

**EVALUACION DE LA MIGRACION ESPECÍFICA DE CAPSAICINA Y  
COLORANTE DE UN POLIMERO BIODEGRADABLE ACTIVO A BASE DE  
ALMIDON DE YUCA MODIFICADO UTILIZANDO HPLC Y ULTRAVIOLETA  
VISIBLE**

**AYDA MARCELA ERAZO ARCOS  
SERGIO DIOMEDES JIMENEZ JIMENEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NARURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION,  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUIMICA  
DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)  
POPAYÁN  
2012**

**EVALUACION DE LA MIGRACION ESPECÍFICA DE CAPSAICINA Y  
COLORANTE DE UN POLIMERO BIODEGRADABLE ACTIVO A BASE DE  
ALMIDON DE YUCA MODIFICADO UTILIZANDO HPLC Y ULTRAVIOLETA  
VISIBLE**

**Trabajo de grado Presentado como requisito parcial para optar el título de  
Químico**

**AYDA MARCELA ERAZO ARCOS  
SERGIO DIOMEDES JIMENEZ JIMENEZ**

**DIRECTOR  
FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ BLANCO. M.SC.  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUIMICA DE PRODUCTOS BIOACTIVOS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION,  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUIMICA DE  
COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)  
POPAYÁN  
2012**

**Nota de aceptación.**

---

---

---

**Director.**

---

**Fernando José Hernández Blanco.**

**M.Sc**

**Jurado.**

---

**Edier Humberto Pérez.**

**Dr.**

**Jurado.**

---

**Reinaldo J. Velasco**

**M.Sc**

**Popayán, 5 de Marzo del 2012**

## CONTENIDO

		Pág.
	<b>LISTA DE TABLAS</b>	9
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	11
	<b>LISTA DE ECUACIONES</b>	12
	<b>LISTA DE ANEXOS</b>	13
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	14
	<b>RESUMEN</b>	15
<b>1</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	18
2.1	Objetivo general	18
2.2	Objetivos específicos	18
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTOS TEORICOS Y ESTADO DEL ARTE</b>	19
<b>3.1</b>	<b>EMPAQUE</b>	19
<b>3.2</b>	<b>EMPAQUES BIODEGRADABLES</b>	20
3.2.1	Polímeros biodegradables naturales obtenidos por microorganismos	20
3.2.2.	Polímeros biodegradables naturales obtenidos de plantas (Almidón)	20
<b>3.3</b>	<b>EMPAQUE ACTIVO Y SUS COMPONENTES</b>	21
<b>3.4</b>	<b>MIGRACIÓN Y SUS FUNDAMENTOS</b>	23
3.4.1	Migración	23
3.4.2	Matemática de la Migración	24
3.4.3	Ley de Fick	24
<b>3.5</b>	<b>REGULACIÓN Y NORMAS DE MIGRACIÓN EN EMPAQUES DESTINADOS A ESTAR EN CONTACTO CON ALIMENTOS</b>	26
3.5.1	Regulación de los Estados Unidos EE.UU	26
3.5.2	Regulación en la Unión Europea (EU)	28
3.5.2.1	Legislación Comunitaria	28
3.5.3	Normas Colombianas	29
3.5.3.1	NTC 5022	29
3.5.3.2	NTC 4606	29
<b>3.6</b>	<b>TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN</b>	29
3.6.1	Precisión	29
3.6.2	Repetibilidad	30
3.6.3	Precisión Intermedia	30
3.6.4	Linealidad	30
3.6.5	Límite de detección LOD	30
3.6.6	Límite de cuantificación LOQ	30
<b>3.7</b>	<b>DISEÑO DE EXPERIMENTOS FUNDAMENTOS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	30
3.7.1.	Diseño de Experimentos (DDE)	31
3.7.2	Diseños Factoriales 2 <sup>3</sup>	31
3.7.2.1	Efectos Simples	32
3.7.2.3	Efectos principales	33
3.7.2.2	Efectos Interacción	33

	<b>Pág.</b>
<b>3.8</b>	<b>MANEJO ESTADÍSTICO DATOS</b> 34
3.8.1	Distribución Normal de las Poblaciones (prueba de Shapiro-Wilk) 34
3.8.2	Igualdad de Varianzas (Estadístico de Levene) 35
3.8.3	Análisis de varianza (ANOVA) 36
3.8.3.1	Correlación de Pearson 36
3.8.3.2	Análisis de Varianza del modelo de Regresión 38
3.8.3.3	Estudio de la línea de Tendencia Central 40
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> 41
<b>4.1</b>	<b>REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO</b> 41
4.1.1	Reactivos 41
4.1.2	Equipos 41
4.1.3	Material de Vidrio y Plástico 41
<b>4.2</b>	<b>VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DEL MATERIA DE VIDRIO</b> 42
<b>4.3</b>	<b>PREPARACIONES DE SOLUCIONES ESTÁNDAR</b> 42
4.3.1	Curvas de calibración para HPLC 42
4.3.1.1	Preparación de la curva de capsaicina en Acetonitrilo 42
4.3.1.2	Preparación de la curva de capsaicina en los diferentes simulantes 42
<b>4.4</b>	<b>CURVAS CALIBRACIÓN PARA EL UV-VIS</b> 43
4.4.1	Curvas de colorante 43
4.4.1.1	Estandarización del tiempo de agitación para la curva de colorante 43
4.4.1.2	Preparación de la curva de colorante en cloroformo 43
<b>4.5</b>	<b>PARÁMETROS DE CALIDAD PARA LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS DE HPLC Y UV-VIS</b> 44
4.5.1	Límite de detección y cuantificación 44
4.5.1.1	LOD 44
4.5.1.2	LOQ 44
4.5.2	Repetibilidad y precisión intermedia 45
4.5.2.1	Repetibilidad 45
4.5.2.2	Precisión intermedia 45
<b>4.6</b>	<b>PREPARACIÓN DE MUESTRA</b> 45
4.6.1	Preparación de blancos 46
4.6.2	Diseño experimental 46
4.6.3	Evaluación de la migración 47
4.6.3.1	Migración global 47
4.6.3.2	Migración específica 47
<b>4.7</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTES EVALUADOS EN LA MIGRACIÓN</b> 48
4.7.1	Determinación de capsaicina por HPLC 48
4.7.2	Determinación de colorante por UV-Vis 48
4.7.3	Determinación de metales por A.A 48
<b>4.8</b>	<b>EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE RESULTADOS</b> 49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> 50

		<b>Pág.</b>
<b>5.1</b>	<b>VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO</b>	50
<b>5.2</b>	<b>PREPARACIONES DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR</b>	51
5.2.1	Curvas para el equipo de HPLC	51
5.2.1.1	Análisis de la curva de capsaicina de Acetonitrilo por HPLC	51
<b>5.3</b>	<b>ANÁLISIS DE CURVAS DE CAPSAICINA EN SIMULANTES REFRIGERADOS</b>	57
<b>5.4</b>	<b>ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS SIMULANTES A DIFERENTES TEMPERATURAS</b>	58
5.4.1	Cinética de degradación en simulantes	58
5.4.2	Análisis de la curva de calibración en cloroformo por espectroscopia UV-Vis	63
<b>5.5</b>	<b>ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE AGITACIÓN</b>	68
<b>5.6</b>	<b>ANÁLISIS DE BLANCOS</b>	69
<b>5.7</b>	<b>ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN</b>	70
<b>5.7.1</b>	Migración global	70
<b>5.7.2</b>	Migración específica	72
5.7.2.1	Análisis de estandarización de la técnica de extracción líquido-líquido	72
5.7.2.2	Cuantificación de compuestos evaluados en la migración	72
5.7.2.3	Análisis en la migración de colorante por espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis)	83
5.7.2.4	Análisis de la determinación de metales por A.A	87
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	89
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	91
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	92

## *Ayda Marcela Erazo Arcos*

### **DEDICATORIA**

Como un sencillo gesto de agradecimiento, quiero dedicarle este Trabajo de Grado, a mi padre Hernando Erazo Guerrero por brindarme su confianza y otorgarme los medios para estudiar, a mi madre Lupe Lucia Arcos Ortega que permanentemente me apoyó con espíritu alentador, contribuyendo incondicionalmente a lograr las metas y objetivos postulados sin importar las condiciones, pues se convirtió en el pilar fundamental en mi formación profesional y personal y a mis hermanos Hernando y David Erazo Arcos por depositar en mí su infinito e incondicional apoyo.

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de manera sincera a todos aquellos organismos universitarios, otras dependencias y demás personas que con sus aportes hicieron posible la realización del mismo, entre los que se deben mencionar:

A nuestra casa universitaria de estudios por haberme dado la oportunidad de ingresar al sistema de Educación Superior y culminar con éxito este gran sueño.

A los docentes y estudiantes pertenecientes al programa de Química quienes me han acompañado e instruido durante el largo camino de crecimiento profesional, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético, básicos en la adquisición de los conocimientos y afianzando mi formación como estudiante universitaria.

A mi Director Fernando Hernández Blanco quien en el desarrollo del presente estudio, ha sido sin duda orientador en todo momento de la realización de este proyecto que enmarca el último escalón de esta etapa hacia un futuro, en donde sea partícipe en el mejoramiento de diferentes procesos de enseñanza, aprendizaje y haga significativo mi aporte a la sociedad en donde deberé desarrollarme como persona y profesional.

Al laboratorio de Reología de la facultad de ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, al grupo de Química de Compuestos Bioactivos Q.C.B. y su director el Ph.D. Fabio cabezas, quienes confiaron en mi para llevar a cabo esta investigación y a la Unidad de Análisis Industriales por la disposición de los equipos y el espacio para llevar a cabo este trabajo.

*Sergio Diomedes Jiménez Jiménez*

## **DEDICATORIA**

A mis Padres LUZ MARIA JIMENEZ y DIOMEDES JIMENEZ quienes con su apoyo me dieron las fuerzas para salir adelante con humildad y respeto hacia los demás.

A mis Hermanos y Hermanas, LEONARDO, LUIS CARLOS, NANCY Y ROSAURA JIMENEZ, quienes me brindaron la confianza, apoyo incansable y la oportunidad de obtener este logro en mi vida.

A mi sobrina ASTRID JOHANA DELGADO JIMENEZ, el motivo de esfuerzo y dedicación para salir adelante

A mis compañeros, amigos y al espacio de RESIDENCIAS UNIVERSITARIAS 4 DE MARZO, espacio que me acogió durante el periodo académico y me dio la oportunidad de crecer no solo académicamente sino que también como ciudadano activo en esta sociedad de desigualdad.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento muy especial a mi director, profesor y amigo Fernando J. Hernández por confiar en mí para este trabajo y por compartir sus conocimientos y dedicación en el desarrollo de este proyecto

A mis jurados y profesores del Departamento de Química por brindarme a través de la enseñanza la entrada a este maravilloso mundo de la química.

A todos mis compañeros y amigos, en especial a FERNANDO TABARES, MARCELA ERAZO, JAMES MARTINEZ, JULIAN ROJAS, JIMMY PEPICANO, DIANA GUZMAN con los que compartimos una amistad incondicional y por este motivo los recordare por siempre.



## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1</b>	Capsaicinoides y su porcentaje en oleorresinas	22
<b>Tabla 2</b>	Datos toxicológicos para la capsaicina	22
<b>Tabla 3</b>	Clasificación de los alimentos y simulantes recomendados	27
<b>Tabla 4</b>	Tiempo y temperatura de extracción de acuerdo a temperaturas de uso	28
<b>Tabla 5</b>	Diseño de experimentos 2 <sup>3</sup> , Factores codificados	32
<b>Tabla 6</b>	Efectos simples del factor A para un diseño 2 <sup>3</sup>	33
<b>Tabla 7</b>	Parámetros de calidad para las técnicas HPLC y UV	44
<b>Tabla 8</b>	Diseño experimental de fabricación del polímero “valores codificados”	45
<b>Tabla 9</b>	Parámetros para la extracción liquido-liquido	48
<b>Tabla 10</b>	Calibración del material de vidrio	50
<b>Tabla 11</b>	Niveles de concentración para curvas de calibración de capsaicina por HPLC	51
<b>Tabla 12</b>	Pruebas de Normalidad para DIA 3 y precisión intermedia	52
<b>Tabla 13</b>	Pruebas de homogeneidad de varianzas para repetibilidad y precisión intermedia en HPLC	53
<b>Tabla 14</b>	Valores de t para repetibilidad del DIA 7.capsaicina	54
<b>Tabla 15</b>	Anova de un factor para los Días 1 y 5 capsaicina	55
<b>Tabla 16</b>	Análisis de coeficientes y anova para curva A de calibración DIA 1	56
<b>Tabla 17</b>	Descriptivos de la pendiente e interceptos para repetibilidad de la curva de capsaicina en Acetonitrilo	57
<b>Tabla 18</b>	Comparación de curvas de capsaicina en Acetonitrilo y diferentes simulantes	58
<b>Tabla 19</b>	Áreas del primer patrón durante los 5 días	58
<b>Tabla 20</b>	Escogencia del comportamiento cinético par el primer patrón (0.098ppm)	60
<b>Tabla 21</b>	Resumen del comportamiento cinético a 25°C	61
<b>Tabla 22</b>	Resumen del comportamiento cinético a 40°C	61
<b>Tabla 23</b>	Constantes de velocidad para cada patrón	62
<b>Tabla 24</b>	Niveles de concentración para curvas de colorante	63
<b>Tabla 25</b>	Pruebas de Normalidad para DIA 10 y precisión intermedia	64
<b>Tabla 26</b>	Pruebas de homogeneidad de varianzas para repetibilidad y precisión intermedia en UV	64
<b>Tabla 27</b>	Valores de t para repetibilidad del DIA 10.colorante	65
<b>Tabla 28</b>	Anova de un factor para los Días 1 y 5 Colorante	65
<b>Tabla 29</b>	Análisis de coeficientes y anova para curva A de calibración DIA 3 colorante	67
<b>Tabla 30</b>	Descriptivos de la pendiente e interceptos para repetibilidad de la curva de colorante	68
<b>Tabla 31</b>	Absorbancias a diferentes tiempos de agitación	69

		<b>Pág.</b>
<b>Tabla 32</b>	Porcentaje de pérdida de material en la migración global en 3 simulantes a dos temperaturas	71
<b>Tabla 33</b>	Áreas de las extracciones con diferentes solventes	72
<b>Tabla 34</b>	Áreas a evaluar los parámetros de extracción líquido-líquido	72
<b>Tabla 35</b>	Porcentaje de capsaicina de las muestras del grupo 1 que migran en cada simulante al décimo día a las dos temperaturas	74
<b>Tabla 36</b>	Porcentaje de capsaicina de las muestras del grupo 2 que migran en cada simulante al décimo día a las dos temperaturas	79
<b>Tabla 37</b>	Porcentaje de capsaicina de las muestras del grupo 3 que migran en cada simulante al décimo día a las dos temperaturas	80
<b>Tabla 38</b>	Porcentajes de migración en los cuatro simulantes	83
<b>Tabla 39</b>	Concentración de metales por Absorción Atómica	88

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Tipos de empaque	19
<b>Figura 2</b>	Ciclo de los plásticos biodegradables	20
<b>Figura 3</b>	Estructura del almidón	21
<b>Figura 4</b>	Interacciones entre el entorno/envase/alimento	23
<b>Figura 5</b>	Proceso de migración en la interface polímero/alimento	25
<b>Figura 6</b>	Curva de calibración de capsaicina repetibilidad día 3	55
<b>Figura 7</b>	Curva de calibración de capsaicina precisión intermedia	56
<b>Figura 8</b>	Curvas de cinética “Área vs tiempo”	59
<b>Figura 9</b>	Correlación de Pearson para el primer patrón	60
<b>Figura 10</b>	Curva de calibración de colorante repetibilidad decimo día	66
<b>Figura 11</b>	Curva de calibración de colorante precisión intermedia	67
<b>Figura 12</b>	Cromatogramas blancos simulantes A, B y C	69
<b>Figura 13</b>	Hongo producido en el polímero que está en contacto con el simulante graso “D”	71
<b>Figura 14</b>	Superficie de respuesta para migración con puntos medios en el simulante D a 25°C	73
<b>Figura 15</b>	Efectos principales y de interacción para perfil de temperatura alto en los cuatro simulantes	74
<b>Figura 16</b>	Efectos principales y de interacción para perfil de temperatura bajo en los cuatro simulantes	77
<b>Figura 17</b>	Gráficos de superficie de respuesta para simulante A	81
<b>Figura 18</b>	Gráficos de superficie de respuesta para simulante B	81
<b>Figura 19</b>	Gráficos de superficie de respuesta para simulante C	82
<b>Figura 20</b>	Gráficos de superficie de respuesta para simulante D	82
<b>Figura 21</b>	Efectos principales y de interacción para migración de colorante a porcentajes altos de capsaicina en los cuatro simulantes	83
<b>Figura 22</b>	Efectos principales y de interacción para migración de colorante a porcentajes bajos de capsaicina en los cuatro simulantes	86

## LISTA DE ECUACIONES

		<b>Pág</b>
<b>Ecuación 1</b>	Primera ley de Fick	25
<b>Ecuación 2</b>	Segunda ley de Fick	25
<b>Ecuación 3</b>	Estadístico de Shapiro-Wilk	34
<b>Ecuación 4</b>	Estadístico de Levene	35
<b>Ecuación 5</b>	Estadístico F	39
<b>Ecuación 6</b>	Limite de Detección	44
<b>Ecuación 7</b>	Limite de cuantificación	44
<b>Ecuación 8</b>	Porcentaje de migración global	47
<b>Ecuación 9</b>	Varianzas para prueba t	50
<b>Ecuación 10</b>	Velocidad de disminución para reacciones de primer orden	62
<b>Ecuación 11</b>	Velocidad de disminución para reacciones de primer orden	63

## LISTA DE ANEXOS

		<b>Pág</b>
<b>Anexo 1</b>	Pruebas de normalidad para HPLC	95
<b>Anexo 2</b>	Tabla de homogeneidad de varianzas prueba de “Levene” para HPLC	96
<b>Anexo 3</b>	Tabla de comparación de medias, prueba t Student para curvas de HPLC	96
<b>Anexo 4</b>	Análisis de regresión lineal para curvas de HPLC	97
<b>Anexo 5</b>	Curvas de calibración para repetibilidad para la técnica HPLC	98
<b>Anexo 6</b>	Pruebas de normalidad para UV	99
<b>Anexo 7</b>	Tabla de homogeneidad de varianzas prueba de “Levene” para UV	100
<b>Anexo 8</b>	Tabla de comparación de medias, prueba t Student para curvas de UV	100
<b>Anexo 9</b>	Análisis de regresión lineal para curvas de hplc	101
<b>Anexo 10</b>	Curvas de calibración para repetibilidad para la técnica UV	102
<b>Anexo 11</b>	Cromatogramas de patrones de capsaicina en HPLC	103
<b>Anexo 12</b>	Cromatogramas de muestras	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>HPLC</b>	High performance Liquid Chromatography
<b>LMG</b>	Límite de Migración Global
<b>LME</b>	Límite de migración Específica
<b>EE.UU</b>	Estados Unidos
<b>EU</b>	Unión Europea
<b>FFDCA</b>	Food Additives Amendment to the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act
<b>NEPA</b>	National Environmental Policy Act
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GRAS</b>	Generally Recognized as Safe
<b>FCS</b>	Food Contact Substances
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>FID</b>	Detector de ionización de Llama
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>AA</b>	Absorción Atómica
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de Cuantificación

## RESUMEN

Hasta hace poco tiempo, el objetivo principal de los empaques solo se enfocaba en la protección de su contenido. Dicha protección consideraba aislar el producto de agentes externos como la radiación, humedad y oxígeno. El principal inconveniente de estos empaques se relacionaba con su tiempo de vida medio, fundamentalmente se limitaba a la conservación del producto hasta la fecha de consumo.

Los empaques fabricados tradicionalmente de polímeros sintéticos provenientes de combustibles fósiles, entre ellos polietileno de baja y alta densidad (LDPE, HDPE), polipropileno PP, poliestireno PS, Cloruro de polivinilo PVC [Helmorth, E. Et. Al.] entre otros; son los principales causantes de contaminación por su largo tiempo de degradación. Con el avance de la tecnología y largos periodos de investigación se están produciendo en la actualidad polímeros amigables con el medio ambiente, llamados biodegradables, sintetizados a partir de materias primas provenientes de la naturaleza “polímeros naturales”, un ejemplo común son los polisacáridos entre ellos y de principal interés en la presente investigación es el almidón obtenido de la yuca [R. chandra (1998)].

En la búsqueda de la eficiencia en la conservación de los alimentos se ha buscado empaques que además de ser biodegradables interactúen con el alimento de forma activa ya sea mejorando su calidad o protegiéndolo de agentes patógenos como microorganismos, hongos entre otros. Uno de los problemas de los empaques activos es un proceso de transporte de masa conocido actualmente como migración. Este es un fenómeno en el cual los componentes del polímero interactúan con los alimentos interfiriendo en sus propiedades organolépticas y de sabor.

La norma actual que rige este fenómeno de migración es la directiva 87/107/EEC del 2001 la cual regula las sustancias que se pueden utilizar como aditivos en los empaques destinados a estar en contacto con alimentos [EU 89/107/CEE (1988)]. Teniendo en cuenta lo anterior en este trabajo se evaluó la migración global y específica de dos aditivos, un agente activo “capsaicina” y un colorante en un polímero biodegradable fabricado a partir de almidón modificado de yuca destinado a proteger el fruto del plátano. El proceso de análisis se basó en las normas colombianas [NTC 4606, 5022] las cuales establecen la metodología y el tiempo requerido para evaluar la migración, en este caso al tratarse de un polímero nuevo se exige que debe ser evaluado por todos los simulantes alimenticios nombrados en la directiva 85/572/EEC, estos simulantes representan las propiedades de los alimentos y son:

- Simulante A: Agua destilada
- Simulante B Ácido acético al 3%
- Simulante C Etanol al 15%
- Simulante D Aceite de oliva rectificado o en su defecto “aceite de girasol”

La cuantificación de los analitos de interés, se hizo utilizando las técnicas instrumentales cromatografía líquida de alta resolución HPLC fase reversa para Capsaicina y Espectrofotometría Ultravioleta Visible para el colorante. Como trabajo complementario se utilizó la técnica Absorción Atómica para la determinación de metales como Se, Pb, Cd, Hg como posibles migrantes, estos provenientes del proceso de modificación del almidón de yuca [Mousavi, M. Et. Al (1999).].

La interpretación de resultados de los datos obtenidos para las técnica HPLC y UV-Vis se hizo por medio de estudios estadísticos paramétricos con la ayuda del paquete estadístico SPSS v17 y las líneas de tendencia con la Hoja de Cálculo MICROSOFT EXCEL.

El análisis de resultados para los datos de migración para capsaicina por HPLC y Colorante por UV, se basó en Diseños de experimentos factoriales  $2^3$  con puntos medios y estrella por medio de análisis de efectos principales y de interacción para el diseño y por análisis de superficie de respuesta para los puntos medios y estrella con ayuda del paquete estadístico MINITAB ver 15.1.20.0 desarrollado por Minitab inc.



## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La buena conservación en las propiedades organolépticas de los alimentos es una de las principales preocupaciones de la industria alimenticia, y por esto se invierten grandes recursos en investigación para la obtención de materiales que cumplan el objetivo de protección y conservación de estas propiedades. Los empaques son los encargados de proteger los alimentos de agentes externos y mantenerlos aptos hasta el consumo humano.

La problemática ambiental presente en la actualidad del ser humano por el uso elevado de polímeros sintéticos (empaques), a hecho que los miembros de las Naciones Unidas (ONU), fomenten la investigación en la producción de polímeros a base de productos naturales.

Estudios como el proyecto “OBTENCION DE UN EMPAQUE ACTIVO PARA PLATANO A PARTIR DE ALMIDON DE YUCA CAPSAICINA Y GLICEROL POR EXTRUSIÓN SOPLADO” del que hace parte la presente investigación, la cual se concentra en la obtención de un nuevo empaque a partir de almidón de yuca como una posible solución a estos problemas ambientales, el nuevo polímero necesita de un estudio de migración ya que se utilizó capsaicina como parte activa, que se puede convertir en un inconveniente debido a su transferencia que afecte las propiedades de los alimentos, de esta manera y al no cumplir con las normas establecidas el biopolímero puede ser rechazado.

Los componentes de los empaques tienen la tendencia a migrar, los límites permitidos de migración de cualquier componente están establecidos internacionalmente con las legislaciones Europeas (Directivas 82/711/CEE, 85/572/CEE y 97/48/CE), y en Colombia por las normas NTC4606 y 5022, estos límites también dependen de la sustancia migrante la cual no puede migrar en concentraciones que causen efectos adversos en la salud de los consumidores, en si dependen de la toxicología de las sustancias migrantes[Mousavi, M. et.al (1999)].

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la migración específica de capsaicina y colorante en un polímero biodegradable a base de almidón de yuca modificado empleando HPLC y ultravioleta visible.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer la concentración óptima de compuesto activo en el empaque biodegradable teniendo en cuenta las pérdidas por el proceso de fabricación para que contribuya a conservar sus propiedades biológicas y establecer dentro de las concentraciones evaluadas en la preparación del polímero cual es la concentración óptima en función de la migración.
- Estudiar la influencia en la migración específica del compuesto activo y el colorante de la relación almidón modificado de yuca y otros copolímeros utilizados para la fabricación del empaque.
- Utilizar herramientas estadísticas y el diseño experimental para evaluar los principales factores como temperatura, tipo de simulante, concentración, entre otros que afectan la migración específica y su posible correlación.
- Evaluar la migración específica del compuesto activo y el colorante en el polímero biodegradable utilizando como base normas técnicas colombianas (NTC 4606 / 5022) y técnicas analíticas como HPLC y UV Vis para su cuantificación.
- Corroborar la ausencia de posibles metales remanentes del proceso catalítico de modificación del almidón de yuca empleado en la fabricación del biopolímero utilizando espectrometría de absorción atómica.
- Implementar una técnica de extracción líquido-líquido para la evaluación de la migración específica de capsaicina en un simulante graso por HPLC.

### 3. FUNDAMENTOS TEORICOS

A continuación se presentan algunas definiciones que se utilizarán a lo largo de este trabajo.

#### 3.1 EMPAQUE

El empaque es el material encargado de proteger de la humedad, luz procesos químicos de oxidación, ayudando a aumentar la vida útil del alimento. El empaque según el tipo de contacto con el alimento se clasifica en:

- a) **Empaque Primario:** es aquel que se encuentra en contacto con el alimento.
- b) **Empaque secundario:** este contiene empaques primarios y es el medio de presentación del producto.
- c) **Empaque terciario o embalaje:** este también llamado de transporte es el encargado de proteger una cantidad definida de empaques secundarios.

