

**DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y CADMIO EN  
EMPAQUES TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES,  
EMPLEANDO LA TÉCNICA ESPECTROMÉTRICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

**ROBERTO JULIÁN DEL CASTILLO RAMÍREZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2012**

**DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y CADMIO EN  
EMPAQUES TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES,  
EMPLEANDO LA TÉCNICA ESPECTROMÉTRICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

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

**ROBERTO JULIÁN DEL CASTILLO RAMÍREZ**

Directora:

**MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D.**  
Grupo de Investigación BICAMSA

Asesores:

**OLGA LUCÍA HOYOS SAAVEDRA, Ph.D.**  
Grupo de Investigación QPN

**LILA MARCELA CLAROS GÓMEZ, Química**  
Joven Investigadora Colciencias  
Grupo de Investigación BICAMSA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2012**

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

Directora \_\_\_\_\_  
Maite Del Pilar Rada Mendoza, Ph.D.

Jurado1 \_\_\_\_\_  
Edier Humberto Pérez Dr.

Jurado 2 \_\_\_\_\_  
José Antonio Gallo Corredor M.Sc.

Fecha de sustentación: 5 de diciembre de 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por ser la luz que ilumina mi camino, quien me llena de sabiduría y fortaleza para enfrentar y superar todas las pruebas que se me presentan en la vida.

A mis padres Jaime y Rosa por su gran amor, apoyo incondicional y sus esfuerzos para ayudarme a salir adelante y terminar esta etapa de mi vida.

A mi hermano y hermana Oscar y Laura por ser una parte más de mí y alegrar mi corazón

A Carmen por brindarme su amor, cariño y llenar mi vida de felicidad.

A mis amigos y compañeros de carrera, Fernando, Jonathan, Stefy, Kate, Miguel, Angélica, Paola, Sergio y César por brindarme su amistad y haber compartido muchas alegrías y tristezas.

A mis amigos Jairo, Daniel, Dianita, Leidy, Luis Carlos, Oscar y Cristian, por haberme hecho entrar en sus vidas y haber compartido tantas cosas inolvidables.

A doña Carmen Ramírez y su familia, por abrirme las puertas de su casa y haberme brindado su apoyo.

A mis amigos del Junín, Alejandro, Giovanni, Mono, Pájaro, Angy, Oscar y Pacho por brindarme su amistad y haber compartido muchas alegrías.

A Leidy Fernanda por haberme ayudado y apoyado durante gran parte de mi carrera y trabajo de grado.

A mi directora de tesis Ph.D. Maite del Pilar Rada y al grupo de investigación BICAMSA, por permitirme desarrollar este proyecto de investigación.

A los profesores del departamento de Química por brindarme sus conocimientos y ayudarme en mi formación académica.

A la Universidad del Cauca (Laboratorios de BICAMSA, QPN, Reología), al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y al CREPIC, por la financiación de los proyectos que enmarcan este trabajo.

## CONTENIDO

	pág.
LISTA DE TABLAS .....	9
LISTA DE NEXOS.....	14
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	15
RESUMEN.....	17
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 General .....	19
2.2 Específicos.....	19
3 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	20
3.1 POLÍMEROS BIODEGRADABLES .....	20
3.1.1 Biopolímeros de origen agrícola.....	20
3.1.2 Polisacáridos .....	20
3.1.3 Biopolímeros de origen microbiano.....	23
3.1.4 Ácido poliláctico (PLA) .....	24
3.2 PLASTIFICANTES .....	24
3.3 TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES.....	25
3.3.1 Termoformados .....	25
3.3.2 Películas flexibles .....	25
3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS.....	26
3.4.1 Absorción Atómica.....	26
3.5 DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO.....	28
3.6 METALES PESADOS .....	29
3.6.1 Cadmio .....	29
3.6.2 Mercurio.....	30
3.7 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	30
3.7.1 Intervalo lineal.....	30
3.7.2 Precisión.....	30
3.7.3 Sensibilidad .....	31
3.8 MARCO DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32

3.8.1	Statistical Package For The Social Sciences (SPSS).....	32
3.8.2	Análisis de Varianza (ANOVA).....	34
4	METODOLOGÍA .....	36
4.1	EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	36
4.1.1	Equipos.....	36
4.1.2	Material de vidrio y plástico.....	37
4.1.3	Reactivos.....	37
4.2	LIMPIEZA DEL MATERIAL .....	37
4.3	VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO .....	38
4.4	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES .....	38
4.5	MUESTRAS .....	39
4.6	PRE-TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	39
4.7	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO .....	40
4.7.1	Optimización de la relación de ácidos.....	40
4.7.2	Optimización del peso de la muestra .....	41
4.7.3	Optimización de la temperatura y el tiempo de digestión .....	41
4.8	PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA .....	41
4.8.1	Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de mercurio y cadmio.....	41
4.8.2	Optimización de la temperatura de calcinación y atomización para la determinación de cadmio por horno de grafito .....	42
4.9	MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN.....	42
4.10	ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO Y MERCURIO .....	43
4.10.1	Linealidad .....	43
4.10.2	Precisión.....	43
4.10.3	Sensibilidad .....	44
4.10.4	Exactitud evaluada como porcentaje de recuperación .....	44
4.11	ESTABILIDAD DE LOS METALES.....	45
4.11.1	Estabilidad del Estándar .....	45
4.11.2	Estabilidad de los metales en las muestras digeridas .....	45
4.12	DETERMINACIÓN DE CADMIO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	46

4.13	DETERMINACIÓN DE MERCURIO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	46
4.14	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	47
5	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	48
5.1	VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO.....	48
5.2	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIGESTIÓN.....	48
5.2.1	Optimización de ácidos.....	48
	Para los demás procesos de optimización, se realizaron mezclas en diferentes proporciones de los dos ácidos (tabla 5), para los pesos 0,5000, 1,0000 y 2,0000 para así, obtener la mejor relación para las digestiones de las muestras de termoformados y películas flexibles. ....	48
5.2.2	Optimización del peso de la muestra para termoformados.....	49
5.2.3	Optimización del tiempo y temperatura de digestión para termoformados .....	49
5.2.4	Optimización del peso para películas flexibles .....	51
5.2.5	Optimización del tiempo y temperatura de digestión para películas flexibles .....	51
5.3	PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA .....	52
5.3.1	Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de cadmio y mercurio.....	52
5.4	ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	53
5.4.1	Linealidad .....	54
5.4.2	Precisión.....	56
5.4.3	Sensibilidad de calibrado .....	58
5.4.4	Sensibilidad analítica .....	59
5.4.5	Porcentaje de recuperación .....	61
5.5	ESTABILIDAD.....	63
5.5.1	Estabilidad de estándares de cadmio y mercurio.....	63
5.5.2	Estabilidad en muestras de termoformados y películas flexibles.....	64
5.6	DETERMINACIÓN DE CADMIO Y MERCURIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA...	66
5.6.1	Optimización de la temperatura de calcinación y atomización para la determinación de cadmio por horno de grafito .....	66
5.6.2	Determinación de cadmio en termoformados y películas flexibles .....	68
5.6.3	Determinación de cadmio en la materia prima .....	69
5.6.1	Determinación de mercurio en termoformados y películas flexibles.....	71
5.6.2	Determinación de mercurio en materia prima.....	72

6	CONCLUSIONES .....	75
7	BIBLIOGRAFÍA.....	77
	ANEXOS .....	82



## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Reactivos utilizados para digestiones por vía húmeda.....	<b>28</b>
<b>Tabla 2.</b> Equipos empleados para la estandarización e implementación de los métodos analíticos.....	<b>36</b>
<b>Tabla 3.</b> Material de vidrio y plástico usados para la estandarización e implementación de los métodos analíticos .....	<b>37</b>
<b>Tabla 4.</b> Reactivos.....	<b>37</b>
<b>Tabla 5.</b> Relación de ácidos ( $\text{HNO}_3$ y $\text{HClO}_4$ ) para la digestión ácida con reflujo.....	<b>40</b>
<b>Tabla 6.</b> Datos de preparación de estándares de Cd para la curva de calibración.....	<b>42</b>
<b>Tabla 7.</b> Datos de preparación de estándares de Hg para la curva de calibración.....	<b>43</b>
<b>Tabla 8.</b> Condiciones instrumentales en el EAA - Horno de Grafito para la determinación de Cadmio .....	<b>46</b>
<b>Tabla 9.</b> Condiciones instrumentales en el EAA-VP para determinación de Mercurio ....	<b>46</b>
<b>Tabla 10.</b> ANOVA de un factor para la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de cadmio.....	<b>53</b>
<b>Tabla 11.</b> ANOVA de un factor para la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de mercurio.....	<b>53</b>
<b>Tabla 12.</b> Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares de cadmio para evaluar la linealidad.....	<b>54</b>
<b>Tabla 13.</b> Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares de mercurio para evaluar la linealidad .....	<b>54</b>
<b>Tabla 14.</b> Coeficiente de correlación de Pearson para cadmio y mercurio .....	<b>55</b>
<b>Tabla 15.</b> Ajuste del Modelo lineal para cadmio y mercurio .....	<b>55</b>
<b>Tabla 16.</b> Análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$ .....	<b>56</b>
<b>Tabla 17.</b> ANOVA de un factor para cadmio.....	<b>56</b>
<b>Tabla 18.</b> ANOVA de un factor para mercurio .....	<b>56</b>
<b>Tabla 19.</b> Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de cadmio (Repetibilidad) .....	<b>57</b>
<b>Tabla 20.</b> Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de mercurio (Repetibilidad).....	<b>57</b>

**pág.**

<b>Tabla 21.</b> Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de cadmio (Precisión Intermedia).....	<b>58</b>
<b>Tabla 22.</b> Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de mercurio (Precisión Intermedia) .....	<b>58</b>
<b>Tabla 23.</b> Pendiente de la repetibilidad y precisión intermedia de cadmio y mercurio para la sensibilidad de calibrado .....	<b>59</b>
<b>Tabla 24.</b> Absorbancias del blanco para el análisis de cadmio .....	<b>59</b>
<b>Tabla 25.</b> Absorbancias del blanco para el análisis de mercurio.....	<b>60</b>
<b>Tabla 26.</b> Porcentaje de recuperación de cadmio ( $\mu\text{g/L}$ ) en el análisis de termoformados (MPER-183).....	<b>61</b>
<b>Tabla 27.</b> Porcentaje de recuperación de mercurio ( $\mu\text{g/L}$ ) en el análisis de termoformados Nataima 31) .....	<b>61</b>
<b>Tabla 28.</b> Porcentaje de recuperación de mercurio ( $\mu\text{g/L}$ ) en el análisis de películas flexibles (CM 7138-7 nativo).....	<b>62</b>
<b>Tabla 29.</b> Estadísticos para los porcentajes de recuperación de cadmio y mercurio en el análisis de termoformados .....	<b>62</b>
<b>Tabla 30.</b> Estadísticos para los porcentajes de recuperación de mercurio en el análisis de películas flexibles (CM 7138-7 nativo) .....	<b>62</b>
<b>Tabla 31.</b> ANOVA de un factor para estabilidad del estándar de $0,8 \mu\text{g Cd/L}$ .....	<b>63</b>
<b>Tabla 32.</b> ANOVA de un factor para estabilidad del estándar de $12 \mu\text{g Hg/L}$ .....	<b>64</b>
<b>Tabla 33.</b> ANOVA de un factor para estabilidad de termoformado, metal cadmio.....	<b>65</b>
<b>Tabla 34.</b> ANOVA de un factor para estabilidad de termoformado, metal mercurio .....	<b>65</b>
<b>Tabla 35.</b> ANOVA de un factor para estabilidad de película flexible, metal mercurio .....	<b>65</b>
<b>Tabla 36.</b> Condiciones de temperatura óptimas del Horno de Grafito para la determinación de Cadmio .....	<b>66</b>
<b>Tabla 37.</b> Temperatura, absorbancia promedio y coeficiente de variación para la optimización de la temperatura de calcinación .....	<b>66</b>
<b>Tabla 38.</b> Temperatura, absorbancia promedio y coeficiente de variación para la optimización de la temperatura de atomización.....	<b>67</b>
<b>Tabla 39.</b> Concentración promedio ( $\pm$ desviación estándar), coeficiente de variación (CV%) de cadmio (N=3) de siete muestras de termoformados biodegradables .....	<b>68</b>
<b>Tabla 40.</b> Concentración promedio ( $\pm$ desviación estándar) de cadmio (N=3) de seis muestras de películas flexibles .....	<b>69</b>

<b>Tabla 41.</b> Concentración promedio ( $\pm$ desviación estándar), coeficiente de variación(CV%) de cadmio (N=3) de siete muestras de harina de yuca y fibra de fique.....	<b>70</b>
<b>Tabla 42.</b> Concentración promedio ( $\pm$ desviación estándar), coeficiente de variación (CV%) de cadmio (N=3) de siete muestras de termoformados .....	<b>71</b>
<b>Tabla 43.</b> Concentración promedio ( $\pm$ desviación estándar), coeficiente de variación (CV%) de mercurio (N=3) de seis muestras de películas flexibles .....	<b>72</b>
<b>Tabla 44.</b> Concentración promedio ( $\pm$ desviación estándar), coeficiente de variación (CV%) de mercurio (N=3) de tres muestras de harina de yuca y fibra de fique.....	<b>73</b>
<b>Tabla 45.</b> Concentración promedio ( $\pm$ desviación estándar), coeficiente de variación (CV%) de mercurio (N=3) de cinco muestras de almidones.....	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Celulosa .....	21
<b>Figura 2.</b> Amilosa .....	22
<b>Figura 3.</b> Amilopectina .....	22
<b>Figura 4.</b> Máquina de moldeo por compresión empleada para la elaboración de termofomados .....	25
<b>Figura 5.</b> Máquina de extrusión empleada para la elaboración de películas flexible.....	26
<b>Figura 6.</b> Muestras: a) Macerado de termofomado, b) Cortado de película flexible .....	40
<b>Figura 7.</b> Digestión de termofomado HMC-1; 1,0000 g, 70°C, 3 horas: a) HClO <sub>4</sub> b) HNO <sub>3</sub> .....	48
<b>Figura 8.</b> Digestión ácida de termofomado HMC-1:a) 2,0000 g b) 1,0000g.....	49
<b>Figura 9.</b> Digestión de termofomado HMC-1, relación 3:1, 0,5000 g 70°C:a) 60 minutos, b) 120 minutos c) 180 minutos .....	50
<b>Figura 10.</b> Digestiones de termofomado HMC-1, relación 3:1, 1,0000 g 70°C a) 60 minutos; b) 120 minutos; c)180 minutos .....	50
<b>Figura 11.</b> Concentración de mercurio del termofomado HMC-1, de diferentes relaciones de ácidos, 1,0000 g de muestra, 70°C y 180 minutos de digestión.....	50
<b>Figura 12.</b> Digestiones de película flexible (SM 707-17 hidrolizado) 50°C a) 0,5000 g 5 minutos; b) 1,0000 g 15 minutos; c) 1,0000 g 30 minutos; d) 1,0000 g, 45 minutos .....	51
<b>Figura 13.</b> Optimización de la digestión para películas flexibles a diferentes temperaturas y tiempos, relación de ácidos 3:1 y 1,0000 g de muestra .....	52
<b>Figura 14.</b> Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de: a) cadmio, b) mercurio.....	52
<b>Figura 15.</b> Curva de calibración para cadmio .....	54
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración para mercurio.....	55
<b>Figura 17.</b> Estabilidad del estándar de: a) 0,8 µg Cd/L, b) 12,0 µg Hg/L durante 10 días	63
<b>Figura 18.</b> Estabilidad de: a) Cd en el termofomado CM 4574-7, b) Hg en el termofomado NATAIMA -31, c) Hg en la película flexible CM 7138-7 nativo .....	64
<b>Figura 19.</b> Optimización de la temperatura de calcinación .....	67
<b>Figura 20.</b> Optimización de la temperatura de atomización.....	20
<b>Figura 21.</b> Concentración promedio de cadmio en termofomados, harinas de yuca .....	70
<b>Figura 22.</b> Concentración promedio de mercurio en termofomados, harinas y fibra de fique .....	73
<b>Figura 23.</b> Concentración promedio de mercurio en películas flexibles y almidones .....	74

## LISTA DE ECUACIONES

	pág.
<b>Ecuación 1.</b> Reducción de mercurio con borohidruro de sodio .....	27
<b>Ecuación 2.</b> Ecuación para calcular el límite de detección .....	31
<b>Ecuación 3.</b> Ecuación para calcular el límite de detección .....	32
<b>Ecuación 4.</b> Ecuación para calcular el límite de cuantificación .....	32
<b>Ecuación 5.</b> Ecuación de recta .....	35
<b>Ecuación 6.</b> Ecuación para calcular el porcentaje de recuperación .....	40
<b>Ecuación 7.</b> Ecuación para determinar el porcentaje de humedad .....	45

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Verificación de la calibración del material de vidrio .....	82
<b>Anexo 2.</b> Humedad de las muestras de termoformados y películas flexibles .....	88
<b>Anexo 3.</b> Optimización del proceso de digestión ácida con reflujo .....	89
<b>Anexo 4.</b> Puesta a punto de la técnica analítica .....	94
<b>Anexo 5.</b> Determinación de los parámetros de calidad .....	96
<b>Anexo 6.</b> Determinación de la estabilidad de los metales.....	102
<b>Anexo 7.</b> Determinación de cadmio y mercurio por absorción atómica .....	108
<b>Anexo 8.</b> Certificados de presentación del trabajo .....	110
<b>Anexo 9.</b> Carta de presentación de artículo a revista .....	114
<b>Anexo 10.</b> Carta de aceptación de artículo a revista .....	115

## LISTA DE ACRÓNIMOS

$\alpha$	Nivel de significancia
$\gamma$	Coefficiente de expansión de los balones aforados, expresado en 1/°C
$\rho_G$	Densidad de las pesas de ajuste en la balanza, expresado en gramo/mililitro
$\rho_L$	Densidad del aire en función de la presión atmosférica expresado en gramos/mililitro
$\rho_W$	Densidad del agua a la temperatura de medida, expresado en gramos/mililitro
$\bar{A}$	Absorbancia media
$\mu\text{g}$	Microgramos
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>BH<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	Borohidruro
<b>Cd</b>	Cadmio
<b>CREPIC</b>	Centro Regional de Productividad e Innovación del Cauca
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>EAA</b>	Espectrometría de absorción atómica
<b>EAA-HG</b>	Espectrometría de absorción atómica – Horno de grafito
<b>EAA-VP</b>	Espectrometría de absorción atómica – Vapor frío
<b>F</b>	Estadístico de Levene
<b>Factor Z</b>	Factor inverso a la densidad del agua, que en función de la temperatura, es corregido para considerar la presión atmosférica y el coeficiente de expansión del vidrio borosilicato (material de los balones aforados), expresado en mililitro/gramo
<b>gl</b>	Grados de libertad
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>H<sub>0</sub></b>	Hipótesis nula
<b>H<sub>1</sub></b>	Hipótesis alternativa
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	Ácido bórico
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HClO<sub>4</sub></b>	Ácido perclórico
<b>HDPE</b>	Polietileno de alta densidad
<b>Hg</b>	Mercurio
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Ácido nítrico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrógeno
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>LDPE</b>	Polietileno de baja densidad
<b>MADR</b>	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
<b>mL</b>	mililitros
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	Borohidruro de Sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b>ng</b>	Nanogramos

<b>nm</b>	Nanómetros
<b>PCL</b>	Policaprolactona
<b>PHA</b>	Polihidroxiacanoatos
<b>PHB</b>	Polihidroxi butirato
<b>PLA</b>	Ácido poliláctico
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>PS</b>	Poliestireno
<b>PET</b>	Polietilentereftalato
<b>PVC</b>	Policloruro de vinilo
<b>r</b>	Coefficiente de correlación de regresión
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>S<sub>a</sub></b>	Desviación estándar de la señal del blanco
<b>s</b>	Desviación estándar
<b>µg/L</b>	microgramos/Litro (ppm)
<b>mg/L</b>	miligramos/Litro (ppb)
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TPS</b>	Almidón termoplástico biodegradable
<b>W</b>	Estadístico de Shapiro-Wilk
<b>W<sub>1</sub></b>	Valor obtenido de la pesada del balón aforado sin carga (seco), expresado en gramos
<b>W<sub>2</sub></b>	Valor obtenido de la pesada del balón aforado con carga (lleno de agua), expresado en gramos}
<b>W<sub>1</sub>-W<sub>2</sub></b>	Masa de agua con la cual se ha llenado el balón aforado, expresado en gramos
<b>X<sub>LC</sub></b>	Concentración del límite de cuantificación
<b>X<sub>LD</sub></b>	Concentración del límite de detección
<b>XRFS</b>	Espectrometría de fluorescencia de rayos X
<b>□<sub>0</sub></b>	Señal media del blanco



## RESUMEN

En este trabajo, se determinaron los metales pesados Cadmio (Cd) y Mercurio (Hg) en 7 muestras de empaques termoformados y 6 muestras de películas flexibles biodegradables (empleando la técnica de espectrometría de absorción atómica y utilizando como métodos de atomización horno de grafito y vapor frío, respectivamente), obtenidas durante el desarrollo de los proyectos “Producción y caracterización de empaques termoformados biodegradables a partir de harina de yuca, fibra de fique y plastificantes” y “Películas flexibles biodegradables por extrusión de tornillo simple a partir de almidón de yuca, plastificante y PLA”; estos proyectos contaron con la financiación del Ministerio Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), del Centro Regional De Productividad e Innovación del Cauca (CREPIC) y de la Universidad del Cauca.

Previamente a la determinación, se llevó a cabo una digestión ácida con reflujo y se determinó cadmio a una longitud de onda de 228,8 nm y mercurio a 253,7 nm, empleando curva de calibración como método de cuantificación.

Con el propósito de ofrecer metodologías confiables para la cuantificación de estos metales en las muestras de interés, se llevó a cabo la estandarización del método analítico, determinándose los parámetros de calidad como son, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión intermedia, repetibilidad y exactitud; además, se evaluó la estabilidad de los estándares de cadmio (0,8 µg/L) y de mercurio (12 µg/L), de una muestra de termoformado (CM4574-7 para cadmio y NATAIMA-31 para mercurio) y de película flexible para mercurio (CM 7138-7 NATIVO).

A los datos obtenidos por cada uno de los métodos empleados, se les realizó un tratamiento estadístico con el paquete Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 11.5, y excel.

Las concentraciones de cadmio y mercurio detectadas en las muestras de termoformados y películas flexibles, están por debajo de las concentraciones permitidas para productos que van a estar en contacto con los alimentos (<1,0 mg de Hg/Kg y <1,0 mg de Cd/Kg); sin embargo, hay que tener cuidado con estos elementos, ya que su bioacumulación causa un problema muy grave a nivel medioambiental.

Adicionalmente, dentro del proyecto de investigación, se determinaron otros metales tóxicos tales como plomo, arsénico, selenio y zinc.

Palabras Clave: *Termoformados, Polímeros biodegradables, Espectrometría de absorción atómica, Horno de Grafito, Vapor frío, Cadmio, Mercurio.*

## 1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con la creciente conciencia ambiental, en los últimos años ha habido una expansión en la búsqueda de nuevos materiales, que muestran un alto rendimiento a precios asequibles y son respetuosos con el medio ambiente, siendo “renovables”, “reciclables”, “sostenibles” y “biodegradables” [1].

Lo anterior ha llevado al desarrollo de biopolímeros o polímeros biodegradables, tales como el almidón termoplástico (TPS), que han abierto un gran campo de estudio e investigación, incentivado por la necesidad de encontrar alternativas viables a los polímeros convencionales derivados del petróleo, no solo por la escasez del hidrocarburo, sino por el negativo impacto ambiental generado y la elevada acumulación de plásticos no degradables [2].

Uno de los principales usos de los biopolímeros, es como empaques para la preservación y protección de todo tipo de productos, siendo los alimentos y las materias primas el campo de mayor prioridad. Estos productos requieren atención, dada la contaminación que pueden presentar durante su elaboración o su presencia en la materia prima [3] por metales pesados, los cuales generan una preocupación importante en la salud pública, debido a su toxicidad aguda y/o crónica, ya que no son biodegradables y permanecen durante mucho tiempo en el entorno, bioacumulándose en los seres vivos.

Dentro de los metales pesados tóxicos se encuentran el Cd y el Hg, los cuales pueden modificar a las células y a los procesos bioquímicos. Se ha demostrado que el Cd inhibe muchas enzimas y afecta a un gran número de procesos asociados con calcio; adicionalmente, puede alterar los patrones de fosforilación que actúan directamente sobre el citoesqueleto. El Hg, interfiere en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, inhibe varias enzimas citosólicas y afecta el sistema nervioso central [4].

Para que los biopolímeros elaborados puedan utilizarse en contacto con los alimentos, la norma técnica colombiana NTC-4096 regula, entre otros parámetros, la concentración de metales pesados tóxicos presentes en estos materiales y por tanto, es de gran importancia realizar su determinación y establecer que cumplan con los requerimientos especificados en la norma para así garantizar una buena calidad del producto [5]; adicionalmente, para tener certeza de la concentración de dichos metales, los análisis se deben realizar mediante técnicas sensibles y confiables.

Es por esto que en este trabajo, se estandarizaron las técnicas para la determinación de Cd y Hg en empaques termoformados y películas flexibles biodegradables, empleando la espectrometría de absorción atómica con horno de grafito y vapor frío, respectivamente, como métodos de atomización.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 General

Determinar mercurio y cadmio en muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables obtenidas a partir de harina y almidón de yuca, fibra de fique y plastificantes por espectrometría de absorción atómica, empleando como métodos de atomización vapor frío y horno de grafito, respectivamente.

### 2.2 Específicos

- Estandarizar el método para determinar mercurio, mediante la técnica analítica de Espectrometría de Absorción Atómica, utilizando como método de atomización vapor frío.
- Estandarizar el método para determinar cadmio, mediante la técnica analítica de Espectrometría de Absorción Atómica, utilizando como método de atomización horno de grafito.
- Determinar cadmio y mercurio en las muestras de termoformados y películas flexibles.
- Evaluar estadísticamente los resultados de cada uno de los métodos estandarizados, garantizando así, resultados confiables.

### 3 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

La creciente industria del plástico y el uso indiscriminado de empaques sintéticos producen gran cantidad de desechos sólidos de baja degradabilidad y baja biodisponibilidad, que han generado serios problemas ecológicos que contribuyen a la contaminación ambiental; esto ha impulsado a la búsqueda de biopolímeros naturales, en los cuales se aprovechan los recursos naturales como materia prima, ya que son fuente de conservación y permiten el reciclaje, convirtiéndose así en una excelente opción para el desarrollo de nuevos productos biodegradables [3,6].

#### 3.1 POLÍMEROS BIODEGRADABLES

Los polímeros biodegradables representan un avance hacia la protección del medio ambiente de la contaminación; varios centros de investigación e industrias en el mundo, están enfocando su atención al estudio de diferentes composiciones poliméricas y estructuras de materiales de base biológica [7].

Los biopolímeros naturales provienen de cuatro grandes fuentes: agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos), microbiano (ácido poliláctico (PLA) y polihidroxialcanoatos (PHA)), marino (quitina/quitosan) y animal (colágeno/gelatina) [8].

A continuación, se describen algunos de los biopolímeros de origen agrícola y microbiano, utilizados en la elaboración de los termoformados y las películas flexibles, estudiadas en este trabajo.

##### 3.1.1 Biopolímeros de origen agrícola

Dentro de los biopolímeros agrícolas, los más empleados son los polisacáridos, los cuales se describen a continuación.

##### 3.1.2 Polisacáridos

Los polisacáridos son conocidos por su compleja estructura y diversidad funcional, que proporcionan a algunas películas dureza, flexibilidad y transparencia; ejemplos de polisacáridos son: la celulosa y el almidón.

