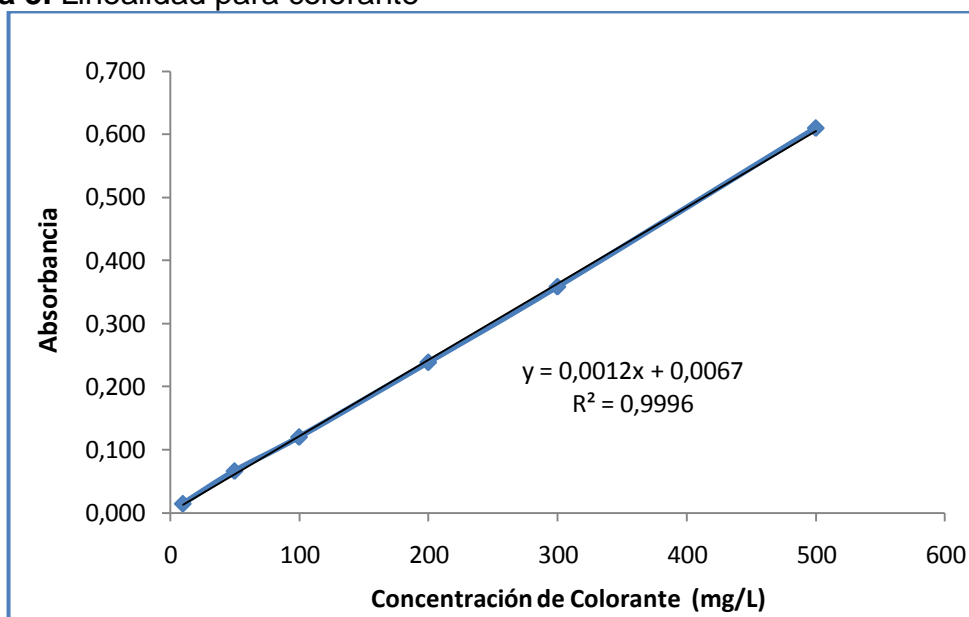
La curva de calibración del colorante se determinó con las concentraciones y señal de absorbancias presentadas en la Tabla 19, con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 19. Curva de calibración para colorante

Nivel de concentración (NC)	Concentración (mg/mL)	Señal promedio	Desviación Estándar (s)	Coefficiente de Variación (% CV)
1	10	0,015	0,0025	5,045
2	50	0,066	0,0053	3,968
3	100	0,120	0,0031	2,563
4	200	0,239	0,0033	1,380
5	300	0,359	0,0033	0,933
6	500	0,610	0,0082	1,336

5.2.2.2. Evaluación de la linealidad. Se examinaron la serie de concentraciones en la curva de calibración, para comprobar la linealidad del sistema determinando un coeficiente de correlación positivo, para establecer una relación entre la concentración de colorante y la absorbancia obtenida.

Gráfica 5. Linealidad para colorante



Con el fin de establecer si los datos experimentales obtenidos presentan una tendencia gráfica lineal y que el coeficiente de correlación presenta valores diferentes de cero, se determina estadísticamente si se presenta una correlación significativa por medio de una prueba *t student* de dos colas, $\alpha = 0,05$ y (n-2) grados de libertad. Para este caso se tienen las siguientes hipótesis:

(H₀): No existe correlación lineal entre “x” y “y” ($t_r < t_t$)

(H₁): Existe correlación lineal entre “x” y “y” ($t_r > t_t$)

El contraste t demostró que t calculado (246,99) es mayor que t tabulado (1,67), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se concluye que hay correlación entre la concentración y la absorbancia.

Tabla 20. Pruebas estadísticas para linealidad de colorante

Parámetro	Símbolo	Valor
Coefficiente de correlación	r	0,9996
Intercepto	a	0,0067
Pendiente	b	0,0012
Desviación estándar para el intercepto	s_a	0,0017
Desviación estándar para la pendiente	s_b	1×10^{-5}
Test estadístico para el coeficiente de correlación ⁽²⁾	t_r	246,99
Test estadístico para el intercepto ⁽²⁾	t_a	3,890
Test estadístico para la pendiente ⁽²⁾	t_b	1,702

¹ Número total de ensayos $N = 54$, número total de niveles $k = 6$, número de réplicas por nivel $m = 9$

² Valor de $t_{tabla} = 1,67$ para $n-2$ gl y 95% de confianza.

Luego de comprobar que los datos presentan una tendencia lineal se busca la recta que minimice las desviaciones de la absorbancia (y) entre los puntos experimentales y los analizados (x), utilizando el método de los mínimos cuadrados. De acuerdo con esto la recta calculada presenta intercepto y pendiente, para los cuales se establece su significancia estadística. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 20.

Para el intercepto se plantean las siguientes hipótesis:

(H₀): El intercepto no es significativamente diferente de cero ($t_a < t_t$)

(H₀): La pendiente no es significativamente diferente de cero ($t_b < t_t$)

Para la pendiente e intercepto el criterio de aceptación establece que el valor de t tabulado debe ser menor que t calculado, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula para los dos casos y se concluye que tanto “a” como “b” son significativamente diferentes de cero.

Por último se verificaron los límites de confianza de la pendiente, los cuales están dados por $b \pm t_{(n-2)}Sb$ y los límites de confianza para la ordenada en el origen vienen dados por $a \pm t_{(n-2)}Sa$.

Los resultados de los límites de confianza de la pendiente y la ordenada, muestran que la curva de calibración puede ser utilizada para el procedimiento de cuantificación del colorante, en los ensayos de migración.

Tabla 21. Límites de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen

Intercepto "a"	Pendiente "b"
0,0067±0,0029	0,0012± 1x10 ⁻⁵

5.2.2.3. Límite de detección y cuantificación. Los parámetros para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación para las tres matrices poliméricas se encuentran en la Tabla 22, donde se observa que la MB tiene una mayor señal que las otras matrices.

Tabla 22. Parámetros para determinar LD y LC

Parámetro	Símbolo	Valor		
		PLA	PB	MB
Señal del blanco promedio	\bar{S}_{bl}	0,00370	0,00690	0,00730
Desviación estándar del blanco	S_{bl}	0,00048	0,0006	0,00048
Múltiplo de la desviación estándar	k	3;10		
Pendiente	m	0,001		

Con las ecuaciones 2 y al remplazar en 3 arroja los resultados de la Tabla 23

Tabla 23. LD y LC para el colorante

Compuesto	Límite de Detección (mg/L)			Límite de Cuantificación (mg/L)		
	PLA	PB	MB	PLA	PB	MB
Colorante	7,140	10,000	10,740	14,900	10,500	14,100

De acuerdo con la cantidad de colorante adicionado en los polímeros biodegradables donde el nivel máximo era de 500 mg/L de colorante como aditivo, se observó que la técnica utilizada es óptima, porque los límites de cuantificación son de 10 mg/L, esto precisa alta sensibilidad en la técnica para determinar la

migración del colorante en diferentes matrices poliméricas. Esta estabilidad del colorante da respuesta sobre si el colorante tendría la capacidad de migrar fuera de la matriz polimérica y así tener consecuencias negativas en el empaque final.

Al utilizar este colorante como materia prima para un empaque que esté en contacto con alimentos, se puede concluir que su estabilidad proporciona la seguridad de que no cambiará las cualidades del alimento.

Así mismo, se comprobó que la estandarización de la metodología fue apropiada, al realizar ensayos en cada una de las materias primas por separado y la MB con el colorante, el uso de los diferentes simulantes determinó los parámetros en los cuales se analizaron los diferentes ambientes donde el empaque podría estar en contacto.

5.2.2.4. Precisión

✓ **Repetibilidad y precisión intermedia para colorante**

Prueba de Shapiro-Wilk

Se aplicó el estadístico de Shapiro-Wilk para comprobar de la normalidad de los datos de repetibilidad y precisión intermedia, en la Tabla 24 se encuentran los valores encontrados de W_{cal} para las curvas de calibración realizadas.

Para la anterior prueba se plantean las siguientes hipótesis

(H₀): Los datos provienen de una distribución normal ($W_{calc} < W_{tab}$)

(H₁): Los datos no provienen de una distribución normal ($W_{calc} > W_{tab}$)

Siendo el $W_{tab} = 0,978$ mayor que el W_{calc} para un número de grados de libertad de 9 en todos los niveles de concentración para repetibilidad, se acepta la hipótesis de normalidad, con un 95% de confianza.

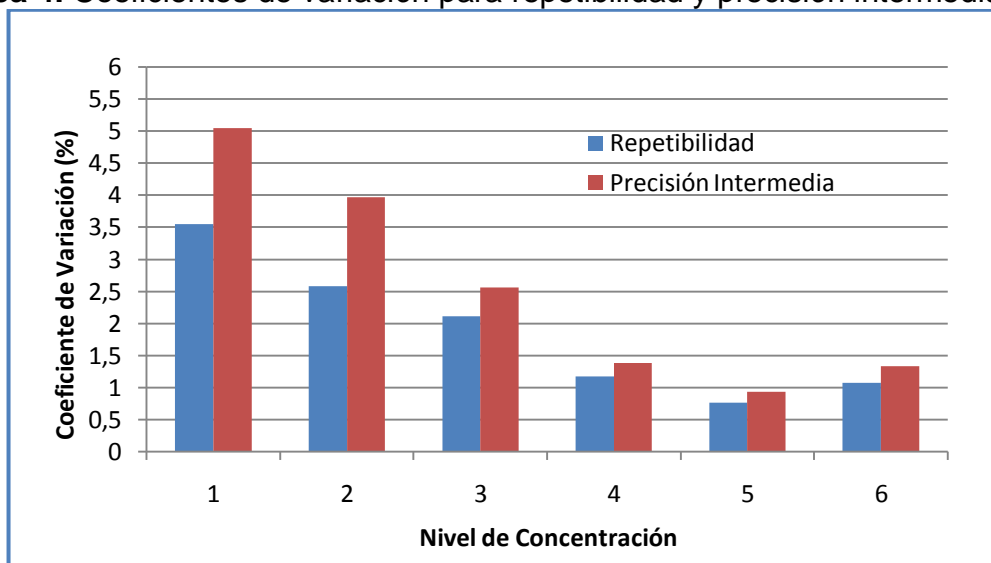
Tabla 24. Estadístico de Shapiro-Wilk para repetibilidad y precisión intermedia

NC	Repetibilidad		Precisión Intermedia	
	Estadístico	Significancia	Estadístico	Significancia
1	0,617	0,000	0,684	0,000
2	0,777	0,011	0,733	0,000
3	0,875	0,140	0,857	0,011
4	0,810	0,027	0,853	0,009
5	0,642	0,000	0,597	0,000
6	0,858	0,091	0,723	0,000

Por otra parte siendo el $W_{\text{tab}} = 0,982$ mayor que el W_{calc} para un número de grados de libertad de 18 en todos los niveles de concentración para precisión intermedia, se acepta la hipótesis de normalidad, con un 95% de confianza.

La precisión intermedia para el colorante presenta coeficientes de variación en el estándar de 10 mg/L más grandes en comparación con los otros niveles de la curva de calibración, determina que la precisión para este rango es baja, esto se debe a estar debajo del límite de cuantificación donde el método es poco sensible. En la Grafica 4 se presentan los resultados tanto de repetibilidad como de precisión intermedia.

Gráfica 4. Coeficientes de variación para repetibilidad y precisión intermedia



Comparación de dos medias experimentales

Se realizó una prueba t para comparar diferencias significativas entre los resultados obtenidos para repetibilidad y precisión intermedia, para este caso tenemos las siguientes hipótesis:

(H₀): Las dos medias no se diferencian significativamente ($t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$)

(H₁): Las dos medias se diferencian significativamente ($t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$)

El valor de $t_{\text{tab}} = 2,23$ para 10 grados de libertad y un 95% de confianza, se acepta la hipótesis nula comprobando que no hay diferencias significativas entre las curvas de calibración para repetibilidad y precisión intermedia.

Tabla 25. Prueba t student para repetibilidad y precisión intermedia

NC	t _{calc}
1	0,000
2	0,362
3	0,605
4	1,132
5	0,566
6	0,931

Condiciones establecidas para la cuantificación de colorante

Tabla 26. Condiciones espectrométricas para la determinación de colorante.

PARÁMETRO	CARACTERÍSTICAS
Longitud de Onda	645 nm

5.3.DETERMINACIÓN DE MIGRACIÓN GLOBAL PARA COLORANTE POR GRAVIMETRÍA

El estudio gravimétrico se realizó en los polímeros PLA y PB, solamente para uno de los aditivos, colorante ya que la adición de capsaicina fue muy pequeña para realizar la determinación por gravimetría. Esta se hizo de acuerdo con las ecuaciones 5 y 6. La determinación de la migración por gravimetría reportó los siguientes resultados, para el PLA y PB a temperatura ambiente y a 50°C encontrados en la Tabla 27.

Tabla 27. Porcentaje de migración global en PLA

TEMPERATURA AMBIENTE				
SIMULANTE	A	B	C	D
NIVEL				
1	0.30	0.19	0.02	0.36
2	1.71	0.39	0.14	1.46
TEMPERATURA 50°C				
1	2.01	1.80	3.33	2.23
2	0.74	0.64	0.27	0.37

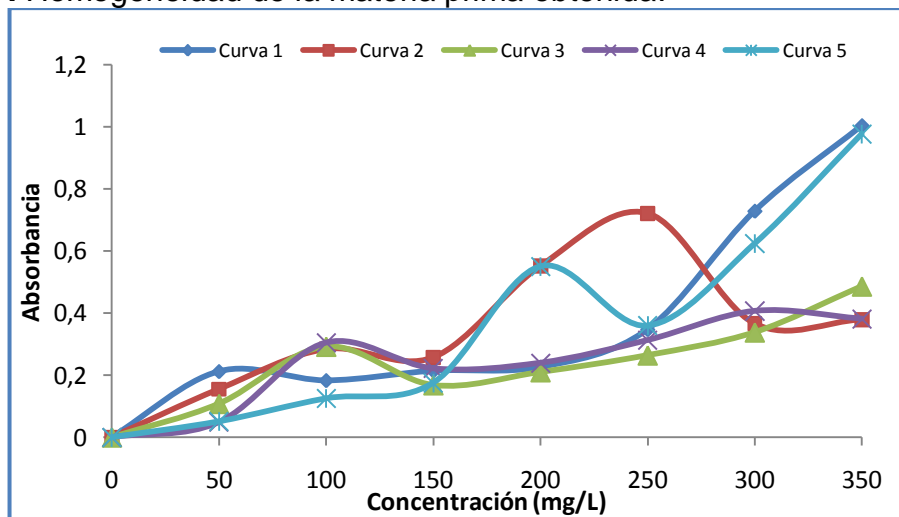
En la Tabla 28 muestra los datos de la migración global de PB en los cuatro simulantes, a las dos temperaturas.

Tabla 28. Porcentaje de migración global en PB

TEMPERATURA AMBIENTE				
SIMULANTE	A	B	C	D
NIVEL				
1	0.53	0.73	1.57	1.81
2	4.99	5.81	2.87	3.92
TEMPERATURA 50°C				
1	2.05	5.09	0.67	0.24
2	1.47	0.96	0.28	0.20

Los resultados mostraron una interacción de la temperatura con respecto al nivel de colorante para cada polímero en los cuatro simulantes, esto demuestra que hay una migración global y no es posible determinar si el porcentaje de esta migración se debe al colorante o algún monómero del material polimérico, esta técnica no tiene un buen rango de confianza y por ello no fue viable para su implementación, ya que la materia prima no es homogénea, como se pudo comprobar realizando un estudio a diferentes concentraciones de colorante en los polímeros contra la señal de absorbancia, la linealidad de las curvas de las obtenidas determinó que el coeficiente de correlación es inferior a 0,999 esto indica que el parámetro de linealidad no se cumple, en la Gráfica 7 se observa la unión de las curvas realizadas. Las curvas de calibración por separado con sus respectivas ecuaciones se encuentran en el ANEXO G

Gráfica 7. Homogeneidad de la materia prima obtenida.



5.4. ESTUDIO DE MIGRACIÓN ESPECÍFICA DE CAPSAICINA Y COLORANTE

El estudio de migración específico de capsaicina y colorante se desarrollará de acuerdo a los parámetros estandarizados para los dos aditivos.