**Figura 1.** Tipo de empaque a) Primario; b) secundario; c) terciario



Los empaques son fabricados de diferentes tipos de materiales como papel, vidrio madera, y empaques provenientes de polímeros sintéticos como Polietileno (PE), Polipropileno (PP) Polietileno de alta (HDPE) y baja densidad (LDPE), Poliestireno (PS) y Cloruro de polivinilo PVC<sup>1</sup>, pero en la actualidad se fabrican de productos naturales, a estos se les llama plásticos biodegradables.

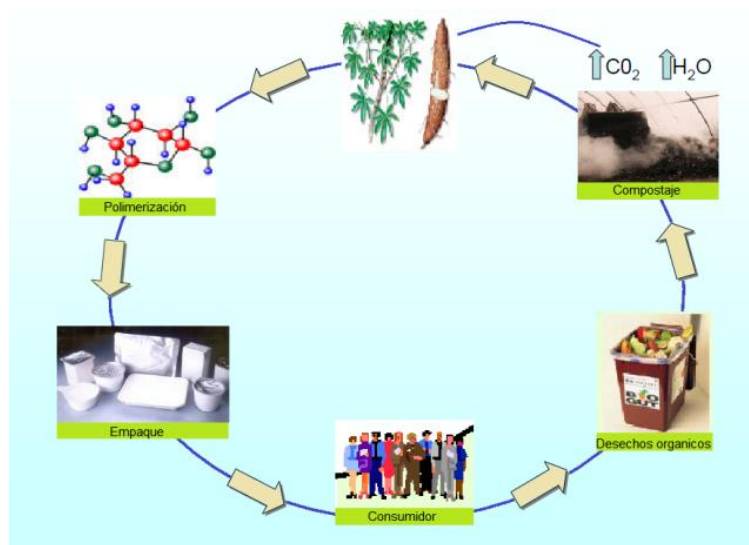
---

<sup>1</sup>Química de polímeros, polímeros sintéticos una especialidad de la química orgánica. Disponible en <http://www.quimica.uns.edu.ar/edicion/apuntes/15/teoriaDoderofqo26.pdf>

## 3.2 EMPAQUES BIODEGRADABLES

La mayoría de los empaques biodegradables son obtenidos de polímeros de distintas variedades de plantas, estos al ser naturales una vez llegan al suelo son degradados gracias a la acción enzimática en el metabolismo microbiano completando un ciclo vital [Chandra, R. (1998)], como se puede apreciar en la figura 2.

**Figura 2.** Ciclo de los Plásticos Biodegradables



A continuación se presentan conceptos fundamentales relacionados con los polímeros biodegradables.

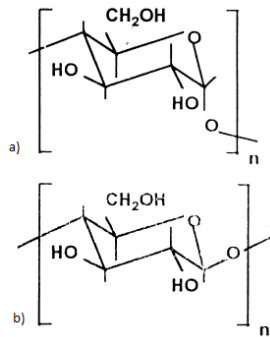
### 3.2.1 Polímeros biodegradables naturales obtenidos por microorganismos

Estos polímeros biodegradables son formados durante el ciclo de crecimiento de los microorganismos, en la síntesis de estos están involucradas variedad de reacciones catalizadas por enzimas en las células de los microorganismos en complejos procesos metabólicos. [Chandra, R. (1998)].

### 3.2.2 Polímeros biodegradables naturales obtenidos de plantas (Almidón)

Entre los polímeros biodegradables naturales los más conocidos y en el que se enfocó este trabajo son los polisacáridos, siendo los de más interés la celulosa y el almidón, este último es el componente principal del empaque de estudio.

**Figura 3.** a) estructura almidón b) estructura celulosa



El almidón posee estructuras macromoleculares ordenadas en capas y cuyas características en cuanto a composición, cantidad y forma varían de acuerdo con el tipo de fuente de la que provenga y consta de capas externas de amilopectina e interna de amilosa cuya unidad monosacárido es la glucosa. El almidón para la fabricación del polímero se extrajo de la yuca (*Manihot esculenta* Grantz), esta es una planta originaria de América del Sur.

### 3.3 EMPAQUE ACTIVO Y SUS COMPONENTES

El empaque activo es un concepto moderno en el desarrollo de materiales para empaques, que interactúan con los alimentos teniendo un rol importante en la preservación y presentando una alternativa en la incorporación de sustancias activas a materiales de empaque como películas biodegradables cuya función es la interacción de sustancias que puedan alterar la calidad, la presentación o propiedades del alimento. Las principales técnicas de envasado activo se refieren a las sustancias que absorben oxígeno, etileno, humedad, dióxido de carbono, sabores/olores, estas sustancias activas van desde interactivas directas con el alimento o indirectas como agentes antimicrobianos [Kuehl, O. (2001)].

El componente activo del polímero de este trabajo es la capsaicina obtenida de ají del (*Capsicum annuum*) en forma de oleorresina, el nombre químico trans-8-metil-N-vanillil-6-nonenamida es la causante del sabor picante. La capsaicina es el componente principal de una familia de compuestos denominados capsaicinoides que poseen igualdad en su estructura amida, pero varían en la saturación, sustitución y longitud de la cadena como se puede observar en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Capsaicinoides y su porcentaje en oleorresinas

Nombre	% en oleorresina	Estructura
Capsaicina (C)	70	
Dihidro-capsaicina (DHC)	20	
Nordihidro-Capsaicina (NDHC)	7	
Homodihidro-Capsaicina (HDHC)	1	
Homo-Capsaicina (HC)	1	

Los usos de la capsaicina son variados, siendo la industria alimenticia la más popular, seguida por lo usos en medicina, y actualmente como agente antimicrobiano, sin embargo, la información sobre la actividad antimicrobiana de la capsaicina es escasa y esta opacada por el uso de extractos crudos que contienen diferentes cantidades de componentes activos [Torres, M. et. al. (2001)].

Debido a que la capsaicina es componente nuevo en su uso como agente activo de polímeros aún no se encuentran reportes en la literatura sobre las cantidades a emplear dentro de la fabricación del polímero por lo cual los parámetros tenidos en cuenta como control para la determinación de los límites de migración de capsaicina en el empaque fueron sus valores toxicológicos mostrados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Datos Toxicológicos para la capsaicina[Barceloux D. (2009)].

Parámetro	Determinado en	Valores mg/Kg
LD50 Oral	Ratas Macho	161.2
LD50 Oral	Ratas Hembra	148.1
LD50 dérmico	ratones	512.0

Otro aditivo del empaque es un colorante para la presentación final del producto. Los colorantes como aditivos se adquieren comercialmente en masterbatches en una resina vehículo y su uso en los polímeros se hace por extrusado [Wong, A. 1997].

En la presente investigación en la fabricación del polímero se utilizó una mezcla de colorante y Oxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en relación 1:7 respectivamente con el fin de disminuir la intensidad de color del colorante

ya que este es de color verde intenso. La presentación del colorante es en polvo, este es un compuesto tipo ftalocianina metálica.

### 3.4 MIGRACIÓN Y SUS FUNDAMENTOS

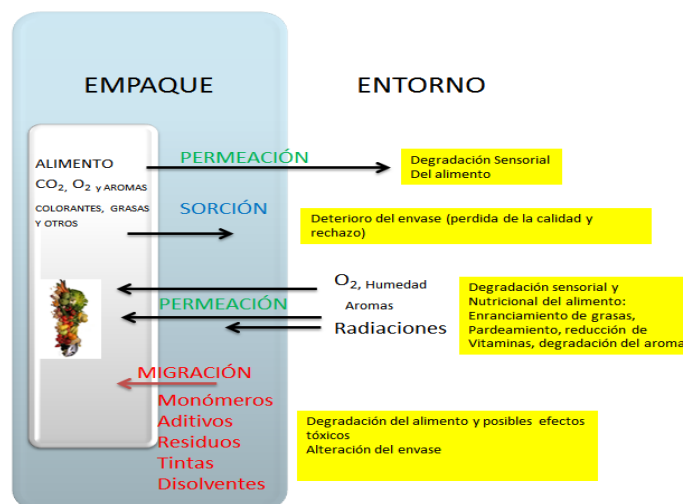
El concepto de migración se asocio a la aparición de los primeros empaques biodegradables activos, los cuales utilizan sustancias que cumplen ésta función, debido a que estas sustancias son las que en contacto con los alimentos pueden ser liberadas por fenómenos de transferencia de masa.

#### 3.4.1 Migración

La migración es la forma de interactuar de los empaques con los alimentos, estas formas de interactuar las cuales se muestran en la Figura 4 son llevadas a cabo por mecanismos de difusión, es decir por un proceso de transferencia de masa el cual se efectúa a favor de un gradiente de concentración desde el empaque hacia el alimento [Wong, S. Lao, O. 2001]. Este fenómeno de migración es un parámetro importante para tener en cuenta a la hora de implementar un nuevo empaque activo, ya que puede tener dos efectos principalmente en:

- Toxicidad: las sustancias empleadas en el empaque pueden ser perjudiciales para el consumidor si migran al alimento en concentraciones altas de acuerdo a su perfil toxicológico.
- Calidad: las sustancias migrantes pueden tener efectos favorables con el alimento de distintas formas, pueden servir como antioxidantes, mejorar la apariencia del producto entre otras.

**Figura 4.** Interacciones entre el Entorno-Envase-Alimento y sus consecuencias



En investigación el concepto de migración comprende otros dos conceptos como los son:

- **Migración Específica:** se refiere a la cantidad de una sustancia concreta, el límite de migración específica (LME) depende del perfil toxicológico de cada sustancia.
- **Migración Global:** es la cantidad total de sustancias conocidas o no que migran al alimento en determinadas condiciones. Límite de migración global (LMG) 10 mg/dm<sup>2</sup> o 60 mg/Kg [NTC 5022 (2003)].

### 3.4.2 Matemática de la migración

La migración al ser un proceso de difusión está controlada por la termodinámica y la cinética:

- **Termodinámica:** cómo será la transferencia de masa cuando el sistema esté en equilibrio.
- **Cinética:** que tan rápido se produce el proceso de migración [Silva, A. et.al. (2006)].

Tanto la cinética como la termodinámica pueden ser estudiadas por las leyes de difusión de Fick.

### 3.4.3 Ley de Fick

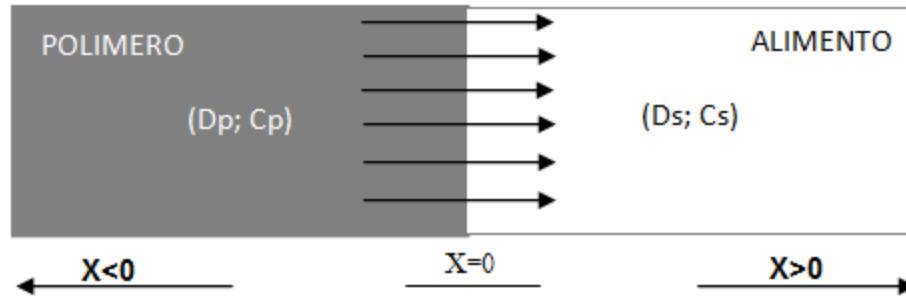
La ley de Fick, describe el proceso de difusión en función del tiempo, temperatura, espesor del material, la cantidad de químicos en el material y coeficiente de reparto y de distribución.

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

Considere un sistema ideal de dos fases que no interactúan, donde uno es el polímero y el otro es el producto alimenticio, en contacto como lo muestra la figura 5.



**Figura 5.** Proceso de migración en la interface polímero/alimento donde  $D_p$  y  $D_s$  son los coeficientes de difusión de la sustancia migrante en el polímero y el alimento respectivamente, y  $C_p$  y  $C_s$  son las concentraciones de la sustancia migrante en el polímero y alimento respectivamente [Wong, S. Lao, O. (1997)].



La interfaz de polímero y el alimento se encuentra en  $X = 0$ , y las dos fases se encuentran definidas en  $-X$  y  $X$ , respectivamente, y de sección transversal constante "área". Si los coeficientes de difusión de la sustancia migrante en la fase de polímero y la fase de los alimentos se denominan, respectivamente, por  $D_p$ , y  $D_s$ , entonces el proceso de migración puede ser descrito por las siguientes ecuaciones diferenciales como el conjunto de los límites y las condiciones iniciales siguiendo las leyes de Fick de difusión [Ding, S. Petuskey, Y. (1998); Wong, S. Lao, O. (1997)].

**Ecuación 1.**  $\frac{dc}{dt} = D_p \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$  Para  $X < 0$

**Ecuación 2.**  $\frac{dc}{dt} = D_s \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$  Para  $X > 0$

Donde  $C$  es la concentración de la sustancia migrante,  $t$  el tiempo de contacto  $C=C_0$  para  $X < 0$  y  $C=0$  para  $X > 0$  al  $t=0$ .

Aunque los modelos matemáticos de difusión son diversos (modelo de difusión Maxwell–Stefan entre otros) [Yan, S. Kun, Y. (2007)] según el tipo de estudio, las leyes de Fick son el parámetro para la evaluación de procesos de migración. Y la escogencia del modelo dependerá de las fases de estudio sea sólida líquida o gaseosa [Kuehl, O. (2001); Triantatlou, V. et. al. (2001); Yan, S. Kun, Y. (2007)], y solo bastara hacer el estudio matemático que tenga en cuenta las modificaciones del sistema migratorio [Ding, S. petuskey, T. (1998)]. Para la presente investigación la migración se determinó utilizando las leyes de Fick (ecuaciones 1,2).

### 3.5 REGULACIÓN Y NORMAS DE MIGRACIÓN EN EMPAQUES DESTINADOS A ESTAR EN CONTACTO CON ALIMENTOS.

Los estudios de migración deberán ser de principal atención, tanto para la industria de empaques activos como para el comerciante de los alimentos, y se centraran especialmente a que las sustancias a migrar sean inocuas o se encuentren en las listas de sustancias permitidas por las diferentes legislaciones, y cumplan con los límites de migración.

La evaluación de los límites de migración tanto específica como global son de suma importancia ya que la sustancia a utilizar como agente activo acompañara al empaque durante su vida útil y tendrá que comportarse de una forma adecuada con el fin de evitar riesgos a los consumidores.

Hay diferentes Normas y reglamentos que rigen la migración en plásticos destinados a estar en contactos con alimentos entre ellas La legislaciones de EU, EE.UU, y en Colombia por las Normas NTC.

#### 3.5.1 Regulación de los estados unidos EE.UU.

El ente regulador de la migración en los EE:UU es la *Food Additives Amendment to the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* (FFECA) de 1958, y de esta el departamento *Food and Drug Administration* (FDA). En ellas definen a las sustancias que pueden cambiar las características de alimentos (incluyendo agentes activos de empaques) como ADITIVOS alimentarios, esta definición cubre no solo a sustancias en contacto directo con los alimentos sino también a las sustancias provenientes de los empaques activos por migración [Heckman, J. (2005)].

La FDA dentro de la regulación brinda información química, perfiles toxicológicos y ambientales, donde se consideran factores de exposición para sustancias en contacto con alimentos (FCS por sus siglas en ingles), entre los que se encuentran los niveles de concentración para un aditivo en general como el mecanismo para la determinación de la migración según el tiempo de uso del empaque, es decir de un solo uso o de usos prolongados por más de una vez con el alimento.

Para el estudio de la migración la FDA los fija por uno o varios métodos

- Determinación de migración con el uso de simulantes alimenticios
- Modelos matemáticos de migración en los polímeros por tratamiento térmico prolongado de almacenamiento mediante uso real.

Las condiciones para la evaluación por uso de los empaques de las FCS como los son toma de muestra, perfiles de temperatura, escogencia de simulantes y tiempo de exposición son fijadas en protocolos por esta norma.

En la Tabla 3, se muestran los tipos de simulantes a escoger en estudios de migración según la descripción de las propiedades de cada alimento.

**Tabla 3.** Clasificación de los tipos de alimentos y simulantes recomendados [Barnes, K. et. al. (2007); EU 85/572/CEE (1988)].

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

Los protocolos para la fijación de perfiles de temperatura y tiempo de exposición van de acuerdo al tipo de empaque del que se esté tratando, como lo muestra la tabla 4.

**Tabla 4.** Tiempo y temperatura de extracción de acuerdo a condiciones de uso [Barnes, K. et. al. 2007; EU 85/572/CEE (1988)]

Designación	Descripción	Temperatura (°C) / tiempo (h)
Uso individual		
A	Una alta temperatura, el calor esterilizado o por encima de 100°C	120 / 2 ; 4 / 238
B	Hervir el agua esterilizada	100 / 2 ; 40 / 238
C	Llenado en caliente o pasteurizada por encima del 66°C	100 / 0.5 ; 40 / 239.5 o 66 / 2 ; 40 / 238
D	Llenado en caliente o pasteurizados por debajo de 66 °C	66 / 0.5 ; 40 / 239.5
E	Llenado y almacenado a temperatura ambiente (Sin tratamiento térmico en el envase)	40 / 240
F	Almacenamiento en refrigerador (sin tratamiento térmico en el envase)	20 / 240
G	Congelados (sin tratamiento térmico en el envase)	20 / 120
H	Almacenamiento refrigerado o congelado Alimentos previamente elaborados destinados a recalentarse en un contenedor en el tiempo de uso	100 / 2
Repita uso	Repetir el uso en contacto con los alimentos	Con la temperatura más alta y el tiempo más prolongado
Alto uso de Temperatura	Bandeja doble para horno	

### 3.5.2 Regulación en la Unión Europea (EU)

En la Unión europea (EU), existen dos legislaciones para materiales en contacto con alimentos, la legislación comunitaria la cual cubre toda la EU y la legislación Nacional adoptada por los miembros de cada estado.

#### 3.5.2.1 Legislación Comunitaria

Esta legislación contiene un conjunto de normas establecidas en un Reglamento Marco que solo son aplicables a ciertos materiales o sustancias determinadas.

El Reglamento Marco (EC) No 1935/20042 es la legislación comunitaria básica en ella se define lo que se entiende por el término “material a estar en contacto con alimentos” y establece requisitos mínimos para garantizar alimentos seguros y proteger la salud de los consumidores

- Los materiales en contacto con los alimentos no pueden poner en riesgo la salud Humana.
- Los materiales no cambiarán la composición de los alimentos, Sabor Olor y Textura de los mismos. [Barnes, K. et. al. (2007)].

### 3.5.3 Normas colombianas

Las normas colombianas se rigen según las Normas ISO de calidad, en estas se especifica algunos parámetros considerados en las legislaciones de EE.UU y la EU.

#### 3.5.3.1 NTC 5022

Esta norma establece el método para determinar la migración global de los compuestos no volátiles de los materiales o plásticos destinados a estar en contacto directo con alimentos o bebidas.

#### 3.5.3.2 NTC 4606

Esta norma específica un método para determinar la tendencia de los aditivos a migrar desde los plásticos en los que se encuentran, hacia otros materiales u otros plásticos, con los que se encuentran en contacto estrecho además de la toma y tratamiento de muestras.

## **3.6 TECNICAS INSTRUMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA MIGRACION**

Una vez se encuentran los protocolos para la determinación de la migración, se utilizan técnicas analíticas instrumentales para cuantificarla. Las técnicas a utilizar dependerán del tipo de analito. En este trabajo se utilizaron: técnica de cromatografía líquida de alta resolución HPLC, espectrometría UV, y Absorción Atómica (A.A).

La técnica HPLC es la técnica más efectiva a la hora de cuantificar variedad de analitos para nuestro caso la cuantificación de capsaicina [Schwdiggert, U. et. al. (2006)]. Los parámetros utilizados para las técnicas antes mencionadas fueron tomados de un trabajo previo [Perdomo, A. Pizo, V. (2010)].

La confiabilidad o validez para los métodos de cuantificación de nuestros analitos de interés (capsaicina y colorante) para las técnicas HPLC y UV se determinaron por medio de estudios de Precisión. [Perdomo, A. Pizo, V. 2010; Skoog, D. et. al. (2001)].

### 3.6.1 Precisión

La precisión mide el grado de concordancia entre una serie de medidas repetidas a partir de una única muestra, este parámetro se puede estudiar evaluando dos parámetros más la repetibilidad y la precisión intermedia.

### 3.6.2 Repetibilidad

Esta estudia la variabilidad de las medidas de un método sobre una única muestra en diferentes condiciones de operación es decir tomadas por un mismo analista en el mismo equipo y laboratorio en un periodo de tiempo corto.

### 3.6.3 Precisión Intermedia

Este parámetro estudia la variabilidad de las medidas del método sobre una misma muestra en condiciones operativas diferentes es decir diferente analista en el mismo equipo y laboratorio pero a diferentes días (periodo de tiempo mayor que la repetibilidad).

### 3.6.4 Linealidad

Este es un parámetro importante y con ello estudio de la capacidad del método para brindar resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de los patrones del analito dentro de un rango establecido. De acuerdo con los datos de calibración de los equipos es importante junto con la linealidad determinar cuál es el valor mínimo de concentración que se puede detectar y cuantificar con el método por medio de los límites de detección y cuantificación LOD y LOQ respectivamente.

### 3.6.5 Límite de detección LOD

Este es el valor mínimo de concentración que se puede detectar. Esta se expresa en unidades de concentración [Skoog, D. et. al. (2001)].

### 3.6.6 Límite de cuantificación LOQ

Este es el valor mínimo de concentración que se puede cuantificar con exactitud y precisión en las condiciones de evaluación, también se expresa en unidades de concentración [Skoog, D. et. al. (2001)].

## **3.7 DISEÑO DE EXPERIMENTOS FUNDAMENTOS PARA EL ANALISIS ESTADISTICO.**

En la experimentación el investigador se encontrará con varios factores que de una u otra forma afectará la obtención de valores, es de suma importancia analizar que tipos de factores podrían causar algún efecto en la respuesta de los datos y para evaluar esto, tenemos a disposición el diseño de experimentos que evaluará las interacciones entre diversos factores y

con estos tomar decisiones sobre la optimización de los procesos que se llevan a cabo en las etapas de experimentación.

### 3.7.1 Diseño de experimentos (DDE)

El diseño de experimentos es una metodología basada en matemática aleatoria y estadística, con el fin de analizar factores que intervienen en un experimento y se basa en la planeación de un conjunto de pruebas experimentales que se puedan analizar estadísticamente para obtener conclusiones confiables de un proceso investigativo.

En los DDE intervienen generalmente tres tipos de variables que se definen como:

- Factores: son cualquier influencia que afecte a la respuesta, esta se controla por el investigador.
- Nivel de un factor: son los valores de ajuste que toma un factor definido.
- Variable respuesta: es la variable de interés, es la media cuantitativa después de un tratamiento donde intervienen uno o más factores.

Entre los diversos modelos de DDE, los más populares son los Diseños factoriales.

### 3.7.2 Diseños Factoriales $2^k$

Los Diseños factoriales  $2^k$ , son diseños que cruzan de forma aleatoria los factores, en estos diseños el valor 2 indican los niveles que toma cada factor es decir un Máximo denotado como +1, y un Mínimo -1 y k el número de factores. Un ejemplo común de este tipo de diseños son los experimentos  $2^3$ , como el mostrado en la tabla 5 con un total de 8 experimentos.

Con el fin de estudiar la varianza y la robustez del experimento se emplean métodos de experimentación llamados diseños centrales compuestos (DCC), y su base matemática se centra en los experimentos a dos niveles  $2^k$ , estos DCC contienen un conjunto de datos llamados puntos centrales para determinar la desviación del método experimental además de otro conjunto de datos ubicados sobre los ejes llamados puntos estrella con los cuales se estudia la robustez del diseño experimental [Álvarez, H. (2000)].

**Tabla 5.** Diseño de experimentos  $2^3$ , factores codificados

Factores				
Experimento	A	B	C	Respuesta
1	-1	-1	-1	$Y_1$
2	1	-1	-1	$Y_2$
3	-1	1	-1	$Y_3$
4	1	1	-1	$Y_4$
5	-1	-1	1	$Y_5$
6	1	-1	1	$Y_6$
7	-1	1	1	$Y_7$
8	1	1	1	$Y_8$

En una buena interpretación de los resultados obtenidos en la etapa de diseño experimental, se encuentra la credibilidad de dichos resultados, este se da en apoyo a formulaciones matemáticas de probabilidad que conocemos como estadística. La estadística es la herramienta más eficaz para la interpretación de datos, ya que con ella se puede ver el comportamiento de los mismo entre sí, o comparándolos con otro conjuntos de datos de diferentes tratamiento experimentales. En nuestras épocas la estadística es de uso común en investigación y con ello se ha creado gran variedad de software que contienen paquetes estadísticos en los cuales el investigador toma sus conclusiones.

El análisis de los resultados obtenidos por el diseño experimental consiste de estudiar los efectos que tienen los factores. El efecto de un factor es la respuesta medida ocasionada por un cambio en el nivel de ese factor. Los tres efectos de interés en un experimento factorial son los efectos simples, principales, y los de interacción [Levaggi, M. (2005)], descritos a continuación:

### 3.7.2.1 Efectos simples

Los efectos simples de un factor son las comparaciones entre los niveles de un factor a un solo nivel del otro. Según la tabla 5, los efectos simples del factor A son los cambios de este factor manteniendo los factores A y B constantes, estos efectos para el factor A se muestran en la tabla 6.



**Tabla 6.** Efectos simples para el factor A de un diseño  $2^3$

Factores		Cambio de factor A		Efecto simple
B	C	-1	1	
-1	-1	Y1	Y2	Y2-Y1
1	-1	Y3	Y4	Y4-Y3
-1	1	Y5	Y6	Y6-Y5
1	1	Y7	Y8	Y8-Y7

### 3.7.2.2 Efectos Principales

Los efectos principales de un factor son comparaciones entre los niveles de un factor promediados para todos los niveles de otro factor, es decir es el promedio de sus efectos simples. El efecto principal del factor A según la tabla 6, será:

$$\text{Efecto principal del Factor A} = \frac{1}{4} [(Y2 - Y1) + (Y4 - Y3) + (Y6 - Y5) + (Y8 - Y7)]$$

### 3.7.2.3 Efectos de interacción

Los efectos de interacción miden las diferencias entre los efectos simples de un factor a diferentes niveles de otro. Es decir el factor A interactúa con el factor B si la respuesta de los dos niveles del factor A, son distintas para un nivel de B.