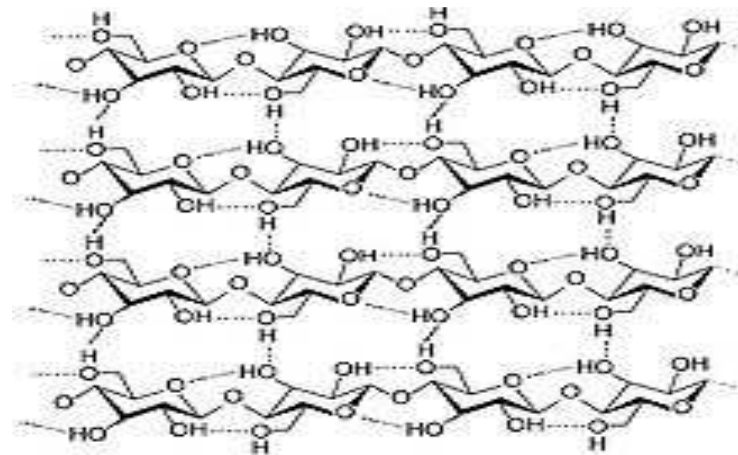
##### 3.1.2.1 Celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante, biodegradable y renovable que existe entre los productos macromoleculares naturales. Su característica química más importante, es la existencia de uniones  $\beta$ -(1-4) entre las unidades de glucoanhidropiranosas.

Su estructura molecular consiste de unidades del disacárido celobiosa, que se repiten formando cadenas macromoleculares, compactadas entre sí por fuertes enlaces de

hidrógeno inter e intramoleculares; estas interacciones son responsables de las excelentes propiedades mecánicas de la celulosa y de su baja solubilidad [9].

**Figura 1.** Celulosa.



Las fibras naturales, son un producto natural con un gran contenido de celulosa, en donde esta, es la responsable de las propiedades mecánicas de la fibra completa; está ordenada en forma de micro-fibras y rodeada de hemicelulosa y lignina y conformada por dominios nano-cristalinos y regiones amorfas.

La utilización de fibras naturales como refuerzo de las matrices poliméricas, muestra un interés creciente; éstas poseen un buen comportamiento mecánico (resistencia, rigidez y dureza), debido a que la interface existente entre la fibra y la matriz polimérica, permite transferir las cargas desde el exterior hacia las fibras rígidas, lo cual proporciona dureza al material; sus características más relevantes se basan en que provienen de recursos renovables y son biodegradables [10].

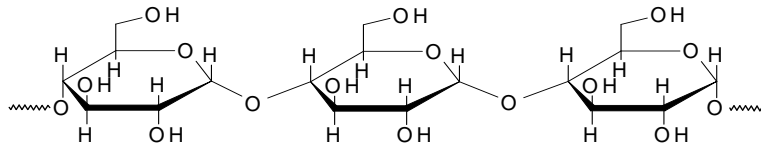
### 3.1.2.2 Almidón

El almidón, una sustancia de reserva en la naturaleza, puede hallarse como pequeños gránulos depositados en semillas (maíz), tubérculos (papa y yuca) y raíces de distintas plantas; está compuesto por unidades repetitivas de glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) unidas por dos tipos de enlace glicosídicos:  $\alpha$ -(1-4) y  $\alpha$ -(1-6).

De acuerdo al ordenamiento de las ramificaciones de glucosa en el almidón y el tipo de enlace, se distinguen dos macromoléculas distintas llamadas amilosa y amilopectina [2, 11].

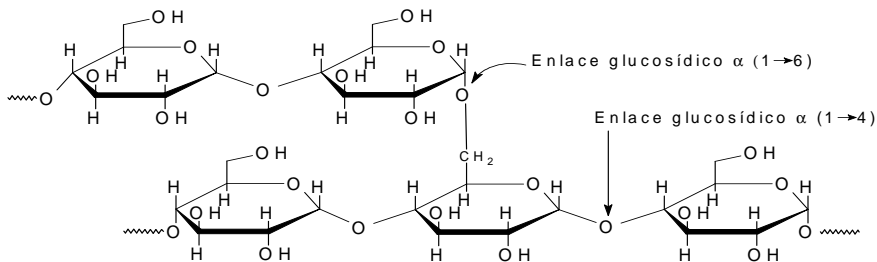
**Amilosa.** Es un polímero lineal soluble en agua, que adquiere una estructura secundaria característica, de forma helicoidal. Contiene aproximadamente entre 60 y 300 unidades de glucosa por molécula que se unen mediante enlaces  $\alpha$ -(1-4).

**Figura 2.** Amilosa.



**Amilopectina.** Es un polímero altamente ramificado e insoluble en agua. Consiste de varios cientos de cadenas cortas de 20 a 25 unidades de  $\alpha$ -glucosa unidas por medio de enlace  $\alpha$ -D-(1-6)[12].

**Figura 3.** Amilopectina.



La proporción relativa de amilosa/amilopectina en cualquier almidón, y el peso molecular específico, determinan las propiedades físico-químicas y por lo tanto, industriales del mismo.

Las principales propiedades físico-químicas de un almidón son: composición proximal, características del grano (tamaño y forma), naturaleza cristalina, peso molecular, poder de hinchamiento, solubilidad, contenido relativo de amilosa y características de la pasta que se produce [13].

Debido a que los productos que se trabajaron en este proyecto, fueron obtenidos a partir del almidón y harina de yuca, se van a detallar algunas características de estos dos productos.

- **Almidón de yuca**

Las características típicas del almidón de yuca, son diferentes a las obtenidas a partir del maíz ó la papa, por lo que ciertos procesos industriales pueden requerir la utilización de un almidón con respecto al otro.

Los gránulos de almidón de yuca son redondos, con terminales truncados y con un núcleo bien definido; su tamaño varía entre 5-35 nm con promedios de 20 nm. El contenido de proteína del almidón de yuca (0,1%) es muy bajo si lo comparamos con los almidones de arroz y de maíz (0,45% a 0,35%, respectivamente). Los gránulos del almidón de yuca

contienen un pequeño porcentaje de sustancias grasas comparado con los almidones de cereales (maíz y arroz), los cuales contienen 0,6% y 0,8%, respectivamente; esta composición favorece al almidón de yuca, ya que estos lípidos forman un complejo con la amilosa, la cual tiende a reprimir el hinchamiento y la solubilización de los gránulos del almidón [13].

Por todo lo anterior, el almidón de yuca se considera una materia prima prometedora para el desarrollo de nuevos materiales, incluyendo biocompuestos, ya que se puede convertir en un material termoplástico mediante la interrupción de las interacciones moleculares de la cadena de doble hélice, formada por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo, en presencia de un plastificante con la ayuda de temperatura y de esfuerzo cortante adecuados [6, 14].

- **Harina de yuca**

El término harina, corresponde a un polvo fino obtenido por un proceso en el que la molienda es seguida de una separación por tamaños de las partículas gruesas. Es un derivado de granos o detubérculos como las raíces de yuca.

La harina es un ingrediente básico en una amplia variedad de productos, debido a su alto contenido de almidón, el cual permite su uso en la elaboración de diferentes productos en la industria alimentaria, como también para la elaboración de biopolímeros.

La raíz de la yuca, producto amiláceo con cerca de 85-90% de almidón en fracción seca del parénquima, se puede transformar industrialmente en un alimento de alto valor agregado, como son los productos expandidos por extrusión, fritos u horneados en forma de hojuelas y bebidas tipo colada [12,15].

### **3.1.3 Biopolímeros de origen microbiano**

Las bacterias convierten de manera eficiente las fuentes de carbono en una amplia gama de productos químicos y polímeros con diferentes propiedades. Los polímeros extracelulares que se pueden sintetizar son variados y algunos de estos tienen la misma función en diferentes procariontes, mientras que otros pueden ser específicos para determinados taxones de bacterias y sirven para distintas funciones biológicas. Cuatro clases principales de polímeros se producen por bacterias: los polisacáridos, poliésteres, poliamidas y polianhídridos inorgánicos como los polifosfatos.

Varios polímeros bacterianos ya se producen en las industrias a través de fermentaciones a mediana y gran escala, con volúmenes anuales de producción mundial alrededor de 2000 y 100000 toneladas para los polisacáridos dextrano y xantano, respectivamente, y hasta 100000 toneladas para los poliésteres [16].

### 3.1.4 Ácido poliláctico (PLA)

El PLA es un poliéster alifático lineal, obtenido por policondensación del ácido láctico y producido de forma natural ó por la apertura del anillo catalítico del grupo láctico; a su vez, es producido (a través de la fermentación del almidón) como un co-producto de la molienda húmeda del maíz. Los enlaces éster en el PLA son sensibles a la hidrólisis (rotura de la cadena) química y enzimática.

El PLA se mezcla a menudo con el almidón para aumentar la biodegradabilidad y reducir los costos de producción; sin embargo, la fragilidad de la mezcla almidón-PLA es una desventaja importante en muchas aplicaciones. Para solucionar esta limitación, una serie de plastificantes de bajo peso molecular como el glicerol, sorbitol o citrato de trietilo se adicionan.

PLA es totalmente biodegradable y permite generar abono en operaciones a gran escala a temperaturas de 60°C o más. La primera etapa de la degradación del PLA (dos semanas), es a través de la hidrólisis de compuestos solubles en agua y ácido láctico, seguida de la metabolización llevada a cabo por los microorganismos, con producción de CO<sub>2</sub>, agua y biomasa [17].

## 3.2 PLASTIFICANTES

De acuerdo con el consejo de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un plastificante es una sustancia que se incorpora en un material (por lo general plástico o un elastómero) para aumentar su flexibilidad, facilidad de utilización o extensibilidad [18].

Los plastificantes como el agua y los glicoles (ej. glicerol), que son adicionados durante la elaboración de los biopolímeros analizados en este proyecto, permiten la lubricación de los almidones, haciéndolos aptos para ser transformados en termoplásticos [19]. Con la incorporación de plastificantes al almidón, se logra la separación de las cadenas poliméricas (rompimiento de enlaces de los polímeros), ya que las pequeñas moléculas de plastificante penetran al interior de los gránulos del almidón, disminuyendo así las fuerzas de atracción molecular, lo que se traduce en un aumento de la movilidad de las cadenas poliméricas, una disminución en el esfuerzo y una mayor elongación al momento de estirarse [20, 21].

Los plastificantes más utilizados son: ftalatos, fosfatos, adipatos, azelatos, sebacatos, ésteres de ácidos grasos epoxidados, benzoatos, poliésteres, trimelitatos, ésteres de ácido sulfónico y sulfamidas, ésteres de ácidos monocarboxílicos, aceites vegetales y epoxidados, hidrocarburos clorados, citratos, oligómeros y elastómeros. Los plastificantes utilizados para la elaboración de polímeros biodegradables son los citratos, polialcoholes ó el trietilenglicol [22].



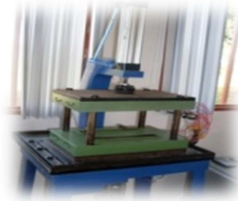
### 3.3 TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES

En el mercado de empaques para alimentos, los termoformados y las películas flexibles, gozan de gran popularidad, debido a su bajo costo, a su gran área superficial por volumen y a su extraordinario desempeño bajo un amplio rango de temperaturas [23].

#### 3.3.1 Termoformados

Termoformado es un término genérico que engloba varias técnicas de procesamiento por las cuales se obtienen artículos plásticos a partir de láminas planas de distintos polímeros. Son elaborados por la técnica de moldeo por compresión, la cual consiste en un proceso de conformado de piezas, en el que el material es introducido en un molde abierto al que luego se le aplica presión para que adopte la forma del molde y se le aplica calor para que el material funda y adopte la forma deseada.

**Figura 4.** Máquina de moldeo por compresión empleada para la elaboración de termoformados.



Los productos termoformados son típicamente clasificados en dos grandes categorías: los productos permanentes o industriales (estantes para equipos médicos o electrónicos, paneles decorativos para autos, aviones, motocicletas, bañeras e implementos para cuartos de baño, cascos y asientos para lanchas y tragaluces) y los productos desechables (empaques para medicinas, empaques tipo burbuja, vasos para bebidas frías y calientes, bandejas para comidas horneables, contenedores para comida y empaques transparentes con la forma del producto, como los utilizados en el área de empaques) [24,25].

#### 3.3.2 Películas flexibles

Las películas, se definen como una hoja delgada y flexible, de origen sintético ó natural, que alcanza un grosor de 0,01 pulgadas o menos. La matriz polimérica que forma la película, puede definirse como la disposición al azar de las cadenas que conforman la estructura. Actualmente, las películas flexibles utilizadas en la industria de los alimentos, se dividen en dos grupos: materiales sintéticos o no biodegradables y materiales biodegradables.

Las películas flexibles son elaboradas por extrusión de tornillo simple, que es un proceso continuo que va formando el material plástico. En la tolva de la máquina se coloca la materia prima, de ahí pasa al cilindro en cuyo interior se encuentra un tornillo sin fin

llamado husillo. Al girar el tornillo, el material va avanzando y fundiéndose con el calor, transformándose así en un material viscoso. En el extremo del cilindro donde se encuentra la boquilla, hay un orificio con una forma determinada (para películas, la boquilla de la extrusión es redonda); de la tolva de extrusión sale la masa plastificada, que es estirada y alisada por medio de rodillos mientras se embobina al mismo tiempo [26].

**Figura 5.** Máquina de extrusión empleada para la elaboración de películas flexibles.



La elaboración de estos productos es importante, ya que se caracterizan porque presentan una rápida y fácil degradación, sin la producción de residuos que causen un impacto desfavorable para los diferentes ecosistemas ambientales [24].

### **3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS**

Diferentes técnicas de análisis se han utilizado para la determinación de metales pesados en los polímeros, como son la espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRFS), la espectrometría de absorción atómica (EAA) y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), entre otras. La XRFS ofrece la posibilidad de analizar los materiales sólidos sin un tratamiento previo de la muestra, sin embargo, esta ventaja se ve limitada por la necesidad de utilizar adecuados materiales de referencia certificados para la calibración, convirtiéndola en una técnica costosa. En ICP-EM y EAA, generalmente se requieren muestras líquidas disueltas, por lo que las muestras tienen que ser digeridas. Este procedimiento puede ser tedioso, consume tiempo y genera errores sistemáticos debido a la extracción incompleta ó a la solubilidad del analito [27].

#### **3.4.1 Absorción Atómica**

La mayoría de las sustancias se descomponen en átomos en fase gaseosa cuando se calientan a una temperatura suficientemente alta. En espectroscopía de absorción atómica, las muestras se vaporizan a muy altas temperaturas y las concentraciones de los átomos seleccionados se determinan midiendo la absorción a sus longitudes de onda características. En esta técnica es común determinar concentraciones de analito (ejemplo Cd, Hg) en niveles de las partes por billón ( $\mu\text{g/L}$ ) [28].

### 3.4.1.1 Métodos de atomización

Para obtener espectros ópticos atómicos y espectros de masas atómicos, los componentes de la muestra deben convertirse en átomos o átomos ionizados en estado gaseoso, para que puedan determinarse mediante medidas espectrales de emisión o absorción, fluorescencia ó masas [29].

Dos técnicas de atomización para las muestras de termoformados y películas flexibles por absorción atómica, se describen brevemente a continuación.

- **Vapor frío**

Para la determinación de mercurio, se prefiere el uso de la espectrometría de absorción atómica por vapor frío; en la bibliografía se reporta la realización de determinaciones de este metal en polímeros plásticos empleados en la elaboración de electrodomésticos, y también en algunos plásticos [30, 31].

La técnica de vapor frío es un método de atomización aplicable solamente a la determinación de mercurio, ya que es el único elemento metálico que tiene una presión de vapor apreciable a temperatura ambiente, lo que le permite formar el hidruro sin tener que realizar un calentamiento [29].

La determinación de mercurio usando la técnica de generación de vapor frío ha sido el método de análisis de trazas de Hg, utilizado desde hace varias décadas; la generación de vapor frío de mercurio, implica la reducción del analito a su forma elemental en una solución acidificada; el agente de reducción, por lo general, es el borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) en condiciones ambientales [32]. El mercurio elemental es conducido entonces a un tubo de absorción de camino óptico largo, mediante el burbujeo de una corriente de gas inerte (Nitrógeno) a través de la mezcla a partir de la cual se formó el elemento; el análisis se completa midiendo la absorbancia a 253,7 nm [29]. La reacción característica que se puede presentar es:



- **Horno de grafito**

La espectrometría de absorción atómica por horno de grafito, comparada con el método de atomización por llama, es más adecuada para la determinación de elementos como el Cd, en concentraciones al nivel de trazas en las muestras de polímeros, ya que es sensible con menores límites de detección en el rango de los µg/L a ng/L; se ha reportado la técnica EAA-HG con muestras sólidas, como un método simple y rápido para la determinación de plomo y cadmio en las muestras de polímeros [27]; Ishiwata y

Martínez et al.[33, 34], analizaron plomo y cadmio en muestras biodegradables hechas de materiales plásticos de poliolefinas y en polímeros como PET, HDPE, LDPE, PP, PS Y PVC, los cuales son empleadas como empaques de alimentos [33, 34].

En este sistema, la atomización se lleva a cabo en un tubo cilíndrico de grafito abierto por ambos extremos, que tiene un orificio central para la introducción de la muestra. El tubo intercambiable de grafito se ajusta perfectamente a un par de contactos eléctricos de grafito cilíndricos que se ubican en los dos extremos del tubo.

Existen dos corrientes de gas inerte: La corriente externa, que previene la entrada de aire exterior y la consiguiente incineración del tubo; la corriente interna que fluye por entre los dos extremos del tubo y sale por el orificio central del compartimiento de la muestra [29].

La atomización mediante horno de grafito tiene mayor sensibilidad, comparada con la atomización por llama, debido a que la muestra completa se confina con el paso de la luz por unos cuantos segundos; el volumen de muestra en un horno es menor a 1  $\mu\text{L}$  [28].

### 3.5 DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO

Los elementos traza generalmente no se encuentran en un estado apropiado para su determinación, por tal razón, deben sufrir algún tipo de transformación que los deje en un estado sobre el que sí se pueda usar una técnica para su identificación y cuantificación; este tipo de transformaciones suelen realizarse a través de digestiones.

La digestión es un proceso en el que se unifica la descomposición y la eliminación de una matriz, quedando como residuo los componentes traza; en este proceso la destrucción de la materia orgánica se realiza por vía húmeda y la muestra se digiere con una mezcla ácido-oxidante, generalmente con la combinación de ácido sulfúrico, nítrico, perclórico o peróxido de hidrógeno (tabla 1), en un sistema que puede ser abierto, de reflujo ó cerrado.

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para digestiones por vía húmeda.

Ácido	Propiedades	Uso
<b>Clorhídrico</b>	-----	Metales que se oxidan más fácilmente que el hidrógeno.
<b>Fluorhídrico</b>	Forma fluoruros estables	Sílice y silicatos, utilizado en combinaciones con otros ácidos.
<b>Nítrico</b>	Oxidante	Metales que no reaccionen con HCl; sustancias orgánicas oxidadas ( $\text{Ag}^+$ , $\text{Hg}^2$ , $\text{Pb}^{2+}$ , ...).
<b>Perclórico</b>	Oxidante fuerte	Metales (no puede ser utilizado con agentes reductores).
<b>Sulfúrico</b>	Alto punto de ebullición (340°C)	Metales, destruye la materia orgánica.

Generalmente, se prefiere esta técnica a la oxidación seca (donde se calienta a 450-500°C), ya que la presencia de cantidades grandes de ácidos produce menos pérdidas de los elementos traza por evaporación; no obstante, existe también el peligro de pérdidas por evaporación de elementos tales como el arsénico, boro, cromo, germanio, mercurio, osmio, renio, antimonio, selenio y estaño, aunque ajustando perfectamente las condiciones, tales como el montaje de reflujo, el control de temperatura y el tiempo de digestión, se puede prevenir [35, 36].

### **3.6 METALES PESADOS**

El acelerado proceso de industrialización que se ha llevado a cabo en los países en vía de desarrollo, combinado con su rápido crecimiento demográfico, el empleo de técnicas de agricultura intensiva, además de la mala eliminación de residuos, han provocado un incremento en los niveles de sustancias consideradas nocivas o tóxicas para los seres vivos [37, 38].

Los metales pesados son relativamente abundantes; en la actualidad, son extraídos y usados en numerosos procesos industriales, siendo tóxicos para el ser humano y causando perturbaciones a los ciclos biogeoquímicos.

La contaminación por metales pesados se ha incrementado en las últimas décadas y se ha convertido en una preocupación importante tanto para organismos que habitan en el medio ambiente como para la salud pública [39].

Los elementos que generan mayor preocupación para el consumidor y por tanto también a las entidades ambientales son: arsénico, cadmio, mercurio y plomo; el seguimiento y control de estos elementos en cantidades traza en el medio ambiente, requiere de un gran número de análisis para caracterizar con precisión su abundancia y llegar a conclusiones fiables acerca de su concentración [39, 40]. En el desarrollo de este trabajo de grado, nos centramos en el análisis de cadmio y mercurio.

#### **3.6.1 Cadmio**

El cadmio está presente en suelos contaminados, en tuberías antiguas, en pinturas (sobre todo de color rojo, amarillo y naranja), está ligado a la producción de zinc y a los desechos de la producción de plásticos, en la manufactura de estabilizadores plásticos y baterías, los productos de incineración de materiales fósiles, fertilizantes y desechos municipales [39].

Es un metal tóxico, dañino para la salud en dosis al nivel de trazas; el envenenamiento por cadmio produce osteoporosis, enfisema pulmonar, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, hipertensión, diversas cardiopatías y retraso en la habilidad verbal de los niños [39, 41].

### **3.6.2 Mercurio**

El mercurio es un elemento metálico que ha sido catalogado como un material peligroso debido a los graves daños que ocasiona a la salud y al ambiente; además, es bioacumulable y la presencia de éste en el ambiente está dada por emisiones naturales, antropogénicas y por la reemisión a la atmósfera del Hg depositado en la superficie terrestre, además es muy utilizado, en la actividad minera en la extracción de oro, en el departamento del Cauca se da esto en la región del Pacífico.

El mercurio y sus compuestos pueden ser clasificados según su grado de toxicidad, así, los compuestos mercuriales orgánicos son más tóxicos que los vapores de mercurio elemental.

La naturaleza tóxica del Hg ha obligado a su determinación en una gran variedad de muestras, incluidas las ambientales, biológicas y materiales industriales [42-44].

## **3.7 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

La estandarización del método analítico por absorción atómica, es un proceso riguroso, que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz del analito y la cantidad de parámetros de estandarización, incluye los parámetros fundamentales para que el método analítico una vez estandarizado, pueda empezar a reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza.

Mediante la estandarización, se obtienen en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterio de confianza del método analítico; estos parámetros son: intervalo lineal, precisión (Repetibilidad y precisión intermedia), sensibilidad de calibrado, sensibilidad analítica (límite de detección, límite de cuantificación), y exactitud (porcentaje de recuperación) [45, 46].

A continuación, se presentan las definiciones de los parámetros a tener en cuenta en el proceso de estandarización.

### **3.7.1 Intervalo lineal**

El intervalo lineal de un método analítico comienza desde la concentración más pequeña a la que se pueden realizar medidas cuantitativas (límite de detección) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (límite de linealidad) y dentro del cual se puede efectuar la cuantificación de un elemento por interpolación en una curva de calibración [45, 46].

### **3.7.2 Precisión**

Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra o patrón, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo

condiciones prefijadas; usualmente se expresa en términos de desviación estándar (s). Evalúa: repetibilidad y precisión intermedia, los cuales se describen a continuación [45,46].

### **3.7.2.1 Repetibilidad**

Es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos cortos de tiempo (mismo día), por el mismo analista, usando los mismos equipos, materiales y reactivos [45, 46].

### **3.7.2.2 Precisión Intermedia**

Es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos de tiempo diferentes (mínimo cinco días diferentes), por el mismo analista y usando los mismos equipos materiales y reactivos [45, 46].

### **3.7.3 Sensibilidad**

#### **3.7.3.1 Sensibilidad de calibrado**

Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración y se mide como la pendiente de la curva de calibración

#### **3.7.3.2 Sensibilidad analítica**

La sensibilidad de un instrumento ó de un método, es una medida de su capacidad para diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito; los parámetros empleados para determinar la sensibilidad son los límites de detección y de cuantificación[45, 46].

#### **3.7.3.3 Límite de detección**

El límite de detección (LD) se define como la cantidad de analito presente que se deriva de la menor señal analítica que puede detectarse con certeza razonable ( $Y_{LD}$ ). Si analizamos un blanco de la muestra varias veces y obtenemos la señal media ( $\bar{y}_0$ ) y su desviación estándar,  $S_{\bar{y}_0}$ , las señales mayores a  $Y_{LD} = \bar{y}_0 \pm 3 S_{\bar{y}_0}$  caerían fuera de la curva gaussiana del blanco analítico y podríamos asignarlas a la presencia de analito. Si tenemos una recta de calibrado de la ecuación  $y = \beta_0 + \beta_1 x$ , el LD se calcularía como la ecuación 2.

$$X_{LD} = \frac{Y_{LD} - a}{b}$$

**ec. 2**

Como la señal del blanco debe coincidir con la ordenada del blanco analítico (puesto que es la señal que se obtendría a una concentración de analito igual a cero), el LD se determinaría empleando la ecuación 3:

$$X_{LD} = \frac{3S_a}{b} \quad \text{ec.3}$$

Siendo  $S_a$  la desviación estándar de la ordenada [45, 46].

#### 3.7.3.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC) se define como la cantidad de analito presente, derivada de la menor señal analítica que puede ser medida con precisión y exactitud. De manera análoga al LD, la IUPAC propone como LC el valor  $Y_{LC} = \bar{y}_0 \pm 10S_{\bar{y}_0}$  que lleva a una concentración, a partir de la recta de calibrado, se determinará utilizando la ecuación 4 [45, 46].

$$X_{LC} = \frac{10S_a}{b} \quad \text{ec. 4}$$

#### 3.7.3.5 Exactitud

Mide la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor real ó aceptado; normalmente se expresa en términos de error y puede ser determinado como el porcentaje de recuperación del analito [45, 46].

### 3.8 MARCO DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Uno de los principales problemas a los que se enfrentan los investigadores, es la selección de la herramienta estadística adecuada, para la interpretación de los datos obtenidos fruto de la experimentación y/o de la información que se obtiene del método empleado. En muchas ocasiones la dificultad reside no sólo en qué tipo de tratamiento estadístico aplicar y cómo interpretarlo, sino en todo el proceso matemático que implica [47].

#### 3.8.1 Statistical Package For The Social Sciences (SPSS)

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en cualquier tratamiento de datos, es el contraste de hipótesis, el cual se puede realizar con el paquete estadístico SPSS. Para el contraste de hipótesis, en el caso de las variables cuantitativas, se cuenta con dos tipos de análisis: los paramétricos, que proceden de un modelo que obliga a cumplir con ciertos supuestos acerca de los parámetros y la distribución de probabilidad de la población de la que se extrajo la muestra, y los no paramétricos, que son menos restrictivos para poder ser aplicados. La estadística paramétrica es más precisa, pero las posibilidades de ser aplicada están limitadas.



Antes de utilizar las pruebas paramétricas, es indispensable comprobar ciertos requisitos para su aplicación.

**a) Distribución Normal de las Poblaciones (Prueba de Shapiro-Wilk)**

Para evaluar la normalidad, la prueba más utilizada es la de Shapiro-Wilk, debido a que esta prueba calcula un estadístico  $W$ , que contrasta si una muestra aleatoria  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , procede de una distribución específicamente normal; este es el primer parámetro que se debe aplicar para poder hacer un análisis de varianza (ANOVA) y es importante realizarlo, efectuarlo porque de los resultados obtenidos se puede definir si es posible trabajar con el valor promedio de los datos obtenidos o si por el contrario, no.

Para determinar si los datos obtenidos en un proceso tienen un comportamiento normal, se plantea lo siguiente:

**La hipótesis nula  $H_0$ :** “el conjunto de datos sigue una distribución normal”.

**La hipótesis alternativa  $H_1$ :** “el conjunto de datos no sigue una distribución normal”.

Si el estadístico  $W$  (teniendo en cuenta el número de muestras y la tabla de valores críticos ya tabulados) es menor que el  $W_{(1-\alpha)}$  tabulado, se acepta que los datos proceden de una distribución normal con un nivel de significancia mayor de 0,05.

**b) Igualdad de Varianzas (Estadístico de Levene)**

Uno de los supuestos que más se requieren en aplicaciones estadísticas populares, tales como el análisis de varianza, el análisis de regresión, etc., es el de la homogeneidad de varianzas. Este supuesto es crucial para garantizar la calidad de los procedimientos estadísticos utilizados tanto en pruebas de hipótesis como en la construcción de intervalos de confianza.