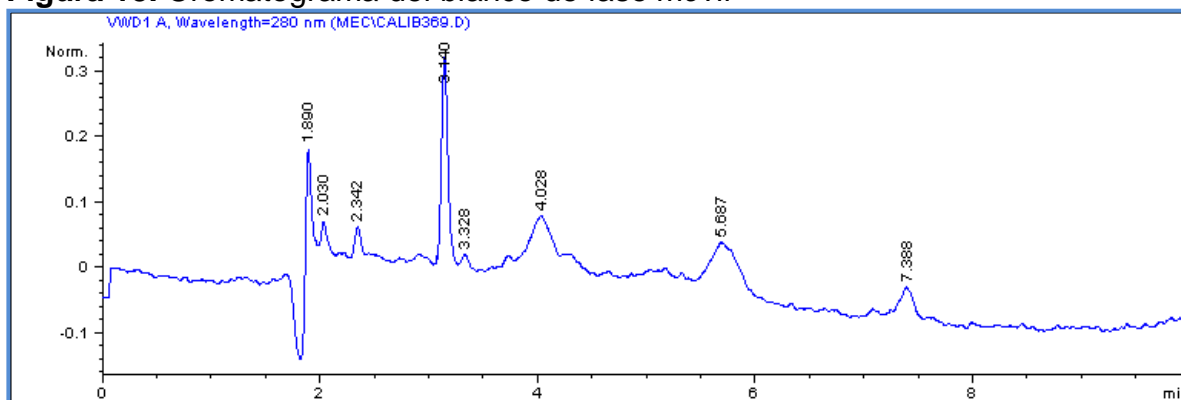
5.4.1. Análisis de blancos

Capsaicina

✓ Blanco de Fase Móvil

Debido a la insolubilidad del patrón de capsaicina en agua y también en los simulantes acuosos utilizados, los estándares de calibración fueron disueltos en solvente y para mayor compatibilidad se utilizó la misma fase móvil, comprobando antes que la capsaicina no se precipitara en esta. Con el cromatograma del blanco de fase móvil se pudo comprobar que al mismo tiempo de retención (4,4 min) de la capsaicina no hubo interferencias de los solventes utilizados y tampoco solapamiento de picos. En la Figura 13 se observa uno de los cromatogramas obtenidos para estas muestras, con el objetivo de obtener una mejor apreciación de las señales asociadas al blanco fue ampliada la escala del cromatograma.

Figura 13. Cromatograma del blanco de fase móvil



✓ Blanco de Simulantes

Al someter este blanco a las mismas condiciones del ensayo de migración se comprobó que a lo largo del proceso no se formaron interferencias al mismo tiempo de retención de la capsaicina. Para cada simulante, matriz polimérica y temperatura se realizó un blanco, en la Figura 14, 15 se presentan los cromatogramas a una escala ampliada de los simulantes acuosos a las dos temperaturas. En todos los cromatogramas de los tres simulantes no aparece ninguna señal asociada en el tiempo de retención de interés.

Figura 14. Cromatogramas de los blancos de los simulantes acuosos a T° ambiente.

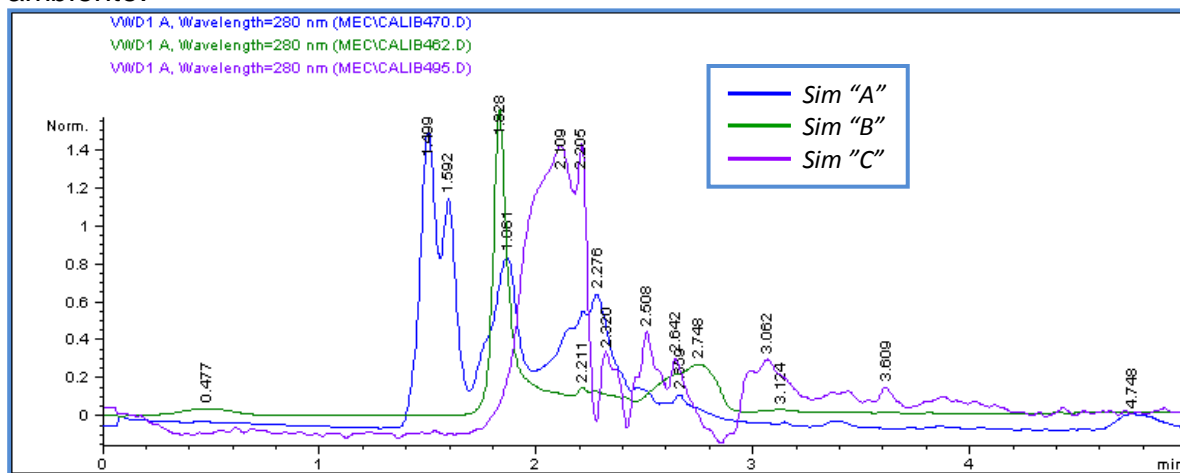
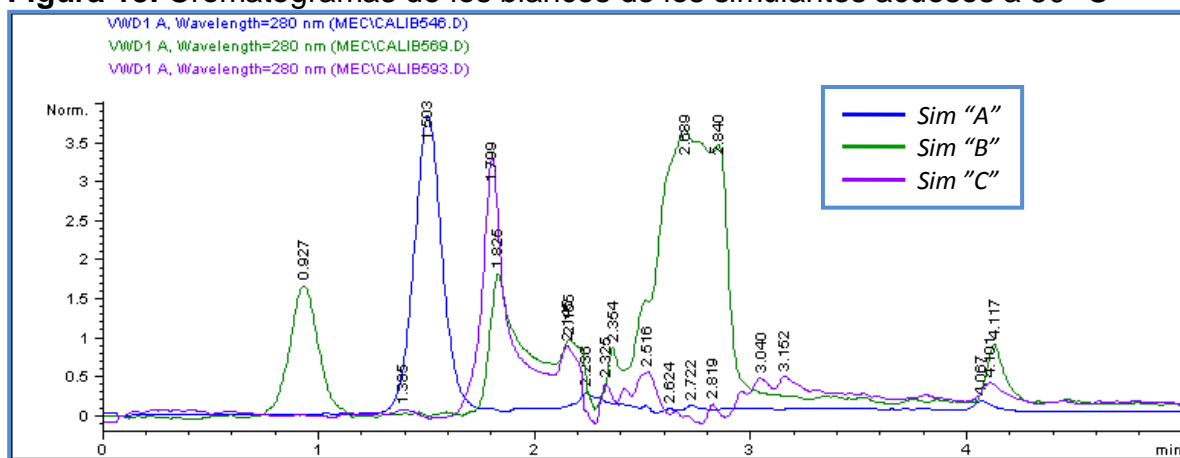


Figura 15. Cromatogramas de los blancos de los simulantes acuosos a 50° C



✓ Blanco de Matriz

Siguiendo con el análisis de blancos, ahora se presentan los resultados del blanco de matriz, siendo este muy importante debido a posibles compuestos que podrían ser liberados desde los polímeros utilizados a los simulante alimenticios, durante el ensayo de migración. Fue necesario analizar cada uno de estos blancos para las tres matrices poliméricas, comprobando efectivamente que no hubo interferencias que causaran solapamiento con el pico cromatográfico de interés. En las Figuras 16 y 17 se muestran los cromatogramas para el PLA, en el ANEXO H se encuentran los cromatogramas para las otras dos matrices poliméricas. A los cromatogramas se les amplió la escala a la altura de los picos obtenidos.

Figura 16. Cromatograma del blanco de matriz (PLA) de los simulantes acuosos a T° ambiente.

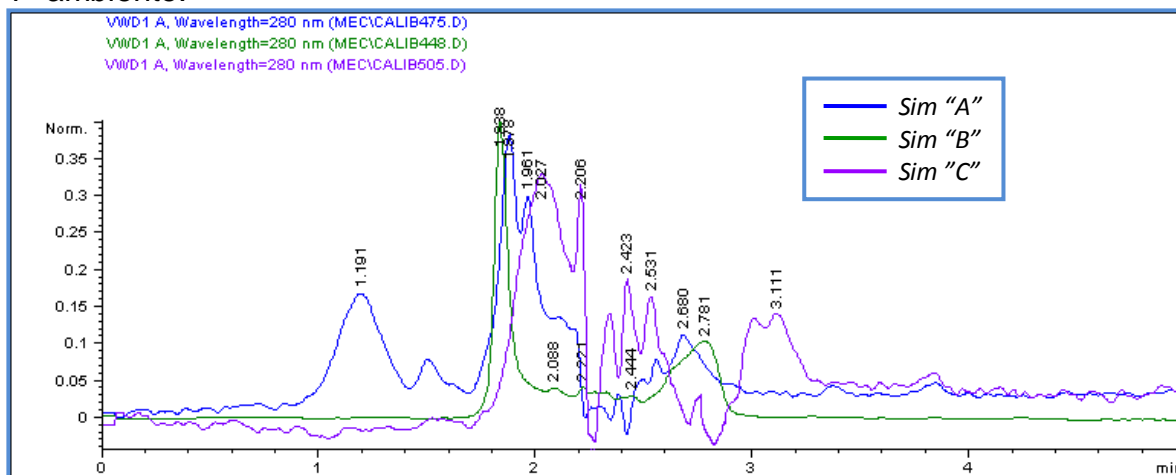
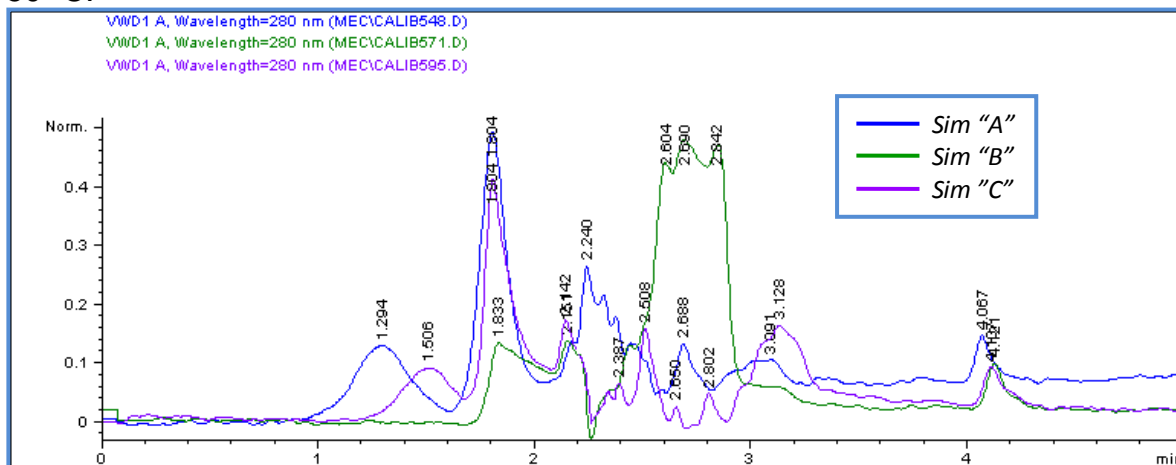


Figura 17. Cromatograma del blanco de matriz (PLA) de los simulantes acuosos a 50 °C.



Colorante

✓ Blanco de solvente

Los resultados de la medición de cloroformo, demostró que la señal no intervenía en los datos de las muestras. Tabla 29.

Tabla 29. Señal de cloroformo.

SOLVENTE	PROMEDIO	s
Cloroformo	0,001	0,001

✓ Blanco de simulante

Los blancos de simulantes involucrando en los ensayos de migración mostraron que no hubo cambios en el simulante durante el proceso. El blanco de simulante ayudó a descartar las posibles interferencias en la señales de las muestras.

Tabla 30. Señales de blanco de Sim “A”

POLIMERO	25°C		50°C	
	PROMEDIO	s	PROMEDIO	s
PLA	0,001	0,001	0,002	0,001
PCL	0,000	0,001	0,001	0,002
MB	0,003	0,002	0,002	0,001

Esto se observa en la Tabla 30 donde las señales de las absorbancias son realmente bajas. Las señales de los blancos de los otros simulantes se encuentran en el ANEXO I.

✓ Blanco de matriz

Al realizar las mediciones de las señales de cada blanco de matriz se observó que hay una mayor señal en MB a diferencia de las otras matrices poliméricas.

Las señales de estos blancos determinaron las interferencias entre la señal que suministra el polímero sin aditivo y el polímero con las dos concentraciones del aditivo, este blanco también determinó que la matriz polimérica no tuvo efectos negativos en la señal de las muestras.

Tabla 31. Señales de blanco de matriz de Sim “A”

POLIMERO	25°C		50°C	
	PROMEDIO	DESVIACION	PROMEDIO	DESVIACION
PLA	0,001	0,001	0,001	0,001
PCL	0,001	0,001	0,001	0,002
MB	0,001	0,001	0,001	0,001

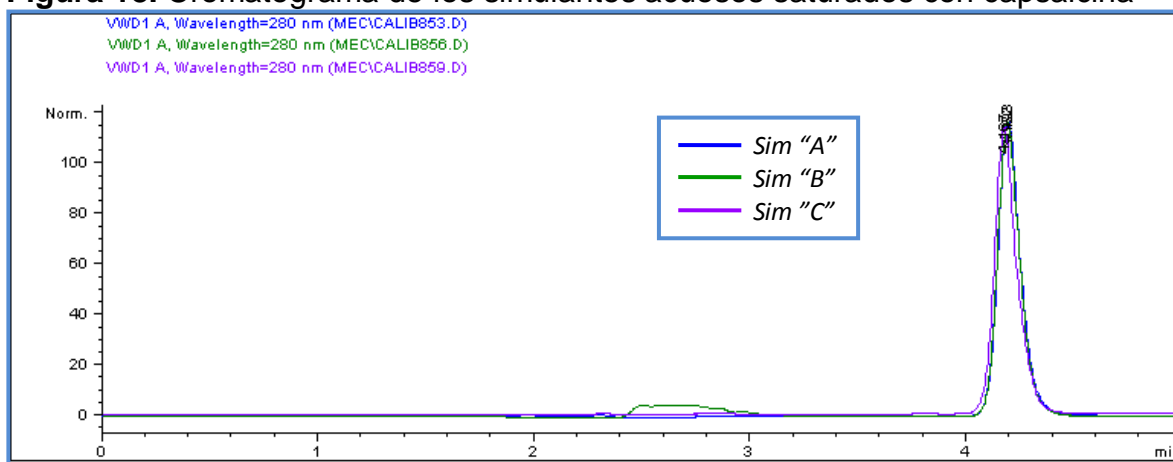
En la Tabla 31, se muestran las señales asociadas al efecto de la matriz polimérica en Sim “A”, en donde se demostró que no hay algún efecto en la señal de la muestra. Las señales de los blancos de matriz poliméricas se encuentran en el ANEXO I.

5.4.2. Cuantificación de Capsaicina por CLAR

✓ Cuantificación de capsaicina en los simulantes acuosos

De acuerdo con los parámetros evaluados en la estandarización del método, se pudo cuantificar capsaicina en las diferentes muestras establecidas a un tiempo de retención de 4,4 min con fase móvil de ACN/Agua al 1% de ácido acético. Para aclarar el hecho de un posible corrimiento del pico de capsaicina en los simulantes acuosos debido al cambio de fase móvil, se analizaron soluciones saturadas con capsaicina de cada uno de los simulantes a las mismas condiciones cromatográficas y efectivamente se encontró que el pico se desplazó a un tiempo de retención de 4,19 min para los tres simulantes, como se observa en la Figura 18.

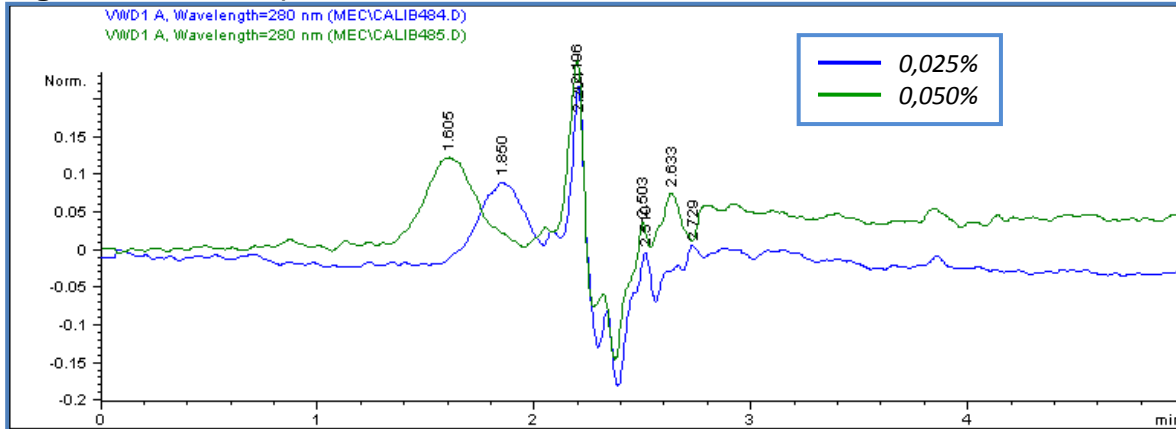
Figura 18. Cromatograma de los simulantes acuosos saturados con capsaicina



De acuerdo con los resultados anteriores se analizaron las muestras poliméricas PLA, PB y MB en los simulantes acuosos a las dos temperaturas establecidas, los cromatogramas mostraron la ausencia de respuesta cromatográfica asociada a la capsaicina en el tiempo de retención determinado para todas las muestras; en la Figura 19 se observa el cromatograma para PLA a dos concentraciones en el Sim "A" a temperatura ambiente, donde aparecen picos similares en ambas muestras, pero ninguno al tiempo de retención esperado. En las muestras sometidas a 50 °C (Figura 20), se encontró un pico cercano a 4,1 min pero como se observa en la Figura 18 también aparece en el análisis de los blancos de matriz, por lo tanto al comparar las áreas de las tres muestras se observó que las tres señales presentaron la misma área, evitando que le pico sea tenido en cuenta. Los cromatogramas pertenecientes a las otras matrices poliméricas y simulantes se encuentran en el ANEXO J.