Matemáticamente para calcular la interacción AB se calcula primero el promedio de los efectos simples de A cuando B=-1 y cuando B=1 de la siguiente forma:

$$\text{Efecto simple de A (B=-1)} = \frac{1}{2} [(Y2 - Y1) + (Y6 - Y5)]$$

$$\text{Efecto simple de A (B=1)} = \frac{1}{2} [(Y4 - Y3) + (Y8 - Y7)]$$

Con los efectos simples de A con respecto a los niveles de B, el efecto principal AB será el promedio de estos dos efectos anteriores:

$$\text{Interacción AB} = \frac{1}{2} [A(B = -1) + A(B = +1)]$$

Para el cálculo de los efectos en la presente investigación se utilizó el paquete estadístico MINITAB ver 15.1.20.0 desarrollado por Minitab inc. Permite crear el esquema experimental con su respectivo análisis, dando la información a través de los gráficos de los efectos principales y de interacción [David, G., Yushimato, F. (2004)].

### 3.8 MANEJO ESTADISTICO DE DATOS

Uno de los aspectos más importantes en cualquier tratamiento de datos es el contraste de hipótesis el cual se puede realizar con un paquete estadístico llamado SPSS V 17.0.0 desarrollado por WinWrapBasic. Para el contraste de hipótesis en el caso de variables cuantitativas se cuenta con dos tipos de análisis:

- Paramétricos: que proceden de un modelo que obliga a cumplir ciertos supuestos acerca de los parámetros y la distribución de probabilidad de la población de la que se extrajo la muestra.
- No paramétricos: son menos restrictivos para poder ser aplicados.

La estadística paramétrica es más precisa, pero las posibilidades de ser aplicada están limitadas y para ser utilizadas los datos tienen que pasar por la comprobación de requisitos de distribución de la población o pruebas de normalidad como:

#### 3.8.1 Distribución Normal de las Poblaciones (Prueba de Shapiro-Wilk)

Para la comprobación de la hipótesis de normalidad se puede emplear la prueba de Shapiro-Wilk. Este es el primer parámetro que se debe aplicar para poder hacer un análisis de varianza ANOVA; es importante 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 es posible y se deba utilizar otro tipo de variables. Así que para saber si los datos obtenidos tienen un comportamiento normal, se plantea lo siguiente:

La hipótesis nula **H<sub>0</sub>**: “el conjunto de datos sigue una distribución normal”. Y La hipótesis alternativa **H<sub>1</sub>**: “el conjunto de datos no sigue una distribución normal”.

Considerando una muestra aleatoria que procede de cierta distribución desconocida denotada por F(x). Se quiere verificar si dichos datos fueron generados por un proceso normal, mediante las hipótesis estadísticas mencionadas anteriormente.

Se calcula el estadístico W [Gonzales, G. (2011)] definido como en la ecuación 3.

**Ecuación 3.** 
$$W = \frac{1}{(n-1)s^2} [\sum_{i=1}^k ai(X_{(n-i+1)} - x_i)]^2$$

Donde  $s^2$  es la varianza muestral. Finalmente si el valor del estadístico es mayor que su valor crítico al nivel  $\alpha$  seleccionado se rechaza la normalidad de los datos. Pero si (teniendo en cuenta el número de muestras y la tabla de valores críticos ya tabulados), el W calculado 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.

### 3.8.2 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 determinada la comprobación de la normalidad de los datos, se debe determinar si las varianzas en tales muestras son iguales (es decir, si se cumple la condición de homogeneidad de varianzas u homoscedasticidad), ya que de que se cumpla o no esta condición dependerá la formulación que empleemos en el contraste de medias. En la presente investigación desarrollaremos la prueba de Levene que es la que emplea SPSS. Para su cálculo se realiza la comprobación de Igualdad de Varianzas definiendo el estadístico de prueba de Levene [Correa, J., Rojas, L. (2006)] como se muestra en la ecuación 4.

**Ecuación 4.**

$$W = \frac{(n-k) \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Z}_i - \bar{Z})^2}{(k-1) \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_i} (Z_{ij} - \bar{Z})^2}$$

Donde  $Z_{ij}$  puede tener las siguientes definiciones:

1.  $Z_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$  donde  $X_i$  es la media del  $i$  – ésimo subgrupo.
2.  $Z_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i^*|$  donde  $X_i$  es la mediana del  $i$  – ésimo subgrupo
3.  $Z_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i^*|$  donde  $X_i$  es la media recortada de los  $Z_{ij}$

Al realizar el cálculo de  $W$  y si el valor calculado da mayor que el valor tabulado, para un valor crítico superior de la distribución  $F$  con  $k - 1$  grados de libertad en el numerador y  $N - k$  Grados de Libertad en el denominador a un nivel de significancia  $\alpha$ , la hipótesis nula se rechaza. Dónde:

$k$  =Número de muestras

$n_i$  =Tamaño de la  $i$  èsima

$S_i^2$  =Varianza estimada para la  $i$  èsima población a partir de una muestra de tamaño  $n_i$ .

$$N = n_1 + n_2 + \dots + n_k$$

$S^2$  =Varianza total estimada

### 3.8.3 Análisis de varianza (ANOVA)

Luego de comprobar la normalidad de los datos y la homogeneidad de las muestras, se intenta 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 [Aguayo C., Lora, M. (2007)].

### 3.8.3.1 Correlación de Pearson

La correlación es una técnica matemática que evalúa la asociación o relación entre dos variables cuantitativas, tanto en términos de direccionalidad como de fuerza o intensidad, proporcionando un coeficiente de correlación ( $r$  de Pearson). La regresión lineal simple [Aguayo C., Lora, M. (2007)] 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.

Ambas técnicas, basadas en la media y en la varianza de las variables evaluadas, tienen importantes condiciones de aplicación, entre las que destacan la independencia de las observaciones y la normalidad, disponiéndose de alternativas no paramétricas (como el coeficiente  $\rho$  de Spearman) para la correlación cuando estas no se cumplen.

La correlación evalúa la fuerza de asociación entre las variables, de forma similar indicando además 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) [Aguayo C., Lora, M. (2007)].

El coeficiente de correlación  $r$  de Pearson [Aguayo C., Lora, M. (2007)]. 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, solo 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 lo 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

El análisis de regresión lineal empieza siempre por un ANOVA [Aguayo C., Lora, M. (2007)], 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 precisamente:

$$H_0: \beta_0 = 0$$

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  $H_0: \beta_0 = 0$  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.

Si se utiliza como criterio de rechazo la comparación de la significancia observada (*p-value*) contra la significancia predefinida  $\alpha$ , entonces se rechaza la  $H_0$  si  $p\text{-value} < \alpha$ , donde en este caso *p-value* es el área bajo la curva, fuera del intervalo  $[-t_0, t_0]$  de la función de densidad de distribución t-Student con  $n-2$  grados de libertad, es decir si  $t_0 > 0$   $p\text{-value} = \Pr(T < -t_0) + \Pr(T > t_0)$ .

### 3.8.3.2 Análisis de varianza del modelo de regresión

Otro enfoque para analizar la significancia del modelo es descomponer la variabilidad observada, y a partir de ello probar la hipótesis. Efectivamente la variabilidad total observada en la variable de respuesta puede ser medida a través de  $S_{yy}$  que está dada por la siguiente expresión:

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

El primer componente de  $S_{yy}$ , se denota por:

$$SC_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

Y mide la variabilidad explicada por la recta de regresión, y se le conoce como la suma de cuadrado de regresión.

El segundo componente de  $S_{yy}$ , se denota por

$$SC_E = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Y mide la variabilidad no explicada por la recta de regresión y se le conoce como la suma de cuadrado de error.

De esta manera, la ecuación toma la siguiente forma:

$$S_{yy} = SC_R + SC_E$$

A partir de esta ecuación podemos ver los grados de libertad para estas sumas de cuadrados:  $S_{yy}$  tiene  $n-1$  grados de libertad,  $SC_R$  tiene 1 grado de libertad, mientras que  $SC_E$  tiene  $n-2$ . Por tanto al dividir las sumas de cuadrados entre sus grados de libertad obtenemos los cuadrados medios:

$$CM_E = SC_E / (n-2) \text{ y } CM_R = SC_R / 1$$

Todo lo anterior podemos utilizarlo para generar otra forma de probar la hipótesis sobre la significancia de la regresión:

$$H_0: \beta_0 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Ya que si  $H_0$  es verdadera, entonces el siguiente estadístico:

**Ecuación 5.**

$$F_0 = \frac{SC_{R/1}}{SC_E/(n-2)} = \frac{CM_R}{CM_E}$$

Tiene una distribución F con 1 y  $n - 2$  grados de libertad en el numerador y denominador respectivamente. Por tanto, se rechaza  $H_0: \beta_0 = 0$ , si el estadístico de prueba es mayor que el valor crítico correspondiente, es decir, se rechaza  $H_0$  si  $F_0 > F_{(\alpha, 1, n-2)}$ .

Esta forma de probar la significancia de la regresión, en el caso de la regresión lineal simple, es equivalente a la establecida a través del estadístico t – Student, ya que elevando su ecuación correspondiente al cuadrado, obtenemos:

$$t_0 = \frac{\widehat{\beta}_1}{\sqrt{CM_E/S_{xx}}}$$

$$t_0^2 = \frac{\widehat{\beta}_1^2 S_{xx}}{CM_E} = \frac{\widehat{\beta}_1 S_{xy}}{CM_E} = \frac{CM_R}{CM_E} = F_0$$

Esto se debe a que en general, el cuadrado de una variable aleatoria t – Student con k grados de libertad, tiene una distribución  $F_{(1, k)}$ .

Cuando los valores p dan menores a 0,05, entonces se debe rechazar las hipótesis nulas para ambos parámetros (intercepto y pendiente), por lo que se concluye que tanto  $\beta_0$  como  $\beta_1$  son significativamente diferentes de cero. Esto también se podría ver a través del método del valor crítico, ya que trabajando con un nivel de significancia de 0,05, y como se trabaja con una hipótesis de dos colas, entonces de acuerdo a las tablas del apéndice el valor crítico para cada parámetro a evaluado debe ser menor que el valor de los estadísticos encontrados. De aquí que se llegue a la misma decisión que por el método del valor p ó *p - value*.

Sin embargo la predicción que realiza el modelo de regresión lineal no es perfecta y siempre queda algo sin explicar. Este “algo sin explicar” es la varianza residual que aparece en la tabla del ANOVA [Aguayo, C., Lora, M. (2007)].

### 3.8.3.3 Estudio de la Línea de tendencia central

Para la evaluación de la líneas de tendencia central para las curvas de calibrado se utilizó el software de calculo microsoft excell 2007 desarrollado por Microsoft Corp. con esta se determinó las ecuaciones de las curvas tanto para capsaicina como para colorante.



## 4. METODOLOGÍA

A continuación se describe la metodología utilizada en la determinación de la migración de capsaicina y colorante empleando las técnicas analíticas de HPLC y UV respectivamente.

### 4.1. REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL DE VIDRIO Y PLASTICO

Los reactivos utilizados en la parte experimental fueron grado analítico para realizar la cuantificación de capsaicina por HPLC, colorante por Ultravioleta visible y metales por absorción atómica. Los equipos utilizados para el estudio de la migración de capsaicina, colorante y metales en el biopolímero se encuentran en la Unidad de Análisis Industriales de la Universidad del Cauca.

#### 4.1.1 Reactivos

- Aceite de girasol
- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC (Merck)
- Ácido Acético 99-100% Glacial P.A. (Merck)
- Agua al 1% de Ácido Acético, pH = 2,7
- Alcohol Etílico Absoluto (Etanol) P.A. (Merck)
- Capsaicin≥95%, from Capsicum sp. (SIGMA)
- Cloroformo Para Análisis (Merck)
- Metanol grado HPLC (Merck)
- Oleoresina de capsicum 20% (CAPSAICIN)

#### 4.1.2 Equipos

- Balanza analítica Precisa XT 220<sup>a</sup>, (220 g / 0.0001 g)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) HEWLETT PACKARD 1100, Desgasificador G 1322<sup>a</sup>, Bomba Cuaternaria G 1311<sup>a</sup>, Detector UV-VIS G1314A, Columna LC Agilent Prep-C18 Scalar; 4.6 x 250 mm, 5 μm
- Equipo de Absorción Atómica, THERMO ElectronCorporation, S Series AA Spectrometer
- Espectrofotómetro Ultravioleta Visible THERMO, GENESIS 6
- Estufa, FISHER SCIENTIFIC
- Incubadora Refrigerada, PRECISION, Modelo 815
- Vortex (Thermolyne tupo 37600 mixer)

#### 4.1.3 Material de Vidrio y Plástico

- Balones aforados clase A, Brand de 10, 25, 50 mL
- Botellas Winkler, Wheaton 300 mL

- Erlenmeyer de 125 mL
- Frascos ambar 60 mL
- Micropipeta 50-200  $\mu$ L
- Pipeta graduada clase A, Brand de 2 y 25 mL
- Probeta 100 mL
- Viales plásticos 2 ml

## **4.2 VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO**

En el marco de control de medios de análisis según ISO IEC/17025 (estándar utilizado por los laboratorios de ensayo y calibración), se exigen el conocimiento y la documentación de la precisión y tolerancia de medición de todos estos medios antes de autorizar su empleo. Para la calibración del material de vidrio se realizaron diez mediciones utilizando como solvente de calibración agua destilada con densidad 0.99 g/mL que fue determinada con el método del picnómetro.

Para la calibración de los balones aforados se utilizó un protocolo de estandarización 48 certificados por la ISO 9001-14001.

## **4.3 PREPARACION DE SOLUCIONES ESTANDAR**

### **4.3.1 Curvas para el equipo de HPLC**

#### **4.3.1.1 Preparación de la curva de capsaicina en Acetonitrilo**

Inicialmente se preparó una curva por triplicado de capsaicina en 100% Acetonitrilo la cual se refrigeró y pasó por el equipo de HPLC para evaluar repetibilidad (tres inyecciones durante el día) y precisión intermedia (día por medio durante diez días), los niveles de la curva fueron: 0.098, 0.294, 0.51, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00 ppm.

#### **4.3.1.2 Preparación de la curva de capsaicina en los diferentes simulantes**

Con el fin de evaluar la estabilidad del compuesto activo y de garantizar que la cantidad de capsaicina cuantificada como resultado del proceso de migración correspondiera con el valor real de la migración, se prepararon curvas por triplicado de capsaicina en los simulantes A, B y C (agua, ácido acético, etanol respectivamente) las cuales se refrigeraron y se analizaron el primer y décimo día.

- Determinación de la cinética de disminución en simulantes

Para evaluar la estabilidad de la capsaicina en los diferentes simulantes, se prepararon nuevamente las curvas por triplicado en cada uno de ellos y se sometieron a las dos temperaturas establecidas por las normas (25 y 40°C), analizándolas por el equipo de HPLC día por medio durante 10 días (tiempo de duración del estudio de la migración) determinando de esta manera la cinética de disminución de la capsaicina.

No se realizaron curvas en el simulante D (aceite), ya que en la estandarización de la Extracción líquido-líquido el solvente que presentó los mejores resultados en cuanto a la recuperación fue el Metanol, por esta razón los resultados obtenidos por extracción del simulante D se cuantificaron utilizando las curvas de calibrado para el simulante C ya que estos poseen un comportamiento químico similar al ser alcoholes.

#### **4.4 CURVAS PARA EL EQUIPO DE UV-VIS**

Inicialmente se empezó con pruebas de solubilidad del masterbach (colorante) y al encontrar que este no es soluble sino cuando está incorporado en la mezcla binaria (MB) se realizaron estas mismas pruebas a la muestra *MB + Masterbach*. La curva se preparó en el solvente que mayor solubilidad presentó (Cloroformo), se efectuó por triplicado y se analizó día por medio durante 10 días para evaluar repetibilidad y precisión intermedia.

Para la lectura de la curva y de las muestras por el equipo de Ultravioleta Visible fue necesario estandarizar el tiempo de agitación debido a una alta variabilidad de respuesta del equipo al no agitarse adecuadamente la muestra.

##### **4.4.1 Curvas de colorante**

###### **4.4.1.1 Estandarización del tiempo de agitación para la curva de colorante**

Se prepararon cinco patrones de la misma concentración de la curva de colorante en cloroformo, cada uno se agito a diferentes tiempos 1, 3, 5, 10 y 15 minutos y se tomo por triplicado la absorbancia, se escogió el tiempo de agitación adecuado cuando la diferencia de absorbancias no fue significativa de un patrón con el otro.

###### **4.4.1.2 Preparación de la curva de colorante en cloroformo**

Se preparó por triplicado una curva en cloroformo con niveles de: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, ppm de colorante, la cual fue refrigerada. Para este caso la curva no fue analizada a las dos temperaturas como para la capsaicina debido a que por tratarse de un solvente altamente volátil las pérdidas de solvente serían

muy altas; posteriormente se llevo a agitación durante 5 minutos para homogenizar la solución y se tomó la lectura en el equipo. La curva se analizó por el equipo de UV-Vis por triplicado día por medio durante diez días con el objetivo de evaluar la repetibilidad y precisión intermedia.

#### 4.5 PARAMETROS DE CALIDAD PARA LAS TECNICAS ANALITICAS EN HPLC Y UV-VIS

Ciertos parámetros para el equipo de HPLC como fase móvil, flujo, tiempo de retención y para el equipo de Ultravioleta-Visible la longitud de onda fueron establecidos en un anterior trabajo a este. [Perdomo, A. Pizo, V. (2010)]. Estos parámetros fueron empleados en el actual trabajo y son reportados en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Parámetros de calidad para las técnicas en HPLC y UV

Equipo de HPLC	Equipo de UV-Vis
Fase móvil: ACN : agua/ ácido acético 80:20 Flujo: 0.9 ml/min Tiempo de retención de la capsaicina 4.4 min	Longitud de onda es de 665 nm

De igual manera en el presente trabajo se evaluaron otros parámetros de calidad tanto para HPLC como para UV-Vis, como son límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad y precisión intermedia.

##### 4.5.1 Limite de detección y cuantificación

###### 4.5.1.1 Límite de detección

Para establecer el límite de detección (LOD) de los equipos se hizo por medio de curvas de calibración, utilizando la ecuación 6:

**Ecuación 6.** 
$$LOD = \frac{3 \times S_{intercepto}}{promedio\ pendiente}$$

Dónde:

S es la desviación estándar del intercepto

###### 4.5.1.2 Límite de cuantificación

Para el límite de cuantificación (LOQ), se multiplicó por 10 el valor de la desviación del intercepto sobre el promedio de la pendiente, como lo muestra la ecuación 7.

**Ecuación 7.** 
$$LOQ = \frac{10 \times S_{intercepto}}{promedio\ pendiente}$$

## 4.5.2 Repetibilidad y precisión intermedia

### 4.5.2.1 Repetibilidad

Se preparó una curva por triplicado y se analizó en el respectivo equipo realizando tres inyecciones de cada nivel de concentración por el mismo analista en el mismo día.

### 4.5.2.2 Precisión intermedia

Para evaluar la precisión intermedia las muestras fueron analizadas diferentes días por diferente analista en el mismo equipo, día por medio durante los diez días del proceso de evaluación de migración.

## 4.6. PREPARACION DE MUESTRA

El biopolímero fue preparado en el laboratorio de Reología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, obtenido por un proceso de extrusión de tornillo simple (Thermo Scientific Poly Lab OS), una vez es conseguida la materia prima se procedió a someterla según las normas Colombiana y Europea para determinar la migración global y específica de capsaicina y colorante, se recolectaron 17 muestras en presentación de película debido al diseño experimental que se implementó en dicho laboratorio, con 8 primeras muestras para el diseño, seguida de tres puntos medios y seis estrella, para evaluar parámetros de preparación industrial que se presenta en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Diseño experimental de preparación del polímero

ORDEN	TRATAMIENTO	PERFIL DE T	% CAPSAICINA	% MEZCLA
1	[-1]	140 - 145 -150 -145	0,4	20
2	a	140 - 145 -160 -155	0,4	20
3	b	140 - 145 -150 -145	0,6	20
4	ab	140 - 145 -160 -155	0,6	20
5	c	140 - 145 -150 -145	0,4	30
6	ac	140 - 145 -160 -155	0,4	30
7	bc	140 - 145 -150 -145	0,6	30
8	abc	140 - 145 -160 -155	0,6	30
9	0	140 - 145 -155 -150	0,5	25
10	0	140 - 145 -155 -150	0,5	25
11	0	140 - 145 -155 -150	0,5	25
12	*	140 - 145 -155 -150	0,5	33,41
13	*	140 - 145 -155 -150	0,6682	25
14	*	140 - 145 - 163,41 -158,41	0,5	25
15	*	140 - 145 -155 -150	0,5	16,59
16	*	140 - 145 -155 -150	0,3318	25
17	*	140 - 145 -146,59 -141,59	0,5	25

En la evaluación de la migración, se reemplazó el perfil de temperatura de extrusión por las temperaturas para la evaluación de la migración (25 y 40°C) para desarrollar un diseño 2<sup>3</sup>.

La muestra fue cortada en cuadros y pesada por triplicado (0.5 g aprox.) para ser sumergida en cada simulante por duplicado A, B, C, o D, durante 10 días a dos temperaturas (25 y 40°C) y posteriormente cuantificar la migración de capsaicina, colorante y metales.

#### 4.6.1 Preparación de blancos

Debido a que el biopolímeros es el resultado de la unión de dos compuestos, uno que contiene Mezcla Binaria (MB) + Masterbach (colorante) y un segundo que contiene Almidón de yuca modificado (TPS) + Capsaicina, se hace necesario analizar tres blancos, que contengan:

- a. Mezcla binaria sin colorante: presentación en pellet, analizado por UV-Vis y absorción atómica
- b. TPS sin capsaicina: presentación en pellet analizado por HPLC y absorción atómica
- c. Mezcla binaria + TPS: presentación película, analizado en por UV-Vis y HPLC y absorción atómica

Los tres blancos fueron analizados por triplicado en los cuatro simulantes (agua, a. acético 3%, etanol 15% y aceite) a las dos temperaturas indicadas por las normas (25 y 40°C) y evaluados en las técnicas respectivas por triplicado.

Para determinar si hubo alteración de la máxima absorbancia a la longitud de onda establecida (665 nm) por parte del simulante graso, se realizó un barrido desde 500 a 800 nm a patrones y a algunas muestras, estas absorbancias fueron comparadas con los resultados a la establecida y se encontró que no hubo alteraciones de matriz; por lo que se decidió no hacer su debida extracción sino pasarlas directamente al equipo de Ultravioleta-Visible.

#### 4.6.2. Diseño experimental

Teniendo en cuenta las muestras obtenidas, se estableció un diseño experimental en el cual se evaluaron los parámetros necesarios en cada uno de los diferentes polímeros obtenidos con las cuales se realiza un propio diseño experimental que varía temperatura ambiente (25 y 40°C) preparadas por duplicado y analizadas por triplicado los días cuarto, séptimo y décimo día de migración; en los cuatro simulantes (agua, ácido acético 3%, etanol 15% y aceite) posteriormente algunas de las muestras son sometidas a la determinación de metales pesados por absorción atómica debido a la modificación del almidón de yuca.

#### 4.6.3 Evaluación de la migración

La materia prima es sumergida completamente en 120 mL de cada uno de los simulantes establecido por las normas:

**Simulante A:** agua destilada

**Simulante B:** ácido acético 3% (p/v) en solución acuosa

**Simulante C:** etanol 15% (v/v) en solución acuosa

**Simulante D:** aceite de girasol

##### 4.6.3.1 Migración global

Se determinó por diferencia de pesos antes de y después del proceso de inmersión teniendo en cuenta el porcentaje de humedad higroscópica del biopolímero, el porcentaje de migración global está dado por la siguiente ecuación:

**Ecuación 8.** 
$$\% mg = \frac{p_i - p_f}{p_i} \times 100$$

##### 4.6.3.2 Migración específica

Se refiere a la cantidad de una sustancia concreta e identificable que es transferida al alimento. Los límites de migración específica (LME) de toxicidad dependen de la sustancia concreta. La migración específica se determinó por análisis en los diferentes equipos, teniendo en cuenta las curvas de los estándares, y los respectivos blancos.

Debido a que no es posible pasar el simulante graso por el equipo de HPLC, fue necesario estandarizar una técnica de extracción líquido-líquido para poder cuantificar la migración en éste.

- Estandarización de la técnica de extracción líquido-líquido

Cuando la muestra terminó el periodo de migración (al cabo de 10 días), fue necesario realizar pruebas de extracción al simulante graso con diferentes solventes a diferentes tiempos y volúmenes para poder cuantificar la migración de capsaicina por el equipo de HPLC.

Para determinar el porcentaje de recuperación se preparó un patrón al 0.5% p/p de capsaicina, el cual se dividió en 4 partes de 20mL y a cada una de ellas se le realizó la extracción a diferentes tiempos y volúmenes escogiendo los parámetros ideales, la tabla 9 muestra las condiciones estudiadas.

**Tabla 9.** Parámetros para la extracción líquido- líquido

Análisis	Tiempo de agitación (min)	Número de extracciones
1	5	5
2	5	10
3	10	5
4	10	10

El solvente utilizado se escogió en pruebas preliminares al realizar la extracción con iguales parámetros (tiempo, número de extracciones) y diferentes solventes, que presentara mayor área del pico de interés, los solventes utilizados fueron: cloroformo, etanol, metanol, acetato de etilo.

#### **4.7. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EVALUADOS EN LA MIGRACIÓN**

##### **4.7.1 Determinación de Capsaicina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Las muestras tratadas por duplicado a las temperaturas establecidas en los cuatro simulantes fueron analizadas por el equipo de HPLC los días cuarto, séptimo y decimo por triplicado durante el proceso de migración.

##### **4.7.2 Determinación de colorante por espectroscopia de ultravioleta-visible**

Las muestras fueron analizadas por el UV-Vis, teniendo en cuenta que las muestras que están sumergidas en aceite no requieren de extracción antes de ser analizadas por el equipo, debido a que algunos de los patrones se pasaron por el equipo y no se observó corrimiento de la longitud de onda de máxima absorción.

##### **4.7.3 Determinación de metales por espectrometría de absorción atómica**

Para la cuantificación de metales se utilizó la técnica de espectrometría de absorción atómica, como sistema de atomización horno de grafito en la cuantificación de Pb, Cd, Se y generador de hidruros para la cuantificación de Hg a diferentes muestras en su cuarto, séptimo y décimo día de inmersión para establecer si hay posible contaminación por metales durante su proceso de migración. Éstos metales fueron establecidos debido al proceso de modificación del almidón.



#### **4.8 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE RESULTADOS**

Se utilizó el paquete estadístico SPSS para evaluar la normalidad (Shapiro Wilk) de los datos y establecer las pruebas que se deben aplicar ya sean paramétricas o no paramétricas.