Una vez comprobada la normalidad de los datos, se debe determinar si las varianzas en las muestras son iguales (es decir, si se cumple la condición de homogeneidad de varianzas), ya que de que se cumpla o no esta condición dependerá la formulación que empleemos en el contraste de medias.

El cálculo de la prueba de Levene, requiere la comprobación de igualdad de varianzas, la cual define el estadístico, planteando las siguientes hipótesis:

La hipótesis nula  $H_0$ : “el conjunto de datos es homogéneo”.

La hipótesis alternativa  $H_1$ : “el conjunto de datos no es homogéneo”.

Al realizar el cálculo de  $F$  y si el valor calculado es mayor que el valor tabulado para un valor crítico superior al de la distribución  $F$  a un nivel de significancia  $\alpha$ , la hipótesis nula se rechaza[47-50].

### 3.8.2 Análisis de Varianza (ANOVA)

Luego de comprobar la normalidad de los datos y la homogeneidad de las muestras, se debe buscar el mejor ajuste entre dos variables para poder representar los datos y evaluar qué tipo de relación existe entre la variable dependiente y la variable independiente. Para ello, debe recurrirse a técnicas de correlación y/o regresión, aunque también es posible transformar una de ellas en una variable categórica u ordinal y luego aplicar un ANOVA.

**Lacorrelación** es una técnica matemática que evalúa la asociación o relación entre dos variables cuantitativas, indicando la dirección de esta asociación, de forma que podemos saber si cuando aumenta el valor de una de ellas aumenta también el valor de la otra variable (relación directa) o por el contrario disminuye (relación indirecta), proporcionando un coeficiente de correlación ( $r$  de Pearson).

**Laregresión lineal simple** es un modelo matemático que explora la dependencia entre dos variables cuantitativas (supone que en el modelo una es la variable dependiente y otra la independiente), tratando de verificar si la citada relación es lineal y aportando unos coeficientes ( $a$  y  $b$ ) que sirven para construir la ecuación de la recta de predicción [47-50].

**El coeficiente de correlación  $r$  de Pearson**, cuyo cálculo es “*paramétrico*”, se basa en la media y la varianza, y asume varios supuestos:

- a)** Que las variables analizadas son simétricas (no hay una dependiente y otra independiente) y, por tanto, son intercambiables mutuamente.
- b)** Que lo que mide es el grado de ajuste de los puntos o pares de valores a una hipotética línea recta (explora la relación lineal). Esto quiere decir que podría existir otro tipo de asociación (curvilínea, exponencial, etc.) y no ser detectada por este coeficiente.
- c)** Que las variables se distribuyen normalmente (criterio de normalidad) en la población de la que proviene la muestra.
- d)** Que las variables exploradas provienen de observaciones independientes (esto es, sólo debe haber un valor para cada variable en cada individuo de la muestra), para evitar lo que se conoce como autocorrelación.

El coeficiente de correlación (sea o no *paramétrico*) es un valor adimensional que oscila entre -1 y +1. El valor cero se da cuando no existe ninguna correlación entre las variables analizadas; el valor -1 implica una correlación perfecta de carácter inverso (o indirecto) y el valor +1 una correlación perfecta de tipo directo (cuando una crece también lo hace la otra).

En términos generales, diremos que: Si  $|r| < 0,3$ , la asociación es débil; si  $0,30 \leq |r| \leq 0,70$ , la asociación es moderada; si  $|r| > 0,70$ , la asociación es fuerte.

Por tanto, a la hora de interpretar adecuadamente un coeficiente de correlación se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

1. Su signo
2. Su magnitud
3. Su significación estadística
4. Sus intervalos de confianza

Por consenso, la variable dependiente ó efecto ocupa el lugar de la Y en el eje cartesiano (ordenada) y la variable independiente el lugar de la X (abscisa). El modelo de regresión lineal simple intenta ajustar, con los datos de la muestra, la ecuación 5:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + e \quad \text{ec. 5}$$

Donde,

$\beta_0$  es el valor de la ordenada en el origen, esto es, el valor que adoptará Y (la variable dependiente) cuando x valga cero.

$\beta_1$  es conocido vulgarmente como “pendiente de la recta” y se interpreta como el cambio de “y” por cada unidad de cambio de x.

$e$  es el error o residual, y representa una cuantificación del desajuste de los datos de la muestra al modelo lineal, puesto que corresponde a la cantidad que habría que sumar o restar a la predicción para que coincidiera exactamente con lo observado.

El análisis de regresión lineal empieza siempre por un **ANOVA**, que trata de responder a la siguiente pregunta: ¿es mejor usar x para predecir la variabilidad de “y”, o por el contrario se puede conseguir la misma explicación de “y” sin tener en cuenta los valores de “x”, simplemente usando el valor más representativo de “y”, esto es, su media? Si fuese esto último, la recta del modelo tendría pendiente cero, por lo que la hipótesis nula del contraste es:  $H_0: \beta_1 = 0$  y la hipótesis alternativa sería:  $H_1: \beta_1 \neq 0$ .

Para encontrar el estadístico de prueba para esta hipótesis, es fácil ver que  $\beta_1$  sigue una distribución normal.

Se rechaza la  $H_0$  si el valor del estadístico es mayor que el valor crítico de las tablas, es decir, se rechaza  $H_0$  si  $|t_0| > t_{(\alpha/2, n-2)}$ . Cuando esto ocurre, (rechazo de  $H_0$  contraste estadísticamente significativo), se concluye diciendo que hay regresión lineal de “y” sobre “x”, ya que se puede explicar una parte de los valores de la variable dependiente (y) a partir de los valores de la variable independiente o predictora (x), o lo que es lo mismo, que conocido el valor x para un individuo se predice el valor de y mejor con la ecuación de la recta que con el valor medio de “y”. En el caso de no rechazar  $H_0: \beta_1 = 0$  para el caso del modelo de regresión lineal simple, implica que no existe una relación lineal significativa entre “x” y “y” ó la relación es de otro tipo [47-50].

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y SOLUCIONES

La metodología de este trabajo se desarrolló para llevar a cabo la cuantificación de cadmio y mercurio en muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables, empleando reactivos y solventes de grado analítico. A continuación, se listan los equipos, reactivos, material de vidrio y plástico empleados para la determinación de dichos metales pesados.

#### 4.1.1 Equipos

**Tabla 2.** Equipos empleados para la estandarización e implementación de los métodos analíticos.

Equipos	Marca
Espectrómetro de absorción Atómica	Thermo S4AA
Vapor Frío	Thermo Vapour System, VP100
Horno de Grafito	Thermo Furnace
Automuestrador	Autosampler GFS 97
Lámpara cátodo hueco Cd	VWR Scientific, 10 mA
Lámpara cátodo hueco Hg	VWR Scientific, 10 mA
Balanza Analítica ( $\pm 0,0001$ )	Mettler AE 200
Horno	Fisher
Campana de Extracción	Mex 90
Desionizador	E&Q
Destilador	GFL
Conductímetro	Thermo Orion 105
Micropipeta digital	Brand 0,5-10 $\mu$ l
Micropipeta digital	Brand 20-200 $\mu$ l
Nevera	Haceb
Plancha de Calentamiento	FisherScientific 0-500 $^{\circ}$ C
Termómetro	Brand 0-110 $^{\circ}$ C

#### 4.1.2 Material de vidrio y plástico

**Tabla 3.** Material de vidrio y plástico usados para la estandarización e implementación de los métodos analíticos.

Material	Volumen
Balones Volumétricos clase A	Pyrex USA 5 mL
Balones Volumétricos clase A	Brand 10, 50 y 100 mL
Balones Volumétricos clase A	Schott Duran 250,500 y 1000mL
Cajas de Petri	-----
Cubetas Electrografito normal	Thermo Elemental Solaar
Balones de Fondo Plano	Schott Duran 100 mL
Beaker	100, 250, 500 mL
Condensador liso	24/40
Desecador	Schott duran
Erlenmeyer	125, 250 mL
Espátulas	-----
Crisoles de filtración	Schott Duran Porosidad 2
Pipetas Aforadas	5, 10 mL
Pipetas Graduadas	0.5, 1, 2, 5,10 mL
Recipiente de Plástico Ámbar	60, 100, 1000 mL
Recipiente de Plástico Transparente	60, 100 mL
Varilla de Vidrio	-----
Mortero	-----

#### 4.1.3 Reactivos

**Tabla 4.** Reactivos marca Merck.

Reactivos
Ácido Clorhídrico, 37% p/p
Ácido Nítrico, 65%p/p
Ácido Perclórico, 70%p/p
Borohidruro de Sodio, 99%p/p
Hidróxido de Sodio, 99%p/p
1000 mg/L de Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> en HNO <sub>3</sub> 0,5 mol/L
1000 mg/L de Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> en HNO <sub>3</sub> 2,0 mol/L

Agua Desionizada (0,3 µS/cm a 22°C)

#### 4.2 LIMPIEZA DEL MATERIAL

Para minimizar las trazas de metales, los materiales de vidrio del laboratorio, al igual que los recipientes para almacenar las muestras, fueron sometidos a un procedimiento de

limpieza con agua regia (HCl:HNO<sub>3</sub>, 3:1 concentrado) durante 12 horas a temperatura ambiente y posteriormente, se enjuagaron con agua, destilada y desionizada.

#### **4.3 VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO**

La verificación de la calibración de los balones aforados utilizados para la preparación de las soluciones stock, de los estándares de calibración y de las muestras digestadas, se realizó mediante un control gravimétrico planteado para los aparatos volumétricos (ajustados para contenido "IN"), indicado en el protocolo de estandarización certificado por la ISO 9001-14001 y el cual está aprobado por los Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración (ISO/IEC 17025:2005) [51, 52], siguiendo las siguientes etapas: a) Determinación de la temperatura del agua del ensayo, b) Determinación del peso del balón seco ( $W_1$ ), c) Llenado del balón con el agua de ensayo hasta el aforo, d) Limpieza con un paño de celulosa de la pared del balón por encima del menisco, como resultado, el punto más bajo del menisco debe encontrarse a la misma altura que el borde superior del aforo, e) Determinación del peso del balón aforado con el agua de ensayo ( $W_2$ ).

Todo el procedimiento mencionado anteriormente se realizó por triplicado; en el anexo 1, se muestran los respectivos cálculos para la verificación de la calibración de los balones aforados y en las tablas 1 a 5 se reportan los resultados obtenidos.

#### **4.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

A continuación, se describe la preparación de las soluciones utilizadas para la elaboración de las curvas de calibración de cadmio y mercurio

Solución de ácido nítrico, 0,2%: En un vaso de precipitados que contenía agua desionizada, se adicionó 3,08 mL de ácido nítrico al 65%; cuando la solución se encontró a temperatura ambiente, se diluyó a 1000 mL con agua desionizada, en un balón aforado.

Solución stock de 1000 µg/L de cadmio: Se prepararon 25 mL, tomando 25 µL de una solución madre de 1000 mg/L de cadmio y aforando con la solución de ácido nítrico al 0,2%.

Solución de ácido clorhídrico, 1,0%: En un vaso de precipitados que contenía agua desionizada, se adicionó 27,03 mL de ácido clorhídrico al 37%; cuando la solución se encontró a temperatura ambiente, se diluyó a 1000 mL en un balón aforado con agua desionizada.

Solución stock de 1000µg/L de mercurio: Se prepararon 25 mL, tomando 25 µL de una solución madre de 1000 mg/L de mercurio y se aforó con la solución de ácido clorhídrico al 1,0%.

Estas soluciones fueron empleadas para la construcción de las curvas de calibración de cadmio y mercurio.

Solución de ácido perclórico, 48,0%: En un vaso de precipitados que contenía agua desionizada, se adicionó 342,86 mL de ácido perclórico al 70%; cuando la solución se encontró a temperatura ambiente, se diluyó a 500 mL en un balón aforado.

Esta solución fue empleada en la digestión de las muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables.

Solución de hidróxido de sodio, 0,5%: En un vaso de precipitados se disolvió cuidadosamente 5,0 g de hidróxido de sodio (perlas) con agua desionizada; cuando la solución se encontró a temperatura ambiente, se diluyó a 1000 mL en un balón aforado.

Solución de borohidruro de sodio al 0,5% m/v en hidróxido de sodio (0,5%): Se disolvió en un vaso de precipitados 5,0 g de borohidruro de sodio (sólido) con la solución de hidróxido de sodio al 0,5%; cuando el sólido estaba disuelto completamente, se diluyó a 1000 mL en un balón aforado.

Esta solución fue empleada para la reducción del mercurio en el sistema de vapor frío.

Solución de ácido clorhídrico, 10%: En un vaso de precipitados que contenía agua desionizada, se adicionó 270,3 mL de ácido clorhídrico al 37%; cuando la solución se encontró a temperatura ambiente, se diluyó a 1000 mL en un balón aforado.

Esta solución fue empleada como matriz ácida en el sistema vapor frío.

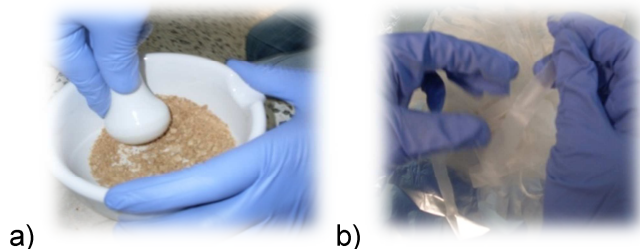
#### **4.5 MUESTRAS**

Las muestras de termoformado (MBRA 383, MPER 183, CM 4574-7, CM 523-7, CM 7951-5, NATAIMA 31, HMC 1) y películas flexibles biodegradables (SM 707-17 Nativo e hidrolizado, CM 7138-7 Nativo e hidrolizado, SM 1498-4 Nativo e hidrolizado) analizadas, fueron aportadas por el grupo de Ciencia y Tecnología de Biomoléculas de Interés Agroindustrial (CYTBIA) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, en el laboratorio de Reología.

#### **4.6 PRE-TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

Las muestras de termoformados, se llevaron a un tamaño de partícula más pequeño mediante métodos mecánicos, iniciando con una ruptura manual; seguidamente se maceraron (figura 6.a) hasta un tamaño de partícula menor a 1,135 mm y finalmente se les eliminó el contenido de agua mediante un proceso de secado en horno a 70°C durante 4 horas y media. Para las muestras de películas flexibles, solamente se realizó un proceso de cortado manual como se observa en la figura 6.b y un proceso de secado a 70°C durante 4 horas [53-56].

**Figura 6.** Muestras: a)Macerado de termoformado, b) Cortado de película flexible.



A partir de los pesos obtenidos, antes y después de realizar el proceso de secado, se determinó el porcentaje de humedad de las muestras por triplicado (ver ecuación 6), los resultados se muestran en el anexo 2 y sus tablas 1 y 2.

#### 4.7 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO

El proceso de optimización de la digestión ácida con reflujo, se realizó con la determinación de mercurio de una muestra de termoformado (HMC-1) y película flexible (SM 707-17 hidrolizada), con seis lecturas de la absorbancia y teniendo en cuenta las variables: peso de muestra, temperatura, tiempo y relación de ácidos; cada ensayo se realizó por triplicado.

La digestión óptima utilizada para la determinación de mercurio, se empleó también, bajo las mismas condiciones, para la determinación de cadmio (con cuatro lecturas de la absorbancia) en los termoformados y películas flexibles biodegradables.

##### 4.7.1 Optimización de la relación de ácidos

La relación de ácidos óptima para la digestión de las muestras de termoformados, se determinó experimentalmente, realizando variaciones en la cantidad de los ácidos minerales:  $\text{HNO}_3$  al 65% (20 a 5 mL) y  $\text{HClO}_4$  al 48% (5 a 20 mL), como se muestra en la tabla 5; cada ensayo se realizó por triplicado.

**Tabla 5.**Relación de ácidos ( $\text{HNO}_3$  y  $\text{HClO}_4$ ) para la digestión ácida con reflujo.

Relación $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$	Ácido nítrico (mL)	Ácido perclórico (mL)
1:0	20,0	---
3:1	15,0	5,0
1:1	10,0	10,0
1:3	5,0	15,0
0:1	---	20,0



Para películas flexibles la optimización, solo se realizó con relación de ácidos 3:1 puesto que esta, fue la que mejor respuesta presentó al procedimiento de digestión para el termoformado.

#### **4.7.2 Optimización del peso de la muestra**

Este parámetro se optimizó variando la cantidad de muestra: 0,5000 ( $\pm 0,0001$ ) g, 1,0000 ( $\pm 0,0001$ ) g y 2,0000 ( $\pm 0,0001$ ) g, para el termoformado, y 0,5000 ( $\pm 0,0001$ ) g y 1,0000 ( $\pm 0,0001$ ) para la película flexible, en base seca.

#### **4.7.3 Optimización de la temperatura y el tiempo de digestión**

La temperatura óptima de digestión, se determinó experimentalmente a tres temperaturas de calentamiento (35, 50 y 70°C) tanto para termoformados como para películas flexibles.

En cuanto al tiempo de digestión, para los termoformados se ensayaron 60, 120 y 180 minutos, para las relaciones de ácidos mostradas en la tabla 5 y para las películas flexibles 15, 30, 45, 60 y 120 minutos, para la relación de ácidos 3:1 porque esta fue la mejor respuesta que dio al termoformado; y además a estos tiempos no se presenta una pérdida considerable del volumen de los ácidos empleados tras haber realizado ensayos previos.

Después de enfriar a temperatura ambiente, todas las soluciones digeridas se filtraron a través de un crisol de filtración, y luego se almacenaron en recipientes de polietileno a 4°C para su análisis por EAA.

### **4.8 PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA**

#### **4.8.1 Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de mercurio y cadmio**

Para la determinación de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de cadmio y de mercurio, se realizó un seguimiento cada 30 minutos durante tres horas del valor de la absorbancia de tres estándares de las curvas de calibración que se emplearon en la estandarización del método (0,2, 0,6 y 1,0  $\mu\text{g Cd/L}$ , y de 4,0, 8,0 y 12,0  $\mu\text{g Hg/L}$ ). A cada estándar de Cd y Hg se le realizaron cuatro y seis lecturas de absorbancia, respectivamente.

Posteriormente, se analizó la normalidad y la homogeneidad de los datos con las pruebas de Shapiro-Wilk con N-1 grados de libertad y Levene con grados de libertad 1 y 2, determinados como K-1 y (k•N)-K (N=lecturas de la absorbancia y K=número de tiempos); se aplicó un tratamiento estadístico por ANOVA de un factor, para saber si existían diferencias significativas entre las absorbancias obtenidas para cada estándar durante las tres horas de análisis.

#### 4.8.2 Optimización de la temperatura de calcinación y atomización para la determinación de cadmio por horno de grafito

Con el fin de obtener una mayor sensibilidad para la determinación de cadmio, se procedió a optimizar la temperatura de calcinación y de atomización en el horno de grafito; para esto, se preparó un estándar de 1 µg/L de cadmio y se fijó la temperaturas de de secado a 100°C, atomización a 1500°C y limpieza a 2500°C, variando la temperatura de calcinación desde 500 hasta 800°C en intervalos de 50°C; una vez hecho esto, se observó que la mayor absorbancia se presentaba entre 500 y 550°C y por tanto se realizó otra variación de la temperatura de calcinación en este rango, esta vez en intervalos de 10°C. Una vez optimizada la temperatura de calcinación, seguidamente se preparó un estándar de 0,8 µg/L de Cd y se realizó su lectura en el equipo de absorción atómica, fijando la temperatura de calcinación en 800°C y variando la temperatura de atomización desde 900 hasta 1800°C; esta variación se la realizó a intervalos de 100°C.

#### 4.9 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

El método empleado para el análisis cuantitativo de los metales pesados cadmio y mercurio fue la curva de calibración; la cual se escogió tras haber realizado algunos ensayos con muestras de termoformados y películas flexibles, en donde se observó que estas muestras presentaban concentraciones en el rango de microgramos por litro de solución y por lo tanto, se prepararon soluciones estándar de cada metal, como se describe a continuación.

##### Cadmio:

A partir de la solución stock de 1000 µg Cd/L y como se muestra en la tabla 6, se construyó la curva de calibración, mediante la preparación de 5 mL de 6 estándares de cadmio en el rango de 0,1 a 1,0 µg de Cd/L en una solución de HNO<sub>3</sub> al 0,2%. Para cada estándar de Cd se realizaron cuatro lecturas de absorbancia en el EAA-HG.

**Tabla 6.** Datos de preparación de estándares de Cd para la curva de calibración.

Volumen (µL) de solución stock (1000 µg Cd/L)	Concentración (µg Cd/L)
0,5	0,1
1,0	0,2
2,0	0,4
3,0	0,6
4,0	0,8
5,0	1,0

### Mercurio:

Se prepararon 10 mL de 8 estándares de mercurio en el rango de concentración de 2,0 a 20,0 µg Hg/L, en una solución de HCl al 1,0%, a partir de una solución de 1000µg Hg/L; para la curva de calibración, como se muestra en la tabla 7, y a cada estándar, se le realizaron seis lecturas de absorbancia en el EAA-VP.

**Tabla 7.** Datos de preparación de estándares de Hg para la curva de calibración.

Volumen (µL) de solución stock (1000 µg Hg/L)	Concentración (µg Hg/L)
20,0	2,0
40,0	4,0
80,0	8,0
120,0	12,0
140,0	14,0
160,0	16,0
180,0	18,0
200,0	20,0

## **4.10 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO Y MERCURIO**

Para la estandarización de los dos métodos analíticos, se evaluaron los parámetros de calidad estadística, de la manera como se describen a continuación.

### **4.10.1 Linealidad**

Para el estudio de la linealidad, se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración que incluyó 6 concentraciones diferentes para cadmio entre 0,1 y 1,0 µg Cd/L (tabla 6) y 8 concentraciones diferentes para mercurio entre 2,0 y 20,0 µg Hg/L, (tabla 7). Se analizaron en el equipo de absorción atómica, realizando cuatro lecturas de absorbancia para cada estándar de cadmio y seis lecturas para cada estándar de mercurio; se graficó la curva de calibración (Absorbancia vs concentración) y se evaluó estadísticamente el coeficiente de correlación y la pendiente, mediante un tratamiento estadístico de los datos paramétricos obtenidos para cada nivel de concentración.

### **4.10.2 Precisión**

Con el fin de analizar el grado de concordancia entre los datos individuales obtenidos cuando el método se aplicó repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea y la repetibilidad, se determinó la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV).

La precisión se evaluó a dos niveles: Repetibilidad y Precisión intermedia.

#### **4.10.2.1 Repetibilidad**

Se analizó la precisión obtenida tras la realización de 5 curvas de calibración, en un rango de concentración de 0,1 a 1,0 µg/L para cadmio y de 2,0 a 20,0 µg/L de mercurio, en donde a cada patrón se le midió 4 y 6 veces su absorbancia para cadmio y mercurio respectivamente, bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto (mismo día) por el mismo analista y usando los mismos equipos, materiales y reactivos.

#### **4.10.2.2 Precisión intermedia**

Se examinó la precisión obtenida tras la realización de 7 curvas de calibración, en el mismo rango de concentración que para repetibilidad, bajo las mismas condiciones de operación, en intervalos tiempo diferente (7 días diferentes), por el mismo analista y usando el mismo equipo, materiales y reactivos, en donde a cada patrón se le midió 4 y 6 veces su absorbancia para cadmio y mercurio respectivamente.

Para los dos procedimientos anteriores (4.10.2.1 y 4.10.2.2), se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk con N-1 grados de libertad (N=lecturas de la absorbancia) y de Homogeneidad de varianzas con grados de libertad 1 y 2 calculados como K-1 y (k•N)-K respectivamente (donde N=lecturas de la absorbancia y K= número de curvas de calibración), planteando las correspondientes hipótesis nulas y alternativas a un nivel de confianza del 95%, además, para cada uno de los niveles de concentración (estándar) se obtuvieron las respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación para determinar si el método fue preciso ó no.

#### **4.10.3 Sensibilidad**

La sensibilidad se evaluó como sensibilidad analítica y sensibilidad de calibrado, las cuales se describen a continuación.

##### **4.10.3.1 Sensibilidad de calibrado**

Este parámetro fue determinado comparando las pendientes de las curvas de calibración de Cd y Hg obtenidas en la precisión del método (repetibilidad y precisión intermedia).

##### **4.10.3.2 Sensibilidad analítica**

Los parámetros empleados para determinar la sensibilidad analítica fueron los límites de detección y cuantificación. Para esto se tomó la lectura de 15 absorbancias del blanco de cada metal; se calculó la desviación estándar de este y los límites de detección y cuantificación, siguiendo el método sugerido por la IUPAC (1995) [40].

#### **4.10.4 Exactitud evaluada como porcentaje de recuperación**

##### Termoformados

La exactitud del método fue determinada en términos del porcentaje de recuperación, adicionando por triplicado cantidades conocidas (4, 8 y 12 µL) de un estándar de 1000 µg/L de cadmio a la muestra MPER-183 y 60, 100 y 180 µL de un estándar de 1000 µg/L

de mercurio a la muestra Nataima-31 antes del proceso de digestión; seguidamente, se realizaron las lecturas respectivas (4 lecturas de absorbancia para cadmio y 6 para mercurio) en el equipo de absorción atómica de la muestra dopada y del estándar adicionado a la muestra.

Para calcular el porcentaje de recuperación, como lo indica la ecuación 7, a las muestras se les determinó previamente la concentración de cadmio y mercurio.

$$R (\%) = \frac{(\text{Concentración con adición del stock}) - (\text{Concentración sin adición del stock})}{\text{Concentración de adición del stock}} * 100 \quad \text{ec. 7}$$

### Películas Flexibles

En estas muestras solo se realizó el porcentaje de recuperación en cuanto a mercurio (dado que el cadmio en las muestras de películas fue no detectable), adicionando por triplicado alícuotas conocidas previamente (40,80 y 160 µL) del estándar de 1000µg Hg/L a la muestra CM 7138-7 nativo, antes del proceso de digestión, y el porcentaje de recuperación se determinó de la misma manera que para termoformados.

## **4.11 ESTABILIDAD DE LOS METALES**

Con el objeto de establecer el tiempo de análisis de un estándar y de una muestra en un laboratorio, se hace necesario establecer qué tan estables son las muestras con el tiempo y para ello se evaluó este parámetro como se describe a continuación.

### **4.11.1 Estabilidad del Estándar**

Para evaluar esta estabilidad, se preparó un estándar de mercurio (12 µg/L) y de cadmio (0,8 µg/L), los cuales se guardaron refrigeradas y se analizaron durante diez días consecutivos.

### **4.11.2 Estabilidad de los metales en las muestras digeridas**

Para evaluar la estabilidad del mercurio, se realizó la digestión de la muestra de termoformado "Nataima-31"; se realizó una dilución de 5 a 100 mL, se guardó refrigerada y se leyó en el equipo durante diez días consecutivos. La muestra para película flexible fue CM-7138-7 nativo, que también se refrigeró y se leyó por diez días consecutivos. En cuanto a cadmio solo se realizó seguimiento a la muestra de termoformado (CM-4574-7), porque las muestras de películas flexibles fueron no detectables.

#### 4.12 DETERMINACIÓN DE CADMIO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Para la determinación de cadmio, el espectrómetro de absorción atómica por horno de grafito, se trabajó en las condiciones instrumentales que se muestran en la tabla 8; el metal se determinó por triplicado en 7 muestras de termoformados y 6 muestras de películas flexibles; adicionalmente, se analizaron 7 muestras de harina, 6 de almidón de yuca y una de fibra de fique, para determinar si la presencia del metal en los termoformados provenía de la materia prima de elaboración.

**Tabla 8.** Condiciones instrumentales en el EAA - Horno de Grafito para la determinación de Cadmio.

Método	EAA-Horno de Grafito
Atomización	Electrotérmica
Elemento	Cd
Lámpara	Cátodo Hueco Cd
Corrección de Fondo	D2 Quadline
Longitud de onda (nm)	228,8
Volumen de Inyección	20
Slit (nm)	0,5

#### 4.13 DETERMINACIÓN DE MERCURIO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Para la determinación de mercurio, se establecieron las condiciones instrumentales que se muestran en la tabla 9. El metal fue determinado por triplicado en 7 muestras de termoformados y 6 películas flexibles; además se determinó mercurio en 3 muestras de harinas, 5 muestras de almidón de yuca y fibra de fique, y así establecer si la presencia de dicho metal en los termoformados y películas flexibles proviene desde la materia prima.