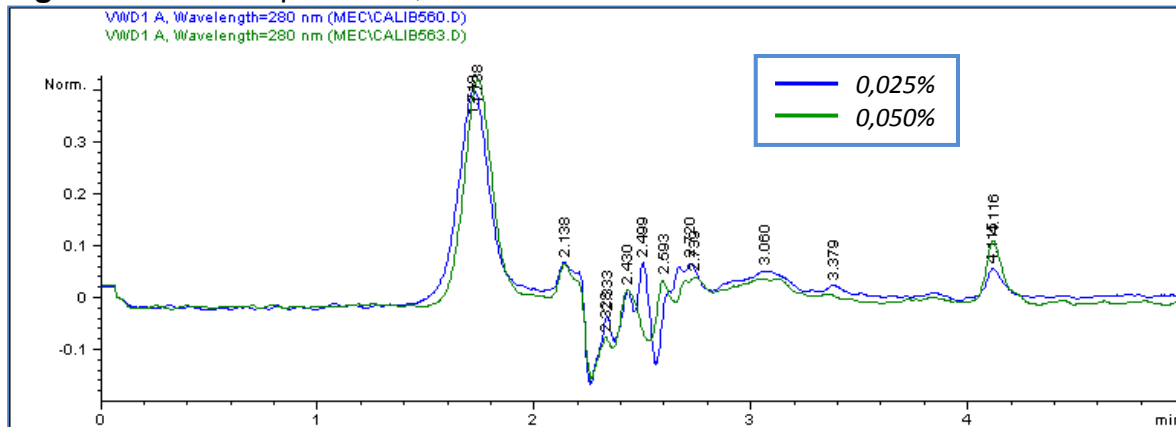
PLA – Temperatura ambiente

Figura 19. Sim “A” para PLA, a dos niveles de concentración



PLA – 50 °C

Figura 20. Sim “A” para PLA, a dos niveles de concentración



✓ Quantificación de capsaicina en el simulante graso

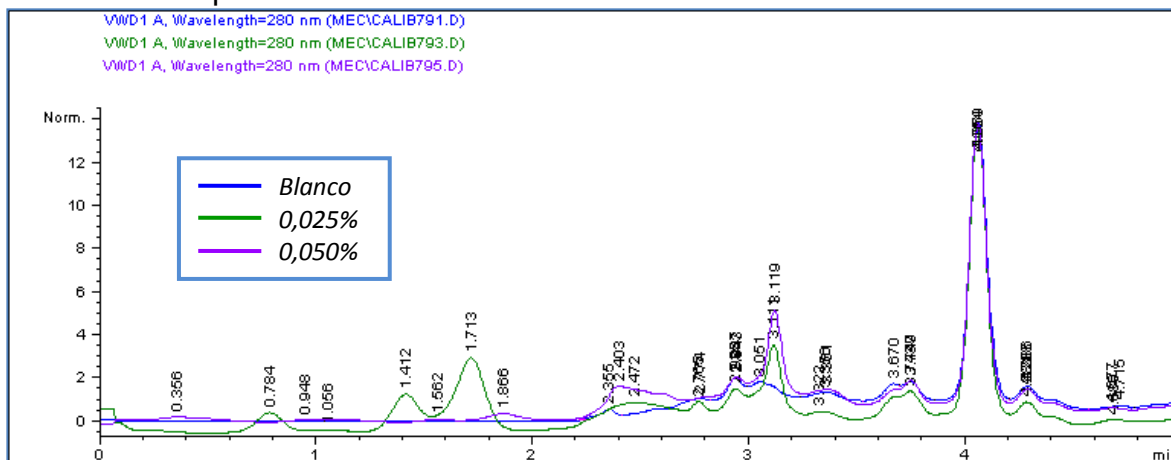
Los resultados de los porcentajes de recuperación (Tabla 32) que arrojaron las muestras dopadas con oleorresina a la misma concentración de los polímeros utilizados en los ensayos de migración fueron muy bajos. Al realizar la extracción en las muestras de PLA en aceite de girasol no se encontró diferencia entre la muestra del blanco y las dos concentraciones estudiadas, como se muestra en la Figura 21. De acuerdo con los resultados en los simulantes acuosos y los

resultados de las extracciones anteriores no se realizó la extracción líquido-líquido en las otras muestras poliméricas.

Tabla 32. Porcentajes de recuperación para la extracción líquido-líquido de capsaicina en las muestras dopadas

Muestra	Concentración	
	0,01%	0,05%
PLA	1,394	0,882
PCL	0,620	0,370

Figura 21. Extracción de capsaicina en Sim “D”, en los dos niveles de concentración para PLA



5.4.3. Diseño experimental de la optimización del procedimiento. Los resultados del diseño experimental del test de migración específica de capsaicina demostró que la migración de capsaicina no se pudo determinar ya que el compuesto se encuentra por debajo de los límites de detección y cuantificación o simplemente no presentó evidencias cromatográficas en el análisis del comportamiento individual de las matrices poliméricas bajo las condiciones establecidas. Desde un punto de vista cualitativo el comportamiento de los tres simulantes acuosos fue similar en cuanto a su desarrollo con la capsaicina como sustancia migrante. En general si se consideran niveles de migración de capsaicina extremadamente bajos y poco probables, el empaque biodegradable activo con capsaicina como agente antimicrobial no representa toxicidad alguna al ser comparados estos niveles con la información toxicológica de la misma (ver 3.4.1.1.).

5.4.4. Cuantificación de colorante por UV. La cuantificación del colorante mostró óptimos resultados en la estandarización de la metodología y cuantificación del colorante en los simulantes a las dos temperaturas, los resultados de migración específica del colorante demostraron que para los diferentes niveles del aditivo en las matrices poliméricas PLA, PB y MB no se presentará algún efecto negativo si este se implementara como aditivo en cualquier empaque para alimento, las concentraciones de colorante en los ensayos no fueron detectadas, por no alcanzar el límite de cuantificación y tampoco el límite de detección. En la Tabla 32 y 33 se observa la cuantificación del PLA para el Sim “A” y el Sim “B”, los resultados de las otras muestras poliméricas se encuentran en el ANEXO K.

Tabla 33. Resultados de la migración del colorante en PLA con Sim “A”

PLA simulante A				
TEMPERATURA AMBIENTE			TEMPERATURA 50°C	
Nivel	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)
1	0,000	ND	0,00	ND
2	0,001	ND	0,001	ND
3	0,001	ND	0,002	ND

ND: No detectado.

Tabla 34. Resultados de la migración del colorante en PLA con Sim “B”

PLA simulante B				
TEMPERATURA AMBIENTE			TEMPERATURA 50°C	
Nivel	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs	Concentración (mg/L)
1	0,000	ND	0,000	ND
2	0,001	ND	0,001	ND
3	0,001	ND	0,002	ND

ND: No detectado.

De acuerdo con los resultados encontrados el colorante como aditivo en PLA no mostró migración específica del colorante hacia el simulante esto determina que el aditivo y el polímero tienen una buena interacción, esto también ocurre en el PB, y en la MB.

5.4.5. Diseño de experimentos y manejo estadístico de los datos.

Basándose en las necesidades de la experimentación se tomaron dos factores temperatura y nivel de concentración de colorante, se determinó que los dos factores están entre el dominio experimental expresado con los valores máximos y mínimos donde el máximo de temperatura fue 50°C y el mínimo de temperatura 25°C, con los dos niveles de concentración del colorante.

Tabla 35. Factores y dominio experimental

Factores	DOMINIO EXPERIMENTAL	
	Nivel (-)	Nivel(+)
X ₁ : Niveles de concentración	-1	+1
X ₂ : Temperatura	25°C	50°C

El diseño experimental escogido determinó el análisis de diferentes respuestas de los factores donde sus rangos fueron niveles de experimentación máximo y mínimo, estableciendo así la factibilidad del diseño experimental, el análisis de las respuestas se realizó con el paquete estadístico SPSS, el cual permitió la interpretación de los resultados.

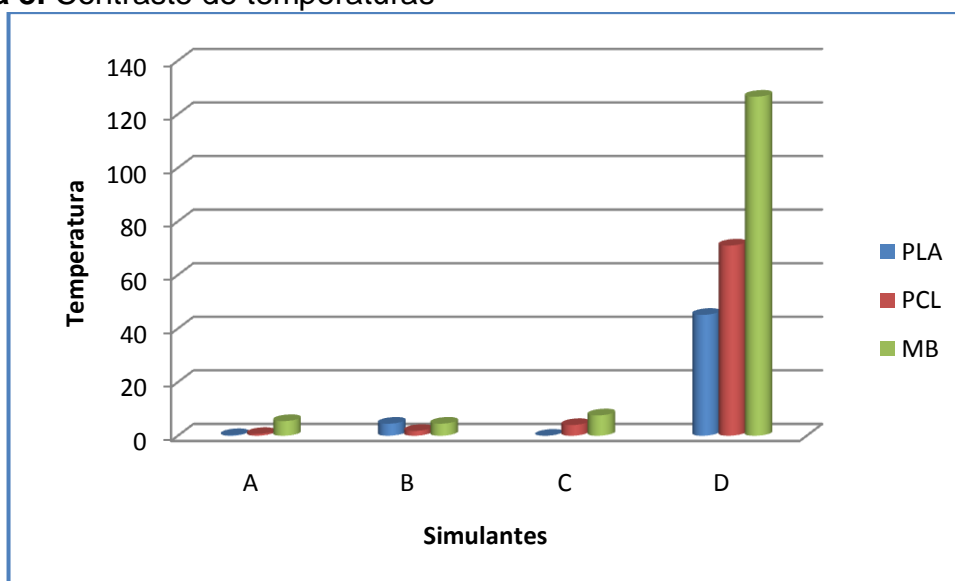
El ANOVA permitió obtener diferentes respuestas de los factores ya sea individuales o por interacción de los dos factores, en el ANEXO L se encuentran los resultados de cada muestra polimérica PLA, PB, MB, en los ensayos de migración específica del colorante con los cuatro simulantes, el ANOVA en la Tabla 36 muestra la respuesta de la matriz polimérica PLA en Sim "A", expresa que hubo una significancia entre la temperatura y la concentración ya que sus valores son mayores que el p value (0,005) esto conlleva a suponer que podría darse una interacción entre la temperatura y la concentración en el proceso de migración específica del colorante.

Tabla 36. ANOVA para Sim "A"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3,667E-6 ^a	3	1,222E-6	0,815	0,521
Intersección	1,633E-5	1	1,633E-5	10,889	0,011
Temperatura	3,333E-7	1	3,333E-7	0,222	0,650
Concentración	3,333E-7	1	3,333E-7	0,222	0,650
TXC	3,000E-6	1	3,000E-6	02,000	0,195
Error	1,200E-5	8	1,500E-6		
Total	3,200E-5	12			
Total corregida	1,567E-5	11			

El contraste de las medidas de significancia F para la temperatura en los diferentes polímeros, comprobó que la temperatura si influye en el fenómeno de la migración y más si se interactúa con diferentes matrices poliméricas, en la Gráfica 8, la migración del aditivo puede observarse mas en MB con Sim "D" y también se observa un mayor interacción de MB en los simulantes acuosos que los otros polímeros biodegradables. Esto se puede asociar con el hecho de que si este polímero se utiliza para materia prima de un empaque, las condiciones de uso deben ser específicas para cierta temperatura y para un producto que no tenga una acidez aparente y un alto porcentaje de grasa.

Gráfica 8. Contraste de temperaturas



Una observación del efecto de la interacción de la temperatura con los polímeros biodegradables fue el cambio observado en PLA al estar en contacto con cualquier simulante a 50°C, su cristalinidad disminuye al ser sometido a esta temperatura ya que está cerca a la temperatura de transición vítrea (T_g)_[41]. Esto influye en el hecho de que las moléculas se pueden mover libremente durante un tiempo determinado, creando así cambios en la posición de la estructura del polímero, que al llevarlo a la temperatura ambiente no tiene tiempo de acomodarse, también hay que tener en cuenta que el PLA es un poco hidrofílico y tiene una afinidad con la matriz de los simulantes que tengan un alto porcentaje de agua (Figura 22).

Figura 22. Polímero PLA sometido al ensayo de migración a 50°C

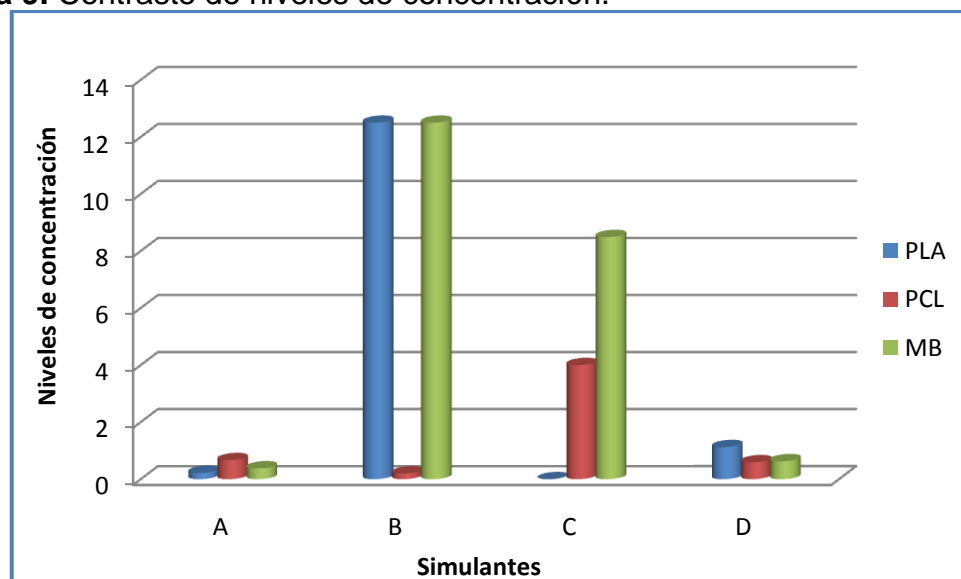


La conformación de un empaque para alimento a base de esta materia prima debe tener en cuenta la finalidad de su uso, ya que no puede ser sometido a un periodo de tiempo largo a temperaturas iguales o superiores a 50°C, porque esto influiría en las propiedades organolépticas del alimento empacado.

Este cambio de cristalinidad también se observó al someter la MB a 50°C esta se torno quebradiza en los cuatro simulantes, pero se observo un mayor cambio en Sim "B", esto motiva a determinar que el uso del empaque debe ser para alimentos con porcentajes bajos de humedad y acidez.