Para el análisis del diseño de experimentos se utilizó el paquete estadístico MINITAB versión 15.1.20.0 desarrollado por Minitab inc, el cual permite crear el esquema experimental con su respectivo análisis, dando la información a través de los gráficos de superficie de respuesta, efectos principales y de interacción

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes secciones se presenta y se evalúa los resultados obtenidos en la determinación de la migración de capsaicina y colorante en el polímero biodegradable usado.

### 5.1 VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO

Según los datos obtenidos en la calibración del material de vidrio, se observa que la incertidumbre asociada al método es aceptable (0.34% en la determinación de capsaicina por HPLC y colorante de 0.57% por UV), siguiendo con el protocolo de estandarización los resultados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Calibración del material de vidrio

Material	Valor Aforo (mL)	Valor Real (mL)	Intervalo de Confianza
Balón	10.00	9.96	±4,85E-03
aforado	25.00	24.90	±1,16E-02
	50.00	49.82	±2,79E-04
Pipeta	2.00	2.00	±1,07E-04
graduada	25.00	25.00	±8,62E-05

Se utilizaron 3 balones de 10 mL para la preparación de las diferentes curvas, los tres se calibraron (10 datos para cada uno) y su coeficiente de variación es < 5.0% por lo que se decidió trabajar con su promedio (t para 30 datos); de igual manera se realizó para 2 balones de 25 mL (t para 20 datos). Para el balón de 50 mL y las pipetas, se utilizó un solo instrumento (t para 10 datos).

T tabulado para el 95% de confianza:

Para 30: 1.6973

Para 20: 1.7247

Para 10: 1.8125

De lo anterior se tiene que el coeficiente de variación del método es:

$$S = 0.034$$

Aplicando la fórmula:

**Ecuación 9.** 
$$S = \sqrt{S1^2 + S2^2}$$

Teniendo en cuenta que las curvas de capsaicina se preparan a partir de 0.1g del patrón, el coeficiente de variación del método para la cuantificación de migración de capsaicina por HPLC es del 0.34% y para la cuantificación

de migración de colorante, las curvas se prepararon a partir de 0.06 g de colorante, el coeficiente de variación para el método es de 0.57%.

## 5.2 PREPARACION DE SOLUCIONES ESTANDAR

Para la cuantificación tanto de capsaicina como de colorante se obtuvieron resultados del triplicado de la curva día por medio durante diez días, debido a esto los resultados mostrados en el análisis estadístico corresponden a resultados para días aleatorios de medición en el estudio de la respetabilidad, los resultados de los demás días se mostrarán en el apartado Anexos 1al 10.

### 5.2.1 Curvas para el equipo de HPLC

#### 5.2.1.1 Análisis de la curva de capsaicina en Acetonitrilo por HPLC

Para la cuantificación de capsaicina se prepararon tres curvas de calibración las cuales se identifican como Curvas A, B y C, Cada una con 7 niveles de concentración (NC) como lo muestra la siguiente Tabla 11.

**Tabla11.** Niveles de concentración para curvas de calibración de capsaicina en HPLC

Nivel de concentración (NC)	ppm
Nivel 1	0,10
Nivel 2	0,29
Nivel 3	0,51
Nivel 4	1,00
Nivel 5	1,96
Nivel 6	4,00
Nivel 7	6,00

#### • Prueba de normalidad para HPLC

El estadístico de Shapiro Wilk basa su estudio en el comportamiento de los datos y si estos provienen de una población normalmente distribuida, por medio del contraste de las Hipótesis:

**Hipótesis Nula ( $H_0$ ):** Los datos provienen de una distribución normal ( $W_{calc} < W_{tab}$ )

**Hipótesis Alterna ( $H_1$ ):** Los datos no provienen de una distribución normal ( $W_{calc} > W_{tab}$ )

Es necesario destacar que la prueba de Shapiro Wilk es la más óptima dentro de las pruebas de normalización para poblaciones entre 5 y 50 datos.

Los resultados para capsaicina por HPLC se muestran en la Tabla 12, para los datos de repetibilidad del tercer día y la precisión intermedia.

**Tabla 12.** Pruebas de normalidad para día 3 y precisión intermedia

	Shapiro-Wilk* 3DIA			Nivel	Shapiro-Wilk** Precisión intermedia		
	Estadístico Wcal	gl	Sig.		Estadístico Wcal	gl	Sig.
Nivel1	0,877	9	0,147	1	0,983	45	0,723
Nivel2	0,906	9	0,289	2	0,920	45	0,004
Nivel3	0,875	9	0,140	3	0,966	45	0,206
Nivel4	0,969	9	0,886	4	0,884	45	0,000
Nivel5	0,919	9	0,387	5	0,944	45	0,031
Nivel6	0,933	9	0,507	6	0,913	45	0,003
Nivel7	0,916	9	0,358	7	0,941	45	0,024

\*Estadístico de Shapiro Wilk para 9 gL  $W_{tab}=0,978$

\*\* Estadístico de Shapiro Wilk para 45 gL  $W_{tab}=0,988$

Para repetibilidad del 3Dia  $W_{cal}<W_{tab}$  aceptando la hipótesis nula de que los datos tienen un comportamiento normal para todos los niveles de concentración (con un 95% de confianza (Sig. $\geq 0.05$ ). Para la Precisión intermedia  $W_{cal}<W_{tab}$  aceptando la hipótesis nula a pesar de que el valor de Significancia para 5 de los 7 niveles de concentración es menor a 0.05, este último no tuvo ningún efecto adverso en la linealidad de las curvas de calibrado como se mostrara más adelante. Las pruebas de normalidad para los demás días de medición también tuvieron un comportamiento Normal (Anexo 1).

- Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas

La prueba de Levene es una estadística deductiva usada para determinar la igualdad de la variación en diversas muestras, y con ello concluir que los resultados obtenidos provienen de una única población, esto se fundamenta según el contraste de hipostesis.

**Hipótesis Nula ( $H_0$ ):** las varianzas son iguales

**Hipótesis Alterna ( $H_1$ ):** las varianzas son significativamente diferentes

En la tabla 13. Se muestran los resultados para la prueba de Levene para las tres curvas en el primer día (repetibilidad) y los datos de todos los días (precisión intermedia).

**Tabla 13.** Prueba de homogeneidad de varianzas para repetibilidad Día 1 y precisión intermedia

<b>DIA 1</b>				
Dia 1	Estadístico de Levene $W_{CAL}^*$	$gl_1$	$gl_2$	Sig. (p)
Cur1a	3,599	6	14	0,023
Cur1b	10,135	6	14	0,000
Cur1c	3,444	6	14	0,027
<b>PRECISIÓN INTERMEDIA</b>				
Precisión intermedia	Estadístico de Levene $W_{CAL}^*$	$gl_1$	$gl_2$	Sig.(p)
Dia1	3,881	6	14	0,017
Dia3	5,167	6	14	0,005
Dia5	4,135	6	14	0,013
Dia7	2,793	6	14	0,053
Dia10	2,525	6	14	0,072

\*Estadístico de Levene para  $gl_1$  6 y  $gl_2$  14  $W_{tab(10,20)}=4,9$

Como se puede observar en la tabla 13, para repetibilidad los valores de  $W_{cal} < W_{tab}$  aceptando la hipótesis nula a excepción de la curva B que muestra un  $W_{cal} > W_{tab}$ , indicando variabilidad en la respuesta del equipo para ese día, ya que en días posteriores no se observó.

Los valores del estadístico W para la precisión intermedia son menores aceptando la hipótesis nula de igualdad de varianzas significando que proviene de una misma población de datos. El valor de la significancia tanto para la repetibilidad del día 1 como para precisión intermedia son menores a 0.05 indicando diferencias significativas no en las varianzas de la población pero si entre los diferentes niveles de concentración de las curvas preparadas.

Prueba de Levene para los demás días de medición se muestra en el Anexo 2.

- Prueba de significancia para medias de una muestra

Al establecer que los datos son representados por la media el paso siguiente fue comparar las medias de cada nivel de concentración de las 3 curvas para la repetibilidad y precisión intermedia utilizando una t de student para una muestra con el fin de establecer si existe diferencia significativa entre los valores obtenidos para las medias de cada curva analizada. La hipótesis nula establece que no hay una diferencia significativa entre las medias si se cumple que  $t_{cal} < t_{teor}$ , lo cual se verifica también al evaluar el valor de significancia (sig.) que debe ser menor que 0,05. La tabla 14, muestra los valores obtenidos de t para la repetibilidad del séptimo día y precisión intermedia respectivamente.

**Tabla 14.** Valores de t para la repetibilidad del séptimo día

	T <sub>CAL</sub> *	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Curva A	2,462	6	0,049	40,140	0,246	80,034
Curva B	2,484	6	0,048	39,560	0,587	78,530
Curva C	2,474	6	0,048	39,647	0,430	78,864

\*Estadístico  $t_{tab}=2,570$

Los análisis de comparación de medias para la repetibilidad y la precisión intermedia muestran que no hay diferencias significativas  $t_{cal} < t_{tab}$  entre las medias de cada uno de los niveles de concentración de las 3 curvas ( $sig < 0.05$ ) analizadas durante los 10 días, lo cual es un indicativo de una estandarización óptima de la preparación de los patrones y del proceso de análisis por el HPLC. Los resultados para los datos de los demás días se muestran en el Anexo 3.

- Análisis de varianza para la regresión lineal

Son los resultados obtenidos de las pruebas de normalidad y conociendo que no hay diferencias significativas entre las medias de las tres curvas preparadas para medir la repetibilidad durante los 10 días (precisión intermedia), se establece el análisis de regresión lineal para establecer los parámetros estadísticos apropiados. Esto se hace por medio del análisis estadístico anovadonde calcula un estadístico F y una significación estadística, y el análisis se hace por medio del siguiente contraste de hipótesis.

Según la ecuación  $Y=mx +b$

**H<sub>0</sub>: m=0**=la pendiente es significativamente igual a cero

**H<sub>1</sub>: m≠0**= la pendiente difiere significativamente de cero

Los resultados del análisis de regresión se muestran en la tabla 15, se establece que los valores del estadístico F son mayores que el estadístico tabulado F (0.05, 2, 4) rechazando la hipótesis nula y concluyendo que si hay una relación directa entre los niveles de concentración y las respuestas dadas para cada uno de estos valores arrojados por el HPLC.

**Tabla 15.** Anova de un factor para los días primero y quinto

		Día 1					
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F <sub>cal</sub> *	Sig.	
1	Regresión	29,729	2	14,864	5495,331	0,000(a)	
	Residual	0,011	4	0,003			
	Total	29,739	6				
		Día 5					
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F <sub>cal</sub> *	Sig.	
1	Regresión	29,732	2	14,866	7982,291	0,000(a)	
	Residual	0,007	4	0,002			
	Total	29,739	6				

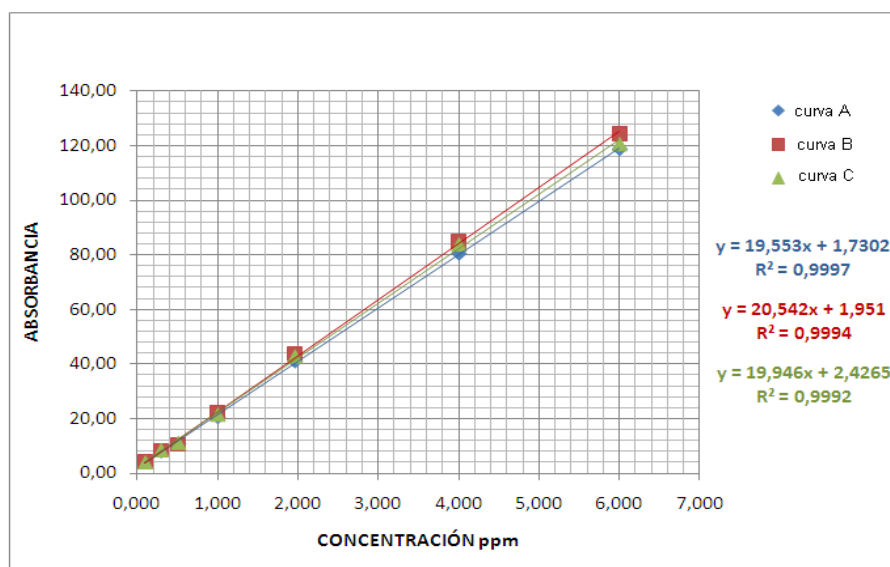
\*estadístico F<sub>tab</sub> (0.05, 2, 4)= 6,94

• Línea de tendencia central en HPLC

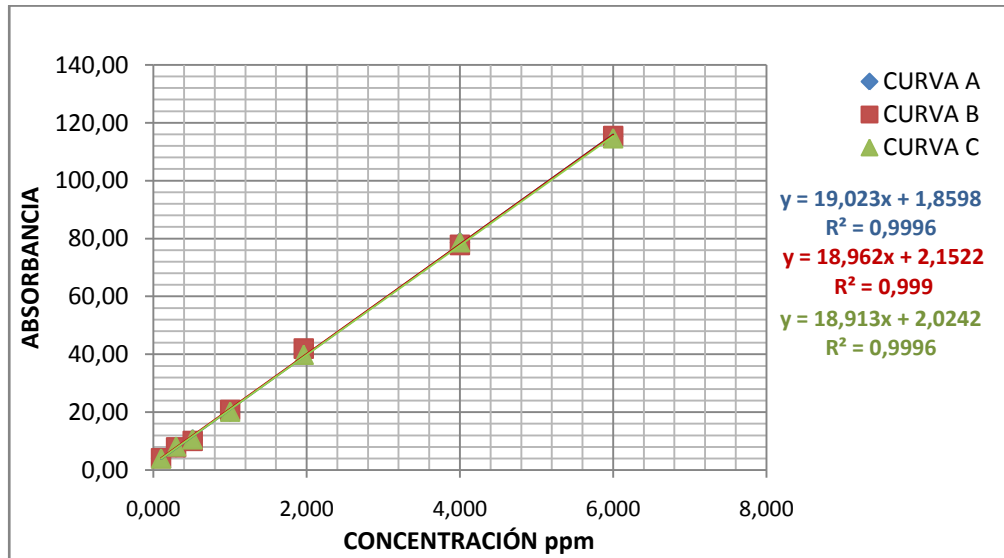
Una vez establecida la relación directa de las variables analizadas se procedió a establecer las líneas de tendencia central, a continuación se muestran las curvas para repetibilidad del día 3 figura6, y para Precisión intermedia figura 7, utilizando la hoja de cálculo de Excel para la obtención de las líneas de tendencia y el paquete estadístico SPSS para el análisis de coeficientes y anova para el primer día (Tabla 16).

Los valores del estadístico F y t una vez más ratifican que la pendiente de las curvas es significativamente diferente de cero como se mostró en el apartado anterior.

**Figura 6.** Curvas de calibración de Capsaicina Repetibilidad día 3



**Figura 7.** Curvas de calibración para precisión intermedia



**Tabla 16.** Análisis de coeficientes y anova para curva A de calibración del primer día

Coeficientes (Curva A)						
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.
			Error típ.	Beta	t	
1	(Constante)	1,800	0,444		4,056	0,010
	ConcentR	18,708	0,155	1,000	120,468	0,000

Anova (curva A)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	10408,999	1	10408,999	14512,437	0,000(a)
	Residual	3,586	5	0,717		
	Total	10412,585	6			

Las curvas para repetibilidad de los demás días se muestran en los anexos 4 y 5

• Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Una vez se han establecido los parámetros estadísticos apropiados y comprobada la normalidad de los datos se procedió a determinar los parámetros de calidad del método cromatográfico, para ello se establecieron las concentraciones de los límites de detección y cuantificación de acuerdo



con la IUPAC. La tabla 17, muestra los datos de la repetibilidad de la curva del primer día en Acetonitrilo con la que se calculó el LOD y el LOQ

**Tabla 17.** Descriptivos de la pendiente e interceptos obtenidos por la repetibilidad de la curva de capsaicina en Acetonitrilo

	<b>Pendiente</b>	<b>Intercepto</b>
	18,71	1,81
	18,17	2,44
	18,42	1,84
Promedio	18,43	2,03
S	0,27	0,35
CV	1,46	17,47

Utilizando la ecuación 6, el límite de detección es:

$$LOD = \frac{3 \times 0.35}{18.43} = 0.06$$

Y el límite de cuantificación, utilizando la ecuación 7 es:

$$LOQ = \frac{10 \times 0.35}{18.43} = 0.19$$

### 5.3 ANÁLISIS DE CURVAS DE CAPSAICINA EN LOS SIMULANTES REFRIGERADOS

Debido a que los estudios de migración se realizaron sobre simulantes específicos (agua, etanol 15%, ácido acético 3%), se hizo necesario establecer si existían diferencias significativas de los valores obtenidos de las aéreas para los diferentes niveles de concentración, con el fin de emplear las curvas preparadas anteriormente para poder ser empleadas en la cuantificación de las muestras. En la tabla 18 se presenta el resultado del análisis de correlación entre las curvas preparadas con acetonitrilo y los diferentes simulantes.

La tabla 18 nos da la correlación y la significación de la prueba t, como ya dijimos, si el valor p o significación estadística es menor que  $\alpha$  (0,05), aceptamos que la correlación es significativamente diferente de 0, es decir, existe relación entre variables. Con lo anterior, se concluye que las curvas analizadas son válidas para cuantificar las muestras en los simulantes.

**Tabla 18.** Comparación de la curva de capsaicina en Acetonitrilo y diferentes simulantes

Correlaciones de muestras relacionadas				
Análisis		N	Correlación	Sig.
1	dia1 ACN y dia1Etanol	12	1.000	0.000
2	dia10 ACN y dia10etanol	12	1.000	0.000
3	dia1 ACN y dia1acacet	12	0.998	0.000
4	dia10 ACN y dia10acacet	12	0.998	0.000
5	dia1 ACN y dia1agua	12	1.000	0.000
6	dia10 ACN y dia10agua	12	0.999	0.000

## 5.4 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA CAPSAICINA EN LOS DIFERENTES SIMULANTES A DIFERENTES TEMPERATURAS

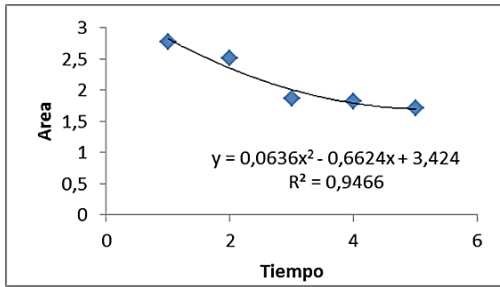
### 5.4.1 Determinación de cinética de disminución de capsaicina en simulantes

El seguimiento de la cinética de disminución de la capsaicina se realizó teniendo en cuenta cada nivel de concentración de la curva de calibración. Esto es, por ejemplo el nivel 1 (0.098 ppm) se evaluó día por medio durante 10 días en los 4 simulantes a dos temperaturas (25-40°C) con el objetivo de estudiar si hay correspondencia en la disminución a concentraciones bajas (0.098-0.51) de capsaicina con concentraciones altas (1.00-6.00 ppm). La tabla 19 y figura 8 muestran los resultados de las áreas del primer patrón durante los 5 días de análisis por el equipo.

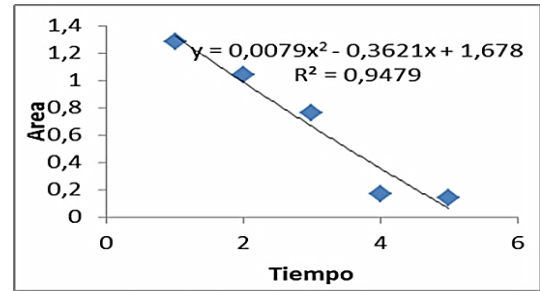
**Tabla 19.** Áreas del primer patrón durante los 5 días de análisis a diferente simulante y temperatura

Día	Simulante	Ácido acético		Agua		Etanol	
		25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
1	Patrón	2.77	1.28	4.11	4.24	5.02	5.63
2		2.51	1.04	4.09	4.1	4.82	5.18
3	0.098	1.87	0.76	3.41	3.89	4.49	4.51
4		1.82	0.17	2.37	3.4	4.30	4.39
5		1.71	0.14	2.11	3.23	3.65	4.24

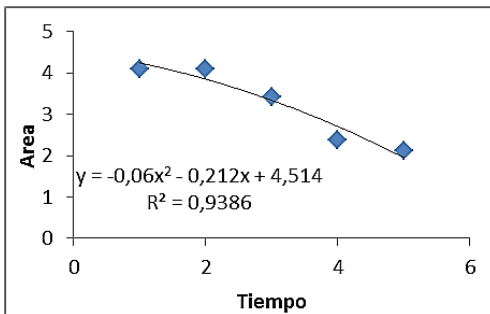
**Figura 8.** Área Vs Tiempo según tabla 19.



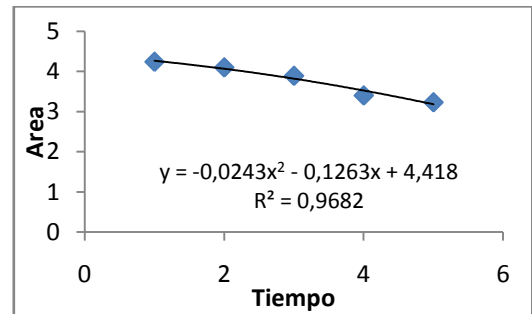
A) Acido acético 25°C



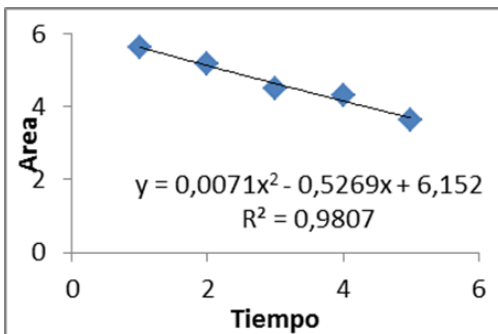
B) Acido acético 40°C



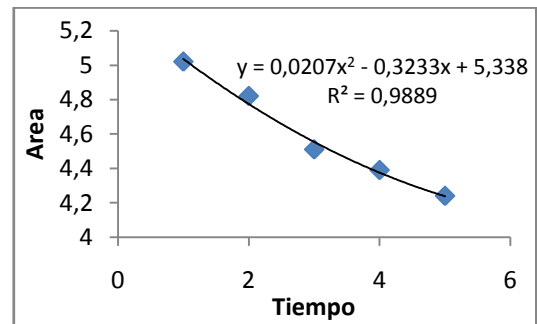
C) Agua 25°C



D) Agua 40°C



E) Etanol 25°C



F) Etanol 40°C

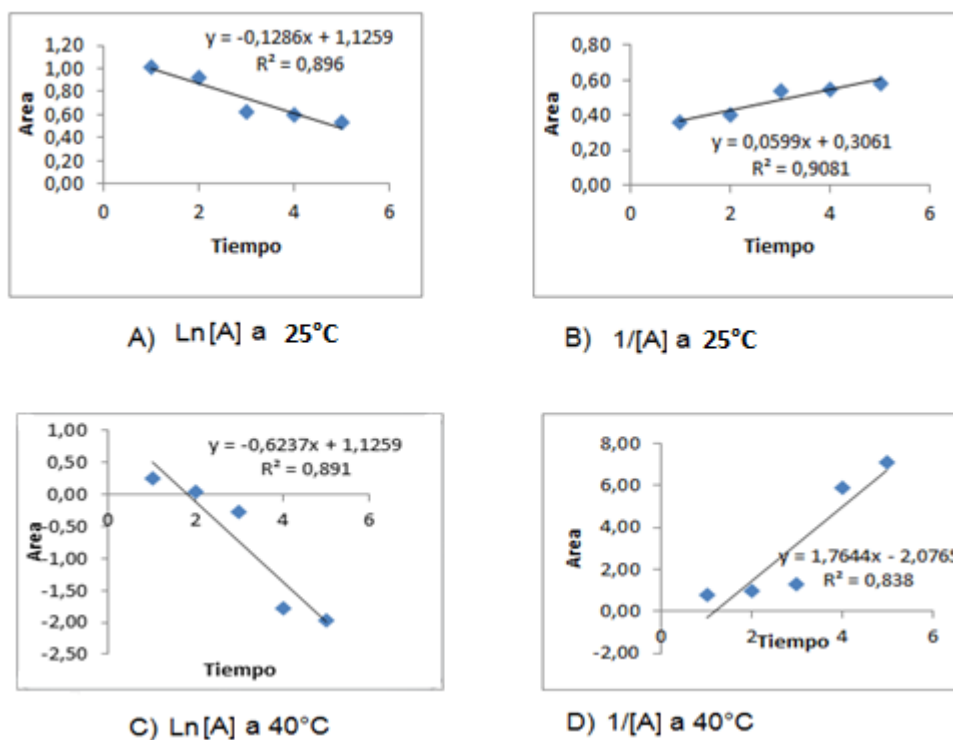
La escogencia del comportamiento cinético de la capsaicina representado por las ecuaciones de primero segundo ordense realizó con base en el mayor valor del índice de pearson ( $R^2$ ).

La tabla 20 muestra la escogencia del comportamiento cinético, para el primer patrón con relación al mayor índice de pearson.

**Tabla 20.** Escogencia del comportamiento cinético para el primer patrón (0.098 ppm)

Día	Patrón	Ácido Acético			
		Ln [A] a 25°C	1/[A] a 25°C	Ln [A] a 40°C	1/[A] a 40°C
1		1.02	0.36	0.25	0.78
2	0.098	0.92	0.40	0.04	0.96
3		0.63	0.53	-0.27	1.32
4		0.60	0.55	-1.77	5.88
5		0.54	0.58	-1.97	7.14

**Figura 9.** Correlación de pearson para el primer patrón de la curva de capsaicina en los diferentes simulantes a las dos temperaturas.