**Tabla 9.** Condiciones instrumentales en el EAA-VP para determinación de Mercurio.

Método	EAA-VP
Atomización	Apagado
Elemento	Hg
Lámpara	Cátodo Hueco Hg
Corrección de Fondo	Deuterio
Longitud de onda (nm)	253,7
Flujo de Gas N <sub>2</sub> (mL/min)	180
Altura Mechero (mm)	15,3
Slit (nm)	0,5
Matriz ácida	HCl (10%)
Reducción	NaBH <sub>4</sub> (0,5%) en NaOH (0,5%)

#### **4.14 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

Con el fin de analizar el grado de concordancia entre los datos individuales obtenidos para la estandarización del método analítico, se les aplicaron pruebas estadísticas: Las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, para evaluar la normalidad y homogeneidad de los datos obtenidos para repetibilidad y precisión intermedia, con una probabilidad mayor al 95% de confianza; además, se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación para determinar si el método es preciso. Para la linealidad se determinó el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), se aplicó ANOVA de un factor y la prueba t-student para evaluar si la pendiente difiere significativamente de cero o no.

A las muestras de termoformados, películas flexibles, muestras de harina y almidones, se les aplicó ANOVA de un factor para determinar si existen diferencias significativas entre ellas.

Para este análisis estadístico se utilizaron los siguientes programas: Microsoft Office Excel 2007 y Software estadístico SPSS versión 11.5

## 5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO

De acuerdo con los resultados obtenidos en la verificación de la calibración del material de vidrio para el caso de los balones aforados, los datos mostraron que la dispersión de los valores individuales, son menores que un cuarto del límite de error admisible, el cual se encuentra reportado en cada balón (<0,0375mL para el balón de 100; <0,0225 para el de 50 mL y <0,015 para el 10mL); además, se observa que la desviación estándar es menor a 0,0455 y el coeficiente de variación menor a 0,15% para todos los balones (ver anexo 1, tablas 2-5), lo que significa que la incertidumbre de trabajo debida a este material es aceptable y por tanto los balones pueden usarse para la estandarización del método y preparación de las diferentes soluciones empleadas en el desarrollo del trabajo.

### 5.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIGESTIÓN

Previamente al análisis de los metales pesados (cadmio y mercurio) y con el fin de obtener resultados confiables, se procedió a optimizar el proceso de digestión de las muestras como se mencionó en la metodología (sección 4.7).

Las muestras se utilizaron en base seca; los porcentajes de humedad (anexo 2) encontrados están entre el 3,71 al 5,80% para los termoformados (anexo 2, tabla 1) y de 8,34 a 10,35% para las películas flexibles (anexo 2, tabla 2), los cuales están dentro del rango de humedad de los polímeros empleados para envolturas [54].

#### 5.2.1 Optimización de ácidos

Los ácidos nítrico y perclórico, según la literatura, son los más usados y los que mejores resultados muestran para las digestiones ácidas con reflujo, en la determinación de metales pesados. Según los resultados obtenidos en el proceso de digestión para termoformados, la utilización únicamente de ácido perclórico no mostró buena digestión (ver figura 7a), a diferencia del ácido nítrico, que sí dió una mejor oxidación de la materia orgánica (ver figura 7b).

**Figura 7.** Digestión del termoformado (HMC-1), 1,0000 g, 70°C, 3 horas: a) HClO<sub>4</sub>, b) HNO<sub>3</sub>.



Para los demás procesos de optimización, se realizaron mezclas en diferentes proporciones de los dos ácidos (tabla 5), para los pesos 0,5000, 1,0000 y 2,0000

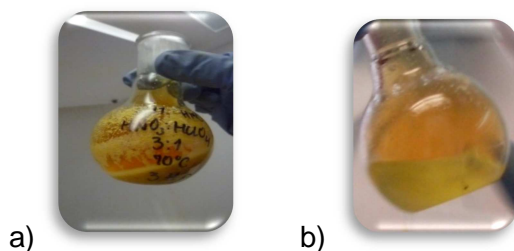


para así, obtener la mejor relación para las digestiones de las muestras de termoformados y películas flexibles.

### 5.2.2 Optimización del peso de la muestra para termoformados

La cantidad de muestra de termoformado (HMC-1) utilizado, influye en la eficiencia de la digestión en los 20 mL de ácido empleados para tal fin; cuando se emplearon 2,0000 g de muestra, no se presentó un buen proceso de oxidación de la materia orgánica, a ningún tiempo de digestión, temperatura y relación de ácido nítrico-perclórico (anexo 3, tablas 1-4, ensayos 19-27), quedando muestra sin digerir como se observa en la figura 8.a, por tanto, el empleo de esta cantidad de muestra se descartó para la digestión de los termoformados; cuando se utilizó 0,5000 y 1,0000 g de muestra, la digestión mejoró (figura 8b) y dependió de la temperatura, el tiempo y la relación de ácidos (anexo 3, tablas 1-4), los cuales se analizan más a fondo en el siguiente ítem.

**Figura 8.** Digestión ácida del termoformado (HMC-1): a) 2,0000 g, b) 1,0000 g.

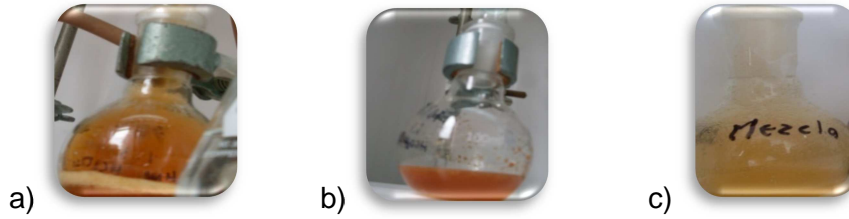


### 5.2.3 Optimización del tiempo y temperatura de digestión para termoformados

El proceso de digestión se ve afectado directamente por el tiempo y la temperatura; de acuerdo a los resultados, se encontró que a 60 minutos, no se tiene un buen proceso de digestión a ninguna temperatura y relación de mezcla de ácidos (anexo 3, tablas 1-4, ensayos 1-3, 10-12 y 19-21) (figuras 9.a y 10.a). Con respecto a 120 minutos, depende de la temperatura y la cantidad de muestra, así, cuando se utilizó 0,5000g de muestra de termoformado (HMC-1) a las temperaturas de 35 y 50°C no se presentó digestión a ninguna relación de ácidos (anexo 3, tablas 1-4, ensayos 4 y 5). Cuando se incrementó la temperatura a 70°C, si hubo una buena oxidación de la materia orgánica (anexo 3, tablas 1-4, ensayo 6) (figura 9.b) con excepción de cuando se empleó la relación de ácidos 1:3, la cual se analizó y se encontró que el mercurio para dicha muestra de termoformado fue no detectable.

Al utilizar 1,0000 g de muestra no hubo buena digestión a ninguna temperatura y relación de ácidos (anexo 3, tablas 1-4, ensayos 13-15), a excepción de la relación de ácidos 3:1 a 70°C (anexo 3, tablas 1-4, ensayo 15, figura 10 b).

**Figura 9.** Digestión de termoformado HMC-1, relación de ácidos 3:1, 0,5000 g, 70°C: a) 60 minutos, b) 120 minutos, c) 180 minutos.

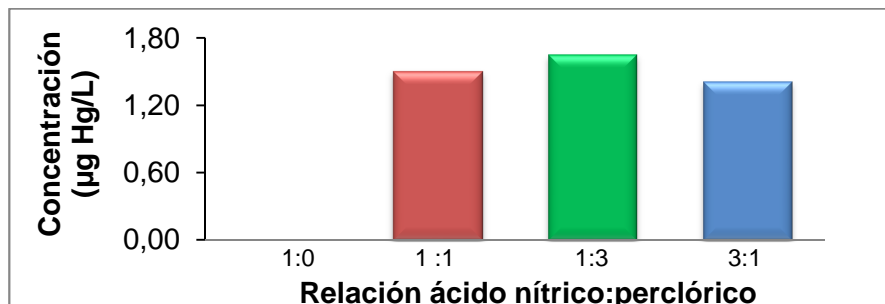


Cuando se incrementó el tiempo de digestión a 180 minutos, la digestión mejoró (figuras 9.c y 10.c) con respecto a 60 y 120 minutos, pero esta se vio afectada por la temperatura, la relación de ácidos y la cantidad de muestra (anexo 3, tablas 1-4, ensayos 7-9, 16-18). De acuerdo a los resultados, cuando se utilizó 0,5000 g y a la temperatura de 35°C, no se presentó digestión de la muestra en las diferentes relaciones de ácidos empleadas, a excepción de la relación 1:1 (anexo 3, tablas 1-4, ensayo 7); al realizar la digestión a las temperaturas de 50 y 70°C, se dió una buena digestión, pero la concentración de mercurio fue no detectable (anexo 3, tablas 1-4, ensayos 8 y 9). Al emplear 1,0000 g de muestra a la temperatura de 35°C y la relación de ácidos 1:3 no se presentó una completa destrucción de la materia orgánica; en las demás relaciones de ácidos y a las temperaturas de 35 y 50°C, la concentración de mercurio fue no detectable, pero el mercurio sí fue detectable a una temperatura de 70°C a excepción de cuando se utilizó solo ácido nítrico. Los resultados se muestran en el anexo 3, tablas 1-4, ensayos 16-18 y en la figura 11.

**Figura 10.** Digestión de termoformado HMC-1, relación 3:1, 1,0000 g, 70°C: a) 60 minutos, b) 120 minutos, c) 180 minutos.



**Figura 11.** Concentración de mercurio del termoformado (HMC-1), a diferentes relaciones de ácidos, 1,0000 g de muestra, 70°C y 180 minutos de digestión.



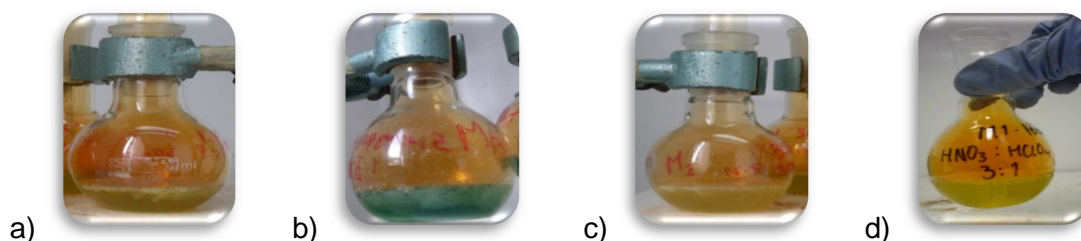
De acuerdo a los resultados, las condiciones de digestión para termoformados en las cuales se obtuvo un menor coeficiente de variación son: 1,0000 g de muestra, relación de ácidos 3:1, 70°C y 180 minutos de digestión y por tanto, con estas condiciones se realizó la digestión de las demás muestras de termoformados para su respectivo análisis.

De acuerdo a los resultados encontrados en el procedimiento de digestión para los termoformados, se aplicó este proceso en las películas flexibles, es decir, con la relación de ácidos 3:1 y variando el peso de la muestra, el tiempo y la temperatura de digestión.

#### 5.2.4 Optimización del peso para películas flexibles

Con 0,5000 y 1,0000 g, la digestión depende, del tiempo y temperatura (anexo 3, tabla 5), a 15 y 30 minutos no se presentó buena digestión (figuras 12.a 12.b y 12.c); y a 45 minutos hay una mejor respuesta a este parámetro (figura 12.d); en el siguiente ítem se analiza cada uno de estos aspectos.

**Figura 12.** Digestión de película flexible (SM 707-17 hidrolizado), 50°C a) 0,5000 g, 15 min, b) 1,0000 g, 15 min, c) 1,0000 g, 30 min, d) 1,0000 g, 45 min.



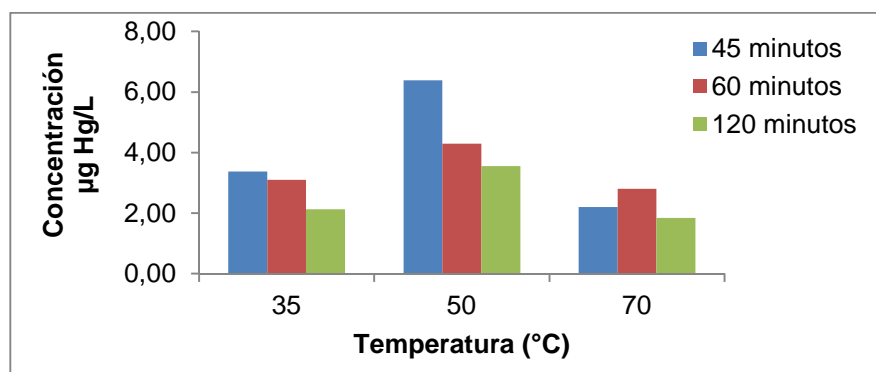
#### 5.2.5 Optimización del tiempo y temperatura de digestión para películas flexibles

Con los resultados obtenidos, la digestión depende del tiempo: a 15 y 30 minutos no hubo buena oxidación de la materia orgánica(anexo 3, tabla 5, ensayos 1-6, 16-21), a ninguna de las dos cantidades de muestra (SM 707-17 hidrolizada) utilizada (0,5000 y 1,0000g).

Al incrementar el tiempo a 45, 60 y 120 minutos, la digestión de la muestra fue mejor, pero la concentración del metal (mercurio) se vio afectada por la cantidad de muestra y la temperatura; con 0,5000g la concentración es no detectable (anexo 3, tabla 5, ensayos 7-15), pero con 1,0000g, la muestra fue cuantificable y dependió de la temperatura de digestión (anexo 3, tabla 5, ensayos 22-30).

En la figura 13 y anexo 3, tabla 5, ensayos 23, 26 y 29, se observa que a 50°C durante 45, 60 y 120 minutos se presentó una mayor concentración de mercurio, con respecto a las otras dos temperaturas (35 y 70°C) y por tanto, se concluye que las mejores condiciones para el procedimiento de digestión para películas flexibles es: 1,0000 g de muestra, 50°C, 45 minutos y una relación de ácidos 3:1.

**Figura13.** Optimización de la digestión para películas flexibles a diferentes temperaturas y tiempos, relación de ácidos 3:1 y 1,0000 g de muestra.

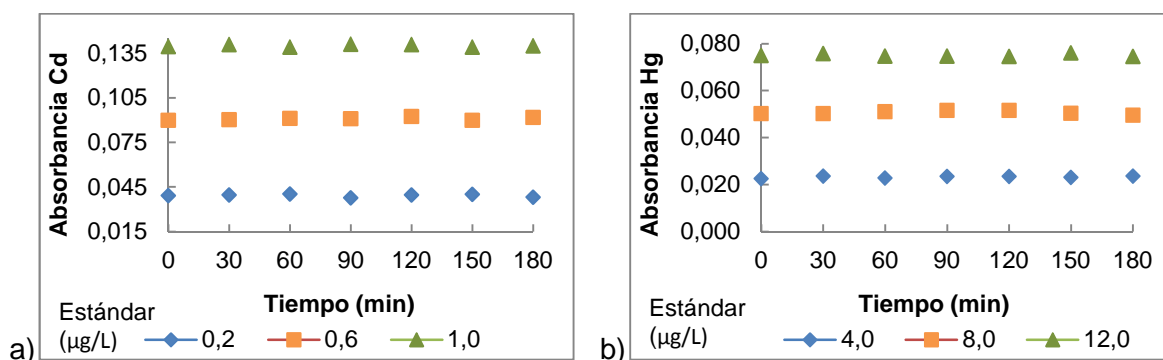


### 5.3 PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

#### 5.3.1 Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de cadmio y mercurio

En la figura 14, se muestran las absorbancias obtenidas para los estándares de cadmio y mercurio, a los cuales se les realizó el seguimiento para observar la estabilidad de las lámparas, frente al tiempo (3 horas); a los resultados de las absorbancias, se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, en las cuales se aceptó la  $H_0$ , ya que el  $W_{\text{calculado}}$  fue menor que el  $W_{\text{tabulado}}$  (0,999 para cadmio y 0,986 para mercurio) y la homogeneidad de varianzas con  $F_{\text{calculado}}$  menor al  $F_{\text{tabulado}}$  (5,100 para cadmio y de 5,900 para mercurio) (ver anexo 4, tablas 1 y 3), indicando que las medias obtenidas, son valores representativos de las absorbancias de cada uno de los estándares de ambos metales, con buenos coeficientes de variación (<3,5% para Cd y < 3,7% para Hg) (anexo 4, tablas 2 y 4).

**Figura 14.** Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de: a) cadmio, b) mercurio.



En las tablas 10 y 11, se muestra el ANOVA de un factor para las absorbancias de cada estándar del metal (cadmio y mercurio), en donde se obtuvo un valor constante para la suma de cuadrados como para la media cuadrática (0,000), además se observa que el  $F_{\text{calculado}}$  es menor que el  $F_{\text{tabulado}}$  a un nivel de confianza del 95%, indicando así que

no existen diferencias significativas entre los valores de las absorbancias a los diferentes tiempos en que se realizó el análisis.

**Tabla 10.** ANOVA de un factor para la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de cadmio.

Estándar ( $\mu\text{g Cd/L}$ )		gl	F calculado	F tabulado
0,2	Inter-grupos	6	2,529	2,570
	Intra-grupos	21		
	Total	27		
0,6	Inter-grupos	6	1,329	2,570
	Intra-grupos	21		
	Total	27		
1,0	Inter-grupos	6	1,263	2,570
	Intra-grupos	21		
	Total	27		

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n^*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}$ , Cd =  $F_{\text{tabulado}}(0,05, 6, 21)$ , donde, n = 7 tiempos y k = número de lecturas de la absorbancia (4 para Cd).

**Tabla 11.** ANOVA de un factor para la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de mercurio.

Estándar ( $\mu\text{g Hg/L}$ )		gl	F calculado	F tabulado
4,0	Inter-grupos	6	2,020	2,340
	Intra-grupos	35		
	Total	41		
8,0	Inter-grupos	6	1,836	2,340
	Intra-grupos	35		
	Total	41		
12,0	Inter-grupos	6	2,193	2,340
	Intra-grupos	35		
	Total	41		

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n^*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}$ , Hg =  $F_{\text{tabulado}}(0,05, 6,35)$ , donde, n = 7 tiempos y k = número de lecturas de la absorbancia (6 para Hg).

#### 5.4 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se estudiaron las características analíticas del método en cuanto a linealidad, sensibilidad analítica (límites de detección y cuantificación), precisión (expresada como repetibilidad y precisión intermedia), sensibilidad de calibrado (pendiente) y exactitud expresada como porcentaje de recuperación.

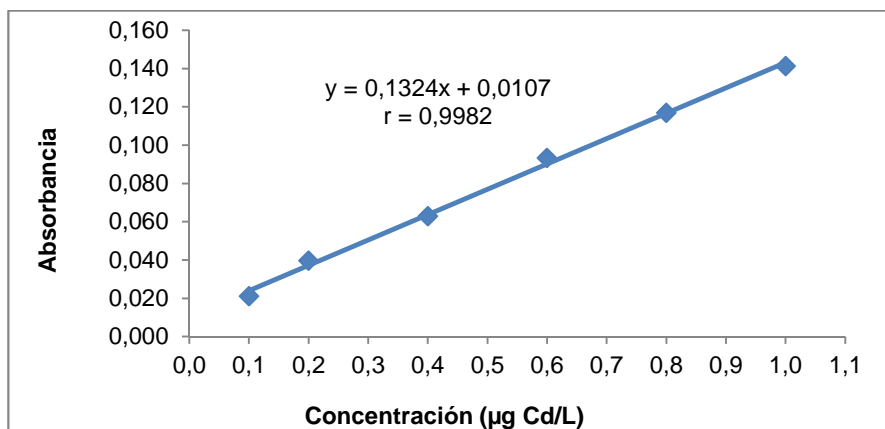
### 5.4.1 Linealidad

En las tablas 12 y 13 se muestran los datos del promedio de las absorbancias obtenidas para las concentraciones de cadmio y de mercurio de la curva de calibración preparada para evaluar la linealidad; en las figuras 15 y 16 se presentan las rectas de calibrado obtenidas para cada metal.

**Tabla 12.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares de cadmio para evaluar la linealidad.

Concentración ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	$\bar{x}$	s	CV (%)
0,1	0,021	0,001	4,6
0,2	0,040	0,001	3,2
0,4	0,063	0,001	1,8
0,6	0,093	0,002	2,6
0,8	0,117	0,001	0,7
1,0	0,141	0,002	1,4

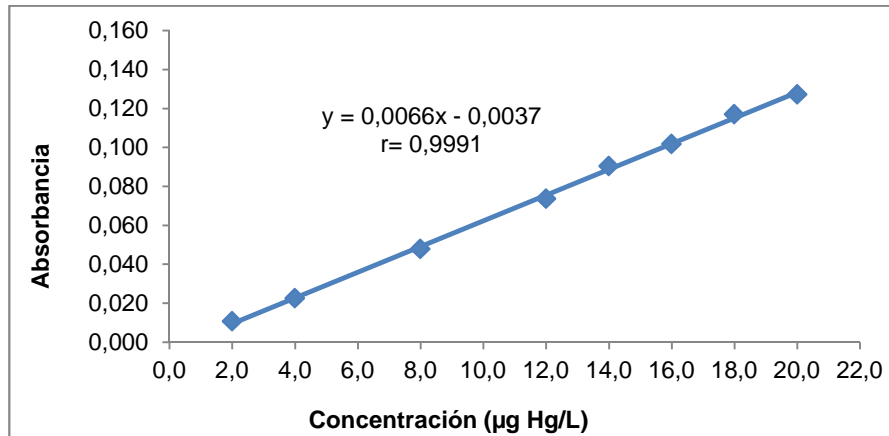
**Figura 15.** Curva de calibración para cadmio.



**Tabla 13.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los estándares de mercurio para evaluar la linealidad.

Concentración ( $\mu\text{g Hg/L}$ )	$\bar{x}$	s	CV (%)
2,0	0,011	0,000	0,0
4,0	0,023	0,001	2,4
8,0	0,048	0,000	0,9
12,0	0,074	0,001	1,4
14,0	0,091	0,001	1,2
16,0	0,102	0,001	0,7
18,0	0,117	0,001	1,1
20,0	0,127	0,002	1,5

**Figura 16.** Curva de calibración para mercurio.



El coeficiente de Correlación de Pearson para los dos metales analizados, mostró que las curvas de calibración tanto de cadmio como de mercurio, presentan un valor de  $r$  alto, por encima de 0,9950 (tabla 14), demostrando que existe una correlación positiva entre la absorbancia de cada metal con la concentración de cada uno.

**Tabla 14.** Coeficiente de correlación de Pearson para cadmio y mercurio.

Metal	N	Correlación Pearson
<b>Cadmio</b>	24	0,9982
<b>Mercurio</b>	48	0,9991

Cd: N = (6 niveles de la curva de calibración) x (4 lecturas de la absorbancia)

Hg: N = (8 niveles de la curva de calibración) x (6 lecturas de la absorbancia)

La tabla 15 muestra un buen ajuste del modelo para la linealidad de los dos metales trabajados, ya que los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) son cercanos a 1, lo que indica que el 99,64% y el 99,83% de la variabilidad de la absorbancia de cadmio y mercurio, está dada por la concentración de estos respectivamente.

En cuanto al  $R^2$  corregido se recomienda al menos un valor de 0,7, lo que significa que se encuentran dentro del parámetro permitido [57].

**Tabla 15.** Ajuste del Modelo lineal para cadmio y mercurio.

Metal	Modelo	R	$R^2$	$R^2$ Corregido
<b>Cadmio</b>	1	0,9982	0,9964	0,9962
<b>Mercurio</b>		0,9991	0,9983	0,9982

Es necesario confirmar si el grado de relación es significativamente lineal entre las dos variables (absorbancia y concentración) mediante un análisis de regresión para el modelo  $Y = \beta_0 + \beta_1 X$ ; en la tabla 16, se observa el coeficiente que define la pendiente de la recta de regresión y los estadísticos  $t$  para cadmio y mercurio, los cuales permiten contrastar la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que la pendiente tiene un valor de cero y de acuerdo a los

resultados, los estadísticos calculados son mayores que los tabulados para cada metal en cuestión, lo que permitió afirmar que las pendientes difieren significativamente de cero y por tanto, la absorbancia está significativamente relacionada con la concentración.

**Tabla 16.** Análisis de regresión para el modelo  $Y = \beta_0 + \beta_1 x$ .

Metal	Pendiente	t calculado	t tabulado
<b>Cadmio</b>	0,1324	78,226	2,048
<b>Mercurio</b>	0,0066	163,287	2,010

Cd:  $t_{(\alpha/2, N-2)} = t_{(0,025, 22)}$ , donde, N = (6 niveles de la curva de calibración)x(4 lecturas de la absorbancia) // Hg:  $t_{(\alpha/2, N-2)} = t_{(0,025, 46)}$ , donde, N = (8 niveles de la curva de calibración)x(6 lecturas de la absorbancia)

Para confirmar, que sí existe asociación entre las dos variables (absorbancia y concentración) mediante una regresión lineal para cadmio y mercurio, se aplicó el ANOVA de un factor, como se muestra en las tablas 17 y 18; los resultados mostraron que el F calculado fue mayor que el F tabulado para los dos metales respectivamente y por tanto, se rechaza la hipótesis nula planteada ( $H_0 =$  No existe relación lineal significativa entre la absorbancia y la concentración).

**Tabla 17.** ANOVA de un factor para cadmio.

Modelo	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado	F tabulado
1	Regresión	0,043	1	0,043	
	Residual	0,000	22	0,000	6119,282
	Total	0,043	23		4,080

Cd:  $F_{(\alpha, 1, n-2)} = F_{(0,05, 1, 22)}$ , donde, N = (6 niveles de la curva de calibración)x(4 lecturas de la absorbancia)

**Tabla 18.** ANOVA de un factor para mercurio.

Modelo	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado	F tabulado
1	Regresión	0,078	1	0,078	
	Residual	0,000	46	0,000	26662,718
	Total	0,078	47		4,000

Hg:  $F_{(\alpha, 1, n-2)} = F_{(0,05, 1, 46)}$ , donde, N = (8 niveles de la curva de calibración)x(6 lecturas de la absorbancia)

## 5.4.2 Precisión

### 5.4.2.1 Repetibilidad

Una vez obtenidas las absorbancias de cada uno de los estándares de las 5 curvas de calibración, se analizó la normalidad y homogeneidad de los datos tanto de cadmio como de mercurio mediante Shapiro-Wilk y Levene (anexo 5 tablas 1 y 2); los resultados muestran que a un nivel de confianza del 95%, el  $W_{\text{calculado}}$  es menor que el  $W_{\text{tabulado}}$  (0,999 para cadmio y 0,986 para mercurio) para todos los niveles de concentración de los dos metales, con 3 grados de libertad para cadmio y 5 grados de libertad para mercurio;



por tanto, se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos provienen de una distribución normal. Al aplicar la prueba de Levene para los datos de cadmio, se observa que para 4 y 15 grados de libertad, el estadístico calculado es menor que el estadístico tabulado para todos los niveles de concentración. Lo mismo se observa para los resultados de mercurio para 4 y 25 grados de libertad, por lo cual, se concluye que las varianzas son homogéneas.

Además como se observa en las tablas 19 y 20, los estándares para cadmio y mercurio, presentan una desviación estándar baja y un coeficiente de variación menor o igual al 5%, indicando así que el método empleado para cada metal presenta una buena repetibilidad.