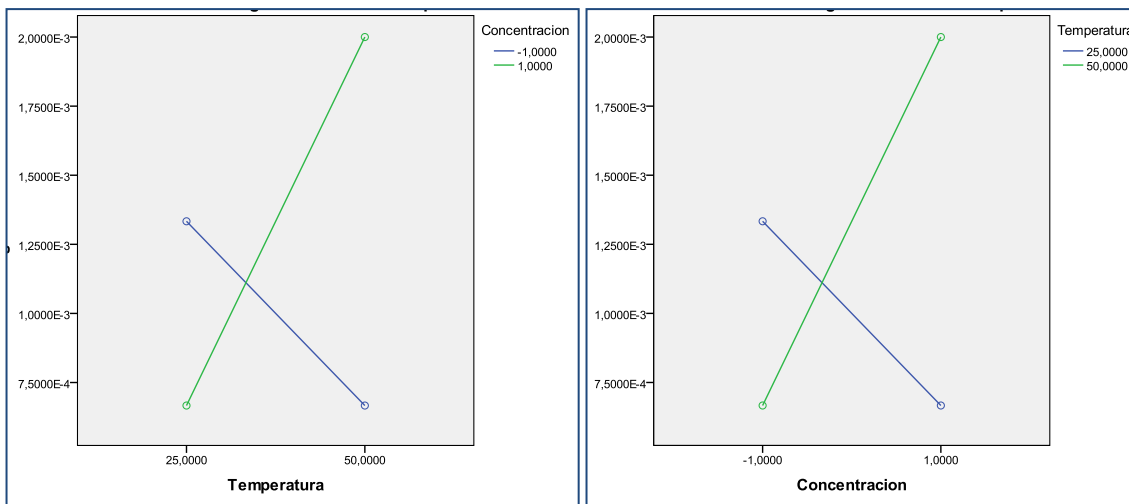
Con la comparación de los niveles de colorante con los polímeros y simulantes, se pretender probar que el aditivo en polímeros biodegradables tiene menor contraste que la temperatura, pero se observa en la Gráfica 9, que hay una posibilidad que en la MB en Sim "B" y Sim "C" el aditivo tenga una mayor posibilidad de migrar hacia el producto.

Gráfica 9. Contraste de niveles de concentración.



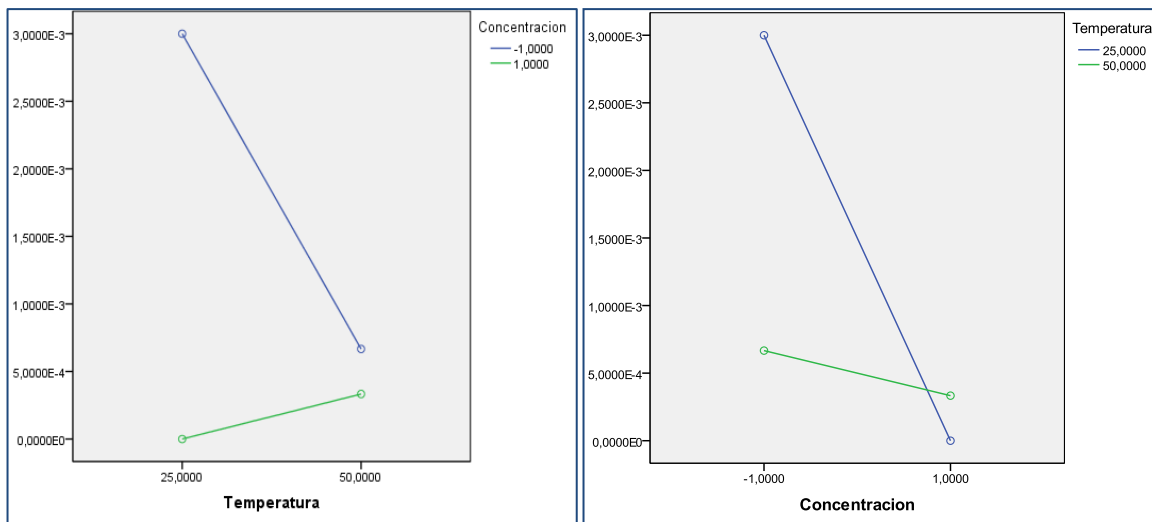
Por otra parte el análisis de las interacciones de temperatura y niveles de concentración o (TXC) analizados en las diferentes matrices poliméricas en los cuatro simulantes demostró que podría haber una interacción a mayor concentración del colorante con una mayor temperatura en PLA.

Grafica 10. Graficas de interacción del PLA en Sim "A"



El efecto de interacción entre la concentración y temperatura se observa fácilmente en el gráfico de interacción CXT y TXC en la Gráfica 10 que muestran el cambio en la respuesta al variar un factor para distintos valores del otro factor, esto afirma que para la matriz polimérica PLA hay una interacción del nivel máximo de concentración del colorante a altas temperaturas, concluyendo que el PLA determinaría una migración específica del colorante con una concentración máxima al aumentar la temperatura.

Grafica 11. Graficas de interacción del PLA en el Sim "B"



Las graficas de interacción para el PLA en Sim "B" muestran que en este simulante el polímero no tiene algún efecto, porque se puede manejar cualquier factor de temperatura con la proporción del colorante.

Al analizar las otras graficas de interacción que se encuentran en el ANEXO M, se observa que el PLA en Sim "C" no tiene ninguna interacción, esto establece que esta materia prima puede ser utilizada con un alimento que contenga un porcentaje alcohólico con una buena refrigeración ya que el PLA no es estable a una temperatura alta.

6. CONCLUSIONES

- Se estandarizaron las técnicas por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de capsaicina y ultravioleta visible para la cuantificación de colorante, en los cuatro simulantes alimenticios del ensayo de migración específica para capsaicina y colorante en polímeros biodegradables, estableciendo una buena confiabilidad y precisión de los métodos debido a que la repetibilidad y precisión intermedia mostró coeficientes de variación por debajo del 5%.
- Los parámetros de calidad límite de detección y cuantificación $< 0,10$ mg/L, linealidad $> 0,9995$ mostraron buenos resultados, cuantificando satisfactoriamente las muestras de capsaicina usando una columna C18, con un óptimo tiempo de corrida de 5 min para la señal cromatográfica de interés. En cuanto a los parámetros de calidad asociados a la cuantificación de colorante, también mostraron buenos resultados con bajos límites de detección < 10 mg/L para las tres matrices poliméricas considerando las altas concentraciones de colorante que fueron utilizadas, la linealidad obtenida para este método fue alta con casi 4 órdenes de magnitud, logrando la cuantificación del colorante en las muestras propuestas.
- El desarrollo de la metodología de migración específica para capsaicina y colorante fue optimizado y exitosamente aplicado ya que se aplicaron todas las normas establecidas para el control de la migración de componentes de materiales destinados a estar en contacto con los alimentos, tales como simulantes alimenticios, tiempo y temperatura los cuales se establecieron de acuerdo al uso del empaque biodegradable.
- La baja o prácticamente nula migración de capsaicina y colorante permite comprobar que la oleoresina y el masterbatch de colorante pueden ser aplicados a los niveles establecidos en la metodología ya que estas concentraciones no presentarán problema de toxicidad sobre la salud del consumidor.
- La determinación de la migración de capsaicina y colorante en matrices poliméricas biodegradables permitió establecer la importancia de implementar nuevas metodologías para el análisis de calidad en empaques en contacto con alimentos, demostrando el potencial que posee este tema en la industria y por tanto sentando las bases para el desarrollo de nuevos empaques biodegradables y mitigando el daño causado por los empaques sintéticos.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] Highlights in Bioplastics. IBAW Publication. (2005). Disponible en http://www.european-bioplastics.org/media/files/docs/en-pub/050203_Highlights_in_Bioplastics_en.pdf

[2] Siracusa, V.; Rocculi, P.; Romani, S. & Dalla Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Food Science & Technology*, 19, 634-643.

[3] Villada, H. S.; Acosta, H.; Velasco, R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*, 12:2, 5-13.

[4] EU Commission Directive 82/711/CEE, que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Official Journal of the European Union, L0711.

[5] EU Commission Directive 85/572/CEE por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios. Official Journal of the European Union, L91/17.

[6] EU Commission Directive 97/48/CE, por la que se modifica por segunda vez la Directiva 82/711/CEE. Official Journal of the European Union, L0048.

[7] NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 5022. (2003-04-23). Materiales y artículos plásticos destinados a estar en contacto con los alimentos y bebidas. Determinación de migración global.

[8] NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4606. (2003-04-23). Plásticos. Determinación de la migración de los plastificantes.

[9] Povea, I. Interacción entre los envases poliméricos y el alimento. (2008). *Facultad de Ingeniería de Alimentos – Universidad de la Salle. Revista Virtual Pro, Procesos Industriales.*

[10] Centro de Comercio Internacional. (Noviembre, 1997) Envase Seguro y Ecológicamente Aceptable Criterios y datos sobre el ciclo de vida de envases en los países industrializados. Nota No. 40.

[11] Avella, M.; De Vlieger, J. J.; Errico, M. E.; Fischer S.; Vacca, P. & Volpe, M. G. (2005) Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, 93, 467-474.

[12] Oliveira, N.S.; Oliveira, J.; Gomes, T.; Ferreira, A.; Dorgan, J.; Marrucho, I.M. (2004). Gas sorption in poly(lactic acid) and packaging materials. *Fluid Phase Equilibria*, 223, 317-324.

[13] Conn, R.E.; Kolstad, J.J.; Borzelleca, J. F.; Dixler, D.S.; Filer Jr, L. J.; LaDu Jr, B. N. & Pariza M. W. (1995). Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer. *Food Chemistry Toxic*, 33, No. 4, 273-283.

[14] Americhem, Inc. Masterbatches de aditivos de alto desempeño. Julio, 2010. Disponible en [http:// es.americhem.com/capabilities/products/additive/](http://es.americhem.com/capabilities/products/additive/).

[15] Wong, A. C-Y. (1997) Colouring of moulded plastic products by the addition of colour masterbatches. *Journal of Materials Processing Technology*, 63, 468-471.

[16] COMA, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extend shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90-103.

[17] Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; van Beest, M.; de Kruijf, N.; Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Food Science & Technology*, 10, 77-86.

[18] Barnes, K. A.; Sinclair, C. R. & Watson, D. H. (2007) *Chemical Migration and Food Contact Materials*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England. Pags. 1 – 4; 17 – 30; 43 – 53.

[19] Schweiggert, U.; Carle R.; Schieber, A. (2006). Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.)

by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 557, 236-244.

[20] Barceloux, D.G. (2009). Pepper and capsaicin. *Medical Toxicology of Natural Substances*, 55, 380 - 390.

[21] Sigma-Aldrich, Capsaicin. (2010). *Material Safety Data Sheet*.

[22] Cran, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford. Pags. 1 – 2; 44 – 45; 69 – 70.

[23] Heckman, J.H. (2005) Food packaging regulation in the United States and the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42, 96-122.

[24] Lau, O.; Wong, S. (2000) Contamination in food from packaging material. *Journal of Chromatography A*, 882, 255-270.

[25] Sanches, A.; Cruz, J.M.; Sendón, R.; Franz, R. & Paseiro P. (2007) Kinetic migration studies from packaging films into meat products. *Meat Science*, 77, 238-245.

[26] Grob, K. (2008) The future of simulants in compliance testing regarding the migration from food contact materials into food. *Food Control*, 19, 263 – 268.

[27] Salafranca, J.; Pezo, D.; Nerín, C. (2009). Assessment of specific migration to aqueous simulants of a new active food packaging containing essential oils by means of an automatic multiple dynamic hollow fibre liquid phase microextraction system. *Journal of Chromatography*, 1216, 3731-3739.

[28] Johnston, J.J.; Goldade, D. A. & Chipman, R.B. (2002) Capsaicin migration through maple sap collection tubing. *Crop Protection*, 21, 1109-1112.

[29] Perucka, I.; Oleszek W. (2000) Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 71, 287 – 291.

[30] Ortega, L. (2001) *Validación de Métodos Analíticos*. AEFI Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. Págs. 56 – 94.

[31] Skoog, D.; Holler, F.; Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*, Quinta edición. M^cGraw-Hill, Aravaca (Madrid). Págs. 12 – 15.

[32] Poças, M.F. & Hogg, T. (2007) Exposure assessment of chemicals from packaging materials in foods: a review. *Food Science & Technology*, 18, 219-230.

[33] 2002/72/EC relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Official Journal of the European Union, L39/2.

[34] Helmroth, E.; Rijk, R.; Dekker, M. & Jongen W. (2002) Predictive modelling of migration from packaging materials into food products for regulatory purposes. *Food Science & Technology*, 13, 102 – 109.

[35] Stener, R.; Kimball, B. (2005) Slow migration of capsicum oleoresin in a sandy loam soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56, 188 – 191.

[36] Kaale, E.; Schepdael, A.; Roets, E. & Hoogmartens, J. (2002) Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 1331 – 1337.

[37] Barbero, G.F.; Liazid, A.; Palma, M. & Barroso, C.G. (2008) Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column. *Food Chemistry*, 107, 1276 – 1282.

[38] Wiczling, P.; Markuszewski, M.; Kaliszan, M.; Galer, K. and Kaliszan, R. (2005). Combined pH/organic solvent gradient HPLC in analysis of forensic material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 871-875.

[39] Kaliszan, R.; Wiczling, P.; Markuszewski, M. (2004). pH gradient high-performance liquid chromatography: theory and applications. *Journal of Chromatography A*, 1060, 1065-1075.

[40] Canals, I.; Oumada, F.; Roses, M.; Bosch, E. (2001). Retention of ionizable compounds on HPLC. 6. pH measurements with the glass electrode in metanol-water mixtures. *Journal of Chromatography A*, 911, 191-202.

[41] Martínez, G.; Urbina, C. (2007). Estudio de la biodegradación de los sistemas biodegradables. *Ciansem*, 218-219.

[42] Cámara de Comercio de Bogotá. (2006). Empaques y embalajes para exportación. Centro Internacional de Negocios, *Seminario*.

[43] Sendón, R.; Sanches, A.; Cooper, I.; Franz, R. & Paseiro, P. (2006) Revision of analytical strategies to evaluate different migrants from food packaging materials. *Food Science & Technology*, 17, 354-366.

[44] Chinn, M. S.; Sharma-Shivappa, R. R.; Cotter, J. (2010). Solvent extraction and quantification os capsaicinoids from capsicum chinense. *Food and Bioproducts Processing*, Accepted Manuscript.

[45] Zhang, Q.; Hu, J.; Sheng, L.; Li, Y. (2010). Simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in rat plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878, 2292-2297.

[46] Miller, J., Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Cuarta edición. Prentice Hall, Madrid, España. Págs. 43-70, 110-151.

ANEXO A

Perfiles empleados en el proceso de extrusión de las muestras poliméricas utilizadas.

✓ Ácido Poliláctico (PLA)

Perfil de temperatura: 130(1), 150(2), 180(3), 165(dado)*
Velocidad del tornillo: 40rpm

✓ Polímero Biodegradable (PB)

Perfil de temperatura: 110(1), 130(2), 130(3), 110(dado)*
Velocidad del tornillo: 40rpm

✓ Mezcla Binaria (MB)

Perfil de temperatura: 130(1), 150(2), 180(3), 165(dado)*
Velocidad del tornillo: 40rpm

*El perfil de temperatura esta dividido en las zonas de calentamiento del extrusor.

ANEXO B

Parámetros directos e indirectos medidos para cada lote de experimentos.