El proceso se realizó para cada patrón durante los 5 días en los diferentes simulantes a las dos temperaturas, determinando su comportamiento cinético, al escoger la mejor linealidad graficando Ln [A] vs t. y 1/ [A] vs t. Las tablas 21 y 22 muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 21.** Resumen del comportamiento cinético a 25°C

Patrón	Simulantes	R <sup>2</sup> Ln [A] 25°C	R <sup>2</sup> 1/[A]25°C	Comportamiento cinético Orden
0.098	Ac. Acético	0.896	0.9181	2 <sup>do</sup>
	Agua	0.9156	0.9025	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9762	0.9628	1 <sup>er</sup>
0.294	Ac. Acético	0.9696	0.9749	2 <sup>do</sup>
	Agua	0.8839	0.8026	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9624	0.9567	1 <sup>er</sup>
0.510	Ac. Acético	0.972	0.9741	2 <sup>do</sup>
	Agua	0.9082	0.8890	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9715	0.9712	1 <sup>er</sup>
1.00	Ac. Acético	0.9129	0.9191	2 <sup>do</sup>
	Agua	0.7889	0.5588	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.981	0.9784	1 <sup>er</sup>
2.00	Ac. Acético	0.9334	0.9380	2 <sup>do</sup>
	Ac. Acético	0.9334	0.9380	2 <sup>do</sup>
	Agua	0.8826	0.8791	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9484	0.9463	1 <sup>er</sup>
4.00	Ac. Acético	0.8668	0.8689	2 <sup>do</sup>
	Agua	0.9779	0.9767	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9687	0.9685	1 <sup>er</sup>
6.00	Ac. Acético	-----	-----	-----
	Agua	0.941	0.9331	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.8985	0.8973	1 <sup>er</sup>

**Tabla 22.** Tabla resumen del comportamiento cinético a 40°C

Patrón	Simulantes	R <sup>2</sup> Ln [A] 40°C	R <sup>2</sup> 1/[A]40°C	Comportamiento cinético Orden
0.098	Ac. Acético	0.891	0.838	1 <sup>er</sup>
	Agua	0.9506	0.9428	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9789	0.9827	2 <sup>do</sup>
0.294	Ac. Acético	0.9824	0.9683	1 <sup>er</sup>
	Agua	0.9528	0.8864	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.8049	0.8082	2 <sup>do</sup>
0.510	Ac. Acético	0.985	0.9849	1 <sup>er</sup>
	Agua	0.9724	0.9555	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9597	0.9614	2 <sup>do</sup>
1.00	Ac. Acético	0.9819	0.9794	1 <sup>er</sup>
	Agua	0.9753	0.9001	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9026	0.9192	2 <sup>do</sup>
2.00	Ac. Acético	0.986	0.9816	1 <sup>er</sup>
	Agua	0.9429	0.9360	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9342	0.9368	2 <sup>do</sup>
4.00	Ac. Acético	0.8894	0.8849	1 <sup>er</sup>
	Agua	0.8957	0.7964	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.9574	0.9578	2 <sup>do</sup>
6.00	Ac. Acético	-----	-----	-----
	Agua	0.9408	0.8413	1 <sup>er</sup>
	Etanol	0.8140	0.8153	2 <sup>do</sup>

Una vez se obtiene el comportamiento cinético de cada simulante a las dos temperaturas se procede a calcular la concentración relacionada con la migración sin el proceso de disminución.

Teniendo en cuenta que la pendiente de cada curva es la constante de velocidad y que es diferente para cada patrón, las concentraciones reales de cada muestra serán determinadas con la constante de velocidad correspondiente en la curva, la tabla 23 muestra las constantes de velocidad correspondientes a cada patrón.

**Tabla 23.** Tabla de constantes de velocidad para cada patrón

Patrón	Simulantes	Com. cinético orden	Constante de Velocidad 25°C	Com. cinético orden	Constante de Velocidad 40°C
0.098	Ac. Acético	2 <sup>do</sup>	0.060	1 <sup>er</sup>	0.624
	Agua	1 <sup>er</sup>	0.188	1 <sup>er</sup>	0.073
	Etanol	1 <sup>er</sup>	0.105	2 <sup>do</sup>	0.009
0.294	Ac. Acético	2 <sup>do</sup>	0.012	1 <sup>er</sup>	0.297
	Agua	1 <sup>er</sup>	0.329	1 <sup>er</sup>	0.342
	Etanol	1 <sup>er</sup>	0.064	2 <sup>do</sup>	0.003
0.510	Ac. Acético	2 <sup>do</sup>	0.006	1 <sup>er</sup>	0.29
	Agua	1 <sup>er</sup>	0.073	1 <sup>er</sup>	0.019
	Etanol	1 <sup>er</sup>	0.035	2 <sup>do</sup>	0.004
1.00	Ac. Acético	2 <sup>do</sup>	0.003	1 <sup>er</sup>	0.208
	Agua	1 <sup>er</sup>	1.009	1 <sup>er</sup>	0.289
	Etanol	1 <sup>er</sup>	0.021	2 <sup>do</sup>	0.0001
2.00	Ac. Acético	2 <sup>do</sup>	0.001	1 <sup>er</sup>	0.151
	Agua	1 <sup>er</sup>	0.039	1 <sup>er</sup>	0.141
	Etanol	1 <sup>er</sup>	0.021	2 <sup>do</sup>	0.001
4.00	Ac. Acético	2 <sup>do</sup>	0.0005	1 <sup>er</sup>	0.053
	Agua	1 <sup>er</sup>	0.011	1 <sup>er</sup>	0.270
	Etanol	1 <sup>er</sup>	0.013	2 <sup>do</sup>	0.0005
6.00	Ac. Acético	-----	-----	-----	-----
	Agua	1 <sup>er</sup>	0.038	1 <sup>er</sup>	0.316
	Etanol	1 <sup>er</sup>	0.012	2 <sup>do</sup>	0.0001

Con las constantes de velocidad de disminución se determina la concentración inicial de migración de capsaicina de cada muestra utilizando las siguientes expresiones según su comportamiento cinético.

Velocidad de disminución para reacciones de primer orden

Resolviendo la integral:

$$-\int_{[A_0]}^{[A]} \frac{d[A]}{dt} = K \int_0^t dt \quad ; \quad -\left| \ln \frac{[A]}{[A_0]} \right| = K|t|_0^t$$

queda:

$$|\ln[A] - \ln[A_0]| = K[t - 0] \quad ; \quad \ln[A] = \ln[A_0] - Kt$$

O bien de la forma exponencial

**Ecuación 10.**  $[A] = [A_0]e^{-Kt}$

Velocidad de disminución para reacciones de segundo orden:

$$-\frac{d[c-x]}{dt} = K[c-x]^2$$

Operando:

$$\frac{dx}{dt} = K[c-x]^2, \quad \int_0^x \frac{dx}{[c-x]^2} = \int_0^t K dt \quad ; \quad \left| \frac{1}{[c-x]} \right|_0^x = \frac{1}{c-x} - \frac{1}{c} = Kt$$

Por lo que queda:

**Ecuación 11.**  $[A] = \frac{1}{Kt - (\frac{1}{c})}$

#### 5.4.2 Análisis de la curva de calibración en cloroformo para colorante por UV-Vis

Para la cuantificación de colorante se prepararon tres curvas de calibrado las cuales se identifican como Curvas A, B y C, Cada una con 6 niveles de concentración (NC) como lo muestra la tabla 24.

**Tabla 24.** Niveles de concentración para las curvas de colorante en UV

Nivel de concentración (nc)	Uv ppm
Nivel 1	0,50
Nivel 2	1,00
Nivel 3	2,00
Nivel 4	3,00
Nivel 5	4,00
Nivel 6	5,00

- Prueba de normalidad, test de Shapiro Wilk en la cuantificación de colorante

En la tabla 25 se muestran los resultados para la prueba de normalidad de los datos correspondientes al 10 día de medición en el espectrofotómetro UV.

**Tabla 25.** Prueba de Normalidad de Shapiro Wilk para décimo día y precisión intermedia

Nivel de concentración	Shapiro-Wilk 10día			NC	Shapiro-Wilk precisión intermedia		
	Estadístico	gl	Sig.		Estadístico	gl	Sig.
	$W_{CALI}$				$W_{CAL}$		
NIVEL1	0,851	9	0,076	NIVEL1	0,282	45	0,000
NIVEL2	0,838	9	0,055	NIVEL2	0,575	45	0,000
NIVEL3	0,931	9	0,494	NIVEL3	0,847	45	0,000
NIVEL4	0,857	9	0,088	NIVEL4	0,945	45	0,033
NIVEL5	0,859	9	0,094	NIVEL5	0,964	45	0,170
NIVEL6	0,803	9	0,022	NIVEL6	0,948	45	0,042

\*Estadístico de Shapiro Wilk para 9 gl  $W_{tab}=0,978$

\*\* Estadístico de Shapiro Wilk para 45 gl  $W_{tab}=0,988$

Como lo muestra la tabla los resultados muestran que el  $W_{cal} < W_{tab}$  para todos los niveles de concentración tanto para la repetibilidad del 10 día como para la precisión intermedia con un 95% de confianza ( $sig \leq 0.05$ ), por el que se concluye que los datos de este día provienen de una población normalmente distribuida. Los datos de los demás días también mostraron un comportamiento normal (Anexo 6).

- Prueba de levene para homogeneidad de varianzas en la cuantificación de colorante

Los resultados obtenidos para la prueba de levene se muestran a la tabla 26, correspondientes al estudio para la repetibilidad del 10 día y precisión intermedia.

**Tabla 26.** Prueba de homogeneidad de varianzas para repetibilidad décimo día y precisión intermedia

Repetibilidad 10 día				
	Estadístico de levene $W_{cal}^*$	gl <sub>1</sub>	gl <sub>2</sub>	Sig.
Cur10a	2,522	5	12	0,088
Cur10b	1,359	5	12	0,306
Cur10c	1,443	5	12	0,278
Precisión intermedia				
	Estadístico de levene $W_{cal}^*$	gl <sub>1</sub>	gl <sub>2</sub>	Sig.
Dia1	2,004	5	12	0,15
Dia3	5,888	5	12	0,006
Dia5	2,085	5	12	0,138
Dia7	2,276	5	12	0,113
Dia10	2,772	5	12	0,069

\*Estadístico de levene para  $gl_1=5$  y  $gl_2=12$   $W_{tab(10,20)}=4,9$

Los datos mostrados en la tabla 26, tanto para precisión intermedia como para la repetibilidad del 10 día presentan que  $W_{cal} < W_{tab}$  aceptando la hipótesis nula de igualdad de varianzas con excepción del día 3 para precisión intermedia donde  $W_{cal} > W_{tab}$  con Sig.  $< 0.05$  mostrando diferencias



significativas y por lo tanto rechazando la hipótesis nula, esto debido a posibles errores sistemáticos en la medición en este día en particular. Este mismo caso se evidencia en la repetibilidad de la curva A en los días 1, 3, 5, y para la curva C en los días 3, 7, la cual evidencia errores de preparación o interferencias en los mismos.

- Prueba de significancia para medias de una muestra en colorante

En la tabla 27 se muestran los valores de significancia para las medias de las curvas del décimo día.

**Tabla 27.** Valores de t para la repetibilidad del décimo día

	T <sub>CAL</sub> *	gl	Valor de prueba = 0			
			Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
CUR10A	3,154	5	0,025	0,443	0,082	0,805
CUR10B	3,292	5	0,022	0,444	0,097	0,792
CUR10C	3,388	5	0,019	0,459	0,111	0,807

\*Estadístico  $t_{tab} = 2,78$  para 5 grados de libertad

Tal como lo indicó la prueba de Levene del apartado anterior sobre la variación de varianzas entre curvas tanto para repetibilidad y precisión intermedia la prueba t nos indica que hay diferencias significativas entre las medias de curvas de un mismo día como lo muestra los resultados de la tabla 27 donde el  $t_{cal} < t_{tab}$ , igualmente se observa para los demás días de medición, esto debido a interferencias causadas por la adición de óxido de titanio, el cual forma una dispersión en las soluciones patrón causando variaciones en las absorbancias en el espectrofotómetro.

- Análisis de varianza para la regresión lineal en colorante

**Tabla 28.** Anova de un factor para el tercer y séptimo día

DÍA 3						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	15,201	3	5,067	1401,911	0,001(a)
	Residual	0,007	2	0,004		
	Total	15,208	5			
DÍA 7						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	15,205	3	5,068	3131,708	0,000(a)
	Residual	0,003	2	0,002		
	Total	15,208	5			

\*estadístico F  $(_{0,05, 3, 2}) = 19.16$

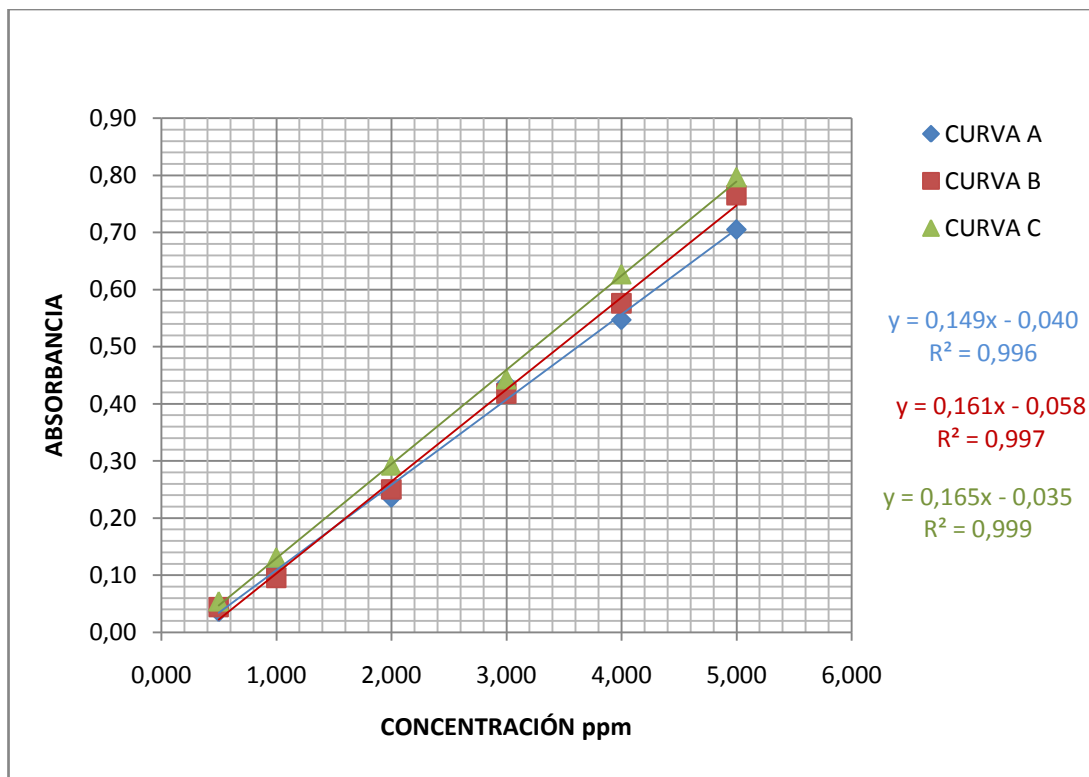
Los valores del estadístico F en la tabla 28, son mayores que el estadístico tabulado F (0.05, 3, 2), concluyendo que si hay una relación directa entre los niveles de concentración y las respuestas dadas para cada uno de estos valores arrojados por el UV.

- Línea de tendencia central en colorante

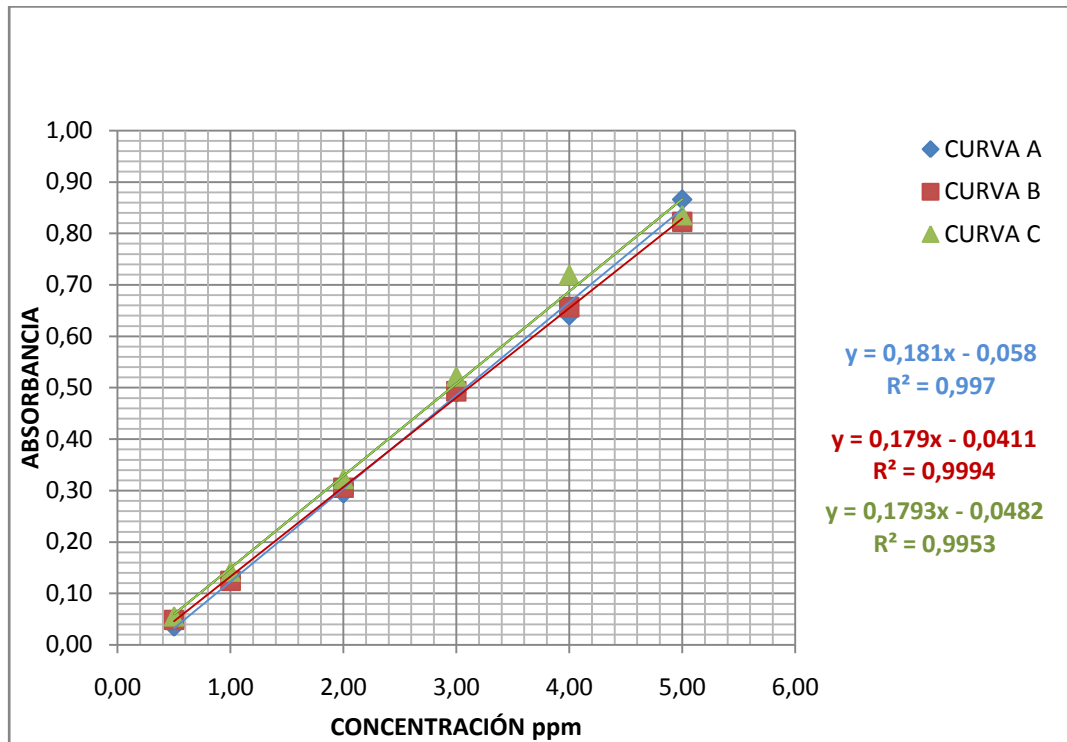
A continuación se muestran las curvas para repetibilidad del tercer día (figura 10) y para precisión intermedia (figura 11), utilizando la hoja de cálculo de Excell para la obtención de las líneas de tendencia y el paquete estadístico SPSS para el análisis de coeficientes y anova para el día 1 (tabla 28).

Los valores del estadístico F para las curvas indican que la pendiente es significativamente diferente de cero como se mostró en el apartado anterior.

**Figura 10.** Curvas de calibración Colorante para el tercer día



**Figura 11.** Curvas de calibración para precisión intermedia del colorante



En la tabla 29, el valor de F indica la correlación entre la variable dependiente y la independiente, el valor negativo de t de la constante indica el intercepto negativo las curvas de calibración, de todas formas indica la relación directa entre la respuesta y los niveles de concentración.

**Tabla 29.** Análisis de coeficientes y anova para curva A de calibración del segundo día

Coeficientes (curva A)						
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-0,057	0,024		-2,38	0,076
	CONCENTR	0,181	0,008	0,996	22,9	0
ANOVA (curva A)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	0,496	1	0,496	524,398	,000(a)
	Residual	0,004	4	0,001		
	Total	0,5	5			

- Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Debido a la variación entre las medias durante la repetibilidad de varios de los días de medición como lo mostro la prueba t y el test de Levene, los parámetros LOD y LOQ se determinaron por medio de las curvas obtenidas para precisión intermedia (Figura 11), utilizando las ecuaciones 6, 7.

Con los estadísticos descriptivos de la tabla 30 los valores de LOD y LOQ son 0.15 y 0.5, este último corresponde al nivel 1 de concentración para las curvas de calibración.

**Tabla 30.** Descriptivos de la pendiente e interceptos obtenidos por precisión intermedia

	Pendiente	Intercepto
	0,18	0,06
	0,18	0,04
	0,18	0,05
Promedio	0,18	0,05
<b>S</b>	0,001	0,009
<b>CV</b>	0,63	17,47

## 5.5 ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE AGITACIÓN PARA LA CURVA DE COLORANTE

Las curvas de colorante fueron guardadas en tubos de ensayo y refrigeradas para evitar pérdidas del solvente; sin embargo el masterbach es adherido a las paredes del tubo y es necesario tener en cuenta el tiempo de agitación para medir su absorbancia y disminuir errores de esta por aumento de varianza. La tabla 31, muestra los resultados de las absorbancias obtenidas de 3 patrones a diferentes tiempos de agitación.

Con estos resultados se decide trabajar con un tiempo de agitación de 5 minutos, que aunque no presenta diferencia significativa con los demás, es un tiempo medio que representa uniformidad en las absorbancias de las muestras.

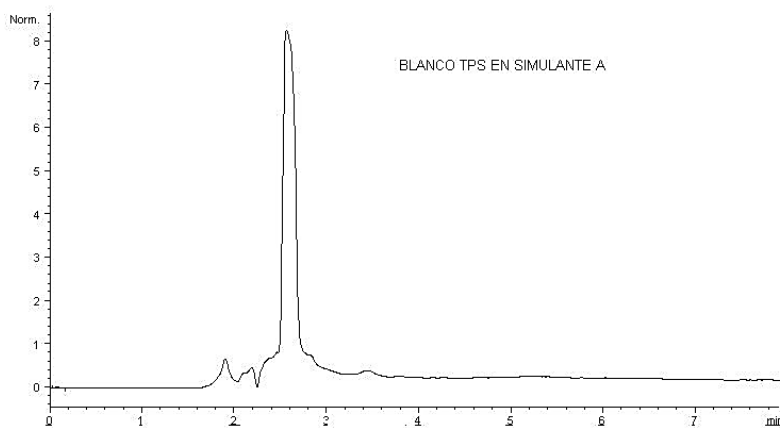
**Tabla 31.** Absorbancias a diferentes tiempos de agitación

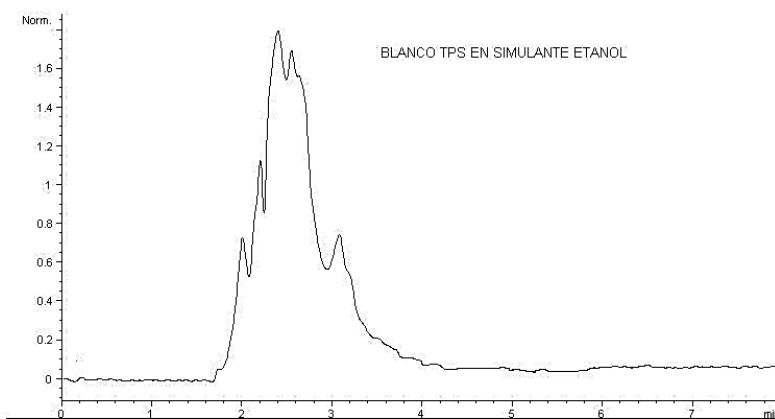
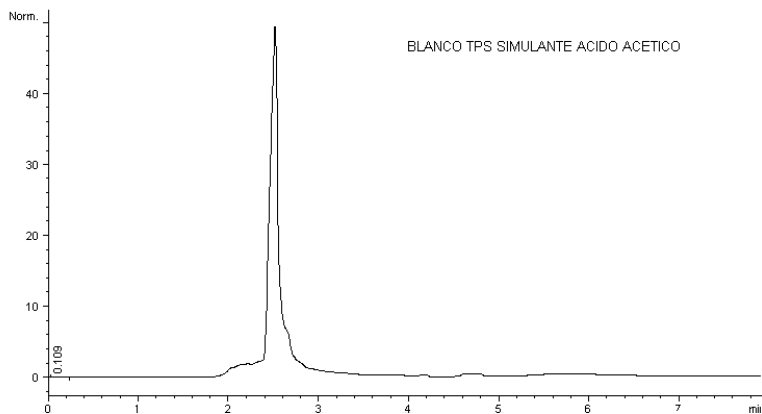
Tiempo de agitación (min)	patrón (ppm)	promedio	desviación	coef. Var
1	2	0,23	0,01	0,43
	4	0,58	0,01	0,52
	6	0,98	0,01	0,06
5	2	<b>0,26</b>	<b>0,01</b>	<b>0,78</b>
	4	<b>0,59</b>	<b>0,01</b>	<b>1,72</b>
	6	<b>1,07</b>	<b>0,01</b>	<b>0,34</b>
10	2	0,27	0,01	0,77
	4	0,57	0,01	0,56
	6	1,13	0,01	0,35
15	2	0,28	0,01	0,54
	4	0,56	0,01	0,78
	6	1,16	0,01	0,3

## 5.6 ANÁLISIS DE BLANCOS

Al analizar por triplicado en los cuatro simulantes sometidos a ambas temperaturas, los 3 blancos que contienen (TPS, MB (pellet) y TPS+MB (película)) no se obtiene señal en el cromatograma a un tiempo de retención de 4.4 (figura 12), lo que indica que no hay presencia de capsaicina en éstos.

**Figura 12.** Cromatogramas de blancos en simulantes A, B y C





## 5.7 ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN

### 5.7.1 Migración global

Para la determinación de la migración global, se debe tener en cuenta que se cuantifico todo el material que es capaz de pasar al simulante, ya sea capsaicina, colorante, almidón, productos de disminución y cualquier otro componente que haga parte del polímero, para su determinación se utilizó la ecuación 8.

Los siguientes resultados están dados en base seca, su porcentaje de humedad para la presentación en bolsa es de 0.05% y para la presentación en pellet es 0.03%.

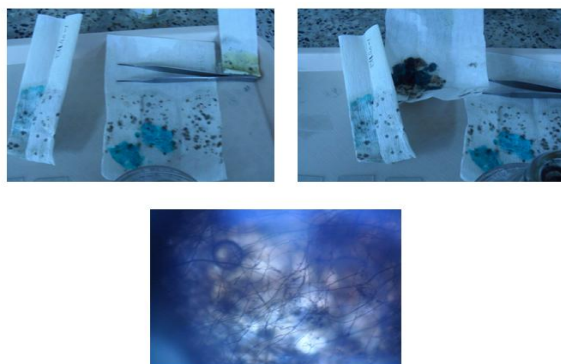
**Tabla 32.** Porcentaje de pérdida de material en la migración global en 3 simulantes a dos temperaturas

Muestra	Agua		Ac. Acético		Etanol	
	25	40	25	40	25	40
1	8.63	45.05	30.71	45.72	26.79	45.25
2	21.92	47.36	29.53	48.13	18.52	44.55
3	26.69	57.23	25.13	64.68	9.34	55.89
4	27.03	50.84	31.42	60.65	11.91	47.42
5	23.50	52.16	26.93	55.33	13.94	47.72
6	28.97	49.87	21.18	53.63	23.57	43.83
7	25.75	46.40	25.63	50.39	17.39	43.54
8	32.09	44.75	26.44	49.90	24.14	45.51
9	49.55	54.99	43.06	59.93	34.99	53.22
10	47.73	36.63	33.04	48.36	25.95	40.83
11	21.61	36.64	21.85	44.63	12.92	33.80
12	47.21	48.31	39.27	52.06	33.98	52.39
13	39.55	48.80	20.28	46.94	9.81	38.73
14	54.20	57.60	33.73	57.45	26.69	49.45
15	44.63	46.22	23.76	57.05	14.08	44.14
16	47.04	48.99	38.40	56.05	29.48	47.57
17	42.73	47.81	36.27	54.90	26.93	45.98

Los resultados muestran que hay mayor tendencia a migrar los componentes del polímero hacia los simulantes al aumentar la temperatura, esto debido a un aumento de la descomposición del componente mayoritario del polímero, el almidón.

Para las muestras en el simulante D (aceite) fue difícil determinar su peso final debido a un alto valor en su incertidumbre por adherirse al polímero gran cantidad de aceite; además de una producción de hongo en las muestras del polímero sumergido en este simulante; producto dado por el medio ya que al cultivarlo en medio aerobio no crece, la figura 12 muestra el hongo producido en el polímero con aceite.