**Tabla 19.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de cadmio.

Estándar ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	$\bar{x}$	s	CV (%)
0,1	0,021	0,001	4,1
0,2	0,04	0,001	2,3
0,4	0,066	0,003	5,0
0,6	0,094	0,002	2,6
0,8	0,121	0,003	2,6
1,0	0,144	0,004	2,9

**Tabla 20.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de mercurio.

Estándar ( $\mu\text{g Hg/L}$ )	$\bar{x}$	s	CV (%)
2,0	0,011	0,000	2,6
4,0	0,023	0,001	5,0
8,0	0,049	0,002	3,3
12,0	0,075	0,002	2,4
14,0	0,091	0,001	1,3
16,0	0,102	0,003	2,6
18,0	0,117	0,001	0,5
20,0	0,128	0,001	1,1

#### 5.4.2.2 Precisión intermedia

Al igual que para repetibilidad, una vez obtenidas las absorbancias se analizó la normalidad y la homogeneidad de los datos mediante Shapiro-Wilk y Levene; los resultados mostrados en el anexo 5, tablas 3 y 4, muestran que el estadístico calculado de Shapiro-Wilk fue menor que el estadístico tabulado tanto para cadmio y mercurio, por lo

tanto, se concluye que los datos provienen de una distribución normal a un nivel de 95% de confianza, y teniendo en cuenta el estadístico de Levene cómo se observa en el anexo 5, tablas 3 y 4, el calculado dió menor que el estadístico tabulado, por lo cual se concluye que las varianzas son homogéneas.

En las tablas 21 y 22 se observa que los estándares de cada metal, muestran una de desviación pequeña y un coeficiente de variación que es menor o igual al 4,8%, concluyendo así que el método posee una buena precisión.

**Tabla 21.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de cadmio.

Estándar ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	$\bar{x}$	s	CV (%)
0,1	0,021	0,001	3,5
0,2	0,038	0,001	3,5
0,4	0,064	0,003	4,0
0,6	0,091	0,003	3,3
0,8	0,120	0,002	1,8
1,0	0,143	0,005	3,8

**Tabla 22.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de mercurio.

Estándar ( $\mu\text{g Hg/L}$ )	$\bar{x}$	s	CV (%)
2,0	0,012	0,001	4,8
4,0	0,025	0,001	4,6
8,0	0,051	0,002	4,8
12,0	0,078	0,001	1,6
14,0	0,091	0,002	2,1
16,0	0,104	0,002	2,2
18,0	0,118	0,002	1,5
20,0	0,131	0,003	2,1

### 5.4.3 Sensibilidad de calibrado

La sensibilidad de calibrado, corresponde a la pendiente de la curva de calibración; en la tabla 23, se muestran las pendientes obtenidas para la repetibilidad y la precisión intermedia, en donde se observa que hay una mayor respuesta a los cambios de concentración para cadmio en la repetibilidad y para mercurio tiene el mismo valor.

**Tabla 23.** Pendiente de la repetibilidad y precisión intermedia de cadmio y mercurio para la sensibilidad de calibrado.

Metal	Pendiente Repetibilidad $\pm s$	Pendiente Precisión Intermedia $\pm s$
<b>Cadmio</b>	0,1358 $\pm$ 0,004	0,1351 $\pm$ 0,004
<b>Mercurio</b>	0,0066 $\pm$ 0,000	0,0066 $\pm$ 0,000

#### 5.4.4 Sensibilidad analítica

Para obtener la sensibilidad del método analítico utilizado en la determinación de cadmio y mercurio, se calcularon los límites de detección y cuantificación. En las tablas 24 y 25 se muestran los datos de las absorbancias registradas para el blanco (el cual se leyó 15 veces), con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

**Tabla 24.** Absorbancias del blanco para el análisis de cadmio.

Absorbancia	$\bar{x}$	s	CV (%)
0,007			
0,006			
0,007			
0,006			
0,006			
0,007			
0,007			
0,007	0,006	0,001	15,1
0,005			
0,005			
0,005			
0,005			
0,005			
0,005			
0,006			
0,005			

**Tabla 25.** Absorbancias del blanco para el análisis de mercurio.

Absorbancia	$\bar{x}$	s	CV (%)
0,001			
-0,001			
-0,001			
-0,002			
-0,002			
-0,001			
0,000			
0,000	-0,0003	0,001	473,3
-0,001			
0,002			
0,001			
-0,001			
0,000			
0,001			
0,001			

Los límites de detección y cuantificación fueron calculados de acuerdo a la IUPAC, empleando las ecuaciones 3 y 4 de la sección 3.7.3.3 y 3.7.3.4 así:

Cadmio:

$$X_{LD} = \frac{(3) * (0,001)}{0,1324} = 0,02 \mu\text{g/L}$$

$$X_{LC} = \frac{(10) * (0,001)}{0,1324} = 0,07 \mu\text{g/L}$$

Mercurio:

$$X_{LD} = \frac{(3) * (0,001)}{0,0066} = 0,54 \mu\text{g/L}$$

$$X_{LC} = \frac{(10) * (0,001)}{0,0066} = 1,79 \mu\text{g/L}$$

0,02  $\mu\text{g}$  de Cd/L y 0,54  $\mu\text{g}$  de Hg/L, son las menores concentraciones de cada metal que se pueden detectar, en las muestras de termoformados y películas flexibles en las condiciones establecidas.

0,07  $\mu\text{g}$  de Cd/L y 1,79  $\mu\text{g}$  de Hg/L, son las menores concentraciones que pueden ser cuantificadas con precisión y exactitud.

#### 5.4.5 Porcentaje de recuperación

Los porcentajes de recuperación obtenidos para cadmio y mercurio en las muestras de termoformados y películas flexibles, con sus correspondientes desviaciones estándar y coeficientes de variación, se muestran en las tablas 26, 27 y 28; como se observa, los resultados muestran porcentajes de recuperación altos, para cada metal, encontrándose en un rango adecuado que es entre 90% y 110% [57], lo que permite concluir que el método de extracción de los metales es bueno, y por tal razón las determinaciones pueden ser confiables.

**Tabla 26.** Porcentaje de recuperación de cadmio ( $\mu\text{g/L}$ ) en el análisis de termoformado (MPER-183).

Cantidad adicionada ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad detectada ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperación (%)	Media Recuperación (%)	s	CV (%)
4,0	0,695	96,67	96,23	0,4126	0,43
	0,695	95,85			
	0,690	96,18			
8,0	0,897	96,55	97,31	0,6940	0,71
	0,874	97,47			
	0,916	97,91			
12,0	1,118	97,71	96,71	1,2304	1,27
	1,123	97,58			
	1,105	95,84			
PROMEDIO			96,75	0,5411	0,56

**Tabla 27.** Porcentaje de recuperación de mercurio ( $\mu\text{g/L}$ ) en el análisis de termoformado (Nataima 31).

Cantidad adicionada ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad detectada ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperación (%)	Media Recuperación (%)	s	CV (%)
60,0	6,494	98,25	97,71	0,4686	0,48
	6,419	97,41			
	6,494	97,47			
100,0	8,313	96,45	96,73	0,5231	0,54
	8,237	96,40			
	8,161	97,33			
180,0	12,580	98,06	98,16	0,6504	0,66
	12,656	97,56			
	12,479	98,85			
PROMEDIO			97,53	0,7312	0,75

**Tabla 28.** Porcentaje de recuperación de mercurio ( $\mu\text{g/L}$ ) en el análisis de película flexible (CM 7138-7 nativo).

Cantidad adiconada ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad Detectada ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperación (%)	Media Recuperación (%)	s	CV (%)
40,0	5,282	94,85	94,99	0,1249	0,13
	5,383	95,09			
	5,358	95,03			
80,0	6,697	95,88	94,97	0,8479	0,89
	6,671	94,84			
	6,697	94,20			
160,0	10,459	93,94	93,65	0,4187	0,45
	10,636	93,17			
	10,333	93,84			
PROMEDIO			95,54	0,7679	0,81

Para determinar si existían diferencias significativas entre el valor obtenido de recuperación y el 100%, se aplicó un test estadístico (t-Student); los valores t experimentales se compararon con los tabulados ( $t_{(0,05, 8)} = 1,860$ ) para 8 grados de libertad. Los resultados se muestran en las tablas 29 y 30, en donde se observa que para todas las recuperaciones de los dos metales, tanto para termoformados como para películas flexibles, existen diferencias significativas entre los valores promedio y el 100% ya que  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$ .

**Tabla 29.** Estadísticos para los porcentajes de recuperación de cadmio y mercurio en el análisis de termoformados.

Metal	Muestra	Promedio (N=9)	s	CV (%)	t-calculado	t-tabulado
<b>Cadmio</b>	MPER-183	96,86	0,8193	0,85	11,489	1,860
<b>Mercurio</b>	NATAIMA-31	97,64	0,6774	0,69	10,442	1,860

$$t_{(\alpha, n-1)} = t_{(0,05, 8)}, \text{ donde, } n = 9 \text{ porcentajes de recuperación, } t_{\text{tabulada}} = 1,860$$

**Tabla 30.** Estadísticos para los porcentajes de recuperación de mercurio en el análisis de películas flexibles (CM 7138-7 nativo).

Metal	Muestra	Promedio (N=9)	s	CV (%)	t-calculado	t-tabulado
<b>Mercurio</b>	CM 7138-7 Nativo	96,86	0,8193	0,85	19,943	1,860

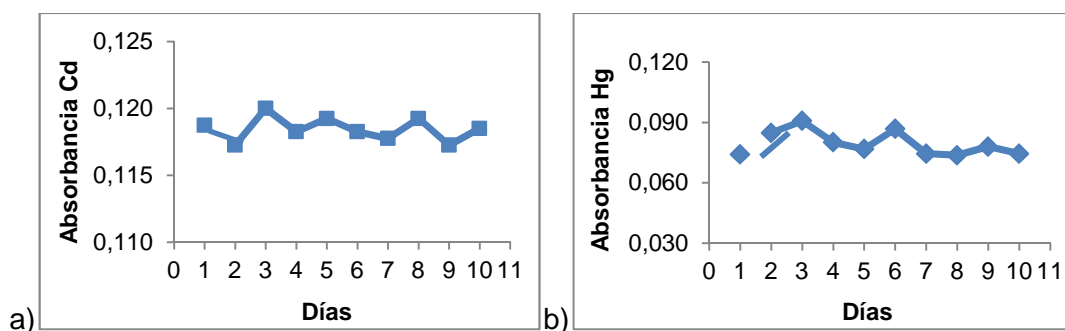
$$t_{(\alpha, n-1)} = t_{(0,05, 8)}, \text{ donde, } n = 9 \text{ porcentajes de recuperación, } t_{\text{tabulada}} = 1,860$$

## 5.5 ESTABILIDAD

### 5.5.1 Estabilidad de estándares de cadmio y mercurio

Se realizó el seguimiento de la estabilidad del estándar de cadmio de 0,8 µg Cd/L y el estándar de mercurio de 12 µg Hg/L como se muestra en las figuras 17.a y 17.b.

**Figura 17.** Estabilidad del estándar de: a) 0,8 µg Cd/L, b) 12,0 µg Hg/L durante 10 días consecutivos.



En el anexo 6 (tablas 1 y 2), se muestran los resultados del promedio de las absorbancias obtenidas durante los diez días de seguimiento para cada metal, con sus desviaciones estándar y coeficientes de variación; además, se muestra los estadísticos de Shapiro-Wilk y Levene, lo cual permitió determinar, que estos resultados provienen de una distribución normal ( $W_{\text{calculado}} < W_{\text{tabulado}}$ ) y presentan homogeneidad en la varianza ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabulado}}$ ).

Seguidamente se aplicó ANOVA de un factor (tablas 31 y 32) y se encontró que para el estándar de cadmio no existen diferencias significativas entre el promedio de las absorbancias durante los días analizados, por tanto, se puede preparar este estándar y guardar a una temperatura de 4°C para su análisis.

**Tabla 31.** ANOVA de un factor para estabilidad del estándar de 0,8 µg Cd/L.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabulado}}$
Inter-grupos	$2,9 \times 10^{-5}$	9	$3,2 \times 10^{-6}$		
Intra-grupos	$5,7 \times 10^{-5}$	30	$1,9 \times 10^{-6}$	1,675	2,420
Total	$8,6 \times 10^{-5}$	39			

En cuanto a mercurio, si existen diferencias significativas entre el promedio de las absorbancias durante los diez días analizados, y lo anterior puede atribuirse a errores aleatorios debido a la falta de homogenización de la muestra, a la estabilidad de la temperatura de las muestras antes de realizar el análisis, y a la variabilidad de la temperatura de almacenamiento (4°C); además se tiene que el mercurio es más volátil que el cadmio debido a su presión de vapor.

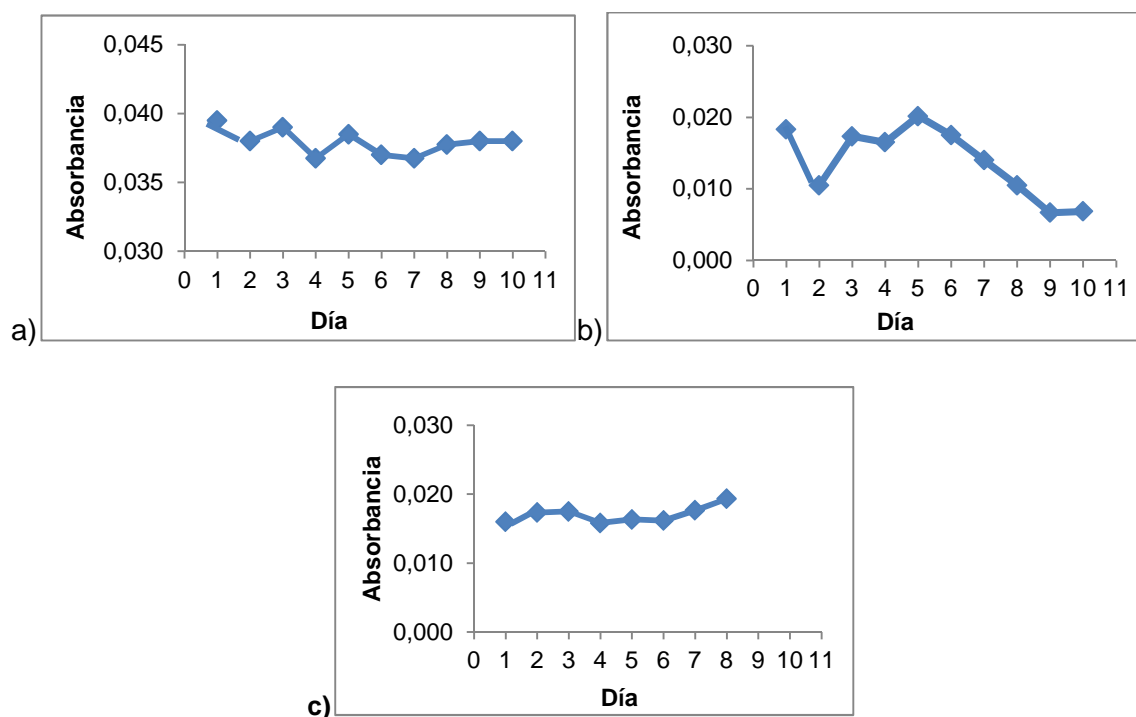
**Tabla 32.** ANOVA de un factor para estabilidad del estándar de 12 µg Hg/L.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F calculado	F tabulado
Inter-grupos	0,002	9	0,000		
Intra-grupos	0,000	50	0,000	83,709	2,340
Total	0,002	59			

### 5.5.2 Estabilidad en muestras de termoformados y películas flexibles

Se realizó el seguimiento de la estabilidad de: Cadmio en el termoformado CM 4574-7, de mercurio en una dilución 0,5 a 10 del termoformado NATAIMA -31 y la película flexible CM 7138-7 nativo. En la figura 18.a, 18.b y 18.c, se muestra el comportamiento de la absorbancia durante el análisis.

**Figura 18.** Estabilidad de: a) Cd en el termoformado CM 4574-7, b) Hg en el termoformado NATAIMA-31, c) Hg en la película flexible CM 7138-7 nativo.



En el anexo 6 (tablas 3, 4 y 5), se observan los valores de las absorbancias promedio con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación obtenidos durante los días de seguimiento realizados para cadmio y mercurio en las muestras de termoformados y películas flexibles. También se presentan los estadísticos de Shapiro-Wilk, a partir del cual se concluyó que los datos provienen de una distribución normal, ya que el  $W_{\text{calculado}}$  es menor que el  $W_{\text{tabulado}}$  y se observa que los datos son homogéneos, ya que el estadístico de Levene calculado es menor que el tabulado.



Para determinar si existían diferencias significativas en el promedio de las absorbancias entre los diferentes días analizados, se aplicó ANOVA de un factor. Los resultados se muestran en las tablas 33, 34 y 35, en donde se determinó que el cadmio fue estable en la muestra de termoformado (CM 4574-7) ya que el  $F_{\text{calculado}}$  es menor que el  $F_{\text{tabulado}}$ .

**Tabla 33.** ANOVA de un factor para la estabilidad de termoformado (CM4574-7), metal cadmio.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabulado}}$
Inter-grupos	0,000	9	0,000		
Intra-grupos	0,000	30	0,000	1,870	2,420
Total	0,000				

En cuanto al mercurio, en la muestra del termoformado (Nataima-31) se encontró que sí existen diferencias significativas entre los promedios de las absorbancias entre los diferentes días ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$ ) y al contrario en la película flexible (CM 7138-7 nativo), el mercurio no presentó diferencias significativas en la absorbancia ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabulado}}$ ). No se realizó el seguimiento de la estabilidad de cadmio en muestras de películas flexibles, ya que en esta la concentración del metal fue no detectable.

**Tabla 34.** ANOVA de un factor para la estabilidad de termoformado (Nataima-31), metal mercurio.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabulado}}$
Inter-grupos	0,001	9	0,000		
Intra-grupos	0,000	50	0,000	407,128	2,340
Total	0,001	59			

**Tabla 35.** ANOVA de un factor para la estabilidad de película flexible (CM 7138-7 nativo), metal mercurio.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabulado}}$
Inter-grupos	0,000	7	0,000		
Intra-grupos	0,000	40	0,000	2,317	2,340
Total	0,000	47			

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluyó que el cadmio es estable en la muestra digestada de termoformado CM 4574-7, al igual que el mercurio en la muestra de película flexible (CM 7138-7 nativo) y por tanto, estas muestras pueden almacenarse a 4°C. En cuanto al mercurio en el termoformado (Nataima-31), no presentó estabilidad en la dilución y por tanto, no se pueden almacenar muestras diluidas.

## 5.6 DETERMINACIÓN DE CADMIO Y MERCURIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA

### 5.6.1 Optimización de la temperatura de calcinación y atomización para la determinación de cadmio por horno de grafito

Previamente a la determinación Cd en las muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables, el horno de grafito se programó teniendo en cuenta las etapas mostradas en la tabla 36.

**Tabla 36.** Programación de temperaturas óptimas del Horno de Grafito para la determinación de Cadmio.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de Gas Argón (L/min)
<b>Secado</b>	100	30	0,2
<b>Calcinación</b>	530	20	0,2
<b>Atomización</b>	1750	3	Apagado
<b>Limpieza</b>	2500	3	0,2

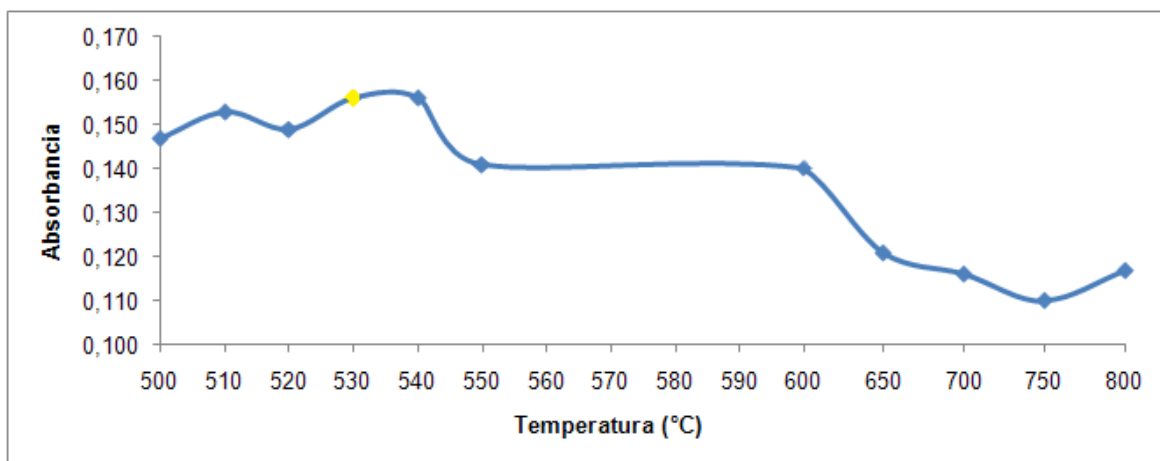
#### Calcinación:

Los resultados de la optimización de la temperatura de calcinación se muestran en la tabla 37 y en la figura 19, de donde se concluye que 530°C fue la temperatura óptima para llevar a cabo la calcinación en el análisis de cadmio, ya que en esta temperatura se obtuvo la mayor absorbancia y el menor coeficiente de variación.

**Tabla 37.** Temperatura, absorbancia promedio y coeficiente de variación para la optimización de la temperatura de calcinación.

Temperatura (°C)	□	CV (%)
500	0,147	1,0
510	0,153	0,4
520	0,149	22,1
<b>530</b>	<b>0,156</b>	<b>1,2</b>
540	0,156	1,9
550	0,141	14,2
600	0,140	30,0
650	0,121	1,2
700	0,116	28,2
750	0,110	19,9
800	0,117	2,5

**Figura 19.** Optimización de la temperatura de calcinación.



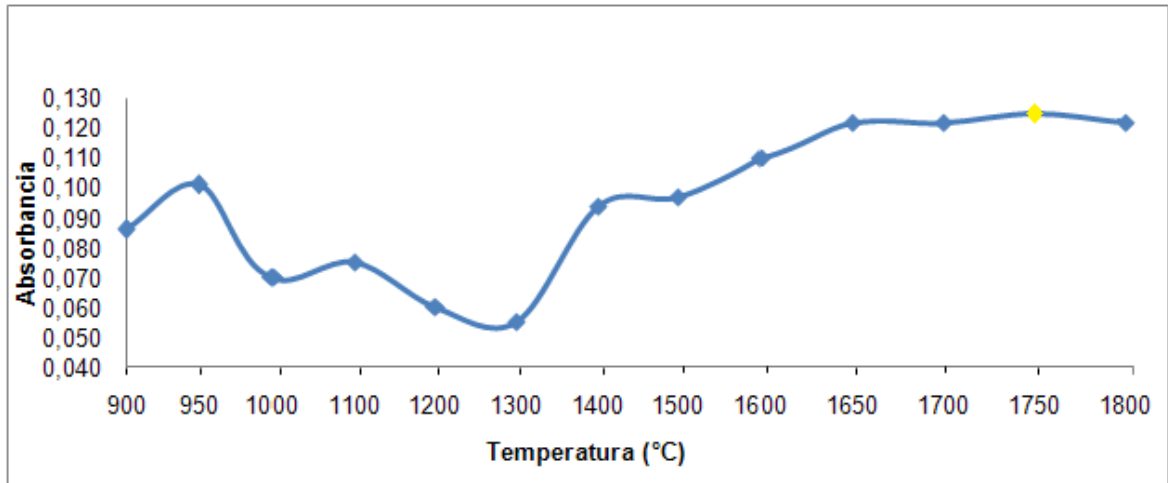
Atomización:

A 1750°C fue la temperatura a la cual se encontró la mayor absorbancia y el menor coeficiente de variación, estableciéndose esta como la temperatura óptima para llevar a cabo la atomización para el análisis de cadmio. Los resultados se muestran en la tabla 38 y en la figura 20.

**Tabla 38.** Temperatura, absorbancia promedio y coeficiente de variación para la optimización de la temperatura de atomización.

Temperatura (°C)	□	CV (%)
900	0,086	1,5
950	0,101	3,8
1000	0,070	35,8
1100	0,075	26,0
1200	0,060	39,8
1300	0,055	43,7
1400	0,094	14,9
1500	0,097	14,1
1600	0,110	1,0
1650	0,122	2,7
1700	0,122	3,2
1750	0,125	2,1
1800	0,122	2,1

**Figura 20.** Optimización de la temperatura de atomización.



### 5.6.2 Determinación de cadmio en termoformados y películas flexibles

En la tabla 39, se reportan las concentraciones de cadmio (en  $\mu\text{gCd/kg}$ ) de los termoformados analizados, los cuales muestran una desviación estándar inferior a 0,346 y un coeficiente de variación menor ó igual a 5,5%. Las concentraciones de las muestras fueron significativamente diferentes entre ellas, puesto que al aplicar ANOVA de un factor (anexo 7, tabla 1), el valor de F calculado fue mayor que F tabulado ( $1507,861 > 3,501$ ) al 95% de confianza.

**Tabla 39.** Concentración promedio ( $\pm$  desviación estándar), coeficiente de variación de cadmio (N=3), de siete muestras de termoformados biodegradables.

Termoformado	Concentración ( $\mu\text{gCd/kg}$ )	s	CV(%)
CM 523-7	17,885	0,023	0,1
NATAIMA-31	14,424	0,209	1,4
MBRA-383	11,455	0,240	2,1
MPER-183	9,688	0,149	1,5
CM 7951-5	9,919	0,220	2,2
CM 4574-7	4,167	0,100	2,4
HMC-1	6,247	0,346	5,5

Los resultados para películas flexibles, se indican en la tabla 40; como se observa, 4 muestras fueron no detectables, por lo tanto, no se presenta contaminación por este metal en ellas; dos muestras (SM 1498-4 nativo e hidrolizado), presentaron concentraciones inferiores al límite de cuantificación ( $0,070 \mu\text{gCd/L}$ ), el cual correspondería a una concentración máxima de  $1,400 \mu\text{gCd/kg}$  de muestra, lo que significa que estas concentraciones al nivel de trazas, son detectables más no cuantificables.

**Tabla 40.** Concentración promedio ( $\pm$  desviación estándar) de cadmio (N=3) de seis muestras de películas flexibles.

Películas Flexibles	Concentración ( $\mu\text{g Cd/kg}$ )
SM 707-17 NATIVO	ND
SM 707-17 HIDROLIZADO	ND
CM 7138-7 NATIVO	ND
CM 7138-7 HIDROLIZADO	ND
SM 1498-4 NATIVO	<1,400
SM 1498-4 HIDROLIZADO	<1,400

La NTC-4096 es la norma que regula el nivel máximo de metales pesados en muestras que van a estar en contacto con alimentos, y según los resultados, las concentraciones de cadmio encontradas en los termoformados fue menor que la establecida por esta, que es de 1mg Cd/kg; por tanto, estos biopolímeros pueden ser empleados para estos fines, pero hay que tener mucho cuidado con este metal ya que es bioacumulable y puede causar problemas ambientales graves.

### 5.6.3 Determinación de cadmio en la materia prima

Una vez determinada la concentración de cadmio en las muestras de termoformados, se procedió a analizar la materia prima principal, como es la harina de yuca y la fibra de fique, debido a que se requería conocer la procedencia de este metal en los termoformados, es decir, que si el cadmio presente en las muestras provenía, de los productos de elaboración.

Los resultados se muestran en las tablas 41 y en la figura 21, en donde se observa que el termoformado que mayor concentración presentó fue CM 523-7, al igual que la harina de la cual procede.

La fibra de fique es la muestra que sigue en mayor concentración con 7,218  $\mu\text{g Cd/kg}$ .

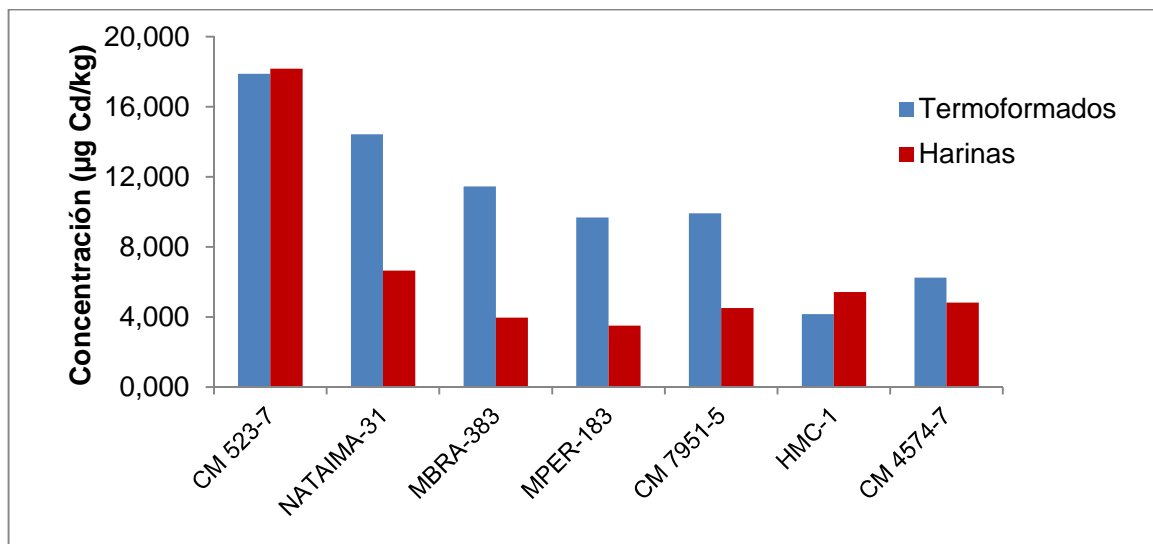
Se observa que la muestra CM 4574-7 de termoformado presenta mayor concentración en la harina que en el termoformado, posiblemente debido a la relación en las proporciones de mezcla de la materia prima utilizada, la cual no se conoce con certeza. En las demás muestras, el termoformado presentó mayor concentración que las harinas, lo cual probablemente se debe a que el cadmio presente en estas muestras es el aporte tanto de harina como de fibra de fique, la cual depende de la relación en las proporciones de mezcla.