Tabla B1. Parámetros directos e indirectos tomados para los ensayos de migración

No.	MUESTRA	d ₁	d ₂	d ₃	Promedio d	r ² (cm)	Volumen (cm ³)	Volumen (cm ³)	Peso (g)	Densidad (g/cm ³)	Peso 2 (g)	Densidad (g/cm ³)	ΔP (g)	Δd (g/cm ³)	% Migración	Promedio %M
82	MEC-A-082	1,01	1,02	1,00	1,01	0,026	1,834	0,801	0,101	0,121	0,217	0,118	0,004	0,002	1,763	
	[-] y T amb.	1,13	1,14	1,17	1,15	0,033		1,033	0,120							
				Promedio	1,08	0,029		0,917	0,221							
83	MEC-A-083	1,04	1,12	1,04	1,07	0,028	1,721	0,894	0,100	0,114	0,195	0,113	0,002	0,001	0,966	1,252
	[-] y T amb.	1,01	1,04	1,03	1,03	0,026		0,828	0,097							
				Promedio	1,05	0,027		0,861	0,197							
84	MEC-A-084	1,15	1,09	1,12	1,12	0,031	1,965	0,985	0,122	0,119	0,231	0,118	0,002	0,001	1,028	
	[-] y T amb.	1,14	1,10	1,11	1,12	0,031		0,979	0,111							
				Promedio	1,12	0,031		0,982	0,233							
85	MEC-B-085	1,03	1,01	1,03	1,02	0,026	1,672	0,822	0,099	0,119	0,197	0,118	0,002	0,001	1,005	
	[-] y T amb.	1,01	1,07	1,04	1,04	0,027		0,849	0,100							
				Promedio	1,03	0,027		0,836	0,199							
86	MEC-B-086	0,95	0,94	0,97	0,95	0,023	1,504	0,714	0,086	0,121	0,180	0,120	0,003	0,002	1,425	1,358
	[-] y T amb.	1,08	0,96	0,97	1,00	0,025		0,791	0,097							
				Promedio	0,98	0,024		0,752	0,183							
87	MEC-B-087	1,04	1,03	1,02	1,03	0,027	1,640	0,833	0,100	0,119	0,191	0,117	0,003	0,002	1,645	
	[-] y T amb.	0,97	1,04	1,03	1,01	0,026		0,806	0,095							
				Promedio	1,02	0,026		0,820	0,195							

CONTINUACIÓN ANEXO B

Tabla B1. (Continuación)

No.	MUESTRA	d ₁	d ₂	d ₃	Promedio d	r ² (cm)	Volumen (cm ³)	Volumen (cm ³)	Peso (g)	Densidad (g/cm ³)	Peso 2 (g)	Densidad (g/cm ³)	ΔP (g)	Δd (g/cm ³)	% Migración	Promedio %M
88	MEC-C-088	1,44	1,40	1,36	1,40	0,049	3,283	1,539	0,173	0,111	0,360	0,110	0,005	0,001	1,263	
	[-] y T amb.	1,52	1,52	1,43	1,49	0,056		1,744	0,191							
				Promedio	1,45	0,052		1,642	0,364							
89	MEC-C-089	1,44	1,33	1,33	1,37	0,047	2,506	1,467	0,164	0,113	0,252	0,101	0,032	0,013	11,139	2,929
	[-] y T amb.	1,17	1,12	1,16	1,15	0,033		1,039	0,120							
				Promedio	1,26	0,040		1,253	0,284							
90	MEC-C-090	1,17	1,22	1,37	1,25	0,039	2,309	1,234	0,134	0,110	0,264	0,114	-0,009	-0,004	-3,615	
	[-] y T amb.	1,15	1,15	1,21	1,17	0,034		1,075	0,120							
				Promedio	1,21	0,037		1,154	0,255							
103	MEC-D-103	1,19	1,20	1,20	1,20	0,036	2,064	1,125	0,126	0,115	0,238	0,116	-0,001	0,000	-0,421	
	[-] y T amb.	1,09	1,10	1,09	1,09	0,030		0,939	0,111							
				Promedio	1,15	0,033		1,032	0,237							
104	MEC-D-104	1,16	1,14	1,15	1,15	0,033	2,145	1,039	0,114	0,112	0,225	0,105	0,015	0,007	6,219	1,709
	[-] y T amb.	1,19	1,18	1,19	1,19	0,035		1,106	0,126							
				Promedio	1,17	0,034		1,072	0,240							
105	MEC-D-105	1,17	1,20	1,16	1,18	0,035	2,032	1,087	0,119	0,110	0,226	0,111	-0,002	-0,001	-0,670	
	[-] y T amb.	1,09	1,09	1,11	1,10	0,030		0,945	0,105							
				Promedio	1,14	0,032		1,016	0,224							

ANEXO C

Ecuaciones y parámetros utilizados para la determinación de la Curva de Van Deemter

✓ *Determinación del flujo de fase móvil óptimo*

Las siguientes ecuaciones se utilizaron para la determinación de número de platos teóricos y altura de plato teórico para encontrar el flujo óptimo.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{w}\right)^2 \qquad H = \frac{L}{N}$$

Los datos presentados en la Tabla D1 representan la variación del flujo de fase móvil, tiempos de retención y ancho de pico utilizados para encontrar el número de platos teóricos.

Tabla C1. Parámetros obtenidos para determinar curva de Van Deemter

F _c (Ml/min)	t _r (min)	w (min)	N
0,80	4,95	0,102	37433,64
0,85	4,67	0,096	37621,93
0,90	4,42	0,091	38040,35
0,95	4,19	0,088	35991,50
1,00	3,98	0,085	35047,20
1,05	3,79	0,082	34144,60
1,10	3,64	0,079	34075,79

ANEXO D

Longitudes de onda utilizados para la obtención de longitud de onda de mayor absorbancia para el colorante

Tabla D1. Barrido desde 400 a 900 nm, para la mayor absorción del colorante.

λ (nm)	Absorbancia	λ (nm)	Absorbancia	λ (nm)	Absorbancia	λ (nm)	Absorbancia
400	0,371	530	0,244	660	0,256	790	0,134
405	0,368	535	0,240	665	0,245	795	0,130
410	0,365	540	0,238	670	0,234	800	0,126
415	0,360	545	0,235	675	0,224	805	0,123
420	0,357	550	0,234	680	0,214	810	0,118
425	0,353	555	0,233	685	0,204	815	0,116
430	0,348	560	0,232	690	0,196	820	0,111
435	0,342	565	0,230	695	0,190	825	0,110
440	0,337	570	0,231	700	0,186	830	0,108
445	0,333	575	0,232	705	0,181	835	0,106
450	0,329	580	0,236	710	0,178	840	0,105
455	0,325	585	0,242	715	0,176	845	0,105
460	0,320	590	0,249	720	0,177	850	0,102
465	0,314	595	0,258	725	0,176	855	0,100
470	0,311	600	0,258	730	0,174	860	0,098
475	0,309	605	0,258	735	0,171	865	0,096
480	0,307	610	0,260	740	0,167	870	0,094
485	0,303	615	0,260	745	0,162	875	0,092
490	0,295	620	0,261	750	0,156	880	0,091
495	0,287	625	0,261	755	0,151	885	0,090
500	0,279	630	0,266	760	0,146	890	0,089
505	0,271	635	0,272	765	0,145	895	0,089
510	0,265	640	0,276	770	0,142	900	0,087
515	0,259	645	0,279	775	0,140		
520	0,254	650	0,275	780	0,139		
525	0,248	655	0,265	785	0,137		

ANEXO E

Concentraciones reales de las soluciones utilizadas en la cuantificación de capsaicina

✓ *Soluciones estándar de capsaicina**

Tabla E1. Concentraciones reales de solución estándar e intermedia

Peso Patrón Capsaicina (g)	Concentración Teórica (mg/L)	Concentración Real (mg/L)
0,0106	1000	1007

Volumen Solución Estándar (µL)	Concentración Teórica (mg/L)	Concentración Real (mg/L)
500	50	50,35

✓ *Estándares de calibración de capsaicina**

Tabla E2. Concentraciones reales de los estándares de calibración

Nivel de Concentración	Volumen Solución Intermedia (µL)	Concentración Teórica (mg/L)	Concentración Real (mg/L)
1	10	0,05	0,0503
2	20	0,10	0,1007
3	40	0,20	0,2014
4	100	0,50	0,5035
5	200	1,00	1,0070
6	600	3,00	3,0210
7	1000	5,00	5,0350

* Las soluciones estándar y los estándares de calibración fueron aforados a 10 mL.

ANEXO F

Curva de calibración utilizada para la determinación del límite de detección y cuantificación para capsaicina.

Tabla F1. Curva de Calibración utilizada para el LD y LC

Nivel de Concentración (NC)	Concentración (mg/mL)	Área Promedio (mAU)	Desviación Estándar (s)	Coficiente de Variación (% CV)
1	0,05	2,830	0,082	2,88
2	0,10	3,310	0,053	1,59
3	0,20	4,442	0,170	3,82
4	0,50	8,524	0,089	1,04
5	1,00	15,568	0,204	1,31
6	3,00	44,278	0,452	1,02
7	5,00	71,392	0,896	1,25

El tratamiento estadístico para establecer la linealidad de la curva se muestra en la Tabla F2

Tabla F2. Pruebas estadísticas para la curva de calibración

Parámetro	Símbolo	Valor
Coficiente de correlación	r	0,9993
Intercepto	a	2,2403
Pendiente	b	13,9603
Desviación estándar para el intercepto	s_a	0,1411
Desviación estándar para la pendiente	s_b	0,0632
Test estadístico para el coeficiente de correlación	t_r	168,85
Test estadístico para el intercepto	t_a	15,880
Test estadístico para la pendiente	t_b	98,955

¹ Número total de ensayos $N = 138$, número total de niveles $k = 7$, número de réplicas por nivel $m = 20$

² Valor de $t_{tabla} = 1,64$ para $n-2$ gl y 95% de confianza.

Hipótesis estadísticas para correlación “x,y” y para el intercepto y pendiente

H₀: No existe correlación lineal entre “x” y “y” ($t_r < t_t$)

H₀: El intercepto no es significativamente diferente de cero ($t_a < t_t$)

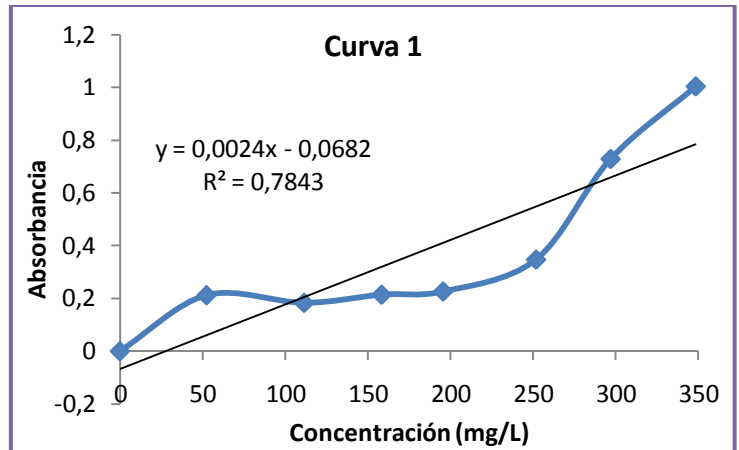
H₀: La pendiente no es significativamente diferente de cero ($t_b < t_t$)

ANEXO G

Curvas de calibración realizadas con el material polimérico obtenido con el colorante como aditivo.

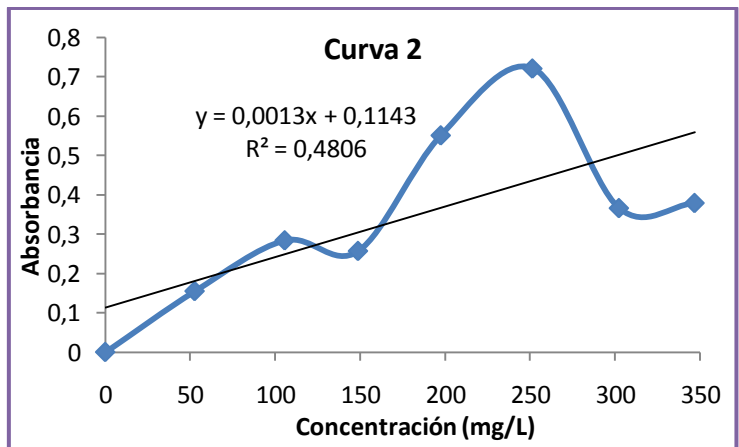
Curva 1

Curva 1	
Concentración	Absorbancia
0	0
52,44	0,212
111,49	0,183
158,43	0,214
195,65	0,226
251,90	0,347
297,03	0,728
348,58	1,003



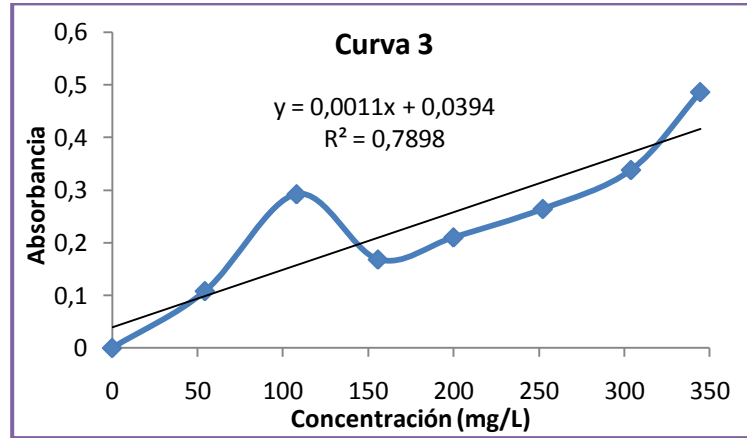
Curva 2

Curva 2	
Concentración	Absorbancia
0	0
52,64	0,155
105,68	0,284
148,82	0,257
197,56	0,551
251,50	0,721
302,44	0,366
346,97	0,379



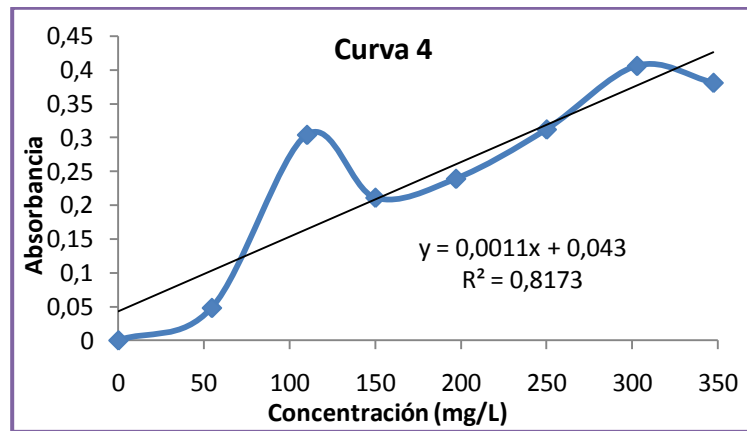
Curva 3

Curva 3	
Concentración	Absorbancia
0	0
54,34	0,108
108,09	0,292
155,72	0,168
199,96	0,210
252,30	0,264
303,94	0,338
344,47	0,486



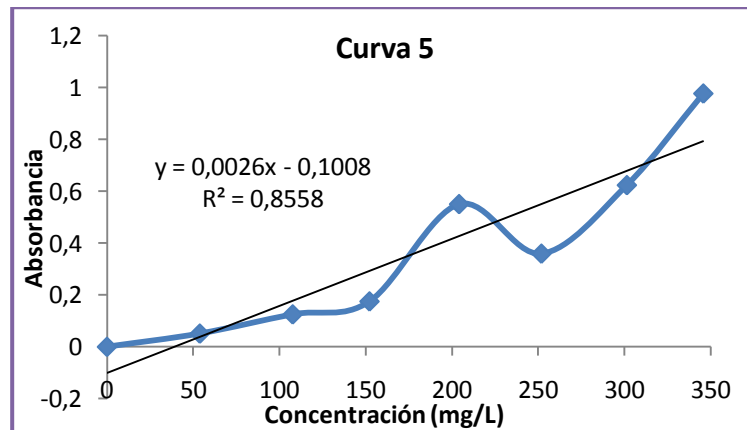
Curva 4

Curva 4	
Concentración	Absorbancia
0	0
54,54	0,048
110,09	0,304
150,02	0,211
197,06	0,239
250,00	0,312
302,74	0,406
347,37	0,381



Curva 5

Curva 5	
Concentración	Absorbancia
0	0
53,84	0,051
107,69	0,125
152,22	0,175
204,16	0,550
251,90	0,359
301,44	0,623
345,77	0,976



ANEXO H

Cromatogramas de los blancos de matriz (PB y MB) a las dos temperaturas.

PB

Figura H1. Cromatograma blanco de matriz (PB) de los simulantes acuosos a T⁰ ambiente.

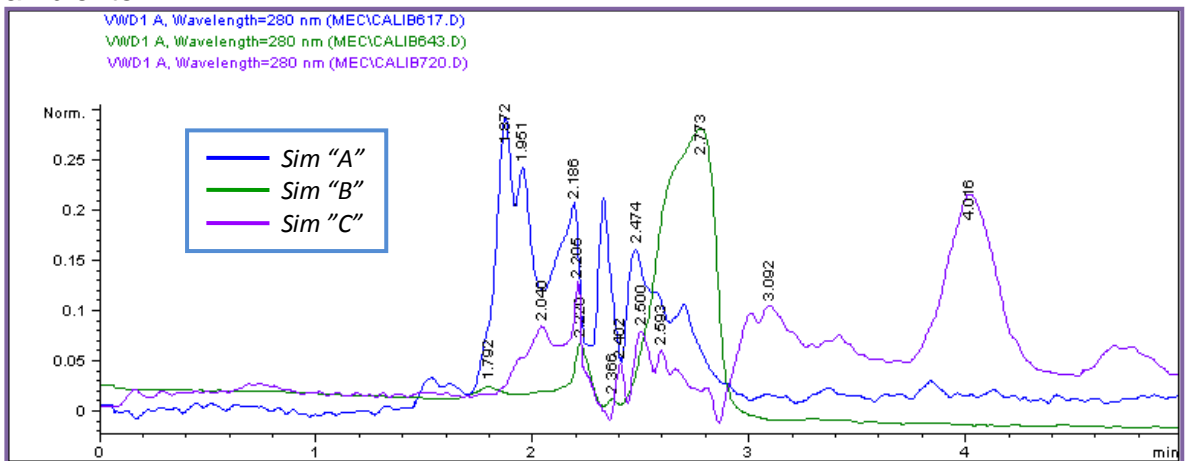
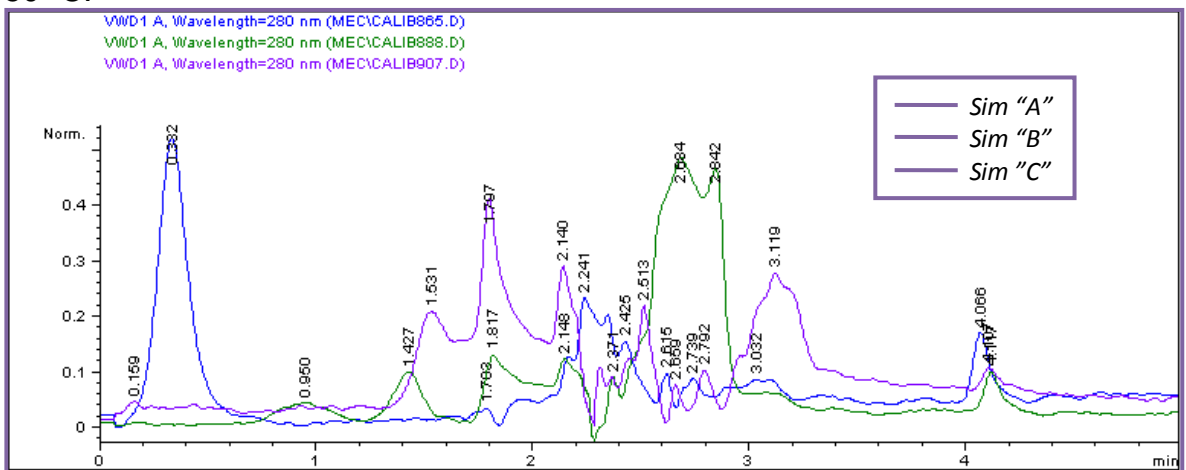


Figura H2. Cromatograma blanco de matriz (PB) de los simulantes acuosos a 50° C.