**Figura 13.** Hongo producido en polímero que está en contacto con el simulante graso



## 5.7.2 Migración específica

### 5.7.2.1 Análisis de la estandarización de la técnica de extracción líquido-líquido

Se realizó la extracción a un patrón en aceite dopado con 0.5% de capsaicina con diferentes solventes, los resultados se muestran en la tabla 33.

**Tabla 33.** Áreas de las extracciones con diferentes solventes

<b>Solvente</b>	<b>Área tiempo de retención 4.4</b>
Etanol	2683.42
Metanol	5120.63
Cloroformo	326.89
Acetato de etilo	Formación de emulsión

Posteriormente, son evaluados los parámetros para llevar a cabo la estandarización como tiempo de agitación y número de extracciones, la tabla 34 muestra los resultados al evaluar los parámetros para la estandarización de la técnica de extracción líquido-líquido.

**Tabla 34.** Áreas al evaluar los parámetros para la extracción líquido-líquido

Análisis	Tiempo de agitación (min)	Numero de extracciones	Área a t <sub>4.4</sub> min		
			promedio	Desv.	Coe. var
1	5	5	92,043	1,592	1,73E-04
2	5	10	110,393	1,744	1,58E-04
<b>3</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>148,253</b>	<b>0,228</b>	<b>1,54E-05</b>
4	10	10	137,157	2,167	1,58E-04

### 5.7.2.2 Cuantificaciones de compuestos evaluados en la migración

- Análisis en la determinación de capsaicina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Las muestras son analizadas según sus características de fabricación del laboratorio de Reología, de esta manera se dividieron en los siguientes grupos:

Grupo 1: muestra 1-8: correspondientes al diseño experimental al evaluar la migración

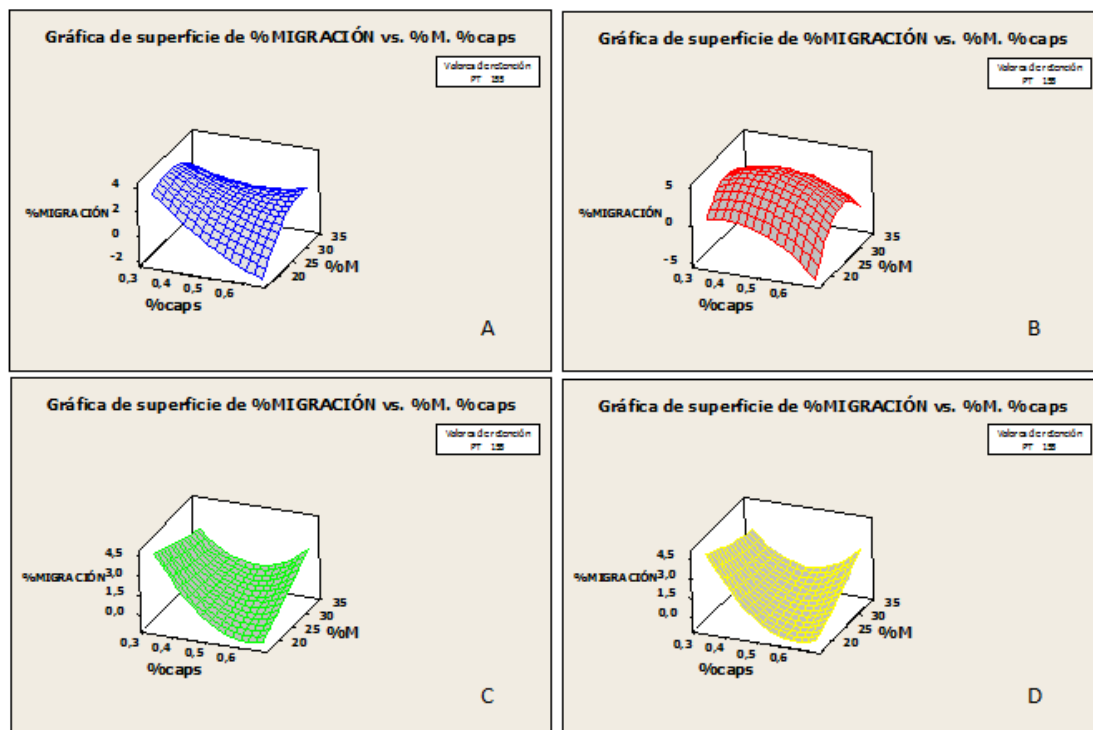
Grupo 2: muestra 9-11: puntos medios del diseño experimental de fabricación



Grupo 3: muestra 12-17: puntos estrellas del diseño experimental de fabricación

Las variables utilizadas en la preparación del polímero fueron obtenidas a partir del diseño de experimento de la fabricación del plástico que incluye temperatura extrusión, porcentaje de mezcla (porcentaje de almidón) y porcentaje de capsaicina, por lo que el análisis del diseño involucra el estudio de las variables consideradas para la migración para cada simulante tomando como constante los perfiles de temperatura de la preparación del polímero (temperatura de extrusión), la figura 14 muestra la representación de cada punto medio (triplicado del diseño experimental de fabricación del biopolímero B, C, D) y del promedio de ellos (A) con respecto al porcentaje de migración (ver tabla 8 pagina 45).

**Figura 14.** Superficies de migración con puntos medios en el simulante D a 25°C



A) Promedio de los puntos medios; B) Punto medio alto (4.83) C) Punto medio intermedio (0.49) D) Punto medio bajo (0.30)

El mismo comportamiento se observó para los simulantes A, B y C a las dos temperaturas, por tal motivo el análisis de migración se realiza con efectos principales y de interacción para un diseño experimental  $2^3$ .

• **Análisis de muestras por grupos**

Análisis grupo 1: muestras 1-8 diseño de experimentos de fabricación.

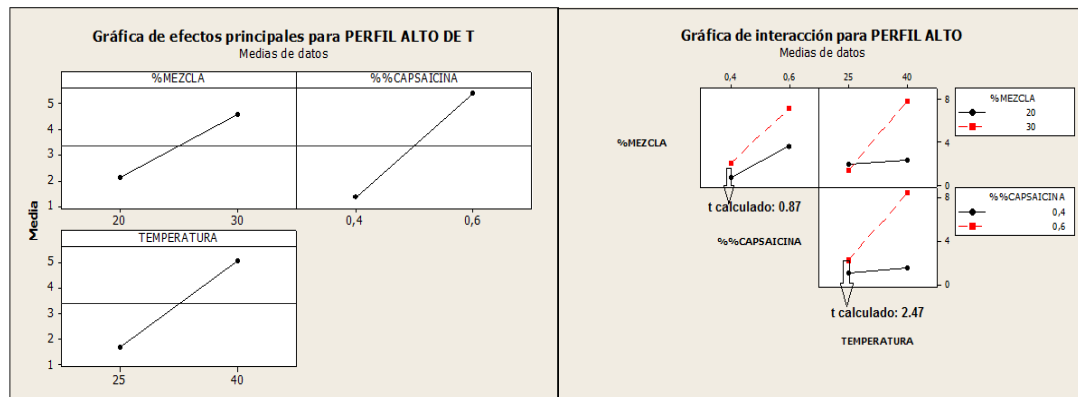
En la tabla 35 se muestran los resultados obtenidos de la concentración de capsaicina en cada uno de los simulantes a las dos temperaturas para las ocho primeras muestras, de las cuales se obtuvieron las gráficas de interacción y efectos principales, las gráficas del diseño están en función del porcentaje de mezcla binaria, aunque el análisis de ella está referido al porcentaje de almidón; a mayor porcentaje de mezcla menor porcentaje de almidón (figura 15).

**Tabla 35.** Porcentaje de capsaicina de las muestras del grupo 1 que migran en cada simulante al décimo día a las dos temperaturas

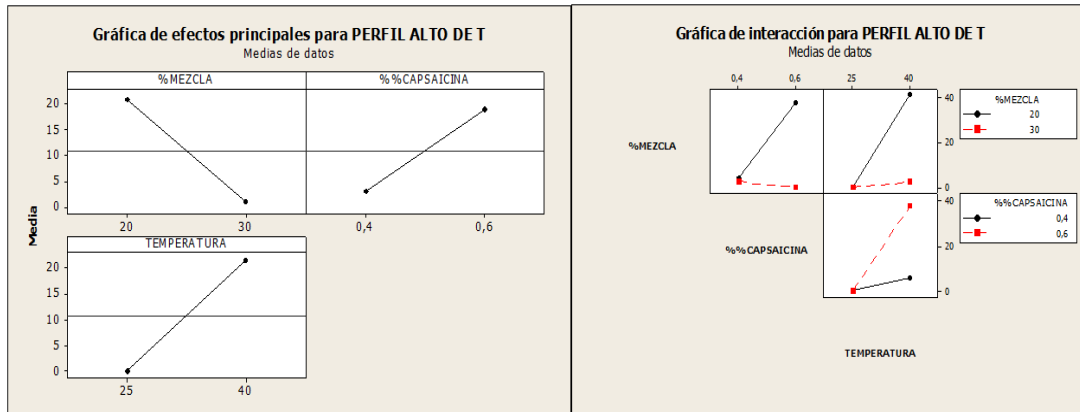
Análisis	Agua		Ac. Acético 3%		Etanol 15%		Aceite	
	25	40	25	40	25	40	25	40
1	1.23	3.37	0.88	9.26	2.05	0.66	7.54	12.61
2	1.38	< 0.06	0.25	6.90	0.76	0.15	< 0.06	< 0.06
3	1.63	3.19	0.67	5.36	1.04	0.13	< 0.06	< 0.06
4	0.88	3.22	< 0.06	4.21	0.27	< 0.06	< 0.06	< 0.06
5	3.51	19.01	0.90	33.51	2.01	0.92	5.03	7.29
6	2.57	4.64	0.07	75.29	0.56	0.39	2.96	1.99
7	0.53	< 0.06	0.33	3.75	0.79	0.64	0.64	0.62
8	1.92	12.35	< 0.06	< 0.06	< 0.06	< 0.06	3.53	4.28

**Figura 15.** Efectos principales y de interacción para perfil de temperatura Alta en los cuatro simulantes

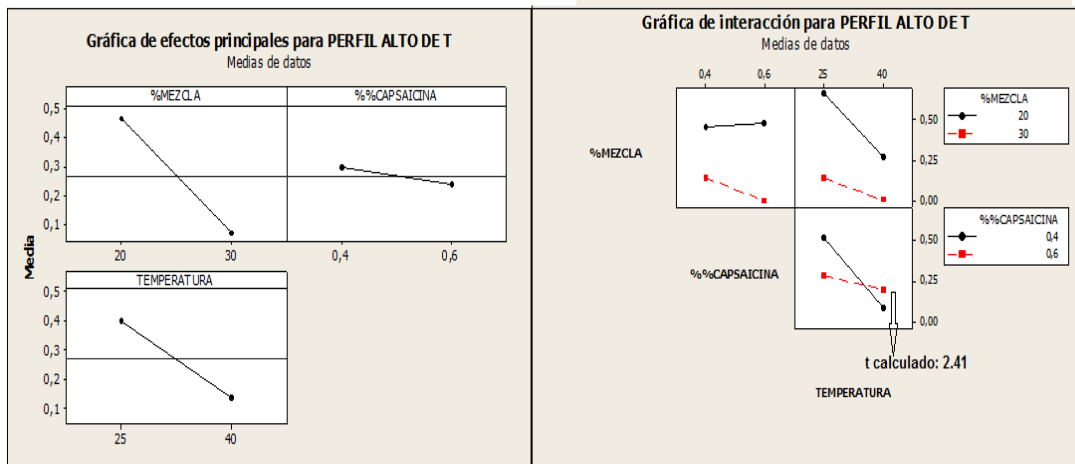
**Simulante A**



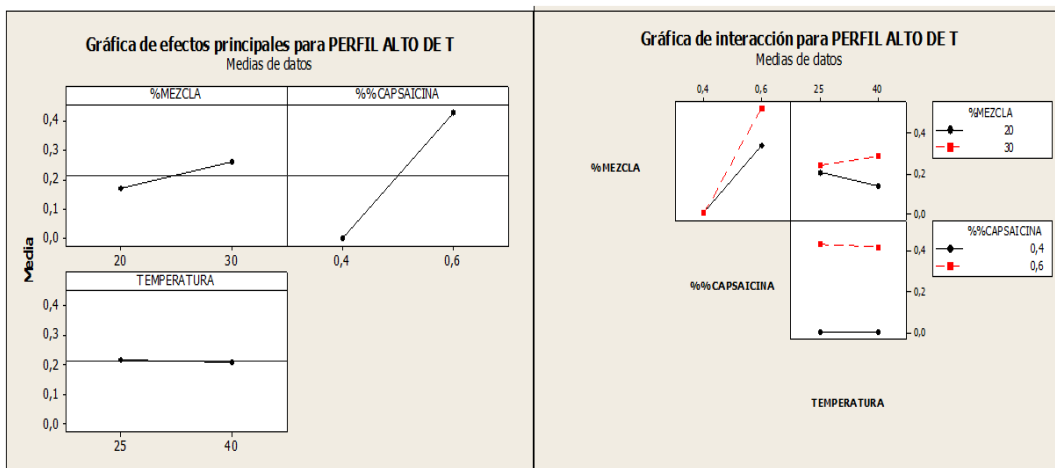
## Simulante B



## Simulante C



## Simulante D



- Análisis de efectos principales para perfil de temperatura alta

Para las variables evaluadas se aprecian los siguientes comportamientos:

- En el simulante A al aumentar el valor de la variable aumenta el porcentaje de migración, lo cual va acorde con la ley de fick para los valores de concentración y temperatura.
- Este mismo comportamiento se observa para el simulante B y D siendo para este ultimo la temperatura una constante, en este caso la capacidad calorífica del aceite es demasiado alta para verse afectada por el cambio de temperatura, que repercutiría en el porcentaje de migración de la capsaicina.
- En el caso del simulante C se observa que al aumentar el valor de la variable, el porcentaje de migración disminuye.
- En el caso de los efectos para los simulantes A y B no se aprecia una variable que tenga un efecto mayor sobre el porcentaje de migración, mientras que para el simulante C se establece que el porcentaje de capsaicina es el efecto con menos impacto sobre la migración, y en el simulante D se observa lo contrario, el porcentaje de capsaicina es el que más influye en el porcentaje de migración, lo cual permite establecer que dependiendo del uso (para alimentos grasos o que se puedan fermentar) el porcentaje de capsaicina va a ser influyente o no en la migración.
- En el caso del efecto del porcentaje de almidón dentro del proceso de fabricación del polímero, el almidón, es el componente al que se agrega la capsaicina en un proceso de extrusión previo para luego ser mezclado con la mezcla binaria por lo que a mayor porcentaje de almidón menor porcentaje de mezcla binaria y por lo tanto mayor migración como se observa en el caso de los simulantes B y C, para los simulantes A y D se observa el comportamiento contrario, a menor almidón mayor porcentaje de migración pero no es un efecto tan marcado en el porcentaje de migración total.

- Análisis de interacciones perfil de temperatura alta

- Para los simulantes A, B y D no hay interacción sobre las variables evaluadas, se establece una marcada tendencia entre los valores mínimos de cada variable obteniendo menor porcentaje de migración; sin embargo, al realizar pruebas de comparación de medias de los porcentajes de migración obtenidos a los valores mínimos de cada variable, se encontró que no hay diferencia significativa en el porcentaje de migración obtenido; esto es, para polímeros empleados en zonas donde la temperatura no sea mayor a 25°C los porcentajes de migración serán bajos independientes del porcentaje de almidón y capsaicina empleada.
- Para los mismos simulantes a bajos porcentajes de capsaicina es independiente a la composición de almidón, la migración es la misma.
- Para los simulantes A y B si se trabaja a una temperatura alrededor de 25°C, el porcentaje de capsaicina es independiente, por el contrario en el

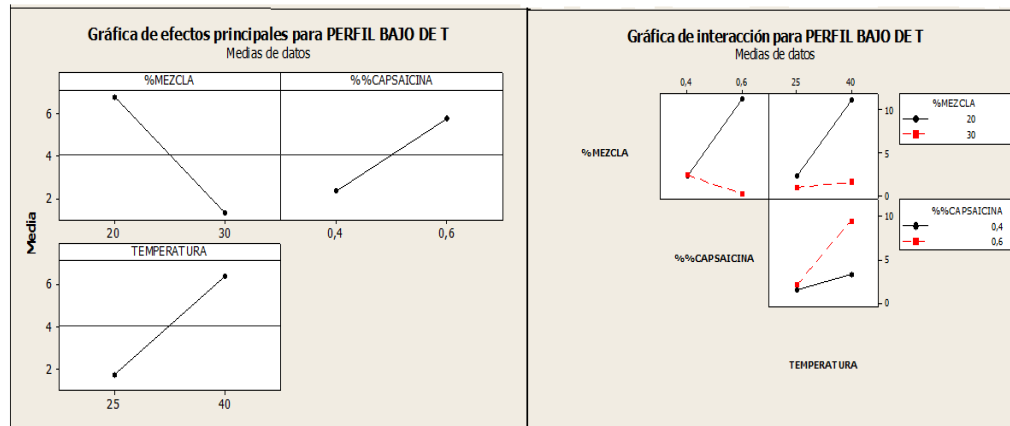
simulante D a bajas concentraciones de capsaicina la migración es independiente de la temperatura; en zonas de hasta 40°C las condiciones para la obtención de menor porcentaje de migración dependen del tipo de alimento hacia el cual este orientado el uso del polímero.

➤ Para el simulante C, se nota que aunque hay una interacción entre la temperatura y el porcentaje de capsaicina se establece que no hay diferencia significativa; las condiciones del diseño experimental muestran que trabajando a bajos porcentajes de almidón con altos porcentajes de capsaicina independiente de la temperatura de la zona a emplear, el porcentaje de migración es menor.

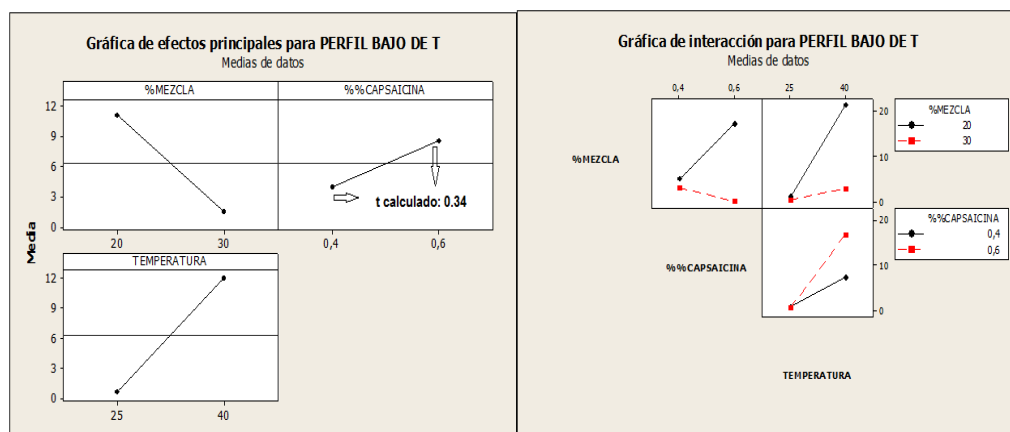
Se procedió a hacer el mismo análisis anterior al diseño correspondiente para el perfil bajo de temperatura, los resultados se muestran en la figura 16.

**Figura 16.** Efectos principales y de interacción para perfil de temperatura baja en los cuatro simulantes

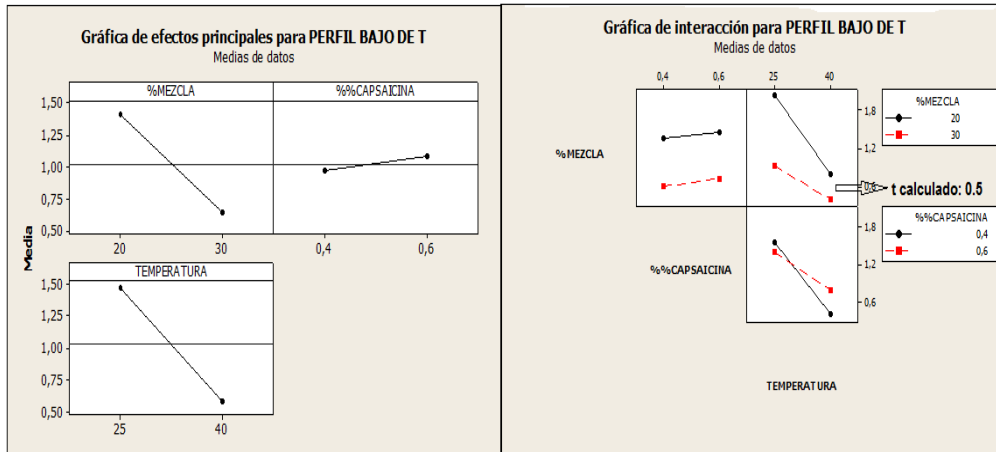
### Simulante A



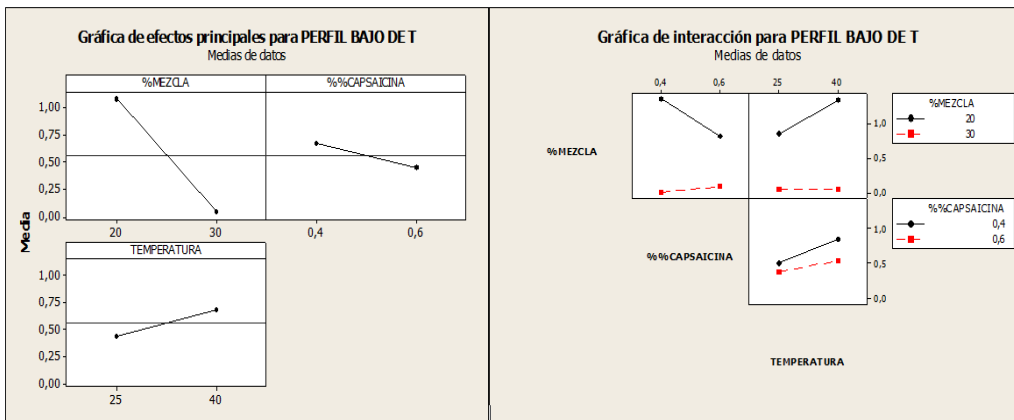
### Simulante B



## Simulante C



## Simulante D



- Análisis de efectos principales para perfil de temperatura baja

- Para los porcentajes de mezcla en los cuatro simulantes (A, B, C, D) se aprecia que al disminuir el porcentaje de almidón, disminuye el porcentaje de migración.
- El simulante A tiene la tendencia que al aumentar el porcentaje de capsaicina aumenta el porcentaje de migración, efecto que no se ve tan marcado en el simulante B, C y D donde el porcentaje de capsaicina no afecta el porcentaje de migración.
- En los simulantes A y B el porcentaje de migración aumenta al aumentar la temperatura, caso contrario para el simulante C y efecto que para el simulante D no es influyente.

- Análisis de interacciones perfil de temperatura baja
  - Para el perfil de temperatura baja, en los simulantes A y B se observa la misma tendencia que para el perfil alto, analizado anteriormente, lo cual indica que el perfil de temperatura utilizado para la fabricación del polímero no influye en el porcentaje de migración para polímeros utilizados en alimentos con alto porcentaje de humedad y/o acidez.
  - El simulante C muestra que a cualquier porcentaje de mezcla y altas temperaturas hay una disminución del porcentaje de migración.
  - Para el mismo simulante se observa que a menor porcentaje de almidón y altas temperaturas se puede utilizar cualquier porcentaje de capsaicina el porcentaje de migración es menor.
  - Para el simulante D se observa que al trabajar con bajos porcentajes de almidón, cualquier porcentaje de capsaicina a bajas o altas temperaturas el porcentaje de migración será bajo.
  - En este simulante también se observa que no importa el porcentaje de capsaicina se obtendrá menor porcentaje de migración si el polímero es utilizado en zonas donde la temperatura no sea mayor a 25°C.

Análisis de grupo 2: muestras 9-11: puntos medios del diseño experimental de fabricación (tabla 36).

El análisis de las muestras se pretendía realizar con superficie de respuesta, pero al encontrar que los puntos medios presentaron un alto coeficiente de variación dentro del método de fabricación del polímero, como se observa en la figura 14 (pág 70), se decidió trabajar con efectos principales y de interacción.

**Tabla 36.** Porcentaje de capsaicina de las muestras del grupo 2 que migran en cada simulante al décimo día a las dos temperaturas

Análisis	Agua		Ac. Acético 3%		Etanol 15%		Aceite	
	25	40	25	40	25	40	25	40
9	1.23	3.37	0.88	9.26	2.05	0.66	7.54	12.61
10	1.38	< 0.06	0.25	6.90	0.76	0.15	< 0.06	< 0.06
11	1.63	3.19	0.67	5.36	1.04	0.13	< 0.06	< 0.06

El diseño de experimentos establece el análisis de puntos medios como la réplica para el cálculo de la desviación en la preparación del polímero. Dentro del estudio de la migración cada una de estas muestras fue estudiada por triplicado, obteniendo coeficientes de variación entre el 1 y el 4% para las dos temperaturas trabajadas en el proceso de migración; al tomar de manera global los experimentos entre el 9 al 11 como réplicas del proceso de fabricación del polímero, se encontraron coeficientes de variación muy altos (coeficiente de variación a 25°C: 56%; a 40°C: 76%), lo que implica una

variabilidad en las condiciones de trabajo del polímero y no del estudio del método de análisis de migración.

Análisis de grupo 3: muestra 12-17: puntos estrella del diseño experimental de fabricación.

En la tabla 37, se muestran los porcentajes de migración para los puntos estrella del diseño de experimentos en la fabricación del polímero.