Dado que la harina y la fibra de fique provienen de productos agrícolas, la presencia de cadmio en estas muestras podría deberse a que este metal se puede encontrar en herbicidas que son utilizados para el control de malezas como el liurion o dinurion, en fertilizantes (fertilizantes fosforados y nitrogenados), plaguicidas y fungicidas como el oxiclورو de cobre y carbofuranos entre otros [58], los cuales son utilizados en el cultivo de yuca y fibra de fique; además, puede estar presente en los suelos, por desechos municipales e incinerización de materiales plásticos.

**Tabla 41.** Concentración promedio ( $\pm$  desviación estándar), coeficiente de variación de cadmio (N=3) de siete muestras de harina de yuca y fibra de fique.

Harina	Concentración	s	CV (%)
	( $\mu\text{gCd/kg}$ )		
CM 523-7	18,168	0,170	0,9
NATAIMA-31	6,655	0,344	5,2
MBRA-383	3,961	0,199	5,0
MPER-183	3,502	0,110	3,2
CM 7951-5	4,517	0,139	3,1
CM 4574-7	5,435	0,268	4,9
HMC-1	4,834	0,092	1,9
FIBRA DE FIQUE	7,218	0,090	1,2

**Figura 21.** Concentración promedio de cadmio ( $\mu\text{g Cd/kg}$ ) en harinas de yuca y termoformados.



Se aplicó ANOVA de un factor (anexo 7, tabla 2), dando como resultado una diferencia significativa entre las concentraciones de las diferentes muestras de harina; el F calculado fue mayor que el F tabulado ( $1872,468 > 3,219$ ).

Se realizó la prueba estadística de t y se encontró que si existen diferencias significativas entre los termoformados y las harinas de la cual proceden, ya que los t tabulados fueron menores que los t calculados, a excepción de la muestra CM 523-7, donde el t tabulado fue mayor que el t calculado para 2 grados de libertad ( $t_{(\alpha, N-1)}$ , donde  $N=3$ , ya que la concentración de cada muestra se realizó por triplicado) a un nivel al 95% de confianza (ver anexo 7, tabla 3).

### 5.6.1 Determinación de mercurio en termoformados y películas flexibles

En la tabla 42 se reportan los resultados de las concentraciones de mercurio en  $\mu\text{gHg/kg}$  para termoformados; estas muestras presentaron una desviación estándar inferior a 52,414 y un coeficiente de variación menor al 6,0%, indicando que los resultados obtenidos en cuanto a mercurio son buenos. La muestra Nataima-31, presentó la mayor concentración de mercurio con respecto a las otras dos muestras, lo cual puede ser debido a una contaminación ya sea de la muestra o del mismo termoformado en el momento de la elaboración, ya que como se observa en la tabla 44, la harina de la cual procede este termoformado presenta mercurio, pero no en concentraciones elevadas como en el termoformado; las muestras HMC-1, CM 4574-7 tienen concentraciones menores al límite de cuantificación, es decir, son detectables mas no cuantificables y la concentración de la muestra CM7951-5 fue no detectable.

**Tabla 42.** Concentración promedio ( $\pm$  desviación estándar), coeficiente de variación de mercurio (N=3) de siete muestras de termoformados.

Termoformado	Concentración ( $\mu\text{g Hg/kg}$ )	s	CV(%)
MPER-183	79,742	3,629	4,6
HMC-1	<35,800	-----	-----
NATAIMA-31	1343,439	52,414	3,9
CM 4574-7	<35,800	-----	-----
MBRA-383	56,042	3,069	5,5
CM 523-7	<35,800	-----	-----
CM 7951-5	ND	-----	-----

Se siguió el mismo procedimiento de análisis estadístico que para cadmio y los resultados se muestran en el anexo 7, tabla 4, en donde se observa que el F calculado fue mayor que el F tabulado ( $1762,673 > 7,260$ ), concluyéndose que la concentración de las muestras, difieren significativamente una de otra, a un nivel de confianza del 95%.

En cuanto a las películas flexibles biodegradables, las concentraciones de las muestras presentaron una desviación estándar menor a 3,059 y coeficientes de variación menores a 6,2%; los resultados se muestran en la tabla 43.

**Tabla 43.** Concentración promedio ( $\pm$  desviación estándar), coeficiente de variación de mercurio (N=3) de seis muestras de películas flexibles.

Película Flexible	Concentración ( $\mu\text{g Hg/kg}$ )	s	CV(%)
SM 707-17 NATIVO	45,094	2,776	6,2
SM 707-17 HIDROLIZADO	127,262	2,192	1,7
CM 7138-7 NATIVO	66,646	3,059	4,6
CM 7138-7 HIDROLIZADO	53,048	1,332	2,5
SM 1498-4 NATIVO	ND	-----	-----
SM 1498-4 HIDROLIZADO	93,857	2,323	2,5

Se aplicó ANOVA de un factor(anexo 7, tabla 5), para determinar si hubo o no diferencias significativas entre las concentraciones de las muestras que se cuantificaron y analizaron, observándose que las concentraciones de mercurio de las muestras de películas flexibles, difieren significativamente una de otra, dado que el F calculado fue mayor que el F tabulado ( $582,293 > 4,468$ )

Se observa que la muestra SM 707-17 hidrolizado, presentó la mayor concentración de Hg, aunque esta no está por encima del valor permisible para productos que van a estar en contacto con alimentos ( $1 \text{ mg Hg/kg}$ ), pero igual que para cadmio, es de total cuidado este metal por su bioacumulación y los problemas que pueda presentar.

También se observa una diferencia entre las películas flexibles procedentes del almidón nativo y el almidón hidrolizado, lo cual probablemente puede ser debido al procedimiento de hidrolización que se le realizó al almidón nativo, presentándose de esta manera una posible contaminación ó una disminución de la cantidad de mercurio por volatilización debido a su presión de vapor.

Los resultados obtenidos en cuanto a la determinación de mercurio en las muestras de biopolímeros, se presentaron en el 43rd World Chemistry Congress, en el XIII Encuentro Nacional de Estudiantes de Química y además se realizó la publicación de un artículo en la revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial (Anexos 8, 7 y 9).

### 5.6.2 Determinación de mercurio en materia prima

Se analizaron las muestras de harina y almidones nativos e hidrolizados, para determinar si la presencia de este metal en los termoformados y películas flexibles, proveniende la materia prima ó si se adquirió durante el proceso de elaboración; las muestras analizadas fueron: las harinas MPER-183, Nataima-31y MBRA-383, y los almidones SM 707-17 nativo e hidrolizado, CM 7138-7 nativo e hidrolizado ySM 1498-4 hidrolizado; ya que en estas muestras se encontró mercurioadicionalmente, se estudió también la fibra de fique.

Los resultados se observan en las tablas 44 y 45 y en las figuras 22 y 23. Los resultados de las concentraciones halladas en los termoformados y películas flexibles se compararon con las concentraciones encontradas en las harinas y almidones



respectivamente, encontrándose que sí existen diferencias significativas dado que los t calculados son mayores que los t tabulados (anexo 7, tablas 6 y 7).

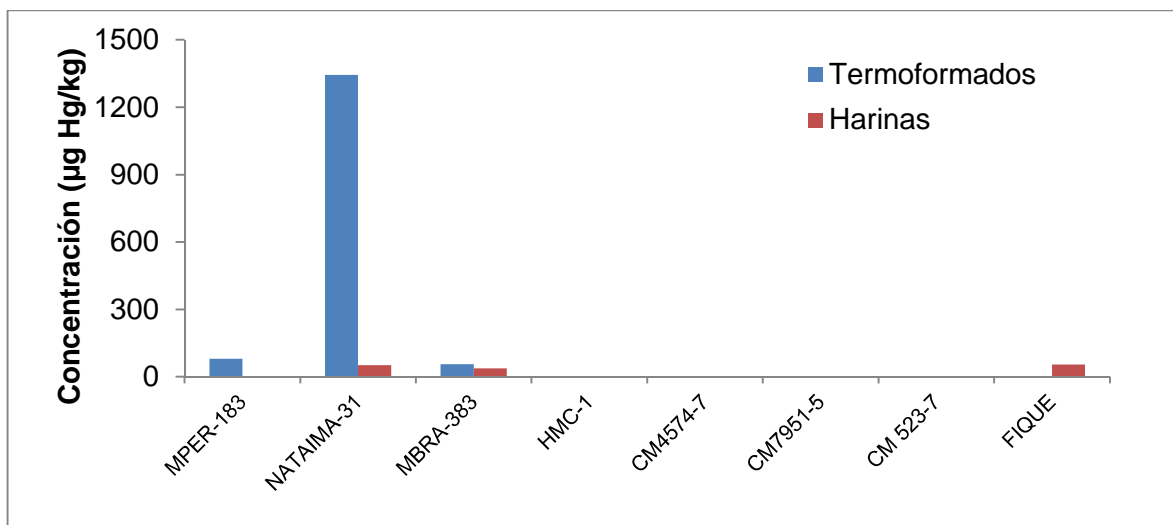
**Tabla 44.** Concentración promedio ( $\pm$  desviación estándar), coeficiente de variación de mercurio (N=3) de tres muestras de harina de yuca y fibra de fique.

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g Hg/kg}$ )	s	CV (%)
MPER-183	<35,800	-	-
NATAIMA-31	51,536	2,664	5,2
MBRA-383	38,233	1,772	5,2
FIBRA DE FIQUE	54,220	2,037	3,8

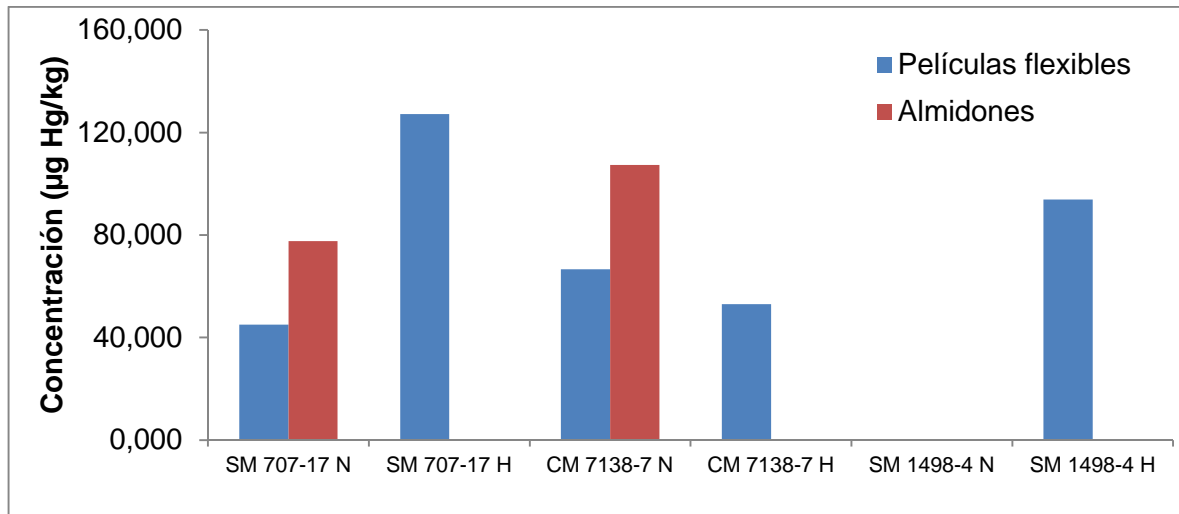
**Tabla 45.** Concentración promedio ( $\pm$  desviación estándar), coeficiente de variación de mercurio (N=3) de cinco muestras de almidones.

Muestra Almidón	Concentración ( $\mu\text{g Hg/kg}$ )	s	CV(%)
SM 707-17 NATIVO	77,663	3,929	5,1
SM 707-17 HIDROLIZADO	<35,800.		
CM 7138-7 NATIVO	107,320	3,645	3,4
CM 7138-7 HIDROLIZADO	<35,800		
SM 1498-4 HIDROLIZADO	<35,800		

**Figura 22.** Concentración promedio de mercurio ( $\mu\text{g Hg/kg}$ ) en harinas, termoformados y fibra de fique.



**Figura 23.** Concentración promedio de mercurio ( $\mu\text{g Hg/kg}$ ) en almidones y películas flexibles.



Se observa que la harina Nataima-31 y la fibra de fique presentaron mayor presencia de mercurio. La harina MPER-183 fue detectable más no cuantificable; estas muestran algo que en los termoformados unas desviaciones estándar bajas, con valores entre 1,772 y 2,664 y coeficientes de variación menores a un 6%, por tanto, se concluye que la presencia de mercurio en los termoformados proviene de la materia prima de elaboración.

Se aplicó un ANOVA de un factor a las muestras de harina y fibra de fique y se encontró que existe una diferencia significativa entre las muestras de harina y fibra de fique (anexo 7, tabla 8).

Para los almidones (solo dos muestras), se determinó su concentración (SM 707-17 nativo y CM 7138-7). Las demás fueron detectables más no cuantificables, por tanto, la presencia de mercurio en las películas flexibles, podría deberse a que se adquirió durante el proceso de elaboración, por un mal manejo de los materiales, para la elaboración de los biopolímeros.

ANOVA de un factor (anexo 7, tabla 9), muestra que existe una diferencia significativa entre las dos muestras en las que se determinó mercurio (SM 707-17 nativo y CM 7138-7 nativo), ya que el F calculado mayor que el F tabulado ( $91,874 > 2,76$ ).

## 6 CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvieron parámetros analíticos para la estandarización del método analítico para la determinación de cadmio y mercurio en termoformados y películas flexibles biodegradables, los cuales demostraron que los resultados obtenidos para los biopolímeros son confiables.
- ✓ La técnica de cuantificación resultó ser lineal para mercurio en el rango de 2 a 20  $\mu\text{g}$  de Hg/L, precisa teniendo en cuenta que los coeficientes de variación son bajos, entre 1,8 y 5%, y con alta sensibilidad debida a sus límites de detección y cuantificación de 0,54 y 1,79  $\mu\text{g}$  de Hg/L.
- ✓ La estandarización del método analítico para cadmio, generó buena confiabilidad y precisión porque los parámetros tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia, mostraron resultados aceptables, los coeficientes de variación se encuentran por debajo del 5%; para los dos parámetros estadísticos, también mostró alta sensibilidad con respecto a sus límites de detección y cuantificación con valores de 0,02 y 0,07  $\mu\text{g}$  de Cd/L indicando que el método estandarizado es preciso y sensible.
- ✓ El mejor proceso de digestión para disolver los termoformados fue con 1,0000 gramo de muestra, 3 horas de digestión, una relación de ácido nítrico:ácido perclórico de 3:1 y a una temperatura de 70°C; para películas flexibles fue de 1,0000 gramo de muestra, 45 minutos, una relación de ácidos de 3:1 y una temperatura de 50°C.
- ✓ Se obtuvieron porcentajes de recuperación aceptables, demostrando así que los métodos para la determinación de cadmio y mercurio en biopolímeros, presentan una buena exactitud.
- ✓ Se cuantificaron 3 muestras de termoformados y 5 muestras de películas flexibles, encontrándose concentraciones entre 2,808 y 67,273  $\mu\text{g}$  de Hg/L; y 2,194 y 6,394  $\mu\text{g}$  de Hg/L respectivamente.
- ✓ Las concentraciones que se encontraron en las muestras de termoformados y películas flexibles, están por debajo de las cantidades permitidas para productos que van a estar en contacto con alimentos que es de 1 mg/Kg, tanto de mercurio como de cadmio, pero hay que tener total cuidado con estos metales puesto que su bioacumulación es un problema muy grave y de total cuidado ambiental.
- ✓ Se determinó que la presencia de cadmio en termoformados, se debe a que este metal, se encuentra en la materia prima a partir de la cual son elaborados.
- ✓ La presencia de mercurio en las muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables, se debe a la presencia de este en la materia prima y a también a una posible contaminación durante el proceso de elaboración.

- ✓ Se observó que el estándar de mercurio y la muestra de termoformado diluidano son estables durante los días que se le realizó el seguimiento; la muestra de película flexible concentrada si muestra estabilidad en la absorbancia durante el seguimiento que se realizó; en cuanto a cadmio, los resultados mostraron que el estándar presentá estabilidad, así como el termoformado.
  
- ✓ La herramienta estadística utiliza como el SPSS en la cual vienen involucradas pruebas paramétricas como Shapiro-Wilk, Levene, Pearson, ANOVA (Análisis de Varianza) entre otras; permitieron, comprobar la confiabilidad en los resultados obtenidos mediante el análisis, concluyendo así que los datos arrojados con la utilización de este método son repetibles y reproducibles cuando se realizó la estandarización del método.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] SATYANARAYANAK.; Arizaga G.; Wypych F. Biodegradable composites based on lignocellulosic fibers—An overview. *Progress in Polymer Science*, vol 34, 2009, pág. 982–1021.
- [2] TUNJANO V.; Salcedo F.; Jiménez I.C.; Medina J.A.; Alvarez O.A.; Prieto E. Estudio de las propiedades térmicas y mecánicas del almidón termoplástico (tps) reforzado con nanoarcilla. Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 2009; pág. 29-36.
- [3] VILLADA, H. Acosta, H. Velasco, R. Investigación de Almidones Termoplásticos, Precursores de Productos Biodegradables. En: *Información Tecnológica*. 2008, vol. 19, no. 2, pág. 3-14.
- [4] CARVALHO C.; Chew E.; Hashemy S.; Lu J.; Holmgren A. Inhibition of the human thioredoxin system a molecular mechanism of mercury toxicity. *The journal of biological chemistry* vol. 283, no. 18, 2008, pág. 11913–11923.
- [5] NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-4096. Plásticos Plastificantes DOP y DOA Grado Alimento. Agosto 30 de 2006.
- [6] MERCHÁN J.; Ballesteros D.; Jiménez I.; Medina J.; Álvarez O. Estudio de la biodegradación aerobia de almidón termoplástico (TPS). Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 2009, S1, pág. 39-44.
- [7] SIRACUSA V.; Rocculi P.; Romani S. y Rosa M. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, vol.19, 2008, pág. 634-643.
- [8] PACHENCE J.; Bohrer M. y Kohn J. Biodegradable Polymers. Chapter twenty-three.
- [9] CATALÁN R.; Neira A.; Rivas B. Estudio de la copolimerización por injerto de acrilonitrilo en fibra celulósica secundaria. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, vol 47, 2002, No 1.
- [10] LUDUEÑA L. Compuestos basados en policaprolactona y fibras naturales: efecto del tamaño y contenido de refuerzo 3er. Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, Concepción del Uruguay, 12-13 de agosto 2010.
- [11] RUIZ G. Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Ingeniería y Ciencia*. Vol.2 N0. 004. Universidad EAFIT. Medellín – Colombia. 2006.

- [12] BONILLA A. Estudio de la viabilidad técnica para la obtención de adhesivos a partir de harina refinada extraída en forma artesanal e industrial, evaluando tres variedades de yuca. Universidad de San Buenaventura. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Santiago de Calí 2002.
- [13] CEBALLOS H.; De la Cruz G. Toxonomía y morfología de la yuca, capítulo 2 parte A. tomado de [http://www.clayuca.org/PDF/libro\\_yuca/capitulo02.pdf](http://www.clayuca.org/PDF/libro_yuca/capitulo02.pdf), 22 de Octubre 2010.
- [14] MARTINS I.; Magina S; Oliveira L.; Freire C.; Silvestre A.; Neto C. y Gandini A. New biocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose. *Composites Science and Technology*, vol. 69, , 2009, pág. 2163–2168.
- [15] RODRÍGUEZ E.; Fernández A.; Alcalá L.; Ospina B. Reología de suspensiones preparadas con harina precocida de yuca. *Ingeniería y Desarrollo*. No. 19. 2006.
- [16] REHM B. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 10, 2010, pág. 1-15
- [17] NOLAN-ITU Pty Ltd. Biodegradable Plastics – Developments and Environmental Impacts. *Environment Australia*, 2002, Australia, pág. 3-10.
- [18] RAHMANZZ M.; Brazel C. Ionic liquids: New generation stable plasticizers for poly(vinyl chloride). *Polymer Degradation and Stability*, vol. 91, 2006, pág. 3371-3382.
- [19] GRAEME, K. Pollack, C. Heavy metal toxicity, part II: lead and metal fume fever. En: *The Journal of Emergency Medicine*. 1998, vol.16, no. 2, pág. 171-177.
- [20] ACOSTA, H. Samuel, H., *et al.* Efecto de las variables de operación de un extrusor de uso Sencillo sobre las propiedades mecánicas de almidón Termoplástico hecho de almidón agrio de yuca. En: *Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2004, vol. 2, no. 1, pág. 18-26.
- [21] MÜLLER, C. Yamashita, F. Laurindo, J. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. En: *Carbohydrate Polymers*. 2008, vol. 72, pág. 82-87.
- [22] SERRANO E.; García L.y Fraile M. Alternativas a los ftalatos en adhesivos y tintas círculo de innovación en materiales, tecnología aeroespacial y nanotecnología parque científico de la universidad carlos iii de madrid leganés tecnológico. *Informe de vigilancia tecnológica*, 2008.
- [23] WAMBUA, P. Ivens, J. Verpoest, I. Natural fibres: can they replace glass in fibre reinforced plastics. En: *Composites Science and Technology*. 2003, vol. 63, pág. 1259-1264.

**[24]**MORALES R.; CANDAL M. Diseño y fabricación de un molde de termoformado utilizando herramientas CAD/CAE. Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela. ISSN 0798-4065 vol.2, 2006.

**[25]**FUNKE, U., BERGTHALLER, W. and LINDHAUER, W. Processing and characterization of biodegradable products based on starch. Polymer Degradation and Stability, pág. 59, 293–296, 1998.

**[26]** VELAZQUEZ G. Efecto de la humedad y la temperatura sobre Las propiedades mecánicas y de transporte de películas flexibles. Universidad Autónoma de Queretaro Facultad de Química . México 2000.

**[27]** ALVARO, T. Morgana, B. Marcia, M. Goreti, R. Welz, B. Determination of cadmium and lead in plastic material from waste electronic equipment using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. Microchemical Journal, vol. 96, 2010, págs. 102-107.

**[28]** HARRIS D. Analisis Químico Cuantitativo. Tercera edición. Grupo Editorial Iberoamérica. Mexico, págs. 579-585.

**[29]** SKOOG D.; Holler F.; Nieman T. Principios de Análisis Instrumenta. Quinta edición. McGraw-Hill. Madrid, págs. 215, 220-225.

**[30]** RESANO M.; Briceño J.; Belarra M. Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry a comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation. Spectrochimica Acta Part B, vol. 64, 2009, pág. 520–529.

**[31]** BENTLIN, F. Pozebon, D. Mello, P. Flores, E. Determination of trace elements in paints by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. En: Analytica Chimica Acta. 2007, vol. 602, pág. 23–31.

**[32]**CERVENY V.; Rychlovsky P.; Netolicka J.; Síma J. Electrochemical generation of mercury cold vapor and its in-situ trapping In gold-covered graphite tube atomizers. Spectrochimica Acta Part B, vol. 62, 2007, págs. 317-323.

**[33]** ISHIWATA H.; Sugita T.; Takeda M. Food hygienic indexes on biodegradable polymers. En: Eisei Shikenjo Hokoku. 1992, vol. 110, pág. 80-83

**[34]**MARTINIS E., Olsina R., Altamirano J., Wuilloud R. Determinación de cadmio en materiales poliméricos de envases alimentarios: desarrollo analítico empleando Líquidos iónicos a temperatura ambiente. CONAMET/SAM, 2008

**[35]** SANCHES, M. VILANOVA, E. Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Editorial Diaz de Santos. 2004. España, pág. 12-13

[36] VALCÁRCEL, M. Técnicas analíticas de separación. Reverté. 1988. Barcelona. pág. 164-165.

[37] VÍLCHEZ, R. Eliminación de metales pesados de aguas subterráneas mediante sistemas de lechos sumergidos: Estudio microbiológico de las biopelículas. Tesis Doctoral. España: Universidad de Granada. 2005, pág. 1-7, 28.

[38] NÚÑEZ, A. Martínez, S. Moreno, S. Cárdenas, M. García, G. Hernández, J. Rodríguez, A. Castillo, I. Determinación de metales pesados (aluminio, plomo, cadmio y níquel) en rábano (*Raphanus sativus L.*), brócoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) y calabacín (*Cucurbita pepo L. var. italica*). Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México. 2008, pág. 1-5.

[39] MORTON O. Contenido de metales pesados en suelos superficiales en la ciudad de México. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 9. No. 001. Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.

[40] SARDANS J.; Montes F.; Peñuelas J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry Spectrochimica Acta Part B, vol. 65, 2010, pág. 97–112.

[41] RUBIO C. Ingesta dietética de contaminantes metálicos (Hg, Pb, Cd, Fe, Cu, Zn y Mn) en la Comunidad Autónoma Canaria. Evaluación toxicológica. Universidad de la Laguna.

[42] MORALES I. y Reyes R. Mercurio y salud en la odontología Rev Saúde Pública vol. 37(2), 2003, págs. 266-272. Venezuela.

[43] RESANO M.; Briceño J.; Belarra M. Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry a comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation. Spectrochimica Acta Part B, vol. 64, 2009, pág. 520–529.

[44] HURTADO, G. Determinación de mercurio total en Hígado y musculo de tiburones Provenientes de las pesquerías de Sonora y Sinaloa, México. (Tesis de Maestría). Universidad de Sonora. México. 2010., págs. 1-17.

[45] PROTOCOLO DE ESTANDARIZACION DE METODOS ANALITICOS. Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios ambientales. Bogotá noviembre 1999.

[46]. CURRIE, LL. Nomenclature in evaluation of Analytical methods including detection and quantification capabilities, IUPAC 1995.

[47] GONZÁLES G., TRATAMIENTO DE DATOS SPSS. Universidad de Vigo; pág. 15-71

[48] CORREA J., ROJAS L. Estudio de Potencia de Pruebas de Homogeneidad de Varianza. Revista Colombiana de Estadística. Junio 2006 Volumen 29. pág. 57-76.



**[49]** MILLER J. y MILLER J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Comparación de dos medias experimentales. 4a edición. España. Prentice Hall. 2000. pág. 45 – 47.

**[50]** SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, Version 12.

**[51]**BLAUDBRAND Aparatos volumétricos y picnómetros, con certificado de conformidad; ISO 9001-14001; Instrucciones de Calibrado (SOP).

**[52]**INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración: NTC/ISO/IEC 17025. Santafé de Bogotá D.C.: ICONTEC, 2005, pág. 16-17.

**[53]** CHA, J. Chung, D. Seib, P. Flores, R. Hanna, M. Physical properties of starch-based foams as affected by extrusion temperature and moisture content. En: Industrial Crops and Products. 2001, vol, 14, issue, 1, pág. 23-30.

**[54]** GUNARATNE, A. Hoover, R. Effect of heat moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. En: Carbohydrate Polymers. 2002, vol. 49, issue. 4, pág. 425-437.

**[55]** TÄBI, T. The analysis of processing and usage of injection moulded biodegradable polymers made of starch and poly(lactic acid). Tesis Doctoral. Budapest: Budapest University of Technology and Economics, Departamento de Ingeniería de Polímeros, 2010, pág. 3, 10.