MB

Figura H3. Cromatograma blanco de matriz (MB) de los simulantes acuosos a T° ambiente.

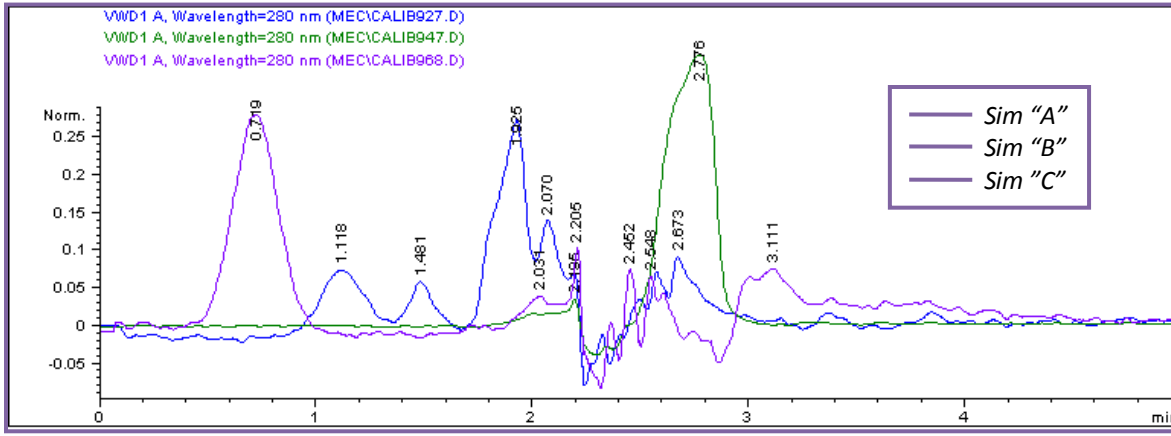
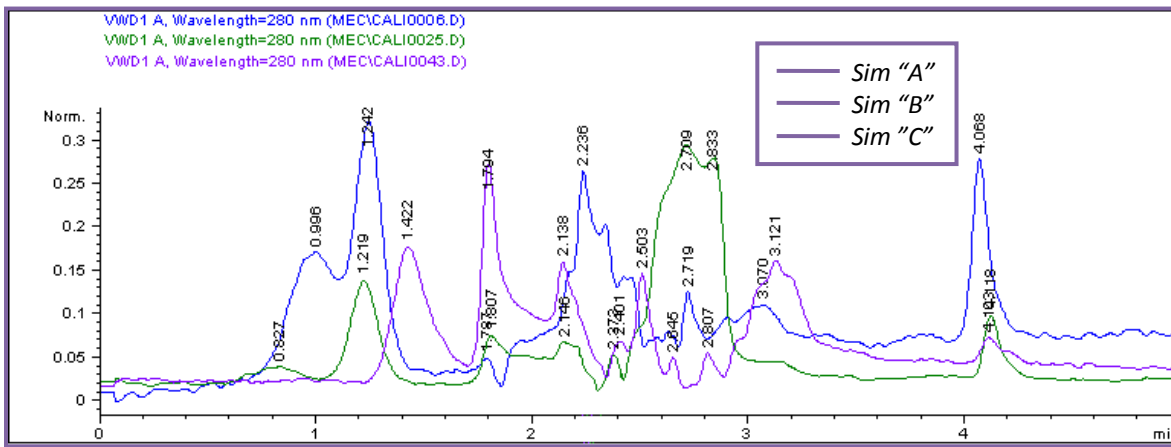


Figura H3. Cromatograma blanco de matriz (MB) de los simulantes acuosos a 50 °C.



ANEXO I

Señales de absorbancias de los blancos de simulantes de los tres polímeros

Tabla I1. Absorbancias de los blancos de simulante.

SIMULANTE B				
POLIMERO	25°C		50°C	
	PROMEDIO	s	PROMEDIO	s
PLA	0,002	0,002	0,000	0,001
PB	0,001	0,001	0,001	0,001
MB	0,002	0,001	0,001	0,001
SIMULANTE C				
POLIMERO	25°C		50°C	
	PROMEDIO	s	PROMEDIO	s
PLA	0,000	0,001	0,000	0,001
PB	0,002	0,002	0,001	0,001
MB	0,002	0,003	0,001	0,002
SIMULANTE D				
POLIMERO	25°C		50°C	
	PROMEDIO	s	PROMEDIO	s
PLA	0,003	0,003	0,002	0,001
PB	0,002	0,002	0,002	0,001
MB	0,003	0,003	0,003	0,002

Tabla I2. Absorbancias de los blancos de matriz en cada simulante

SIMULANTE B				
POLIMERO	25°C		50°C	
	PROMEDIO	s	PROMEDIO	s
PLA	0,001	0,001	0,001	0,002
PB	0,001	0,001	0,001	0,002
MB	0,001	0,002	0,001	0,001
SIMULANTE C				
POLIMERO	25°C		50°C	
	PROMEDIO	s	PROMEDIO	s
PLA	0,001	0,001	0,001	0,001
PB	0,001	0,002	0,001	0,001
MB	0,001	0,001	0,001	0,001
SIMULANTE D				
POLIMERO	25°C		50°C	
	PROMEDIO	s	PROMEDIO	s
PLA	0,006	0,003	0,006	0,002
PB	0,006	0,001	0,007	0,002
MB	0,005	0,003	0,008	0,002

ANEXO J

Cromatogramas obtenidos de la cuantificación de capsaicina en las matrices poliméricas con los simulantes acuosos.

PLA – Temperatura ambiente

Figura J1. Sim “B” para PLA, a dos niveles de concentración

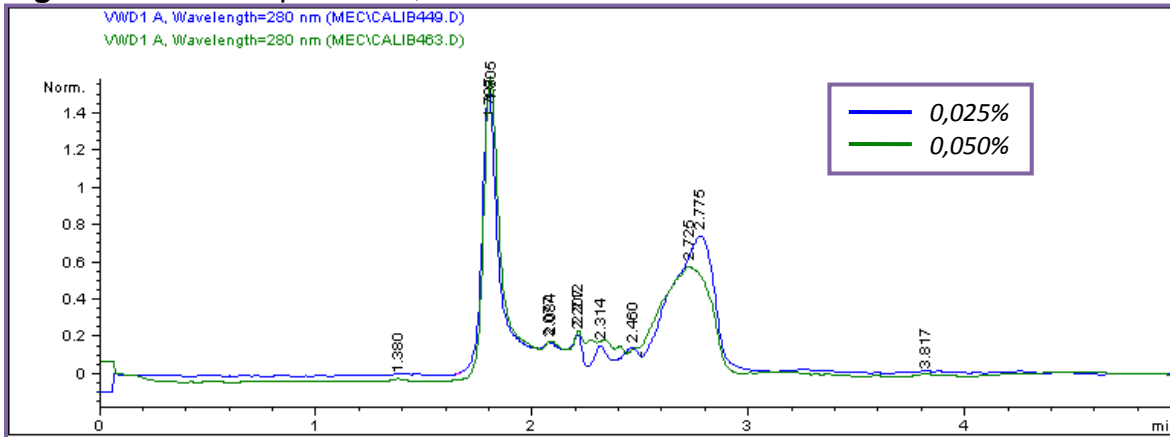
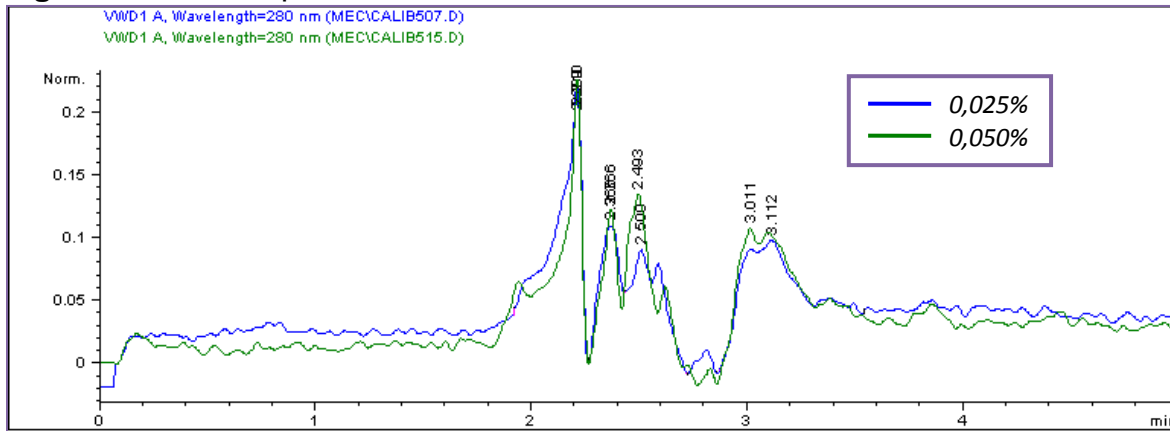


Figura J2. Sim “C” para PLA, a dos niveles de concentración



PLA – 50 °C

Figura J3. Sim “B” para PLA, a dos niveles de concentración

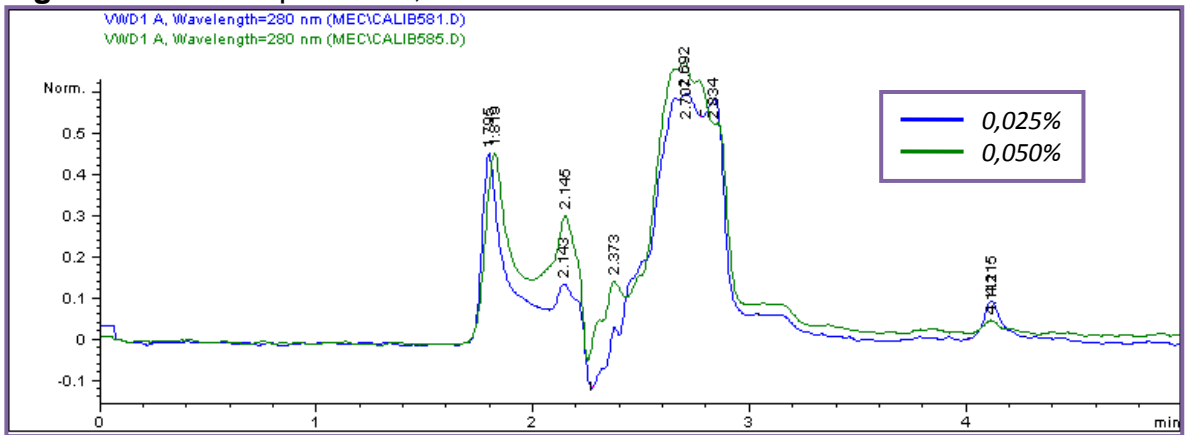
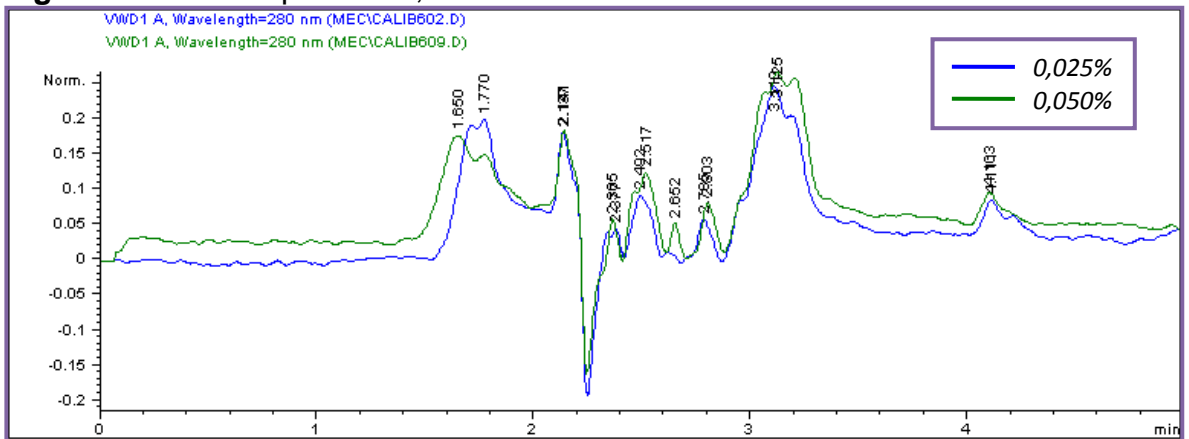