**Tabla 37.** Porcentaje de capsaicina de las muestras del grupo 3 que migran en cada simulante al décimo día a las dos temperaturas

Análisis	Agua		Ac. Acético 3%		Etanol 15%		Aceite	
	25	40	25	40	25	40	25	40
12	< 0.06	< 0.06	0.17	3.18	< 0.06	0.31	< 0.06	0.25
13	< 0.06	< 0.06	0.30	3.83	0.59	0.38	1.87	0.50
14	0.08	< 0.06	0.14	20.42	0.81	0.61	< 0.06	1.35
15	0.60	0.11	0.31	3.75	0.46	0.11	0.30	2.79
16	13.83	0.42	0.26	5.73	0.77	0.22	2.13	7.04
17	2.18	0.06	0.15	6.12	0.49	0.48	5.92	2.79

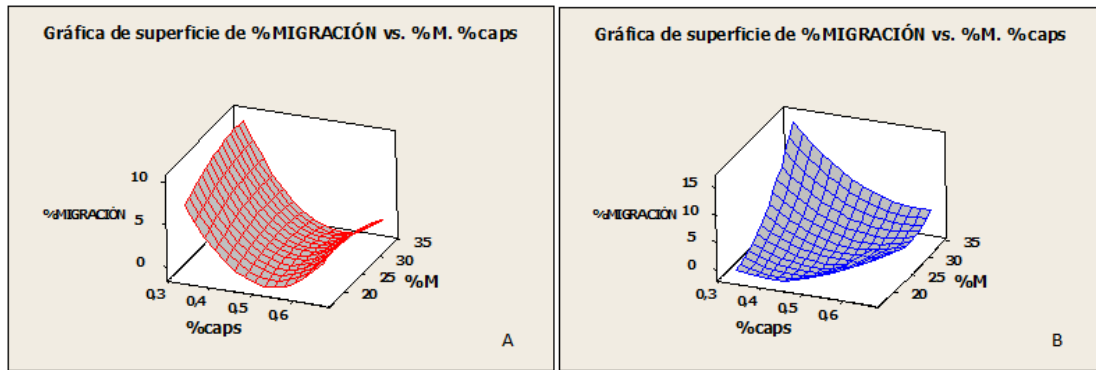
Los puntos estrella establecidos en el diseño experimental de fabricación del polímero, tienen valores por encima y por debajo de los mínimos y máximos de cada variable correlacionados con los puntos medios.

El análisis de los puntos estrella debe realizarse en función de los puntos medios, los cuales se discutieron anteriormente y mostraron una variabilidad alta del porcentaje de migración, debido a la inconsistencia de la fabricación del polímero; de acuerdo con esto no sería adecuado realizar el análisis de los puntos estrella sobre su influencia en la migración.

Con el fin de utilizar la información obtenida de los experimentos realizados, se aplicó una prueba estadística para la eliminación de datos sospechosos (prueba de Grubs) y así disminuir el coeficiente de variación y con ello analizar los resultados de los puntos estrella por medio de las superficies de respuesta como lo muestran las figuras 17 a la 20.



**Figura 17.** Gráficos de superficies de respuesta para simularte A

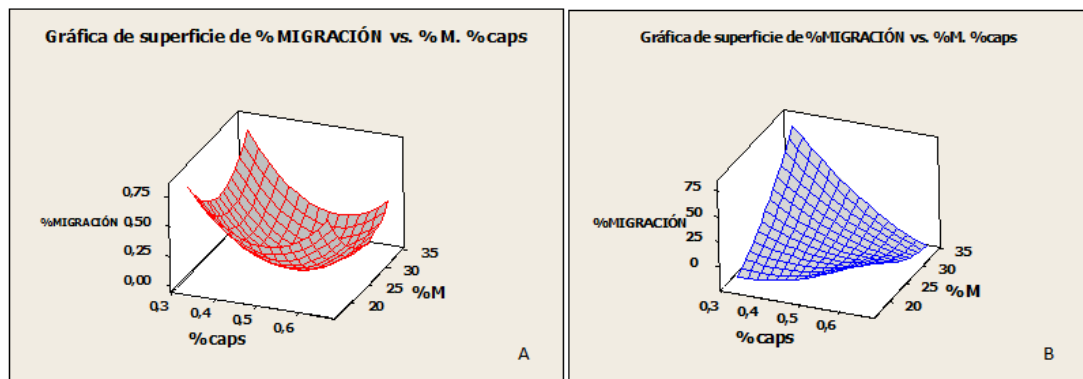


A) Temperatura 25°C

B) Temperatura 40°C

Con respecto a alimentos con humedad relativa alta, las gráficas de superficie de respuesta muestran que se puede fabricar el polímero con cualquier porcentaje de mezcla y con porcentajes de capsaicina medios si el polímero tendrá uso a temperaturas no mayores a 25°C (figura 17A), mientras que para temperaturas cercanas a 40°C, los valores bajos de migración se obtienen con porcentajes medios tanto para capsaicina como para mezcla (figura 17B).

**Figura 18.** Gráficos de superficies de respuesta para simularte B

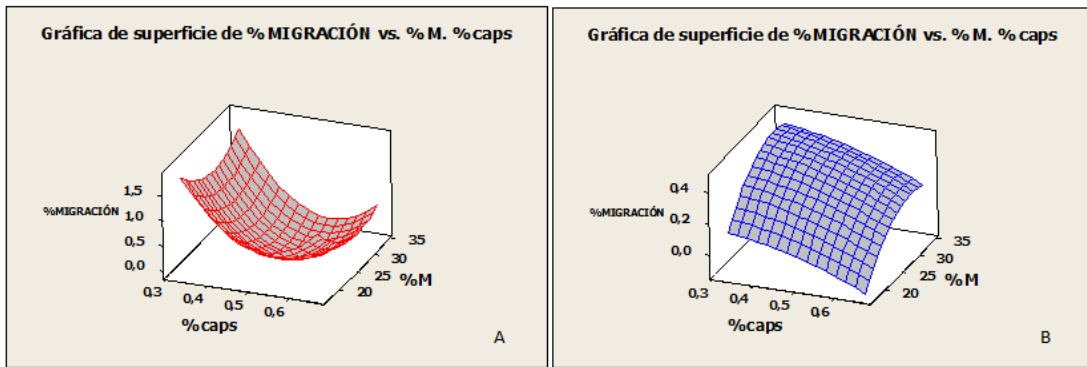


A) Temperatura 25°C

B) Temperatura 40°C

Para los alimentos con alguna acidez, se observa en sus respectivos gráficos de respuesta que el polímero se puede fabricar empleando porcentajes medio de capsaicina y mezcla si su uso comercial estará para temperaturas no mayores a 25°C (figura 18A), mientras que para temperaturas de uso cercanas a 40°C (figura 18B) se obtendrán valores bajos de migración si se utilizan valores bajos tanto para capsaicina y mezcla o valores altos de los mismos respectivamente.

**Figura 19.** Gráficos de superficies de respuesta para simularte C

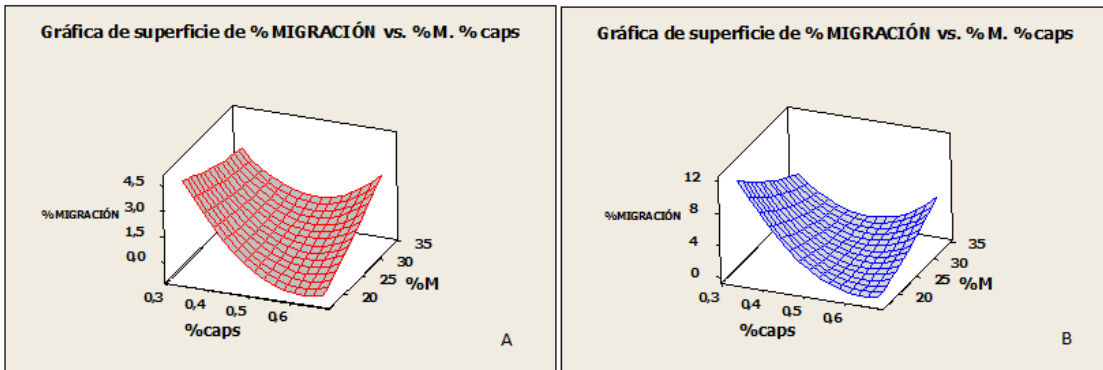


A) Temperatura 25°C

B) Temperatura 40°C

Para alimentos con tendencia a fermentarse, se puede observar que el polímero se puede fabricar con porcentajes medios tanto para capsaicina y mezcla si el polímero tendrá uso a temperaturas no mayores a 25°C (figura 19A), o porcentajes altos de capsaicina y porcentajes bajos de mezcla para uso del polímero a temperaturas cercanas a 40°C (figura 19B).

**Figura 20.** Gráficos de superficies de respuesta para simularte D



A) Temperatura 25°C

B) Temperatura 40°C

Para alimentos grasos, en los gráficos de respuesta se puede observar que para temperaturas de uso del polímero sea 25°C o 40°C (figura 20), este se puede fabricar con porcentajes altos de capsaicina y bajos de porcentaje de mezcla y con ello obteniendo menores porcentajes de migración.

### 5.7.2.3 Análisis en la migración de colorante por espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis)

En la tabla 39 se muestran los resultados de migración de colorante para cada tratamiento en el diseño experimental en la preparación del polímero, teniendo en cuenta los diferentes simulantes y temperaturas utilizados en el estudio de migración.

**Tabla 38.** Porcentaje de migración de colorante en los cuatro simulantes

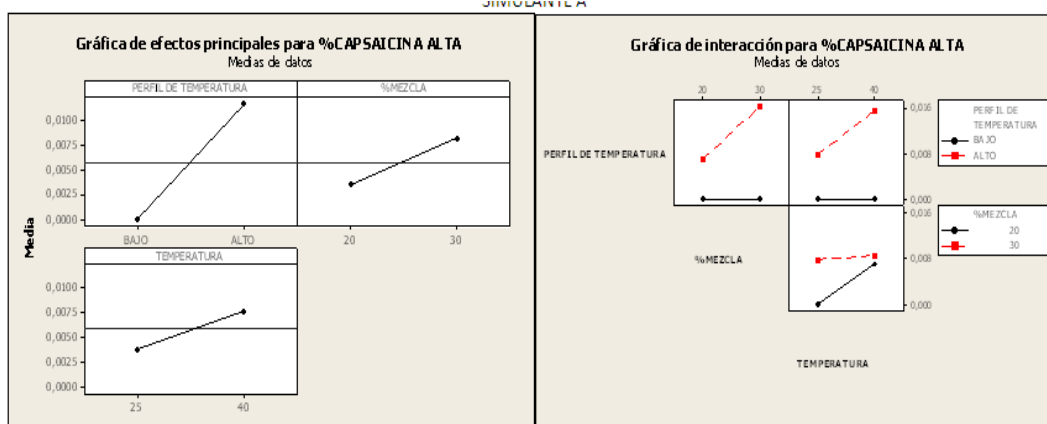
Análisis	Agua		Ac. Acético 3%		Etanol 15%		Aceite	
	25	40	25	40	25	40	25	40
1	<1,5E-6	<1,5E-6	0,012	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	0,011	0,023
2	<1,5E-6	<1,5E-6	0,012	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	0,0105	0,02
3	<1,5E-6	<1,5E-6	0,0115	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	0,011	0,0235
4	<1,5E-6	0,014	0,012	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	0,011	0,019
5	0,013	0,0135	0,012	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	0,011	0,011
6	0,0125	<1,5E-6	0,012	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	0,069	0,1425
7	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	0,03	0,12
8	0,0155	0,017	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	<1,5E-6	0,0105	<1,5E-6

Para el análisis se tomó el porcentaje de capsaicina como constante y como factores el perfil de temperatura, porcentaje de mezcla (factores de preparación) y temperatura de migración para cada simulante.

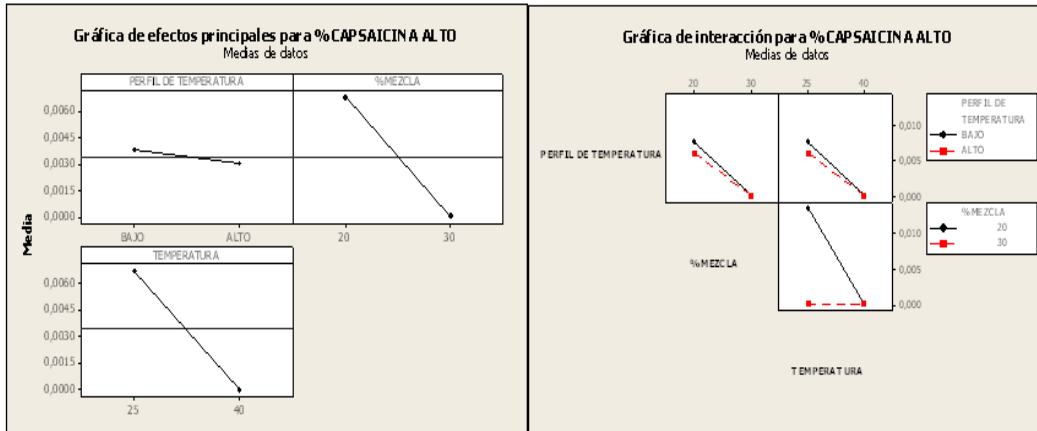
En la figura 21 se muestran los resultados para los efectos principales y de interacción para los cuatro simulantes en la migración de colorante.

**Figura 21.** Graficas de los efectos principales y de interacción para porcentaje alto de capsaicina en los cuatro simulantes

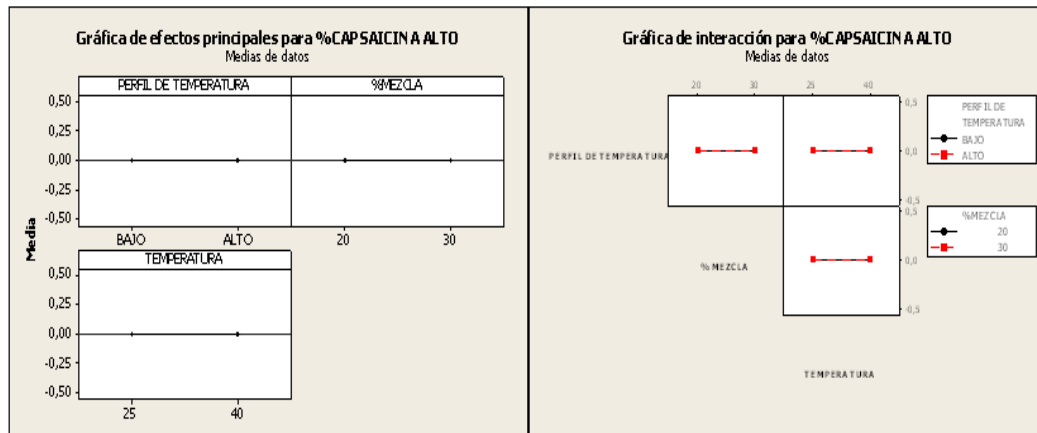
#### Simulante A



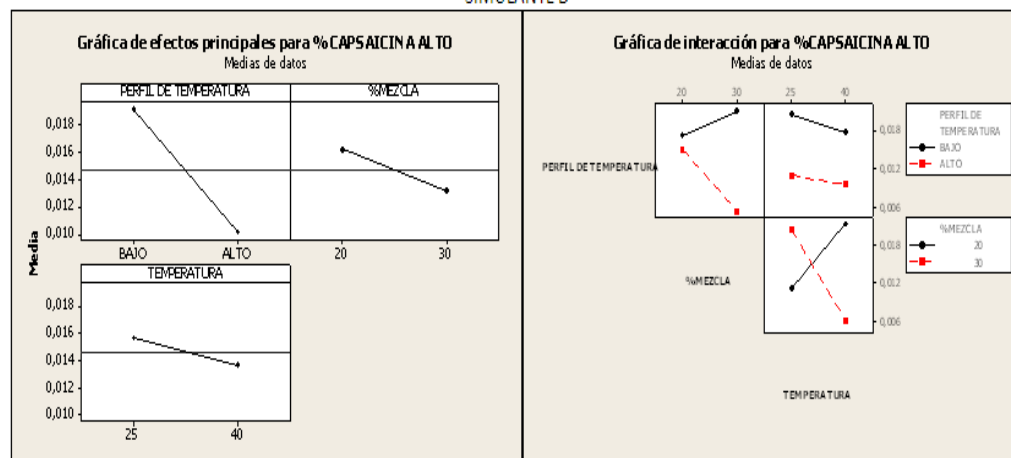
## Simulante B



## Simulante C



## Simulante D



- Análisis de efectos principales para porcentajes altos de capsaicina:
  - Se puede observar en los efectos principales para los simulantes B y D la tendencia a obtener menor migración de colorante al aumentar los valores de cada factor, pero diferenciándose en el factor perfil de temperatura el cual es influyente para la migración en el simulante D pero no para el simulante B.
  - Caso contrario a lo que ocurre con los simulantes B y D, el simulante A presentará mayor migración al aumentar el valor de cada factor.
  - Para el simulante C sin importar el valor que tome cada factor no habrá migración, por lo tanto el polímero se podrá emplear en alimentos con tendencia a fermentarse utilizando cualquier valor de los factores en su fabricación.

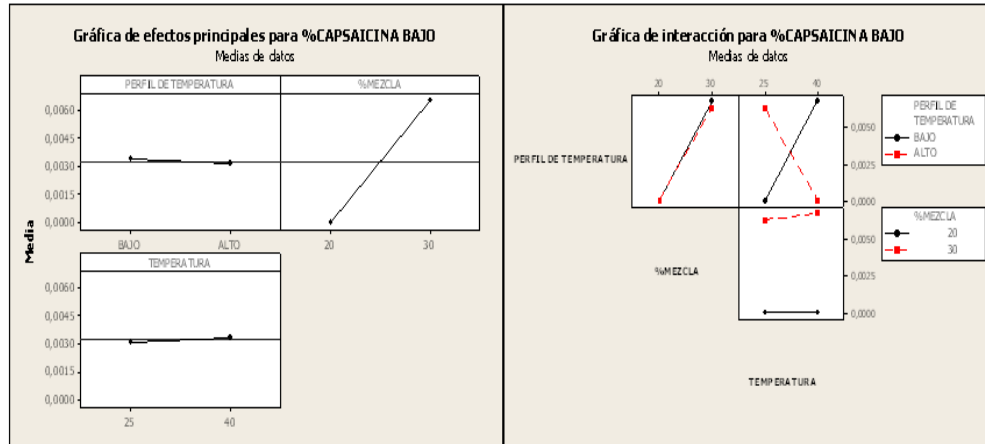
- Análisis de interacciones para porcentajes altos de capsaicina:
  - Como se observa en los gráficos de interacción para el simulante A, el perfil de temperatura es predominante en el porcentaje de migración siendo el perfil bajo donde se obtienen los menores porcentajes.
  - Por el contrario en el simulante B, se observa que sin importar el perfil de temperatura los porcentajes de migración serán menores si se utilizan porcentajes de Mezcla mayores.
  - En tanto para el simulante D los menores porcentajes de migración se obtendrán utilizando perfil de temperatura alto, con porcentajes de mezcla altos a unas temperatura de uso del polímero cercanas a 40°C.
  - Para el simulante C como se planteó en los efectos principales no importa el método de fabricación la migración será menor al límite de detección.

En la figura 22, se muestran los gráficos de efectos principales y de interacción correspondientes a porcentajes de capsaicina bajo.

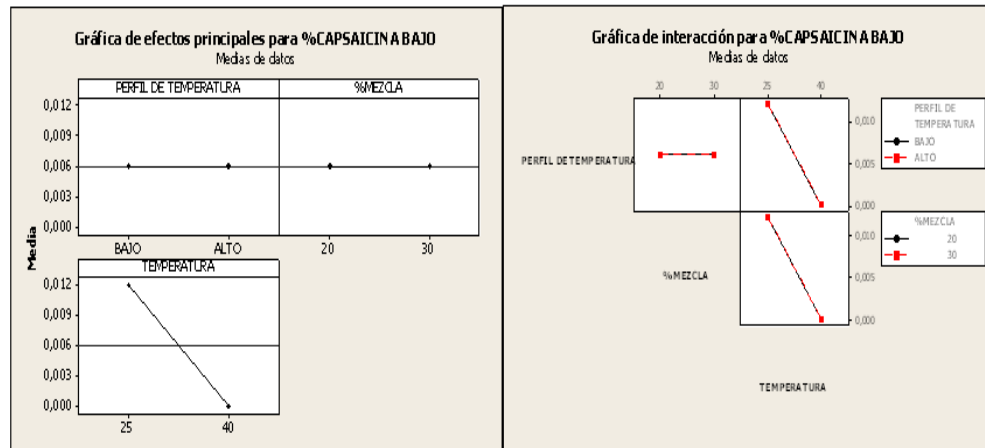
- Análisis de efectos principales para porcentajes bajos de capsaicina:
  - El porcentaje de mezcla es un factor que influye en la migración para los simulantes A y D que al aumentar este se obtendrá mayores porcentajes de migración, caso contrario en los simulantes B y C donde este es indiferente al valor en la migración de colorante.
  - Los factores de Perfil de Temperatura de fabricación y de temperatura de migración, son indiferentes en el porcentaje de migración para los simulantes A y C, pero si en el simulante D.
  - Los tres efectos principales en simulante C tienen comportamiento semejante a porcentajes de capsaicina altos como para bajos.

**Figura 22.** Efectos principales y de interacción para porcentaje bajo de capsaicina en los cuatro simulantes

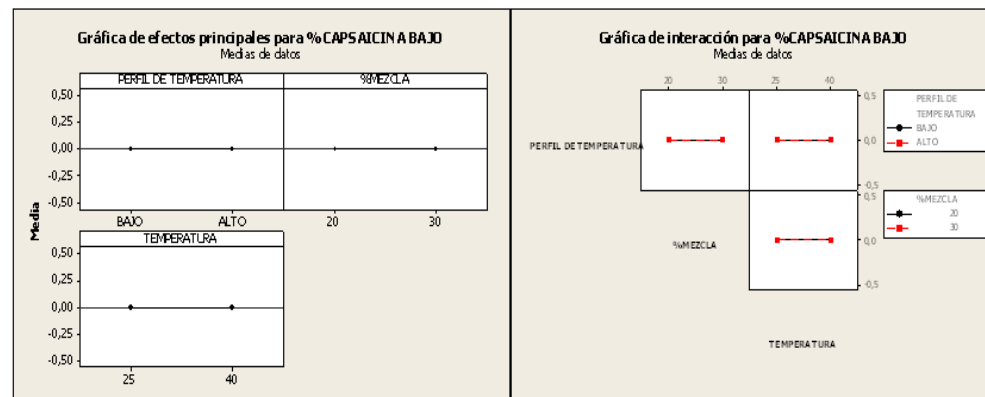
**Simulante A**



**Simulante B**



**Simulante C**





**Tabla 39.**Concentración de metales por absorción atómica

<b>Metal</b>	<b>Concentración ppb</b>
Plomo	< 0.05
Cadmio	< 0.8
Selenio	< 10
Mercurio	< 6



## 6. CONCLUSIONES

En el estudio de los compuestos de interés (capsaicina y colorante) se evaluó la influencia del tipo de simulante, el tiempo y la temperatura como parámetros fundamentales en la estabilidad de los compuestos. Para los simulantes se encontró que no se presentaron diferencias significativas en la concentración encontrada con las curvas preparadas en el solvente de trabajo (acetonitrilo para capsaicina y cloroformo para el colorante) con respecto a los diferentes simulantes al momento de cuantificar, lo cual permitió utilizar estas curvas para determinar los parámetros de calidad de las técnicas empleadas, encontrándose los límites de detección (0.06 % para capsaicina y 0.15% para colorante ) y cuantificación (0.19% para capsaicina y 0.05% para colorante) de cada técnica. Para determinar la repetibilidad y precisión intermedia se estudiaron las curvas de los compuestos de interés durante 10 días (periodo de evaluación de la migración) encontrándose que no hubo diferencias significativas en la linealidad de las curvas para este periodo (R entre 0.9999 y 0.9984 para la capsaicina; entre 0.9996 y 0.9958 para el colorante) permitiendo realizar la cuantificación con gran certeza.

La evaluación de la migración se realizó empleando metodologías de diseño experimental donde se involucraron como variables la temperatura de migración, el porcentaje de almidón en el polímero y el porcentaje de capsaicina utilizado como agente activo, los datos fueron analizados utilizando paquetes estadísticos como SPSS y MiniTab encontrándose correlaciones entre las variables.

La evaluación de la temperatura mostró una disminución de la concentración de los patrones de capsaicina al aumentar de 25° a 40°C, por lo cual se generó la necesidad de evaluar la cinética de disminución de ésta al cabo de los 10 días de estudio de la migración, con el fin de establecer el orden de la cinética de reacción y las constantes de velocidad que permitieron determinar en cada simulante la concentración real de migración al cabo del décimo día a las temperaturas de trabajo. Lamentablemente en el caso del colorante al poseer una solubilidad solo en el cloroformo limito este estudio debido a la alta volatilidad del solvente no pudiéndose realizar éste.

En la determinación de la cinética de disminución de la capsaicina se evaluó teniendo en cuenta diferentes concentraciones de capsaicina para el cálculo de las constantes de velocidad, se encontró que a medida que aumenta la concentración, la constante de velocidad de disminución de la capsaicina disminuye; por tal motivo para la determinación de la concentración real de migración se tuvo en cuenta la concentración encontrada en el migrante al décimo día para aplicar la constante más conveniente en la determinación de la concentración real de migración.

El desarrollo de las metodologías de diseño experimental permitió establecer la influencia de las variables en la migración y las posibles interacciones entre estas y su efecto con el porcentaje de migración. Este análisis realizado para cada simulante permitió establecer las condiciones de producción de los polímeros como dependiente del uso final dado al empaque. El análisis de puntos medios y estrella permite determinar el comportamiento de la migración como resultado de la interacción espacial de las variables entre los puntos extremos, encontrando en algunos casos menor porcentaje de migración con valores medios de concentración tal y como se pudo establecer.

El porcentaje de migración global tiene un límite de 60mg del material migrante/kg del material en suspensión, límite establecido para polímeros tradicionales, pero al tratarse de un polímero biodegradable las muestras presentan un valor muy por encima del límite, esto debido a que se trata de una muestra donde su componente mayoritario es almidón, compuesto con una alta capacidad de gelatinización, por lo que es fácilmente degradado en poco tiempo y los resultados obtenidos son los esperados, de lo anterior es necesario tener en cuenta que al utilizar esta clase de biopolímero no se podrá emplear para alimentos con prolongados tiempos de maduración.

## 7. RECOMENDACIONES

Después de realizar el procedimiento experimental y el análisis de resultados del presente proyecto se sugieren una serie de recomendaciones para trabajos complementarios de investigación o para el conocimiento total del polímero antes de su comercialización:

Se debe realizar un análisis de la estabilidad de la capsaicina dentro del proceso de fabricación del polímero con el fin de establecer su estabilidad térmica ya que como se encontró la temperatura de migración genera disminución de la concentración y al emplearse temperaturas mucho más altas en el proceso de extrusión podría generar pérdidas muy altas que puedan afectar su actividad final.

Como se pudo demostrar es evidente los resultados que muestran una disminución de la concentración de capsaicina al someterse a una temperatura de migración, no es claro si esta disminución se deba a procesos de degradación u otros procesos de autoconversión, por lo que el uso de técnicas como HPLC-MS podría ser útil para la identificación y cuantificación de otros posibles productos originados por la transformación.