**[56]** ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Determination of moisture content. En: Official Methods of Analysis. AOAC 950.43. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

**[57]**HERNANDEZ E. Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de elementos traza por espectroscopía de absorción atómica. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. 2004.

**[58]** MANUAL DE FITOPROTECCION Y ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS (Cultivo de yuca). Fundación Chemonics Colombia. Octubre de 2003.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Verificación de la calibración del material de vidrio

El control gravimétrico de aparatos volumétricos está descrito en la norma DIN EN ISO 4787 donde también está indicada la fórmula general de cálculo siguiente:

$$V_{20} = (W_2 - W_1) \left( \frac{1}{\rho_W - \rho_L} \right) \left( 1 - \frac{\rho_L}{\rho_G} \right) (1 - \alpha(t - 20^\circ C))$$

Tomando en cuenta la aplicación tan complicada de esta fórmula y el gran número de tablas necesarias, el cálculo ha sido simplificado para la introducir el factor "Z".

$$V_{20} = (W_2 - W_1)Z$$

Donde:

$V_{20}$  [mL]: Volumen del aparato de medida a 20°C

$W_1$  [g]: Valor obtenido de la pesada del aparato de medida sin carga

$W_2$  [g]: Valor obtenido de la pesada del aparato de medida lleno

Z [ml/g]: Factor de los parámetros de control resumidos (tabla 1, del presente anexo)

En donde el factor "Z" contiene los parámetros siguientes:

- ✓ Masa específica del peso de ajuste de la balanza ( $\rho_G$ ): 8,0 g/mL
- ✓ Densidad atmosférica en función de la presión del aire, de la temperatura y de una humedad relativa del aire del 40 - 90% ( $\rho_L$ ): Para todos los aparatos volumétricos (a excepción de los matraces aforados > 250 mL), la influencia de la presión atmosférica es relativamente reducida con respecto a los límites de error dados.
- ✓ Densidad del agua en función de la temperatura ( $\rho_W$ ).
- ✓ Coeficiente de expansión del aparato volumétrico en función del material, en nuestro trabajo los balones volumétricos (Schott, Duran y Pyrex) fueron fabricados con vidrio borosilicato 3.3.

**Vidrio borosilicato 3.3 (SCHOTT, DURAN, PYREX)**  $y = 9,9 \times 10^{-5} 1/^\circ C$

Vidrio de soda (Vidrio AR-Glas)

$$y = 27 \times 10^{-5} 1/^\circ C$$

Plástico (PP)

$$y = 450 \times 10^{-5} 1/^\circ C$$

Plástico (PMP)

$$y = 351 \times 10^{-5} 1/^\circ C$$

Plástico (PFA)

$$y = 330 \times 10^{-5} 1/^\circ C$$

### CÁLCULO DEL VOLUMEN $V_{20}$

A continuación, se muestra un ejemplo representativo para calcular el volumen verdadero  $V_{20}$ , para el triplicado del balón aforado 1 de 10 mL (Duran), con un límite de error <0,015 (reportado en el balón). Es de tener en cuenta que la presión atmosférica de Popayán es de 1017,6 hPa y por tanto, ésta se ubica dentro de la gama de presión atmosférica media y los valores del factor Z serían:

$$Z_{22^\circ C, DURAN} = 1,00323 \text{ mL/g} \text{ y } Z_{24^\circ C, DURAN} = 1,00371 \text{ mL/g}$$

Peso del balón aforado:  $W_1 = 15,3688 \text{ g}, 15,3689 \text{ g}, 15,3815 \text{ g}.$

Peso del balón aforado con carga ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $W_2 = 25,3521 \text{ g}, 25,3538 \text{ g}, 25,3488 \text{ g}.$

$$V_{20} = (W_2 - W_1) \cdot Z = (25,3521 \text{ g} - 15,3688 \text{ g}) \cdot \frac{1,00323 \text{ mL}}{\text{g}} = 10,0156 \text{ mL}$$

$$V_{20} = (W_2 - W_1) \cdot Z = (25,3538 \text{ g} - 15,3689 \text{ g}) \cdot \frac{1,00371 \text{ mL}}{\text{g}} = 10,0219 \text{ mL}$$

$$V_{20} = (W_2 - W_1) \cdot Z = (25,3488 \text{ g} - 15,3815 \text{ g}) \cdot \frac{1,00371 \text{ mL}}{\text{g}} = 10,0043 \text{ mL}$$

El promedio de  $V_{20} = 10,0139 \text{ mL}$ ; ahora se tiene:

$$\begin{aligned} 1) (10,0139 \text{ mL} - 10,0156 \text{ mL}) \cdot \frac{1}{4} &= 4,30 \times 10^{-4} \\ 2) (10,0139 \text{ mL} - 10,0219 \text{ mL}) \cdot \frac{1}{4} &= 2,00 \times 10^{-3} \\ 3) (10,0139 \text{ mL} - 10,0043 \text{ mL}) \cdot \frac{1}{4} &= 2,40 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

Así que,  $4,30 \times 10^{-4}$ ,  $2,00 \times 10^{-3}$ ,  $2,40 \times 10^{-3}$  son  $< 0,015$

**Tabla1.** Factor "Z" [mL/g] para el control de materiales volumétricos.

Temperatura de Control (°C)	Gama de presión atmosférica inferior 980 a 1000 hPa		Gama de presión atmosférica media 1000 a 1020 hPa		Gama de presión atmosférica superior 1020 a 1040 hPa	
	material: vidrio					
	Vidrio de Borosilicato	Vidrio de soda	Vidrio de Borosilicato	Vidrio de soda	Vidrio de Borosilicato	Vidrio de soda
Z (mL/g)						
15,0	1,00200	1,00208	1,00202	1,00211	1,00204	1,00213
15,5	1,00207	1,00215	1,00209	1,00217	1,00211	1,00219
16,0	1,00214	1,00221	1,00216	1,00223	1,00218	1,00225
16,5	1,00222	1,00228	1,00224	1,0023	1,00226	1,00232
17,0	1,00230	1,00235	1,00232	1,00237	1,00234	1,00239
17,5	1,00238	1,00242	1,00240	1,00245	1,00242	1,00247
18,0	1,00246	1,00250	1,00248	1,00252	1,00251	1,00254
18,5	1,00255	1,00258	1,00257	1,00260	1,00260	1,00262
19,0	1,00264	1,00266	1,00266	1,00268	1,00268	1,0027
19,5	1,00274	1,00275	1,00276	1,00277	1,00278	1,00279
20,0	1,00283	1,00283	1,00285	1,00285	1,00287	1,00287
20,5	1,00293	1,00292	1,00295	1,00294	1,00297	1,00296
21,0	1,00303	1,00301	1,00305	1,00303	1,00307	1,00305
21,5	1,00313	1,00311	1,00316	1,00313	1,00318	1,00315
22,0	1,00321	1,00318	1,00323	1,00320	1,00325	1,00322
22,5	1,00335	1,00331	1,00337	1,00333	1,00339	1,00335
23,0	1,00346	1,00341	1,00348	1,00343	1,00350	1,00345
23,5	1,00358	1,00352	1,0036	1,00354	1,00362	1,00356
24,0	1,00369	1,00362	1,00371	1,00364	1,00373	1,00366
24,5	1,00381	1,00373	1,00383	1,00375	1,00385	1,00377
25,0	1,00393	1,00384	1,00395	1,00386	1,00397	1,00389
25,5	1,00405	1,00396	1,00408	1,00398	1,00410	1,00400
26,0	1,00418	1,00408	1,00420	1,00410	1,00422	1,00412
26,5	1,00431	1,00420	1,00433	1,00422	1,00435	1,00424
27,0	1,00444	1,00432	1,00446	1,00434	1,00448	1,00436
27,5	1,00457	1,00444	1,00459	1,00447	1,00461	1,00449
28,0	1,00471	1,00457	1,00473	1,00459	1,00475	1,00461
28,5	1,00485	1,00470	1,00487	1,00472	1,00489	1,00474
29,0	1,00499	1,00483	1,00501	1,00485	1,00503	1,00487
29,5	1,00513	1,00497	1,00515	1,00499	1,00517	1,00501
30,0	1,00527	1,00510	1,00529	1,00512	1,00531	1,00514

**Tabla 2.** Calibración del balón de 5mL.

Balón 5 mL	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	T Agua (°C)	Factor Z	(W <sub>2</sub> -W <sub>1</sub> )*Z	Promedio	s	CV (%)	Prueba (1/4)	Resultado <0,0040
1	13,5031	18,4986	23	1,00348	5,0129	5,0125	0,0028	0,06	0,0004	1,00x10 <sup>-04</sup>
	13,5031	18,5008	23	1,00348	5,0151				0,0026	6,50x10 <sup>-04</sup>
	13,5033	18,4955	23	1,00348	5,0096				0,0029	7,30x10 <sup>-04</sup>
2	13,512	18,5019	23	1,00348	5,0073	5,0090	0,0019	0,04	0,0017	4,30x10 <sup>-04</sup>
	13,5119	18,5031	23	1,00348	5,0086				0,0004	1,00x10 <sup>-04</sup>
	13,5121	18,5057	23	1,00348	5,0111				0,0021	5,30x10 <sup>-04</sup>
3	13,7243	18,7023	23	1,00348	4,9953	4,9965	0,0046	0,09	0,0012	3,00x10 <sup>-04</sup>
	13,7245	18,7087	23	1,00348	5,0016				0,0051	1,28x10 <sup>-03</sup>
	13,7275	18,7029	23	1,00348	4,9927				0,0038	9,50x10 <sup>-04</sup>
4	13,4087	18,4021	23	1,00348	5,0108	5,0045	0,0055	0,11	0,0063	1,58x10 <sup>-03</sup>
	13,4087	18,3920	23	1,00348	5,0006				0,0039	9,80x10 <sup>-04</sup>
	13,4087	18,3936	23	1,00348	5,0022				0,0023	5,80x10 <sup>-04</sup>
5	12,8304	17,8096	23	1,00348	4,9965	5,0039	0,0072	0,14	0,0074	1,85x10 <sup>-03</sup>
	12,8305	17,8240	23	1,00348	5,0109				0,0070	1,75x10 <sup>-03</sup>
	12,8304	17,8173	23	1,00348	5,0042				0,0003	8,00x10 <sup>-05</sup>
6	13,443	18,4282	23	1,00348	5,0026	5,0053	0,0033	0,07	0,0027	6,80x10 <sup>-04</sup>
	13,444	18,4356	23	1,00348	5,0090				0,0037	9,30x10 <sup>-04</sup>
	13,4438	18,4307	23	1,00348	5,0043				0,0010	2,50x10 <sup>-04</sup>
7	14,3999	19,3872	23	1,00348	5,0047	5,0012	0,0032	0,06	0,0035	8,80x10 <sup>-04</sup>
	14,4001	19,3812	23	1,00348	4,9984				0,0028	7,00x10 <sup>-04</sup>
	14,4001	19,3833	23	1,00348	5,0005				0,0007	1,80x10 <sup>-04</sup>
8	13,2606	18,2319	23	1,00348	4,9886	4,9942	0,0050	0,10	0,0056	1,40x10 <sup>-03</sup>
	13,2607	18,2414	23	1,00348	4,9980				0,0038	9,50x10 <sup>-04</sup>
	13,2615	18,2403	23	1,00348	4,9961				0,0019	4,80x10 <sup>-04</sup>
9	13,6523	18,6496	23	1,00348	5,0147	5,0102	0,0050	0,10	0,0045	1,13x10 <sup>-03</sup>
	13,6558	18,6495	23	1,00348	5,0111				0,0009	2,30x10 <sup>-04</sup>
	13,6548	18,6423	23	1,00348	5,0049				0,0053	1,33x10 <sup>-03</sup>
10	13,0497	18,0266	23	1,00348	4,9942	4,9939	0,0010	0,02	0,0003	8,00x10 <sup>-05</sup>
	13,0498	18,0273	23	1,00348	4,9948				0,0009	2,30x10 <sup>-04</sup>
	13,0522	18,0277	23	1,00348	4,9928				0,0011	2,80x10 <sup>-04</sup>

**Tabla 3.** Calibración balones de 10 mL.

Balón 10 mL	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	T Agua (°C)	Factor Z	(W <sub>2</sub> -W <sub>1</sub> )*Z	Promedio	s	CV (%)	Prueba (1/4)	Resultado <0,015
1	15,3688	25,3521	22	1,00323	10,0156	10,0139	0,0089	0,09	0,0017	4,30x10 <sup>-04</sup>
	15,3689	25,3538	24	1,00371	10,0219				0,0080	2,00x10 <sup>-03</sup>
	15,3815	25,3488	24	1,00371	10,0043				0,0096	2,40x10 <sup>-03</sup>
2	16,0987	26,0681	22	1,00323	10,0016	10,0112	0,0085	0,09	0,0096	2,40x10 <sup>-03</sup>
	16,1015	26,0823	24	1,00371	10,0178				0,0066	1,65x10 <sup>-03</sup>
	16,1052	26,0825	24	1,00371	10,0143				0,0031	7,80x10 <sup>-04</sup>
3	15,7398	25,7104	22	1,00323	10,0028	10,0100	0,0070	0,07	0,0072	1,80x10 <sup>-03</sup>
	15,7399	25,7132	24	1,00371	10,0103				0,0003	8,00x10 <sup>-05</sup>
	15,7399	25,7197	24	1,00371	10,0168				0,0068	1,70x10 <sup>-03</sup>
4	15,4984	25,4580	22	1,00323	9,9918	9,9931	0,0093	0,09	0,0013	3,30x10 <sup>-04</sup>
	15,5036	25,4696	24	1,00371	10,0030				0,0099	2,48x10 <sup>-03</sup>
	15,5033	25,4510	24	1,00371	9,9846				0,0085	2,13x10 <sup>-03</sup>
5	16,0543	26,0344	22	1,00323	10,0123	10,0072	0,0088	0,09	0,0051	1,28x10 <sup>-03</sup>
	16,0546	26,0298	24	1,00371	10,0122				0,0050	1,25x10 <sup>-03</sup>
	16,0569	26,0170	24	1,00371	9,9970				0,0102	2,55x10 <sup>-03</sup>
6	15,6541	25,6166	22	1,00323	9,9947	9,9987	0,0035	0,04	0,0040	1,00x10 <sup>-03</sup>
	15,6544	25,6187	24	1,00371	10,0013				0,0026	6,50x10 <sup>-04</sup>
	15,6573	25,6203	24	1,00371	10,0000				0,0013	3,30x10 <sup>-04</sup>
7	15,2244	25,1840	22	1,00323	9,9918	10,0001	0,0147	0,15	0,0083	2,08x10 <sup>-03</sup>
	15,2245	25,2046	24	1,00371	10,0171				0,0170	4,25x10 <sup>-03</sup>
	15,2248	25,1793	24	1,00371	9,9914				0,0087	2,18x10 <sup>-03</sup>
8	15,1529	25,1134	22	1,00323	9,9927	10,0002	0,0065	0,07	0,0075	1,88x10 <sup>-03</sup>
	15,1531	25,1206	24	1,00371	10,0045				0,0043	1,08x10 <sup>-03</sup>
	15,1537	25,1202	24	1,00371	10,0035				0,0033	8,30x10 <sup>-04</sup>
9	15,4791	25,4347	22	1,00323	9,9878	9,9995	0,0101	0,10	0,0117	2,93x10 <sup>-03</sup>
	15,4800	25,4489	24	1,00371	10,0059				0,0064	1,60x10 <sup>-03</sup>
	15,4822	25,4499	24	1,00371	10,0047				0,0052	1,30x10 <sup>-03</sup>
10	15,9391	25,9022	22	1,00323	9,9953	10,0026	0,0076	0,08	0,0073	1,83x10 <sup>-03</sup>
	15,9452	25,9186	24	1,00371	10,0104				0,0078	1,95x10 <sup>-03</sup>
	15,9449	25,9100	24	1,00371	10,0021				0,0005	1,30x10 <sup>-04</sup>

**Tabla 4** Calibración de balón de 50 mL.

Balón 50 mL	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	T Agua (°C)	Factor Z	(W <sub>2</sub> -W <sub>1</sub> )*Z	Promedio	s	CV (%)	Prueba (1/4)	Resultado <0,0225
1	43,5764	93,3400	22	1,00323	49,9243	49,9677	0,0377	0,08	0,0434	1,09x10 <sup>-02</sup>
	43,5759	93,3823	24	1,00371	49,9912				0,0235	5,88x10 <sup>-03</sup>
	43,5890	93,3919	24	1,00371	49,9877				0,0200	5,00x10 <sup>-03</sup>

**Tabla 5.** Calibración de balones de 100 mL.

Balón 100 mL	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	T Agua (°C)	Factor Z	(W <sub>2</sub> -W <sub>1</sub> )*Z	Promedio	s	CV (%)	Prueba (1/4)	Resultado <0,0375
1	59,5555	159,1109	23	1,00348	99,9019	99,8876	0,0179	0,02	0,0143	0,0036
	59,5556	159,1026	23	1,00348	99,8934				0,0058	0,0014
	59,5545	159,0758	23	1,00348	99,8676				0,0200	0,005
2	59,6967	159,3019	23	1,00348	99,9518	99,9009	0,0455	0,05	0,0509	0,0127
	59,6974	159,2376	23	1,00348	99,8866				0,0143	0,0036
	59,6971	159,2151	23	1,00348	99,8643				0,0366	0,0092
3	59,3370	158,9060	23	1,00348	99,9155	99,9028	0,011	0,01	0,0127	0,0032
	59,3388	158,8899	23	1,00348	99,8975				0,0053	0,0013
	59,3378	158,8868	23	1,00348	99,8954				0,0074	0,0019

## ANEXO 2. Humedad de las muestras de termoformados y películas flexibles

**Tabla 1.** Porcentajes de humedad, desviación estándar y coeficiente de variación en muestras de termoformados biodegradables.

#	Termoformado	Muestra húmeda (g)	Muestra seca (g)	Humedad (%)	Humedad (%) $\pm$ s	CV (%)
1	MBRA 383	13,1187	12,4026	5,4586	5,41 $\pm$ 0,07	0,72
2		13,0797	12,3747	5,3900		
3		14,2341	13,4667	5,3913		
1	MPER 183	12,7125	12,0526	5,1910	5,20 $\pm$ 0,03	0,40
2		12,2426	11,6086	5,1786		
3		11,7612	11,1474	5,2189		
1	CM 4574-7	17,9698	17,0057	5,3651	5,53 $\pm$ 0,31	3,36
2		17,1568	16,1732	5,7330		
3		20,1601	19,0513	5,5000		
1	CM 523-7	17,2602	16,3341	5,3655	5,31 $\pm$ 0,12	1,31
2		17,3667	16,4392	5,3407		
3		17,0399	16,1479	5,2348		
1	CM 7951-5	12,2355	11,5321	5,7488	5,80 $\pm$ 0,09	0,89
2		12,3804	11,6640	5,7866		
3		15,7802	14,8569	5,8510		
1	NATAIMA 31	16,6909	16,0654	3,7476	3,71 $\pm$ 0,07	1,04
2		16,7457	16,1236	3,7150		
3		15,7855	15,2061	3,6705		
1	HMC 1	18,1780	17,4211	4,1638	4,07 $\pm$ 0,23	3,37
2		18,0128	17,3077	3,9144		
3		15,5062	14,8646	4,1377		

**Tabla 2.** Porcentajes de humedad, desviación estándar y coeficiente de variación en muestras de películas flexibles biodegradables.

#	Película Flexible	Muestra húmeda (g)	Muestra seca (g)	Humedad (%)	Humedad (%) $\pm$ s	CV (%)
1	SM 707-17 NATIVO	4,0032	3,6468	8,9029	8,94 $\pm$ 0,30	1,96
2		4,0052	3,6394	9,1331		
3		4,0034	3,6515	8,7900		
1	SM 707-17 HIDROLIZADO	4,0029	3,6900	7,8168	7,81 $\pm$ 0,02	0,18
2		4,0018	3,6899	7,7940		
3		4,0024	3,6894	7,8203		
1	CM 7138-7 NATIVO	4,0018	3,6290	9,3158	9,39 $\pm$ 0,13	0,82
2		4,0043	3,6252	9,4673		
3		4,0021	3,6270	9,3726		
1	CM 7138-7 HIDROLIZADO	4,0032	3,6656	8,4332	8,51 $\pm$ 0,16	1,08
2		4,0029	3,6583	8,6088		
3		4,0063	3,6668	8,4742		
1	SM 1498-4 NATIVO	4,0043	3,6663	8,4409	8,34 $\pm$ 0,15	1,06
2		4,0047	3,6736	8,2678		
3		4,0050	3,6718	8,3196		
1	SM 1498-4 HIDROLIZADO	4,0037	3,5830	10,5078	10,35 $\pm$ 0,25	1,42
2		4,0018	3,5888	10,3204		
3		4,0023	3,5933	10,2191		



### ANEXO 3. Optimización del proceso de digestión ácida con reflujo.

**Tabla 1.** Concentración de mercurio obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:0, a diferentes pesos, temperaturas y tiempos de digestión.

Relación de Ácidos	Ensayo	Peso	T (°C)	t (min)	Digestión		Concentración (µg Hg/L)	CV (%)
					Si	No		
1:0	1	0,5000	35	60		X	-----	-----
	2	0,5000	50	60		X	-----	-----
	3	0,5000	70	60		X	-----	-----
	4	0,5000	35	120		X	-----	-----
	5	0,5000	50	120		X	-----	-----
	6	0,5000	70	120	X		N.D	-----
	7	0,5000	35	180		X	-----	-----
	8	0,5000	50	180	X		N.D	-----
	9	0,5000	70	180	X		N.D	-----
	10	1,0000	35	60		X	-----	-----
	11	1,0000	50	60		X	-----	-----
	12	1,0000	70	60		X	-----	-----
	13	1,0000	35	120		X	-----	-----
	14	1,0000	50	120		X	-----	-----
	15	1,0000	70	120		X	-----	-----
	16	1,0000	35	180	X		N.D	-----
	17	1,0000	50	180	X		N.D	-----
	18	1,0000	70	180	X		N.D	-----
	19	2,0000	35	60		X	-----	-----
	20	2,0000	50	60		X	-----	-----
	21	2,0000	70	60		X	-----	-----
	22	2,0000	35	120		X	-----	-----
	23	2,0000	50	120		X	-----	-----
	24	2,0000	70	120		X	-----	-----
	25	2,0000	35	180		X	-----	-----
	26	2,0000	50	180		X	-----	-----
	27	2,0000	70	180		X	-----	-----

**Tabla 2.** Concentración de mercurio obtenida para la digestión ácida con reflujó del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:1, a diferentes pesos, temperaturas y tiempos de digestión.

Relación de Ácidos	Ensayo	Peso	T (°C)	t (min)	Digestión		Concentración (µg Hg/L)	CV (%)
					Si	No		
1:1	1	0,5000	35	60		X	-----	-----
	2	0,5000	50	60		X	-----	-----
	3	0,5000	70	60		X	-----	-----
	4	0,5000	35	120		X	-----	-----
	5	0,5000	50	120		X	-----	-----
	6	0,5000	70	120	X		N.D	-----
	7	0,5000	35	180	X		N.D	-----
	8	0,5000	50	180	X		N.D	-----
	9	0,5000	70	180	X		N.D	-----
	10	1,0000	35	60		X	-----	-----
	11	1,0000	50	60		X	-----	-----
	12	1,0000	70	60		X	-----	-----
	13	1,0000	35	120		X	-----	-----
	14	1,0000	50	120		X	-----	-----
	15	1,0000	70	120		X	-----	-----
	16	1,0000	35	180	X		N.D	-----
	17	1,0000	50	180	X		N.D	-----
	18	1,0000	70	180	X		1,50	8,0
	19	2,0000	35	60		X	-----	-----
	20	2,0000	50	60		X	-----	-----
	21	2,0000	70	60		X	-----	-----
	22	2,0000	35	120		X	-----	-----
	23	2,0000	50	120		X	-----	-----
	24	2,0000	70	120		X	-----	-----
	25	2,0000	35	180		X	-----	-----
	26	2,0000	50	180		X	-----	-----
	27	2,0000	70	180		X	-----	-----

**Tabla 3.** Concentración de mercurio obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:3, a diferentes pesos, temperaturas y tiempos de digestión.

Relación de Ácidos	Ensayo	Peso	T (°C)	t (min)	Digestión		Concentración (µg Hg/L)	CV (%)
					Si	No		
1:3	1	0,5000	35	60		X	-----	-----
	2	0,5000	50	60		X	-----	-----
	3	0,5000	70	60		X	-----	-----
	4	0,5000	35	120		X	-----	-----
	5	0,5000	50	120		X	-----	-----
	6	0,5000	70	120		X	-----	-----
	7	0,5000	35	180		X	-----	-----
	8	0,5000	50	180	X		N.D	-----
	9	0,5000	70	180	X		N.D	-----
	10	1,0000	35	60		X	-----	-----
	11	1,0000	50	60		X	-----	-----
	12	1,0000	70	60		X	-----	-----
	13	1,0000	35	120		X	-----	-----
	14	1,0000	50	120		X	-----	-----
	15	1,0000	70	120		X	-----	-----
	16	1,0000	35	180			-----	-----
	17	1,0000	50	180	X		N.D	-----
	18	1,0000	70	180	X		1,65	9,0
	19	2,0000	35	60		X	-----	-----
	20	2,0000	50	60		X	-----	-----
	21	2,0000	70	60		X	-----	-----
	22	2,0000	35	120		X	-----	-----
	23	2,0000	50	120		X	-----	-----
	24	2,0000	70	120		X	-----	-----
	25	2,0000	35	180		X	-----	-----
	26	2,0000	50	180		X	-----	-----
	27	2,0000	70	180		X	-----	-----

**Tabla 4.** Concentración de mercurio obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 3:1, a diferentes pesos, temperaturas y tiempos de digestión.

Relación de Ácidos	Ensayo	Peso	T (°C)	t (min)	Digestión		Concentración (µg Hg/L)	CV (%)
					Si	No		
3:1	1	0,5000	35	60		X	-----	-----
	2	0,5000	50	60		X	-----	-----
	3	0,5000	70	60		X	-----	-----
	4	0,5000	35	120		X	-----	-----
	5	0,5000	50	120		X	-----	-----
	6	0,5000	70	120	X		N.D	-----
	7	0,5000	35	180		X	-----	-----
	8	0,5000	50	180	X		N.D	-----
	9	0,5000	70	180	X		N.D	-----
	10	1,0000	35	60		X	-----	-----
	11	1,0000	50	60		X	-----	-----
	12	1,0000	70	60		X	-----	-----
	13	1,0000	35	120		X	-----	-----
	14	1,0000	50	120		X	-----	-----
	15	1,0000	70	120	X		N.D	-----
	16	1,0000	35	180	X		N.D	-----
	17	1,0000	50	180	X		1,23	7
	18	1,0000	70	180	X		1,41	5,5
	19	2,0000	35	60		X	-----	-----
	20	2,0000	50	60		X	-----	-----
	21	2,0000	70	60		X	-----	-----
	22	2,0000	35	120		X	-----	-----
	23	2,0000	50	120		X	-----	-----
	24	2,0000	70	120		X	-----	-----
	25	2,0000	35	180		X	-----	-----
	26	2,0000	50	180		X	-----	-----
	27	2,0000	70	180		X	-----	-----

**Tabla 5.** Concentración de mercurio obtenida para la digestión ácida con reflujo de la película flexible SM 707-17 hidrolizado para la relación ácido nítrico:perclórico 3:1, a diferentes pesos, temperaturas y tiempos de digestión.