Figura J4. Sim “C” para PLA, a dos niveles de concentración



PB – Temperatura ambiente

Figura J5. Sim “A” para PB, a dos niveles de concentración

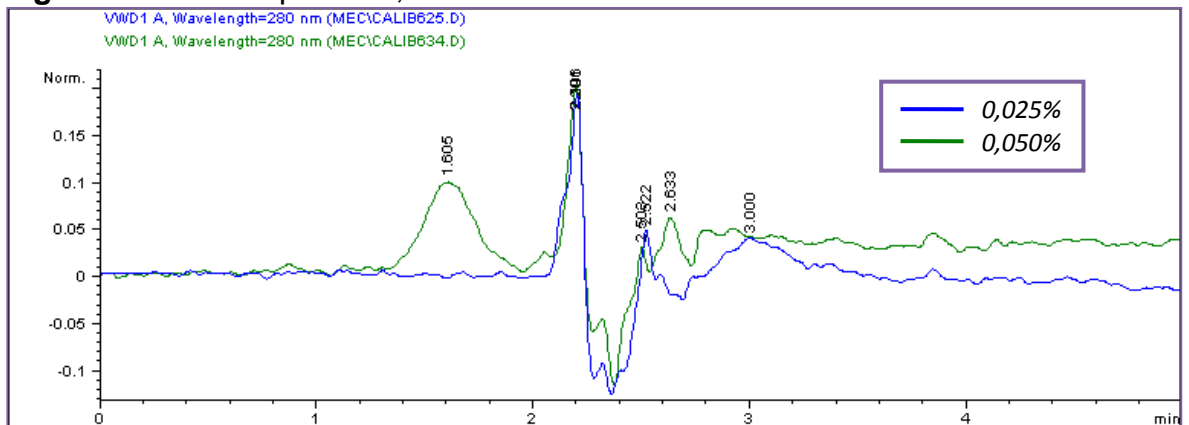


Figura J6. Sim "B" para PB, a dos niveles de concentración

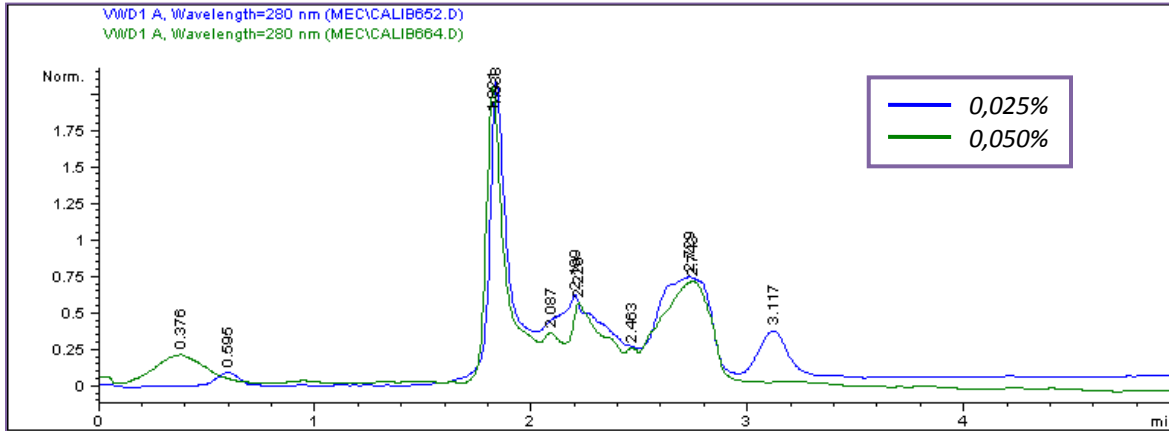
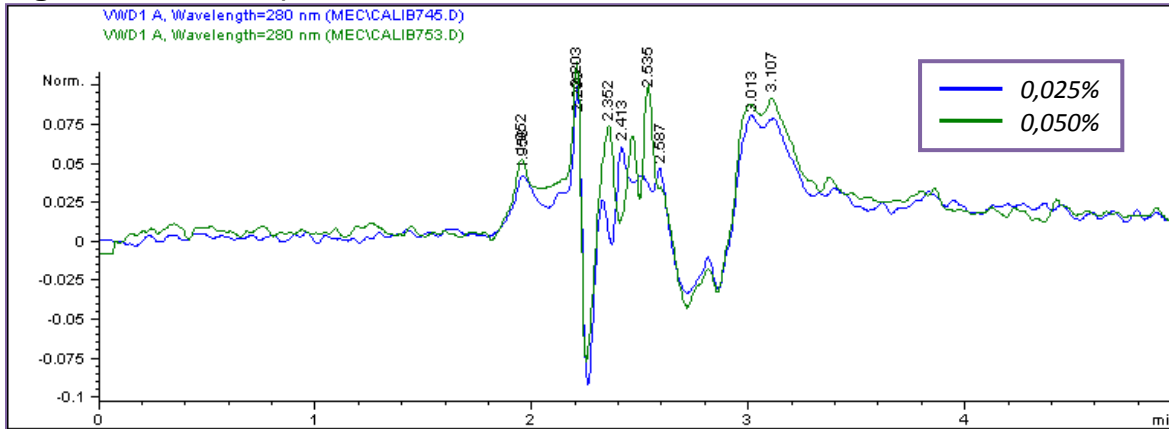


Figura J7. Sim "C" para PB, a dos niveles de concentración



PB – 50 °C

Figura J8. Sim "A" para PB, a dos niveles de concentración

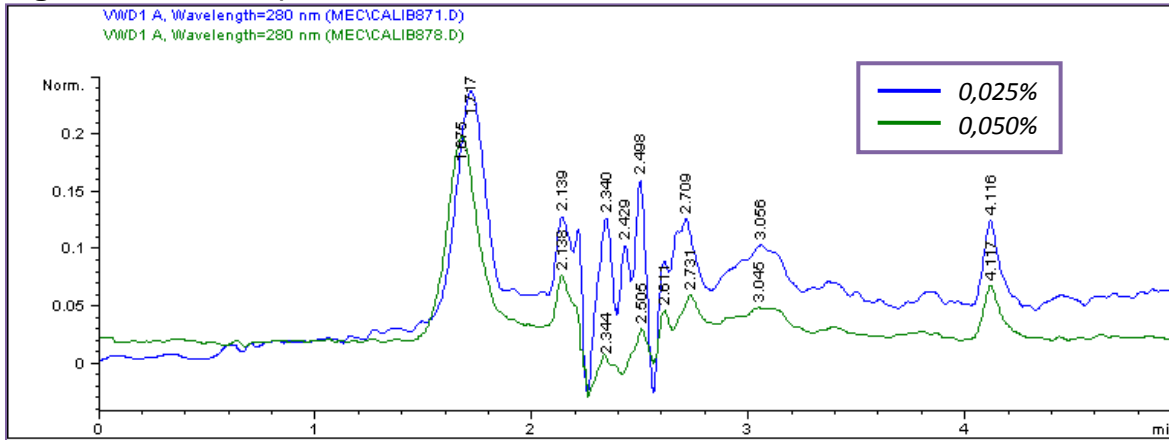


Figura J9. Sim "B" para PB, a dos niveles de concentración

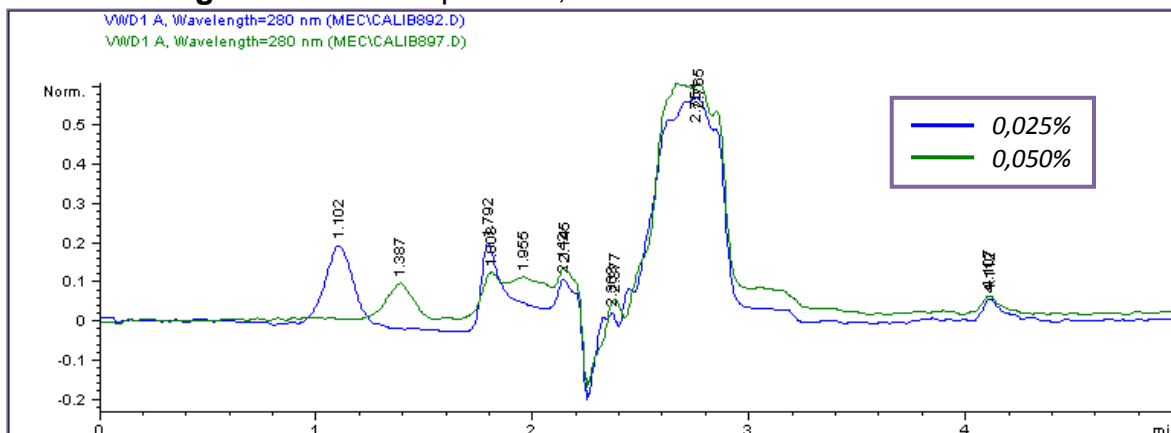
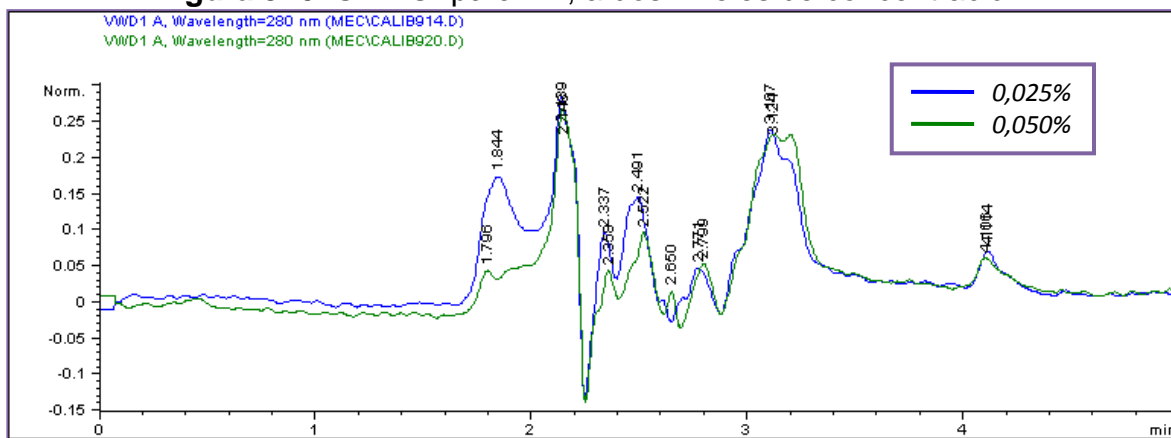


Figura J10. Sim "C" para PB, a dos niveles de concentración



MB – Temperatura ambiente

Figura J11. Sim "A" para MB, a dos niveles de concentración

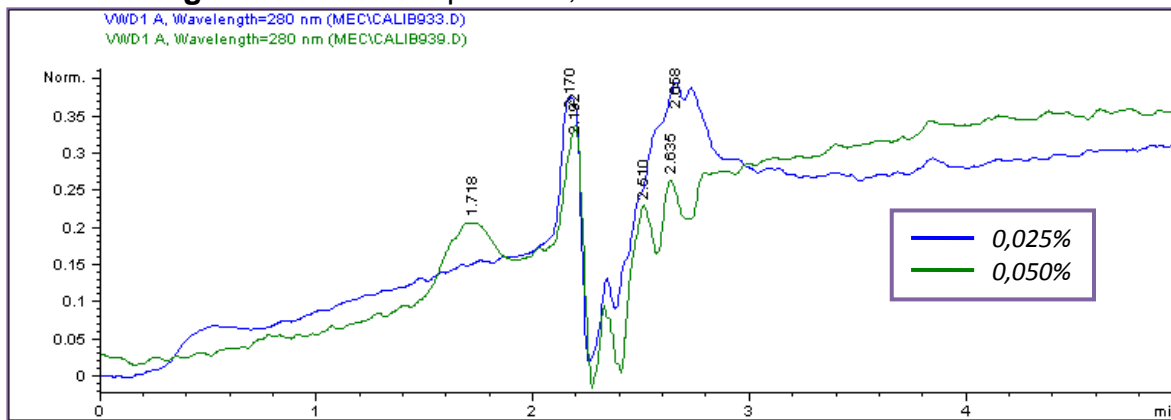


Figura J12. Sim "B" para MB, a dos niveles de concentración

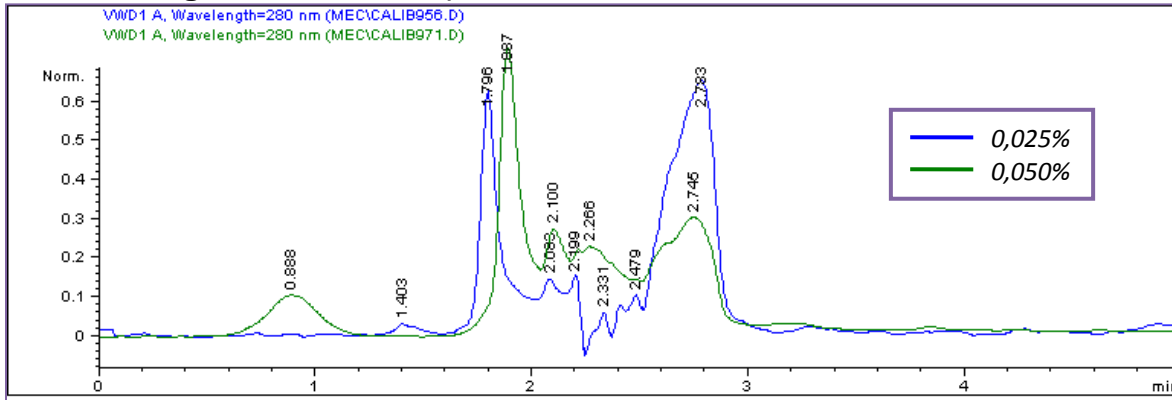
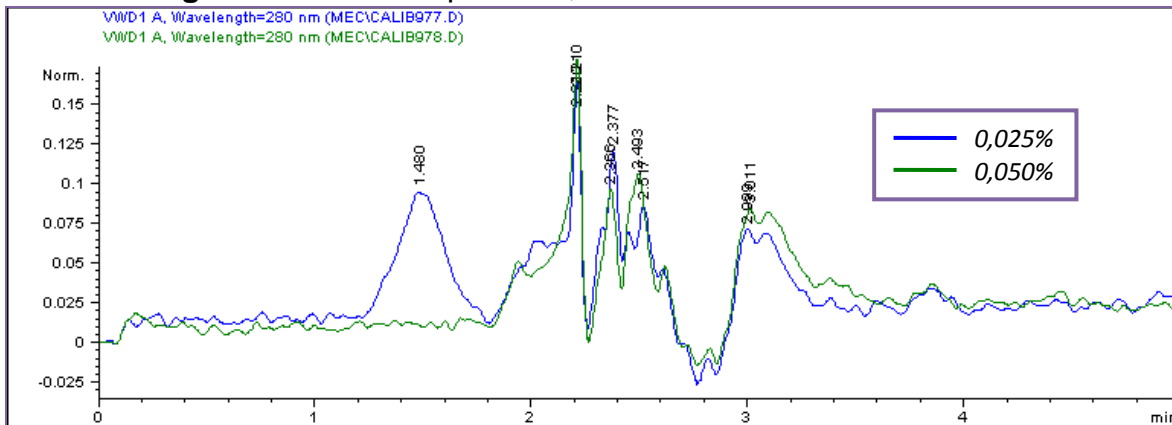


Figura J13. Sim "C" para MB, a dos niveles de concentración



MB – 50 °C

Figura J14. Sim "A" para MB, a dos niveles de concentración

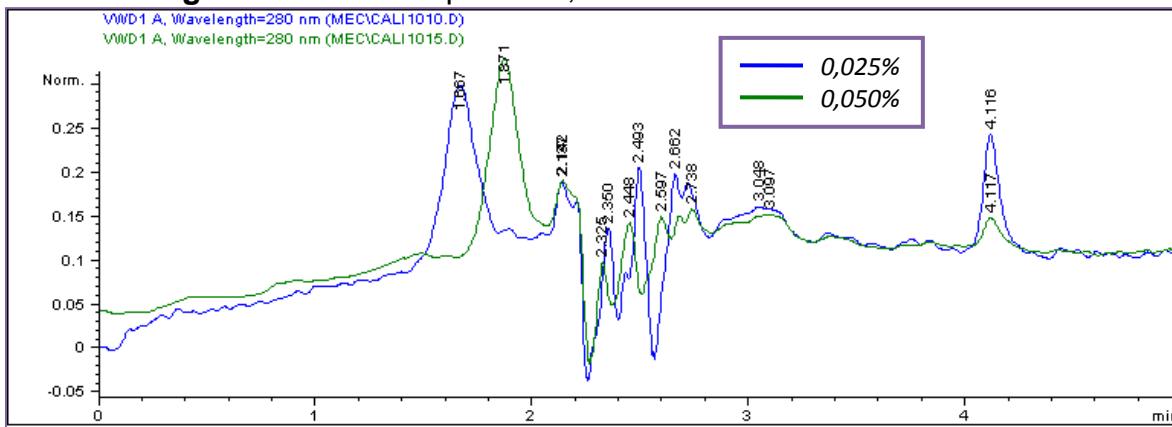


Figura J15. Sim "B" para MB, a dos niveles de concentración

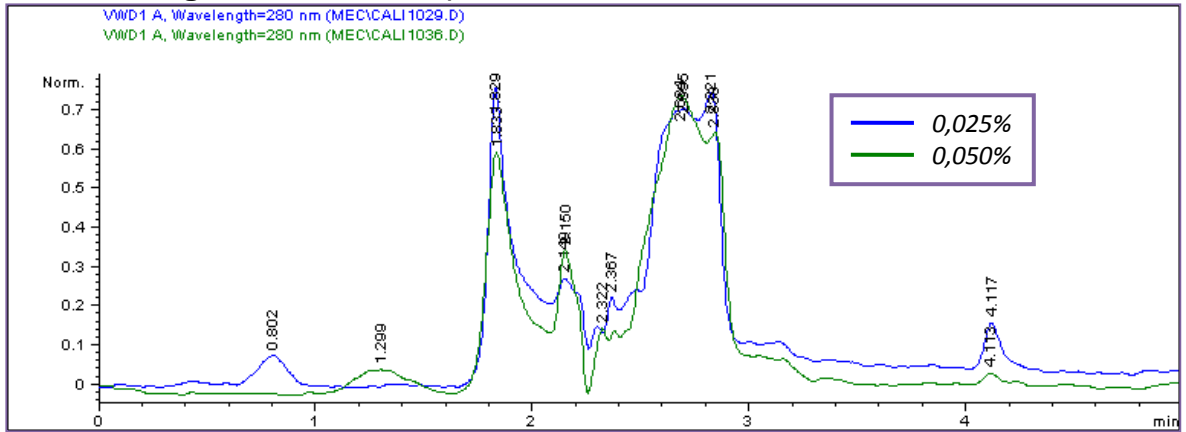
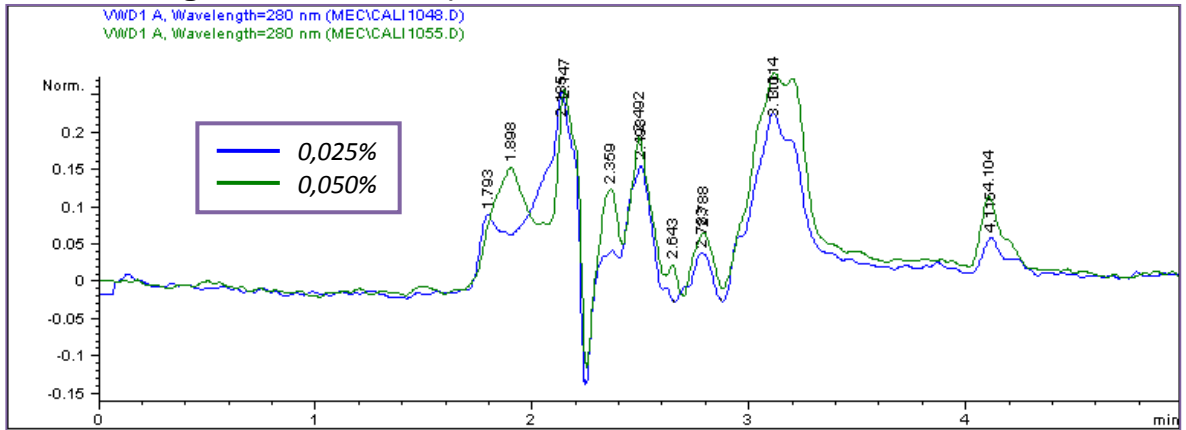