Relación de Ácidos	Ensayo	Peso	T (°C)	t (min)	Digestión		Concentración (µg Hg/L)	CV (%)
					Si	No		
3:1	1	0,5000	35	15		X	-----	-----
	2	0,5000	50	15		X	-----	-----
	3	0,5000	70	15		X	-----	-----
	4	0,5000	35	30		X	-----	-----
	5	0,5000	50	30		X	-----	-----
	6	0,5000	70	30		X	-----	-----
	7	0,5000	35	45	X		N.D	-----
	8	0,5000	50	45	X		N.D	-----
	9	0,5000	70	45	X		N.D	-----
	10	0,5000	35	60	X		N.D	-----
	11	0,5000	50	60	X		N.D	-----
	12	0,5000	70	60	X		N.D	-----
	13	0,5000	35	120	X		N.D	-----
	14	0,5000	50	120	X		N.D	-----
	15	0,5000	70	120	X		N.D	-----
	16	1,0000	35	15		X	-----	-----
	17	1,0000	50	15		X	-----	-----
	18	1,0000	70	15		X	-----	-----
	19	1,0000	35	30		X	-----	-----
	20	1,0000	50	30		X	-----	-----
	21	1,0000	70	30		X	-----	-----
	22	1,0000	35	45	X		3,380	13,6
	23	1,0000	50	45	X		6,390	1,7
	24	1,0000	70	45	X		2,202	22,1
	25	1,0000	35	60	X		3,102	9,2
	26	1,0000	50	60	X		4,300	8
	27	1,0000	70	60	X		2,800	9,5
	28	1,0000	35	120	X		2,126	3,6
	29	1,0000	50	120	X		3,557	7,1
	30	1,0000	70	120	X		1,840	12,8

#### ANEXO 4. Puesta a punto de la técnica analítica

✓ ESTABILIDAD DE LA LAMPARA DE CATODO HUECO DE CADMIO Y MERCURIO

**Tabla 1.** Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la normalidad y homogeneidad de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de cadmio.

Estándar ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	Tiempo (minutos)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
0,2	0	0,863	3	0,999	1,000	6	21	5,100
	30	0,840	3					
	60	0,895	3					
	90	0,849	3					
	120	0,630	3					
	150	0,945	3					
	180	0,945	3					
0,6	0	0,863	3	0,999	1,092	6	21	5,100
	30	0,848	3					
	60	0,729	3					
	90	0,895	3					
	120	0,971	3					
	150	0,963	3					
	180	0,849	3					
1,0	0	0,998	3	0,999	0,469	6	21	5,100
	30	0,971	3					
	60	0,827	3					
	90	0,945	3					
	120	0,895	3					
	150	0,827	3					
	180	0,945	3					

Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 3)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 6, 21)}$ , donde, K = 7 tiempos, N = 4 lecturas de la absorbancia

**Tabla 2.** Estadístico de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de cadmio.

Estándar ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	Estadístico	
	$\bar{x} \pm s$	CV (%)
1 (0,2)	$0,039 \pm 0,001$	3,5
2 (0,6)	$0,091 \pm 0,002$	1,9
3 (1,0)	$0,140 \pm 0,002$	1,1

**Tabla 3.** Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la normalidad y homogeneidad de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de mercurio.

Estándar ( $\mu\text{g Hg/L}$ )	Tiempo (minutos)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
4,0	0	0,960	5	0,986	0,864	6	35	5,900
	30	0,640	5					
	60	0,866	5					
	90	0,683	5					
	120	0,683	5					
	150	0,853	5					
	180	0,915	5					
8,0	0	0,903	5	0,986	1,300	6	35	5,900
	30	0,805	5					
	60	0,853	5					
	90	0,863	5					
	120	0,960	5					
	150	0,666	5					
	180	0,683	5					
12,0	0	0,683	5	0,986	0,854	6	35	5,900
	30	0,775	5					
	60	0,640	5					
	90	0,666	5					
	120	0,960	5					
	150	0,814	5					
	180	0,827	5					

Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 6)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 6, 35)}$ , donde, K = 7 tiempos, N = 6 lecturas de la absorbancia

**Tabla 4.** Estadístico de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de mercurio.

Estándar ( $\mu\text{g Hg/L}$ )	Estadístico	
	$\bar{x} \pm s$	CV (%)
1 (4,0)	0,023 $\pm$ 0,001	3,7
2 (8,0)	0,051 $\pm$ 0,001	2,9
3 (12,0)	0,075 $\pm$ 0,001	1,5

## ANEXO 5. Determinación de los parámetros de calidad

**Tabla 1.** Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración para la Repetibilidad de Cd.

Nivel ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	Curva	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	Wtabulado	Fcalculado	gl1	gl2	F tabulado
0,1	1	0,863	3	0,999	1,636	4	15	4,900
	2	0,729	3					
	3	0,630	3					
	4	0,729	3					
	5	0,729	3					
0,2	1	0,895	3	0,999	0,698	4	15	4,900
	2	0,729	3					
	3	0,630	3					
	4	0,945	3					
	5	0,630	3					
0,4	1	0,729	3	0,999	0,824	4	15	4,900
	2	0,863	3					
	3	0,863	3					
	4	0,849	3					
	5	0,895	3					
0,6	1	0,763	3	0,999	4,564	4	15	4,900
	2	0,849	3					
	3	0,863	3					
	4	0,827	3					
	5	0,916	3					
0,8	1	0,945	3	0,999	1,742	4	15	4,900
	2	0,982	3					
	3	0,946	3					
	4	0,911	3					
	5	0,827	3					
1,0	1	0,863	3	0,999	1,403	4	15	4,900
	2	0,945	3					
	3	0,945	3					
	4	0,963	3					
	5	0,773	3					

Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 3)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 4, 15)}$ , donde, K = 5 curvas de calibración, N = 4 lecturas de la absorbancia



**Tabla 2.** Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración para la Repetibilidad de Hg.

Nivel ( $\mu\text{g Hg/L}$ )	Curva	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	Gl	W-tabulado	F calculado	gl1	gl2	Ftabulado
2,0	1	----	5	0,986	1,25	4	25	5,100
	2	----	5					
	3	0,496	5					
	4	0,640	5					
	5	0,640	5					
4,0	1	0,640	5	0,986	1,563	4	25	5,100
	2	0,640	5					
	3	0,496	5					
	4	0,683	5					
	5	0,496	5					
8,0	1	0,775	5	0,986	4,063	4	25	5,100
	2	0,640	5					
	3	0,496	5					
	4	0,496	5					
	5	0,822	5					
12,0	1	0,702	5	0,986	4,003	4	25	5,100
	2	0,866	5					
	3	0,871	5					
	4	0,915	5					
	5	0,908	5					
14,0	1	0,822	5	0,986	2,467	4	25	5,100
	2	0,866	5					
	3	0,982	5					
	4	0,960	5					
	5	0,907	5					
16,0	1	0,908	5	0,986	1,018	4	25	5,100
	2	0,773	5					
	3	0,920	5					
	4	0,866	5					
	5	0,982	5					
18,0	1	0,767	5	0,986	0,566	4	25	5,100
	2	0,775	5					
	3	0,857	5					
	4	0,831	5					
	5	0,831	5					
20,0	1	0,866	5	0,986	0,948	4	25	5,100
	2	0,908	5					
	3	0,915	5					
	4	0,912	5					
	5	0,701	5					

----: absorbancia es una constante, por lo que se ha desestimado. Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 5)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K \cdot N) - K)} = F_{(0,05, 4, 25)}$ , donde, K = 5 curvas de calibración, N = 6 lecturas de la absorbancia

**Tabla 3.** Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración para la Precisión Intermedia para Cd.

Nivel ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
0,1	1	0,863	3	0,999	0,429	6	21	5,100
	2	0,945	3					
	3	0,945	3					
	4	0,729	3					
	5	0,863	3					
	6	0,729	3					
	7	0,863	3					
0,2	1	0,630	3	0,999	1,756	6	21	5,100
	2	0,791	3					
	3	0,945	3					
	4	0,630	3					
	5	0,993	3					
	6	0,630	3					
	7	0,895	3					
0,4	1	0,863	3	0,999	0,625	6	21	5,100
	2	0,945	3					
	3	0,863	3					
	4	0,729	3					
	5	0,863	3					
	6	0,971	3					
	7	0,729	3					
0,6	1	0,729	3	0,999	4,191	6	21	5,100
	2	0,895	3					
	3	0,945	3					
	4	0,911	3					
	5	0,827	3					
	6	0,811	3					
	7	0,827	3					

Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 3)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K \cdot N) - K)} = F_{(0,05, 6, 21)}$ , donde, K = 7 número de días, N = 4 lecturas de la absorbancia

**Tabla 3.** (Continuación).

Nivel ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
0,8	1	0,916	3	0,999	4,100	6	21	5,100
	2	0,729	3					
	3	0,863	3					
	4	0,971	3					
	5	0,863	3					
	6	0,827	3					
	7	0,827	3					
1,0	1	0,630	3	0,999	3,057	6	21	5,100
	2	0,973	3					
	3	0,863	3					
	4	0,998	3					
	5	0,887	3					
	6	0,773	3					
	7	0,863	3					

Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 3)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K \cdot N) - K)} = F_{(0,05, 6, 21)}$ , donde, K = 7 número de días, N = 4 lecturas de la absorbancia

**Tabla 4.** Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración para la Precisión Intermedia para Hg.

Nivel ( $\mu\text{g Hg/L}$ )	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
2,0	1	0,496	5	0,986	2,524	6	35	5,900
	2	0,496	5					
	3	0,683	5					
	4	0,683	5					
	5	0,701	5					
	6	0,496	5					
	7	0,683	5					
4,0	1	0,496	5	0,986	0,551	6	35	5,900
	2	0,640	5					
	3	0,683	5					
	4	0,640	5					
	5	0,827	5					
	6	0,640	5					
	7	0,640	5					
8,0	1	0,927	5	0,986	3,992	6	35	5,900
	2	0,915	5					
	3	0,827	5					
	4	0,908	5					
	5	0,907	5					
	6	0,683	5					
	7	0,822	5					
12,0	1	0,903	5	0,986	2,314	6	35	5,900
	2	0,866	5					
	3	0,827	5					
	4	0,853	5					
	5	0,866	5					
	6	0,866	5					
	7	0,866	5					

Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 5)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 6, 35)}$ , donde, K = 7 número de días, N = 6 lecturas de la absorbancia

**Tabla 4.**(Continuación).

Nivel ( $\mu\text{g Hg/L}$ )	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de varianzas (Levene)			
		Wcalculado	gl	Wtabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
14,0	1	0,805	5	0,986	0,676	6	35	5,900
	2	0,908	5					
	3	0,908	5					
	4	0,822	5					
	5	0,92	5					
	6	0,701	5					
	7	0,805	5					
16,0	1	0,916	5	0,986	0,352	6	35	5,900
	2	0,908	5					
	3	0,927	5					
	4	0,831	5					
	5	0,958	5					
	6	0,822	5					
	7	0,958	5					
18,0	1	0,915	5	0,986	0,967	6	35	5,900
	2	0,812	5					
	3	0,866	5					
	4	0,933	5					
	5	0,773	5					
	6	0,863	5					
	7	0,827	5					
20,0	1	0,684	5	0,986	1,984	6	35	5,900
	2	0,913	5					
	3	0,907	5					
	4	0,907	5					
	5	0,823	5					
	6	0,95	5					
	7	0,866	5					

Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 5)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 6, 35)}$ , donde, K = 7 número de días, N = 6 lecturas de la absorbancia

**Anexo 6. Determinación de la estabilidad de los metales.**

**Tabla 1.** Absorbancia promedio del estándar de cadmio para cada día y estadísticos de Shapiro-Wilk y Levene.

Día	□	s	CV (%)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de la Varianza (Levene)			
				W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	Ftabulado
1	0,119	0,001	1,2	0,827	3	0,999	2,971	9	30	5,100
2	0,117	0,001	0,5	0,729	3					
3	0,12	0,001	0,4	0,630	3					
4	0,118	0,001	0,8	0,630	3					
5	0,119	0,001	0,8	0,630	3					
6	0,118	0,002	1,5	0,840	3					
7	0,118	0,001	0,7	0,945	3					
8	0,119	0,003	2,5	0,729	3					
9	0,117	0,001	0,5	0,729	3					
10	0,119	0,002	1,3	0,849	3					

\* Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 3)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 9, 30)}$ , donde, K = 10 número de días, N = 4 lecturas de la absorbancia

**Tabla 2.** Absorbancia promedio del estándar de mercurio para cada día y estadísticos de Shapiro-Wilk y Levene.

Día	□	s	CV (%)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de la Varianza (Levene)			
				Wcalculado	gl	W tabulado	Fcalculado	gl1	gl2	F tabulado
1	0,074	0,002	2,2	0,908	5	0,986	0,684	9,0	50	5,900
2	0,085	0,001	1,2	0,775	5					
3	0,091	0,001	1,3	0,908	5					
4	0,08	0,002	2,4	0,912	5					
5	0,077	0,002	2,1	0,809	5					
6	0,087	0,001	1,3	0,908	5					
7	0,075	0,002	2,7	0,801	5					
8	0,074	0,002	2,8	0,918	5					
9	0,078	0,001	1,4	0,684	5					
10	0,075	0,001	1,4	0,880	5					

\* Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 5)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 9, 50)}$ , donde, K = 10 número de días, N = 6 lecturas de la absorbancia

**Tabla 3.** Absorbancia promedio del termoformadoCM 4574-7 para cada día y estadísticos de Shapiro-Wilk y Levene para cadmio.

Día	□	s	CV (%)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de la Varianza (Levene)			
				W calculado	gl	Wtabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
1	0,04	0,001	2,3	0,863	3	0,999	1,640	9	30	5,100
2	0,038	0,001	1,3	0,630	3					
3	0,039	0,001	2,5	0,863	3					
4	0,037	0,001	1,6	0,729	3					
5	0,039	0,002	3,9	0,849	3					
6	0,037	0,002	4,6	0,971	3					
7	0,037	0,001	1,6	0,729	3					
8	0,038	0,001	2,6	0,630	3					
9	0,038	0,002	4,5	0,971	3					
10	0,038	0,001	2,5	0,863	3					

\* Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 3)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 9, 30)}$ , donde, K = 10 número de días, N = 4 lecturas de la absorbancia



**Tabla 4.** Absorbancia promedio del termoformado Nataima-31 para cada día y estadísticos de Shapiro-Wilk y Levene para mercurio.

Día	□	s	CV (%)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de la Varianza (Levene)			
				W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	Ftabulado
1	0,018	0,001	2,8	0,640	5	0,986	0,973	9	50	5,900
2	0,011	0,001	5,2	0,683	5					
3	0,017	0,001	4,7	0,822	5					
4	0,020	0,001	3,3	0,683	5					
5	0,018	0,000	2,0	0,496	5					
6	0,014	0,001	3,1	0,683	5					
7	0,011	0,001	4,5	0,827	5					
8	0,011	0,001	5,2	0,683	5					
9	0,007	0,001	7,7	0,640	5					
10	0,007	0,001	11	0,866	5					

\* Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 5)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 9, 50)}$ , donde, K = 10 número de días, N = 4 lecturas de la absorbancia

**Tabla 5.** Absorbancia promedio para la estabilidad de mercurio en la película flexible CM 7138-7 nativo y estadísticos de Shapiro-Wilk y Levene.

Día	□	s	CV (%)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de la Varianza (Levene)				
				W-calculado	gl	W tabulado	Fcalculado	gl1	gl2	F tabulado	
1	0,016	0,001	8,8	0,982	5						
2	0,017	0,001	4,7	0,822	5						
3	0,018	0,001	4,8	0,701	5						
4	0,016	0,001	9,3	0,958	5						
5	0,016	0,001	3,2	0,640	5	0,986	1,313	7	40	5,900	
6	0,016	0,001	6,1	0,770	5						
7	0,018	0,001	4,6	0,822	5						
8	0,018	0,001	2,9	0,640	5						

\* Shapiro-Wilk:  $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 5)}$  // Levene:  $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 7, 40)}$ , donde, K = 8 número de días, N = 6 lecturas de la absorbancia



## ANEXO 7. Determinación de cadmio y mercurio por absorción atómica

**Tabla 1.** ANOVA de un factor para las muestras de termoformados en la determinación de cadmio.

	Suma de	gl	Media	F	F
	Cuadrados		Cuadrática	Calculado	Tabulado
Inter-grupos	390,082	6	65,014		
Intra-grupos	0,604	14	0,043	1507,861	3,501
Total	390,685	20			

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}(0,05, 6, 14)$ , donde, n = 7 muestras y k = 3 réplicas de muestra

**Tabla 2** ANOVA para el metal cadmio en muestras de harina y fibra de fique.

	Suma de	gl	Media	F	F
	Cuadrados		Cuadrática	Calculado	Tabulado
Inter-grupos	479,063	6	79,844		
Intra-grupos	0,597	14	0,043	1872,468	3,501
Total	479,660	20			

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}(0,05, 6, 14)$ , donde, n = 7 muestras y k = 3 réplicas de muestra

**Tabla 3.** t-student entre las muestras de termoformados y las harinas, metal cadmio.

Muestra	gl	t calculado	t tabulado
CM 523-7	2	3,280	
Nataima-31	2	95,734	
MBRA-383	2	56,506	
MPER-183	2	231,987	4,300
CM7951-5	2	60,829	
CM4574-7	2	9,691	
HMC-1	2	8,037	

$t_{(\alpha, N)} = t_{(0,05, 2)}$ , donde N=3 réplicas de concentración

**Tabla 4.** ANOVA de un factor para las muestras de termoformados en la determinación de mercurio.

	Suma de	gl	Media	F	F
	Cuadrados		Cuadrática	Calculado	Tabulado
Inter-grupos	8161,207	2	4080,603		
Intra-grupos	13,891	6	2,315	1762,673	7,260
Total	8175,098	8			

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}(0,05, 2, 6)$ , donde, n = 3 muestras y k = 3 réplicas de muestra

**Tabla 5.** ANOVA de un factor para las muestras de películas flexibles en la determinación de mercurio.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F Calculado	F Tabulado
Inter-grupos	13527,587	4	3381,897		
Intra-grupos	58,079	10	5,808	582,293	7,260
Total	13585,666	14			

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}(0,05, 4, 10)$ , donde, n = 5 muestras y k = 3 réplicas de muestra

**Tabla 6.** t-student entre las muestras de termoformados y las harinas, metal mercurio.

Muestra	gl	t calculado	t tabulado
Nataima-31	2	40,660	4,300
MBRA-383	2	8,704	

$t_{(\alpha, N)} = t_{(0,05, 2)}$ , donde N=3 réplicas de concentración

**Tabla 7.** t-student entre las muestras de películas flexibles y almidones, metal mercurio.

Muestra	gl	t calculado	t tabulado
SM 707-17 Nativo	2	26,890	4,300
CM 7138-7 Nativo	2	21.013	

$t_{(\alpha, N)} = t_{(0,05, 2)}$ , donde N=3 réplicas de concentración

**Tabla 8.** ANOVA de un factor para harinas y fibra de fique en determinación de mercurio.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F Calculado	F Tabulado
Inter-grupos	439,745	2	219,873		
Intra-grupos	28,774	6	4,796	45,849	7,260
Total	468,519	8			

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}(0,05, 2, 6)$ , donde, n = 3 muestras y k = 3 réplicas de muestra

**Tabla 9.** ANOVA de un factor para almidones en determinación de mercurio.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F Calculado	F Tabulado
Inter-grupos	1319,336	1	1319,336		
Intra-grupos	57,441	4	14,360	91874	7,260
Total	1376,777	5			

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}(0,05, 1, 4)$ , donde, n = 2 muestras y k = 3 réplicas de muestra

## ANEXO 8. Certificados de presentación del trabajo

Certificado de presentación modalidad oral en el **43rd IUPAC World Chemistry Congress**.

### **488. Determination of mercury in flexible thermoformed and biodegradable films by atomic absorption spectrometry.**

**Roberto J Del Castillo**<sup>(1)</sup>, *rocr-3@hotmail.com*, Calle 5 No. 4 – 70, Popayan Cauca 190002, Colombia ; **Maite Rada-Mendoza**<sup>(1)</sup>; **Olga L Hoyos**<sup>(1)</sup>; **Hector S Villada**<sup>(2)</sup>. (1) *Departamento de Quimica*[quot], Universidad del Cauca, Popayan190002, Colombia (2) [quot]*Departamento de Ingenieria Agroindustrial*[quot], Universidad del Cauca, Popayan 190002, Colombia

The main uses of the thermoformed and flexible film biodegradable developed from cassava flour and starch, sisalfiber, plasticizer and PLA, is as packaging for preservation and protection for food. These products require attention because they can acquire pollution during manufacturing, requiring the analysis of heavy metals, which generate toxicity acute and / or chronic because they are not biodegradable and accumulate in living organisms, causing adverse health effects. Within the toxic heavy metal is found mercury, which can modify a variety of cells and biochemical processes, it has been shown that this metal interferes with the synthesis of proteins and nucleic acids, inhibits several cytosolic enzymes also affects the nervous system central. Mercury was determined in samples of thermoformed and films flexible biodegradable by atomic absorption spectrometry-cold vapor; prior to this quantification, we performed the implementation and standardization of the analytical method, which determined the statistical quality parameters (LOD, LOC, linear range, sensitivity calibration, precision and accuracy), who established the performance of the method, in order to quantify with certainty the mercury in each sample. The thermoformed digestive mixture is HNO<sub>3</sub>: HClO<sub>4</sub> (3:1) for 3 hours at 70°C, obtaining concentrations range from 56,042 to 1343,439 µg Hg/kg. For flexible films, digestion was performed with the same mixture of acids for 45 minutes at 50 °C, getting mercury concentrations in the range of 45,094 to 127,262 µg Hg/kg. The samples were quantified by calibration curve at 253.7 nm.

*Keywords: Thermoformed, Flexible Films, Biodegradable Polymers, AAS, cold vapor, Mercury*



*The International Union of Pure and Applied Chemistry  
and  
the Colegio de Químicos de Puerto Rico*



*certify that the following scientific work*

**488. Determination of mercury in flexible thermoformed and biodegradable films by atomic absorption spectrometry. Roberto J Del Castillo<sup>(1)</sup>, Maite Rada-Mendoza<sup>(1)</sup>; Olga L Hoyos<sup>(1)</sup>; Hector S Villada<sup>(2)</sup>. (1) [quot]Departamento de Quimica[quot], Universidad del Cauca, Popayan 190002, Colombia (2) [quot]Departamento de Ingenieria Agroindustrial[quot], Universidad del Cauca, Popayan 190002, Colombia**

*was presented orally during the*

**43<sup>rd</sup> IUPAC World Chemistry Congress**

*held in San Juan, Puerto Rico*

*July 31st-August 5th, 2011*

Gabriel Infante, PhD  
President, 43<sup>rd</sup> World Chemistry Congress



International Year of  
**CHEMISTRY**  
2011

Jorge L. Colón, PhD  
Chair, Scientific Program Committee

ISBN: 978-0-615-52557-0

Certificado de presentación en el **XIII Encuentro Nacional de Estudiantes de Química** – Abril del 2011.

El abstract se encuentra en: Memorias XIII Encuentro Nacional de Estudiantes de Química - ENEQUIM 2011. ISBN: 978-958-44-8498-7.

## **DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES POR EAA**

J. Del Castillo<sup>1</sup>, M. Rada-Mendoza<sup>1</sup>, O. L. Hoyos<sup>1</sup>, H. Villada<sup>2</sup>.rocr-3@hotmail.com

<sup>1</sup>Departamento de Química, FACNED, Universidad del Cauca, Popayán.

<sup>2</sup>Departamento de Ing. Agroindustrial, FACA, Universidad del Cauca, Popayán

**Introducción.** Una de las principales utilidades de los termoformados y películas flexibles biodegradables elaborados a partir de harina y almidón de yuca, fibra de fique, plastificante y PLA, es su uso como empaques para la preservación y protección de todo tipo de productos, siendo los alimentos y las materias primas el campo de mayor prioridad. Estos productos requieren atención, debido a la contaminación que pueden adquirir durante su elaboración [1], siendo de gran importancia el análisis de metales pesados, los cuales generan toxicidad aguda y/o crónica debido a que éstos no son biodegradables y se acumulan en los seres vivos, causando efectos adversos en la salud.

Dentro de los metales pesados tóxicos se encuentra el mercurio, el cual puede modificar una gran variedad de células y procesos bioquímicos; se ha demostrado que éste metal interfiere en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, inhibe varias enzimas citosólicas, además afecta el sistema nervioso central [2].

**Metodología.** Se determinó mercurio en muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables\* por espectrometría de absorción atómica-vapor frío (Model Solaar 989QZ); previo a ésta cuantificación, se realizó la implementación y estandarización del método analítico, en el cual se determinaron los parámetros de calidad estadística (LD, LC, intervalo lineal, sensibilidad de calibración, precisión y exactitud), quienes establecieron el

rendimiento del método, para así poder cuantificar con certeza el mercurio en cada una de las muestras. De igual manera, se realizó la digestión ácida con reflujo, optimizando las condiciones de mezcla de ácidos nítrico:perclórico, la temperatura y el tiempo de digestión; basados en estudios previos. Posteriormente, la muestra digerida se cuantificó por curva de calibración a 253,7 nm.

**Resultados.** Los termoformados se digirieron con la mezcla HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> (3:1) durante 3 horas a 70°C, obteniendo concentraciones en el rango de 56,042 a 1343,439 µg Hg/kg. En cuanto a las películas flexibles la digestión se realizó con la misma mezcla de ácidos durante 45 minutos a 50°C; obteniendo concentraciones de mercurio en el rango de 45,094 to 127,262 µg Hg/kg.

**Conclusión.** Se comprobó que los termoformados y películas flexibles biodegradables cumplen con la NTC 4069 [3], respecto a la concentración de Hg permitida.

Se estandarizó el método analítico, el cual permitió la cuantificación del mercurio en las muestras de polímeros biodegradables.

### **Bibliografía.**

[1] VILLADA H.; Acosta H.; Velasco R. Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. Universidad del Cauca, Departamento de Agroindustria. Universidad del Valle. Departamento de Ingeniería de Alimentos. 2007.

[2] CARVALHO C.; Chew E.; Hashemy S.; Lu J.; Holmgren A. Inhibition of the human thioredoxin system a molecular mechanism of mercury toxicity. The journal of biological chemistry vol. 283, no. 18, 2008, pág. 11913–11923.

[3] NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-4096. Plásticos Plastificantes DOP y DOA Grado Alimento. Agosto 30 de 2006





Universidad de Narifio



International Year of  
**CHEMISTRY**  
2011

**CERTIFICAN QUE:**  
Julián Del Castillo Ramírez  
C.C 1.088.216.060

Participó en calidad de: **EXPOSITOR** en el



Realizado en la ciudad de San Juan de Pasto los días 13, 14 y 15 de Abril de 2011

Dado en San Juan de Pasto a los 15 días del mes de Abril de 2011

**JUAN JOSÉ LOZADA CASTRO**  
Director Departamento de Química

**ESTEFANNI CAGUZZANGO MONTENEGRO**  
Presidenta AEQU  
COMITÉ ORGANIZADOR

## ANEXO 9. Carta de presentación de artículo a revista

### Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial



El director de la revista *Biología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*  
ISSN – 1692-3561  
Indexada en Colciencias

#### CERTIFICA QUE:

El Estudiante de Química, **Roberto Julián Del Castillo Ramírez** postulo en la Revista *Biología en el sector Agropecuario y Agroindustrial* de la Universidad del Cauca el artículo titulado "CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO EN TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES ELABORADAS A PARTIR DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA", el cual se encuentra en evaluación por parte de los jurados designados, una vez se finalice ese proceso y se obtengan los conceptos de aprobación se remitirán a los autores con el fin completar los procesos de corrección y publicación en el próximo volumen de la revista.

Para constancia se firma en Popayán a los ocho (8) días del mes de Abril de 2012.

Atentamente,

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del director, sobre una línea horizontal.

HÉCTOR SAMUEL VILLADA CASTILLO, Ph. D.  
Director

## ANEXO 10. Carta de aceptación de artículo a revista

Biología en el  
Sector Agropecuario  
y Agroindustrial



El director de la revista Biología en el sector Agropecuario y Agroindustrial  
ISSN – 1692-3561  
Indexada en Colciencias

### CERTIFICA QUE:

El artículo titulado "CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO EN TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES ELABORADAS A PARTIR DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA", de los autores Roberto Julián Del Castillo R., Maite Del Pilar Rada Mendoza, Olga Lucia Hoyos S. y Héctor Samuel Villada C., fue sometido a un proceso de evaluación el cual determino su aceptación para ser publicado en el próximo volumen de la revista Biología en el sector Agropecuario y Agroindustrial de la Universidad del Cauca.

Para constancia se firma en Popayán a los diez (10) días del mes de Octubre de 2012.

Atentamente,

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del director, sobre una línea horizontal.

HÉCTOR SAMUEL VILLADA CASTILLO, Ph. D.  
Director