Figura J16. Sim "C" para MB, a dos niveles de concentración



ANEXO K

Cuantificación del colorante por Ultravioleta–Visible en las tres matrices poliméricas

PLA:

Tabla K1. Absorbancias en los simulantes alimenticios para PLA

A		B		C		D		
TEMPERATURA AMBIENTE								
Nivel	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)
1	0,000	ND	0,000	ND	0,000	ND	0,000	ND
2	0,001	ND	0,001	ND	0,001	ND	0,001	ND
3	0,001	ND	0,001	ND	0,001	ND	0,001	ND
TEMPERATURA 50 °C								
Nivel	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)
1	0	ND	0	ND	0,004	ND	0,004	ND
2	0,001	ND	0,001	ND	0,004	ND	0,004	ND
3	0,002	ND	0,002	ND	0,005	ND	0,005	ND

ND = No detectado

PB:

Tabla K2. Absorbancias en los simulantes alimenticios para PCL

A		B		C		D		
TEMPERATURA AMBIENTE								
Nivel	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)
1	0,000	ND	0,002	ND	0,000	ND	0,004	ND
2	0,001	ND	0,000	ND	0,001	ND	0,002	ND
3	0,001	ND	0,000	ND	0,001	ND	0,001	ND
TEMPERATURA 50°C								
Nivel	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)
1	0,001	ND	0,001	ND	0,001	ND	0,006	ND
2	0,002	ND	0,001	ND	0,002	ND	0,009	ND
3	0,003	ND	0,000	ND	0,003	ND	0,009	ND

ND = No detectado

MB:

Tabla K3. Absorbancias en los simulantes alimenticios para MB

A		B			C		D	
TEMPERATURA AMBIENTE								
Nivel	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)
1	0,001	ND	0,004	ND	0,000	ND	0,000	ND
2	0,004	ND	0,003	ND	0,001	ND	0,001	ND
3	0,005	ND	0,000	ND	0,002	ND	0,002	ND
TEMPERATURA 50°C								
Nivel	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)	Abs.	Concentración (mg/L)
1	0,000	ND	0,001	ND	0,000	ND	0,006	ND
2	0,001	ND	0,001	ND	0,000	ND	0,009	ND
3	0,002	ND	0,000	ND	0,000	ND	0,009	ND

ND = No detectado

ANEXO L

ANOVA para el colorante en los diferentes matrices poliméricas y los 4 simulantes.

PLA:

Simulante A:

Tabla L1. ANOVA Sim "A"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl.	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3,667E-6 ^a	3	1,222E-6	0,815	0,521
Intersección	1,633E-5	1	1,633E-5	10,889	0,011
Temperatura	3,333E-7	1	3,333E-7	0,222	0,650
Concentración	3,333E-7	1	3,333E-7	0,222	0,650
TXC	3,000E-6	1	3,000E-6	02,000	0,195
Error	1,200E-5	8	1,500E-6		
Total	3,200E-5	12			
Total corregida	1,567E-5	11			

Simulante B:

Tabla L2. ANOVA Sim "B"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,667E-5 ^a	3	5,556E-6	8,333	0,008
Intersección	1,200E-5	1	1,200E-5	18,000	0,003
Temperatura	3,000E-6	1	3,000E-6	4,500	0,067
Concentración	8,333E-6	1	8,333E-6	12,500	0,008
TXC	5,333E-6	1	5,333E-6	8,000	0,022
Error	5,333E-6	8	6,667E-7		
Total	3,400E-5	12			
Total corregida	2,200E-5	11			

Simulante C:

Tabla L3. ANOVA Sim "C"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	0,000 ^a	3	0,000	0,00	0,00
Intersección	0,000	1	0,000	0,00	0,00
Temperatura	0,000	1	0,000	0,00	0,00
Concentración	0,000	1	0,000	0,00	0,00
TXC	0,000	1	0,000	0,00	0,00.
Error	0,000	8	0,000		
Total	0,000	12			
Total corregida	0,000	11			

Simulante D:

Tabla L4. ANOVA Sim "D"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3,158E-5a	3	1,053E-5	15,792	0,001
Intersección	8,008E-5	1	8,008E-5	120,125	0,000
Temperatura	3,008E-5	1	3,008E-5	45,125	0,000
Concentración	7,500E-7	1	7,500E-7	1,125	0,320
TXC	7,500E-7	1	7,500E-7	1,125	0,320
Error	5,333E-6	8	6,667E-7		
Total	,000	12			
Total corregida	3,692E-5	11			

PB:

Simulante A:

Tabla L5. ANOVA Sim "A"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	8,667E-6 ^a	3	2,889E-6	5,778	0,021
Intersección	3,333E-5	1	3,333E-5	66,667	0,000
Temperatura	8,333E-6	1	8,333E-6	16,667	0,004
Concentración	3,333E-7	1	3,333E-7	0,667	0,438
TXC	0,0000	1	0,000	0,000	1,000
Error	4,000E-6	8	5,000E-7		
Total	4,600E-5	12			
Total corregida	1,267E-5	11			

Simulante B:

Tabla L6. ANOVA Sim "B"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	9,167E-7 ^a	3	3,056E-7	0,733	0,561
Intersección	7,500E-7	1	7,500E-7	1,800	0,217
Temperatura	7,500E-7	1	7,500E-7	1,800	0,217
Concentración	8,333E-8	1	8,333E-8	0,200	0,667
TXC	8,333E-8	1	8,333E-8	0,200	0,667
Error	3,333E-6	8	4,167E-7		
Total	5,000E-6	12			
Total corregida	4,250E-6	11			

Simulante C:

Tabla L7. ANOVA Sim "C"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,000E-6 ^a	3	3,333E-7	4,000	0,052
Intersección	3,333E-7	1	3,333E-7	4,000	0,081
Temperatura	3,333E-7	1	3,333E-7	4,000	0,081
Concentración	3,333E-7	1	3,333E-7	4,000	0,081
TXC	3,333E-7	1	3,333E-7	4,000	0,081
Error	6,667E-7	8	8,333E-8		
Total	2,000E-6	12			
Total corregida	1,667E-6	11			

Simulante D:

Tabla L8. ANOVA Sim "D"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	0,000 ^a	3	5,422E-5	24,099	,000
Intersección	0,000	1	0,000	151,704	,000
Temperatura	0,000	1	0,000	71,704	0,000
Concentración	1,333E-6	1	1,333E-6	0,593	0,464
TXC	0,000	1	,000	0,000	1,000
Error	1,800E-5	8	2,250E-6		
Total	0,001	12			
Total corregida	0,000	11			

MB:

Simulante A:

Tabla L9. ANOVA Sim "A"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3,292E-5 ^a	3	1,097E-5	1,995	0,193
Intersección	0,000	1	0,000	18,561	0,003
Temperatura	3,008E-5	1	3,008E-5	5,470	,048
Concentración	2,083E-6	1	2,083E-6	0,379	0,555
TXC	7,500E-7	1	7,500E-7	0,136	0,722
Error	4,400E-5	8	5,500E-6		
Total	0,000	12			
Total corregida	7,692E-5	11			

Simulante B:

Tabla L10. ANOVA Sim "B"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,667E-5 ^a	3	5,556E-6	8,333	0,008
Intersección	1,200E-5	1	1,200E-5	18,000	0,003
Temperatura	3,000E-6	1	3,000E-6	4,500	0,067
Concentración	8,333E-6	1	8,333E-6	12,500	0,008
TXC	5,333E-6	1	5,333E-6	8,000	0,022
Error	5,333E-6	8	6,667E-7		
Total	3,400E-5	12			
Total corregida	2,200E-5	11			

Simulante C:

Tabla L11. ANOVA Sim "C"

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	8,250E-6 ^a	3	2,750E-6	3,11	0,000
Intersección	6,750E-6	1	6,750E-6	7,64	0,000
Temperatura	6,750E-6	1	6,750E-6	7,64	0,000
Concentración	7,500E-7	1	7,500E-7	8,49	0,000
TXC	7,500E-7	1	7,500E-7	8,49	0,000
Error	7,063E-38	8	8,829E-39		
Total	1,500E-5	12			
Total corregida	8,250E-6	11			

Simulante D:

Tabla L12. ANOVA Sim "D"

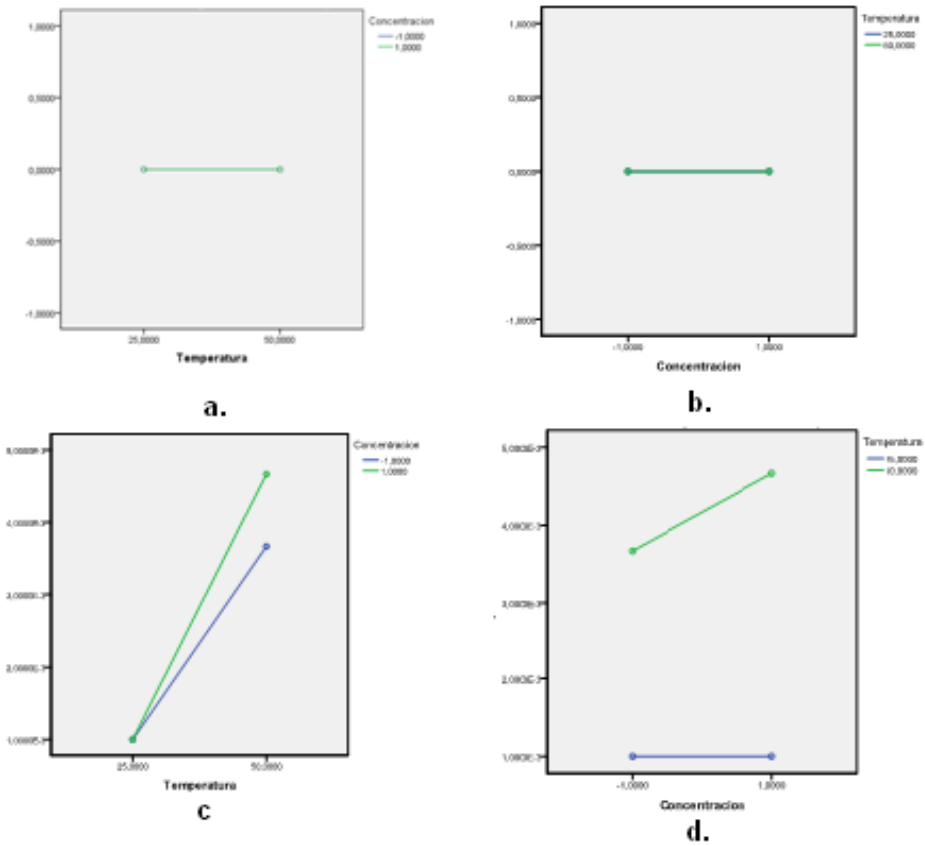
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	0,000	3	5,653E-5	42,396	0,000
Intersección	0,000	1	0,000	248,063	0,000
Temperatura	0,000	1	0,000	126,563	0,000
Concentración	8,333E-8	1	8,333E-8	0,063	0,809
TXC	7,500E-7	1	7,500E-7	0,563	0,475
Error	1,067E-5	8	1,333E-6		
Total	0,001	12			
Total corregida	0,000	11			

ANEXO M

Graficas de interacción de los polímeros PLA PB MB con los distintos simulante

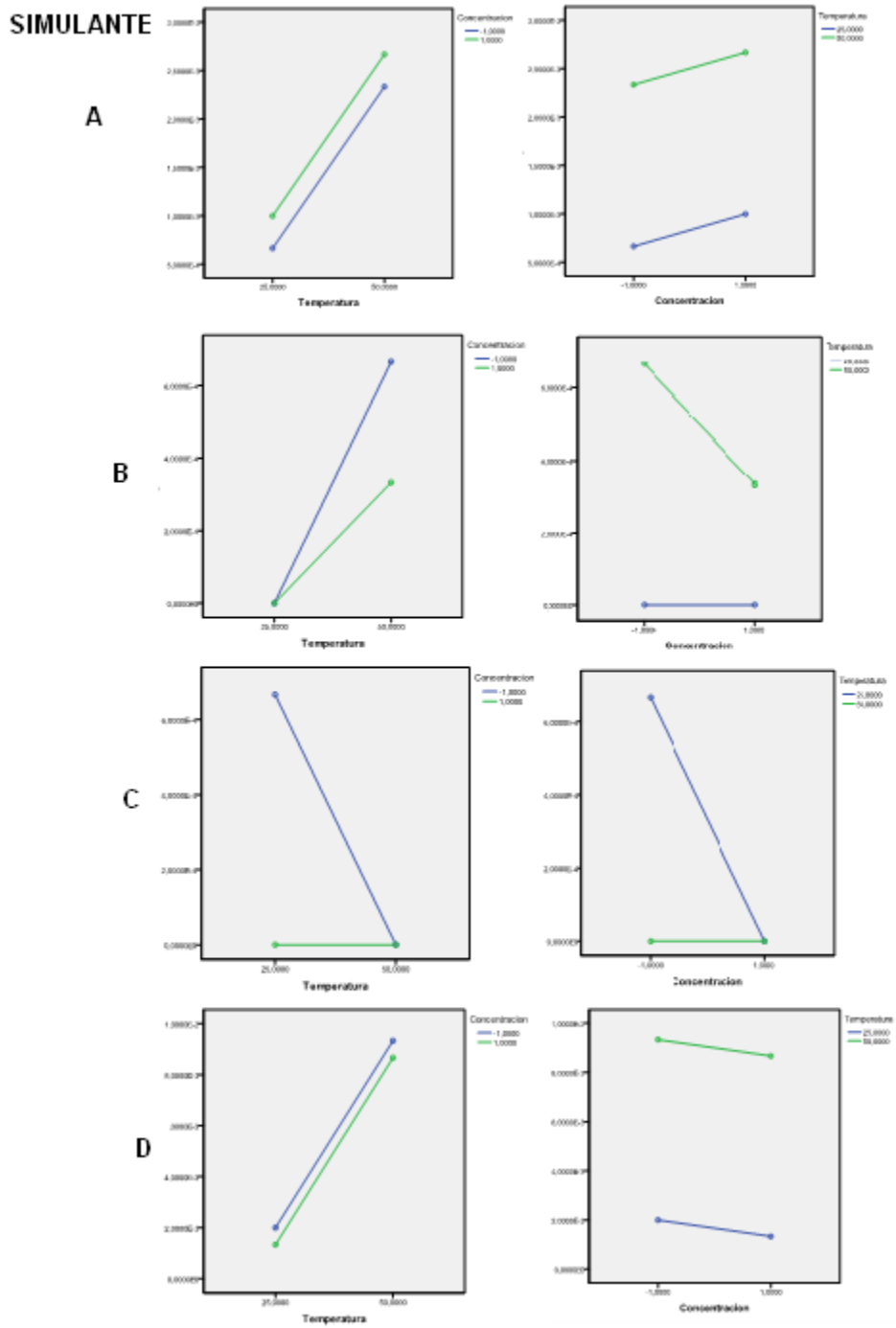
PLA:

Grafica M1. Graficas de interacción de PLA en el Sim "C" (a y b)
Sim "D" (c y d)



PB

Grafica M2. Graficas de interaccion de PB con los cuatro simulantes.



Grafica M3. Graficas de interaccion de MB con los cuatro simulantes.