El análisis de migración del colorante mostró que no hay transferencia de este hacia la mayoría de los simulantes (pequeñas cantidades en el simulante graso < 0.14%), lo cual permite establecer que su descomposición se llevara con los procesos de disgregación del polímero lo cual establece la necesidad de garantizar colorantes biodegradables en el proceso.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Aguayo Canela M. y Lora Monge E. (2007) Cómo realizar “paso a paso” un contraste de hipótesis con SPSS para Windows: (III) Relación o asociación y análisis de la dependencia (o no) entre dos variables cuantitativas. Correlación y regresión lineal simple. DOCUWEB FABIS. p. 1-15.
2. Álvarez H.R. (2000). Superficies de respuesta en la optimización de procesos de interés agroalimentario. Departamento de investigación Operativa. Universidad Politécnica de Catalunya. Barcelona (España).
3. Barceloux, D.G. (2009). Pepper and capsaicin. *Medical Toxicology of Natural Substances*, 55, 380 - 390.
4. Barnes, K. A.; Sinclair, C. R. & Watson, D. H. (2007) *Chemical Migration and Food Contact Materials*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England. Pags. 1 – 4; 17 – 30; 43 – 53.
5. Chandra, R., Rustgi E. (1998) biodegradable polymers. Department of Polymer Technology and Applied Chemistry, Delhi College of Engineering, Delhi-110006, India. Pag. 2-4
6. Correa, J., Rojas Iral Lucinia (2006). Estudio de Potencia de Pruebas de Homogeneidad de Varianza *Revista Colombiana de Estadística*. Volumen 29. p. 57-76.
7. David, G. F. Yushimito Wilfredo. (2004). *Diseño y Analisis de Experimentos en Minitab versión 14*. Departamento de ingeniería Industrial, Universidad de Puerto Rico.
8. Ding S. Petuskey T.W. (1998). Solutions to Fick's second law of diffusion with a sinusoidal excitation. Science and Engineering of Materials Program and the Department of Chemistry, Tempe, AZ 85287-1604, USA.
9. EU Commission Directive 85/572/CEE por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios. *Official Journal of the European Union*, L91/17. (1988)
10. EU Commission Directive 89/107/CEE por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios. *Official Journal of the European Union*, (1988)
11. Gonzales, G. et al (2011). *Tratamiento de datos spss*. Universidad de Vigo; p. 15-71
12. Gutiérrez, H., Salazar, R. *Análisis y Diseño de Experimentos*. México. Mc Graw – Hill 2004. p.103-105. ISBN 970-10-4017.
13. Heckman, J.H. (2005) Food packaging regulation in the United States and the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42, 96-122.

14. Helmroth, E., Rijk, R., Dekker, M., Jongen, W. (2002) Predictive modelling of migration from packaging materials into food products for regulatory purposes. *Food Science & Technology*. 102-109 pag 103.
15. Highlights in Bioplastics. IBAW Publication. (2005). Disponible en [http://www.european-bioplastics.org/media/files/docs/en-pub/050203\\_Highlights\\_in\\_Bioplastics\\_en.pdf](http://www.european-bioplastics.org/media/files/docs/en-pub/050203_Highlights_in_Bioplastics_en.pdf).
16. Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., Tadini, C. (2010) Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. Department of Chemical Engineering, Escola Politécnica, University of São Paulo. *Food Science and Technology*. Disponible en [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt).
17. Kuehl, O. (2001). Diseño de experimentos, principios estadísticos de diseño y análisis de investigación 2<sup>ed</sup>. The University of Arizona. Editorial thomson.
18. Levaggi, M. (2005). Los envases plásticos activos para alimentos. *Latinoamérica inside plastics*. Pag 1-5.
19. Mousavi, M., Desobry, S., Hardy, J. (1999). Mathematical Modelling of Migration of Volatile Compounds into Packaged Food via Package Free Space. Part II: Spherical Shaped Food. Laboratoire de Physico-chimie et Genie Alimentaires, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), 2, Avenue de la F&et de Haye - BP 172,54500, Vandoeuvre-l&-Nancy, France
20. NTC 4606 (1999). Norma Técnica Colombiana. Plásticos, determinación de la migración de plastificantes. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC.
21. NTC 5022 (2003). Norma técnica Colombiana. Materiales y artículos plásticos destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas. Determinación de migración global. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC.
22. Ortega, L. (2001) Validación de Métodos Analíticos. AEFI Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. Págs. 56 – 94.
23. Perdomo, .A., Pizo, V. (2010). Implementación de una metodología para la determinación de migración específica de capsaicina y colorante en un empaque biodegradable activo utilizando técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y ultravioleta-visible. Universidad del Cauca Departamento de Química.
24. Schweiggert, U.; Carle R.; Schieber, A. (2006). Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 557, 236-244.
25. Silva, A. Cruz Freire J.M, Sendón García R. Franz R, Losada P. (2006). Time-temperature study of the kinetics of migration of DPBD. Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela.

26. Skoog, D.; Holler, F.; Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*, Quinta edición. McGraw-Hill, Aravaca (Madrid).
27. Torres M. J. Garcia A. Ramirez E. (1998). Antimicrobial properties of alkalimides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. Departamento de Biotecnología y Bioquímica. CINVESTAN-IPN Unidad, Irapuato, Mexico.
28. Triantafyllou V., Demertzi A. Demertzis. (2006) A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard packaging materials to solid food matrices. Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace, GR-68100 Alexandroupolis, Greece.
29. Wong S.K, Lau O.W. (1997). Mathematical model for the migration of plasticisers from food contact materials into solid food. Department of Chemistry The Chinese University of Hong Kong, Shatin, N.T, Hong Kong.
30. Wong, A. C-Y. (1997) Colouring of moulded plastic products by the addition of colourmasterbatches. *Journal of Materials Processing Technology*, 63, 468-471.
31. Yan Sun, Kun Yang. (2007). Analysis of mass transport models based on Maxwell–Stefan theory and Fick’s law for protein uptake to porous anion exchanger. Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin, China.

## ANEXO 1.

### PRUEBAS DE NORMALIDAD (TEST DE SHAPIRO WILK) PARA HPLC

Precisión intermedia				DIA 5			
	Estadístico	gl	Sig.		Estadístico	gl	Sig.
<b>NIVEL1</b>	0,983	45	0,723	<b>NIVEL1</b>	0,975	9	0,936
<b>NIVEL2</b>	0,92	45	0,004	<b>NIVEL2</b>	0,896	9	0,228
<b>NIVEL3</b>	0,966	45	0,206	<b>NIVEL3</b>	0,829	9	0,043
<b>NIVEL4</b>	0,884	45	0	<b>NIVEL4</b>	0,865	9	0,109
<b>NIVEL5</b>	0,944	45	0,031	<b>NIVEL5</b>	0,8	9	0,02
<b>NIVEL6</b>	0,913	45	0,003	<b>NIVEL6</b>	0,772	9	0,01
<b>NIVEL7</b>	0,941	45	0,024	<b>NIVEL7</b>	0,884	9	0,173

DIA 1				DIA 7			
	Estadístico	gl	Sig.		Estadístico	gl	Sig.
<b>NIVEL1</b>	0,906	9	0,288	<b>NIVEL1</b>	0,943	9	0,61
<b>NIVEL2</b>	0,871	9	0,126	<b>NIVEL2</b>	0,918	9	0,374
<b>NIVEL3</b>	0,86	9	0,095	<b>NIVEL3</b>	0,881	9	0,162
<b>NIVEL4</b>	0,868	9	0,117	<b>NIVEL4</b>	0,885	9	0,177
<b>NIVEL5</b>	0,894	9	0,222	<b>NIVEL5</b>	0,738	9	0,004
<b>NIVEL6</b>	0,895	9	0,224	<b>NIVEL6</b>	0,87	9	0,123
<b>NIVEL7</b>	0,942	9	0,602	<b>NIVEL7</b>	0,792	9	0,017

DIA 3				DIA 10			
	Estadístico	gl	Sig.		Estadístico	gl	Sig.
<b>NIVEL1</b>	0,877	9	0,147	<b>NIVEL1</b>	0,954	9	0,735
<b>NIVEL2</b>	0,906	9	0,289	<b>NIVEL2</b>	0,905	9	0,281
<b>NIVEL3</b>	0,875	9	0,14	<b>NIVEL3</b>	0,838	9	0,055
<b>NIVEL4</b>	0,969	9	0,886	<b>NIVEL4</b>	0,908	9	0,303
<b>NIVEL5</b>	0,919	9	0,387	<b>NIVEL5</b>	0,832	9	0,047
<b>NIVEL6</b>	0,933	9	0,507	<b>NIVEL6</b>	0,796	9	0,018
<b>NIVEL7</b>	0,916	9	0,358	<b>NIVEL7</b>	0,863	9	0,103

## ANEXO 2.

TABLA DE HOMOGENIDAD DE VARIANZAS PRUEBA DE "LEVENE" PARA HPLC

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig. (p)
CUR1A	3,599	6	14	,023
CUR1B	10,135	6	14	,000
CUR1C	3,444	6	14	,027
CUR2A	6,895	6	14	,001
CUR2B	6,743	6	14	,002
CUR2C	4,575	6	14	,009
CUR3A	1,888	6	14	,153
CUR3B	4,348	6	14	,011
CUR3C	2,189	6	14	,107
CUR4A	2,151	6	14	,112
CUR4B	1,287	6	14	,325
CUR4C	4,725	6	14	,008
CUR5A	2,151	6	14	,112
CUR5B	1,287	6	14	,325
CUR5C	6,473	6	14	,002

## ANEXO 3

TABLA DE COMPARACION DE MEDIAS, PRUEBA T STUDENT PARA CURVAS DE HPLC

Valor de prueba = 2,570						
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
CURVA1A	2,468	6	,049	38,85386	,32617	77,38155
CURVA1B	2,510	6	,046	38,41229	,97018	75,85440
CURVA1C	2,471	6	,048	38,31471	,37310	76,25633
CURVA2A	2,473	6	,048	38,79614	,40463	77,18765
CURVA2B	2,485	6	,047	38,86329	,60175	77,12482
CURVA2C	2,473	6	,048	38,58214	,40662	76,75767
CURVA3A	2,458	6	,049	40,45100	,17830	80,72370
CURVA3B	2,465	6	,049	42,63157	,31800	84,94514
CURVA3C	2,497	6	,047	41,92614	,83554	83,01675
CURVA4A	2,462	6	,049	40,14043	,24605	80,03481
CURVA4B	2,484	6	,048	39,55900	,58787	78,53013
CURVA4C	2,474	6	,048	39,64700	,42988	78,86412
CURVA5A	2,484	6	,048	39,41329	,59116	78,23541
CURVA5B	2,502	6	,046	39,14629	,85962	77,43295
CURVA5C	2,483	6	,048	38,91057	,56440	77,25674



ANEXO 4.

ANALISIS DE REGRESION LINEAL PARA CURVAS DE HPLC

**ANOVA (dia1)**

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	29,729	2	14,864	5495,331	,000(a)
	Residual	,011	4	,003		
	Total	29,739	6			

**ANOVA (dia2)**

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	29,730	2	14,865	5984,035	,000(a)
	Residual	,010	4	,002		
	Total	29,739	6			

**ANOVA (dia3)**

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	29,732	2	14,866	7982,291	,000(a)
	Residual	,007	4	,002		
	Total	29,739	6			

**ANOVA (dia4)**

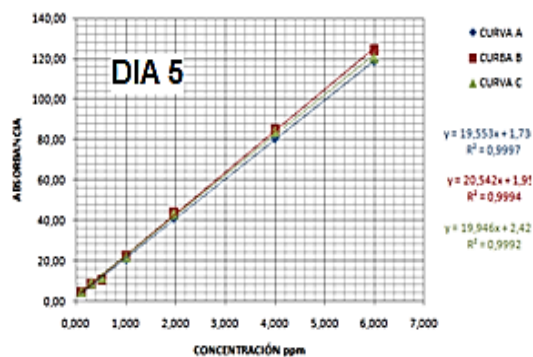
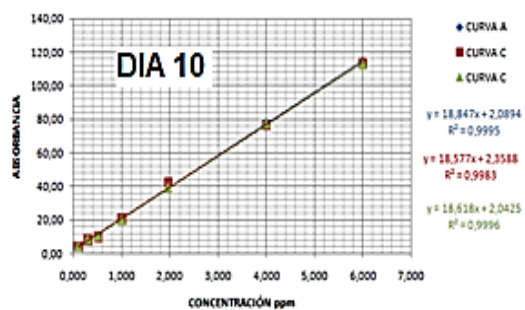
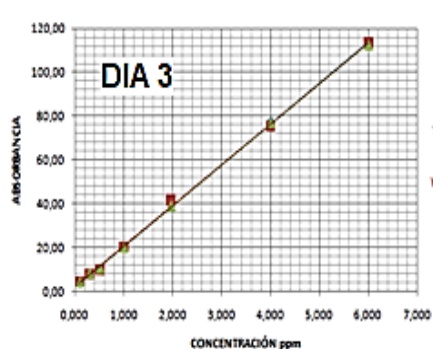
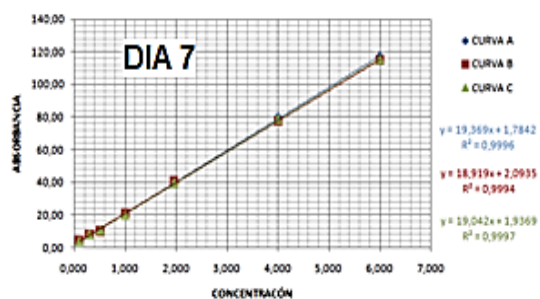
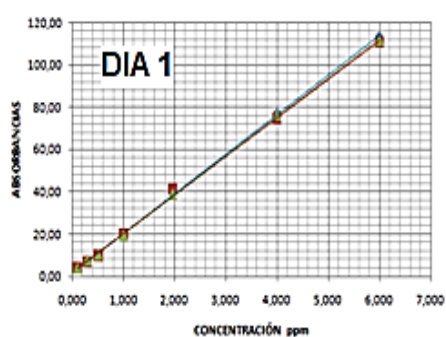
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	29,731	2	14,866	7265,151	,000(a)
	Residual	,008	4	,002		
	Total	29,739	6			

**ANOVA (dia5)**

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	29,727	2	14,864	4769,261	,000(a)
	Residual	,012	4	,003		
	Total	29,739	6			

## ANEXO 5

### CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA REPETIBILIDAD EN LA TECNICA HPLC



## ANEXO 6.

### PRUEBAS DE NORMALIDAD (TEST DE SHAPIRO WILK) PARA UV

DIA 1				DIA 7			
	Estadístic o	gl	Sig.		Estadístico	gl	Sig.
<b>NIVEL1</b>	0,886	9	0,183	<b>NIVEL1</b>	0,815	9	0,03
<b>NIVEL2</b>	0,844	9	0,064	<b>NIVEL2</b>	0,912	9	0,332
<b>NIVEL3</b>	0,789	9	0,015	<b>NIVEL3</b>	0,711	9	0,002
<b>NIVEL4</b>	0,871	9	0,125	<b>NIVEL4</b>	0,835	9	0,05
<b>NIVEL5</b>	0,834	9	0,05	<b>NIVEL5</b>	0,855	9	0,084
<b>NIVEL6</b>	0,802	9	0,022	<b>NIVEL6</b>	0,823	9	0,037
DIA 3				DIA 10			
	Estadístic o	gl	Sig.		Estadístico	gl	Sig.
<b>NIVEL1</b>	0,819	9	0,034	<b>NIVEL1</b>	0,851	9	0,076
<b>NIVEL2</b>	0,792	9	0,016	<b>NIVEL2</b>	0,838	9	0,055
<b>NIVEL3</b>	0,82	9	0,035	<b>NIVEL3</b>	0,931	9	0,494
<b>NIVEL4</b>	0,854	9	0,083	<b>NIVEL4</b>	0,857	9	0,088
<b>NIVEL5</b>	0,67	9	0,001	<b>NIVEL5</b>	0,859	9	0,094
<b>NIVEL6</b>	0,733	9	0,003	<b>NIVEL6</b>	0,803	9	0,022
DIA 5							
	Estadístic o	gl	Sig.				
<b>NIVEL1</b>	0,876	9	0,144				
<b>NIVEL2</b>	0,703	9	0,002				
<b>NIVEL3</b>	0,876	9	0,141				
<b>NIVEL4</b>	0,675	9	0,001				
<b>NIVEL5</b>	0,876	9	0,143				
<b>NIVEL6</b>	0,714	9	0,002				

## ANEXO 7

TABLA DE HOMOGENIDAD DE VARIANZAS PRUEBA DE “LEVENE” PARA REPETIBILIDAD UV

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
CUR1A	6,857	5	12	,003
CUR1B	2,465	5	12	,093
CUR1C	2,900	5	12	,061
CUR3A	7,539	5	12	,002
CUR3B	2,198	5	12	,122
CUR3C	,366	5	12	,862
CUR5A	7,563	5	12	,002
CUR5B	1,414	5	12	,288
CUR5C	3,399	5	12	,038
CUR7A	,998	5	12	,459
CUR7B	3,067	5	12	,052
CUR7C	4,690	5	12	,013
CUR10A	2,522	5	12	,088
CUR10B	1,359	5	12	,306
CUR10C	1,443	5	12	,278

## ANEXO 8

TABLA DE COMPARACION DE MEDIAS, PRUEBA T STUDENT PARA CURVAS DE UV

Valor de prueba = 0						
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
CUR1A	3,242	5	,023	,34517	,07145	,61889
CUR1B	3,115	5	,026	,35800	,06259	,65341
CUR1C	3,314	5	,021	,38900	,08730	,69070
CUR2A	3,173	5	,025	,40967	,07780	,74153
CUR2B	3,357	5	,020	,39967	,09365	,70568
CUR2C	3,334	5	,021	,41417	,09479	,73354
CUR3A	3,078	5	,028	,41633	,06860	,76407
CUR3B	3,293	5	,022	,40417	,08868	,71965
CUR3C	3,437	5	,018	,43550	,10978	,76122
CUR4A	3,225	5	,023	,43383	,08808	,77959
CUR4B	3,368	5	,020	,43483	,10291	,76676
CUR4C	3,262	5	,022	,48100	,10199	,86001
CUR5A	3,154	5	,025	,44333	,08202	,80464
CUR5B	3,292	5	,022	,44450	,09739	,79161
CUR5C	3,388	5	,019	,45883	,11075	,80692

## ANEXO 9

ANOVA (DIA1)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	15,204	3	5,068	2151,844	,000(a)
	Residual	0,005	2	0,002		
	Total	15,208	5			

ANOVA (DIA2)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	15,201	3	5,067	1401,911	,001(a)
	Residual	0,007	2	0,004		
	Total	15,208	5			

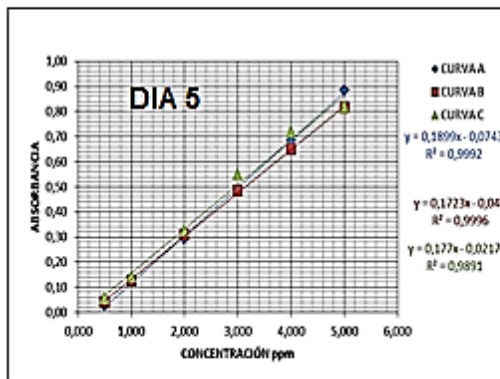
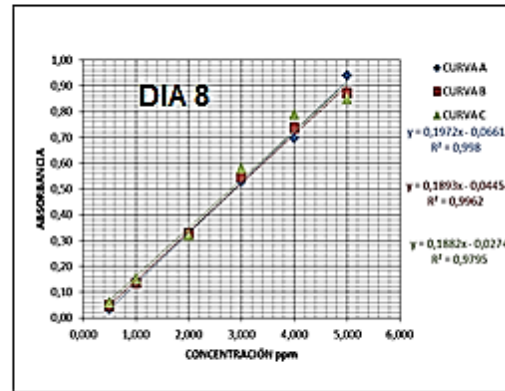
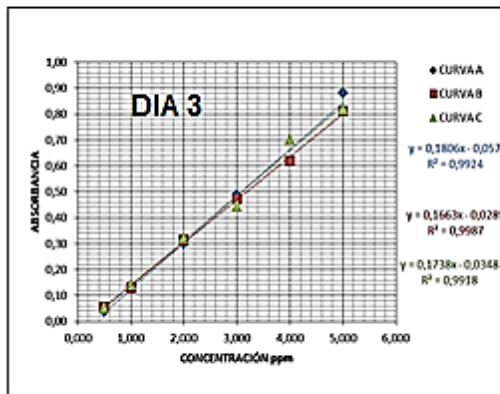
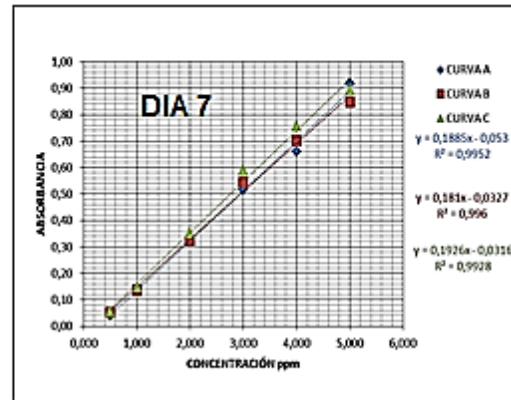
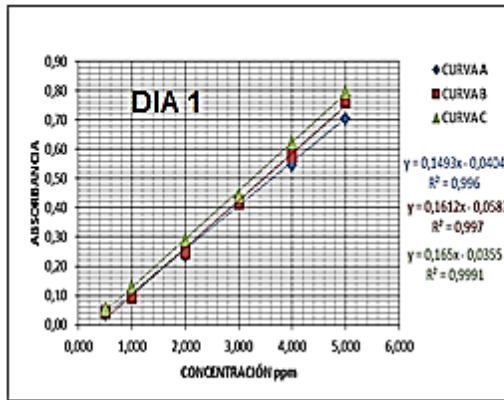
ANOVA (DIA3)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	15,208	3	5,069	48581,301	,000(a)
	Residual	0	2	0		
	Total	15,208	5			

ANOVA (DIA4)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	15,193	3	5,064	670,48	,001(a)
	Residual	0,015	2	0,008		
	Total	15,208	5			

ANOVA (DIA5)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	15,205	3	5,068	3131,708	,000(a)
	Residual	0,003	2	0,002		
	Total	15,208	5			

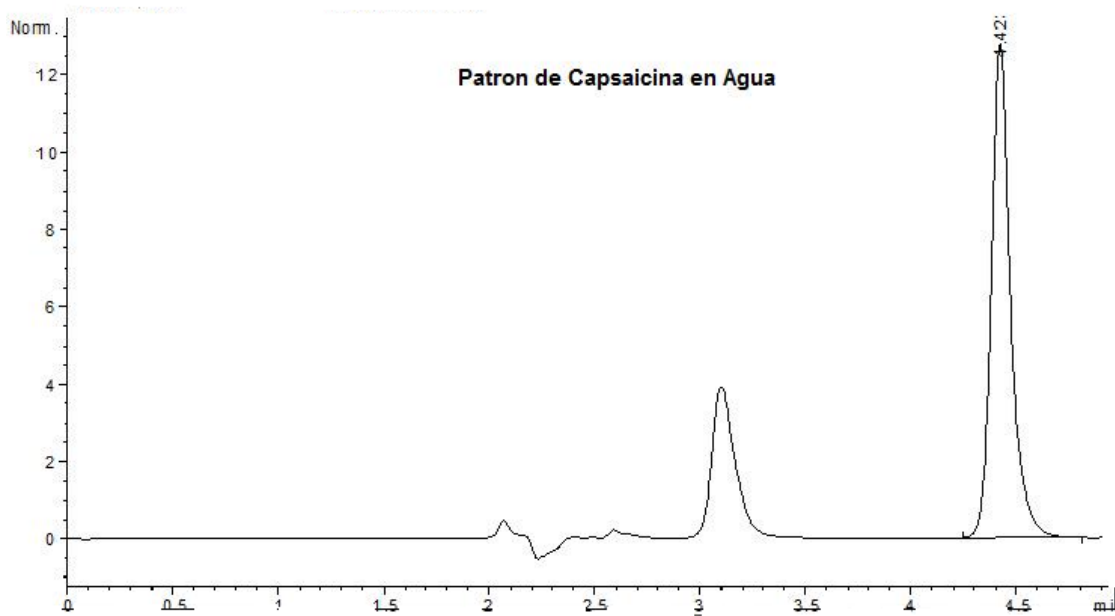
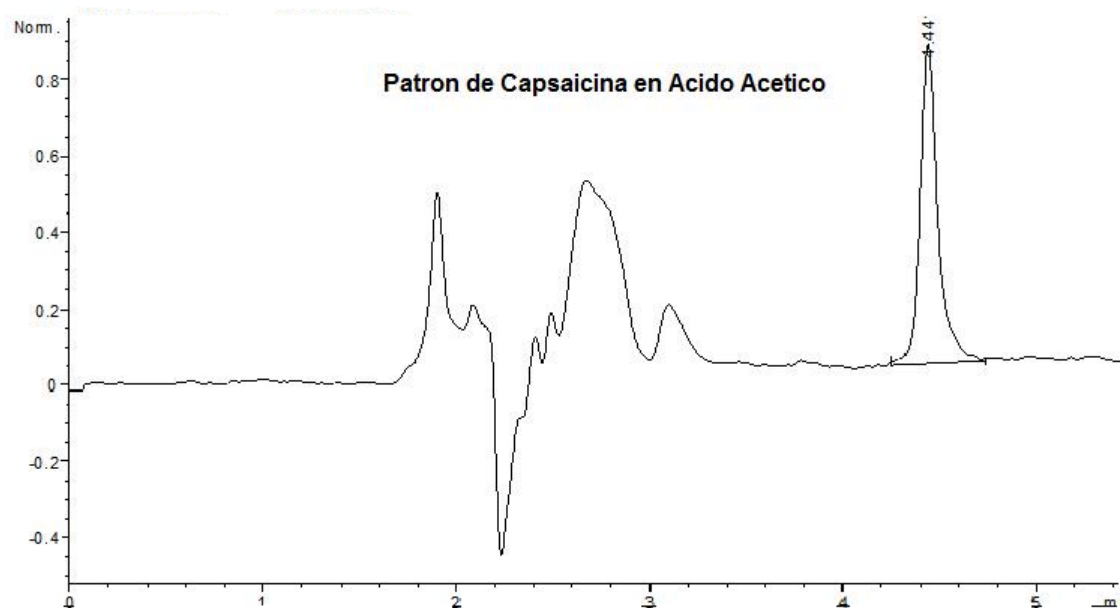
## ANEXO 10

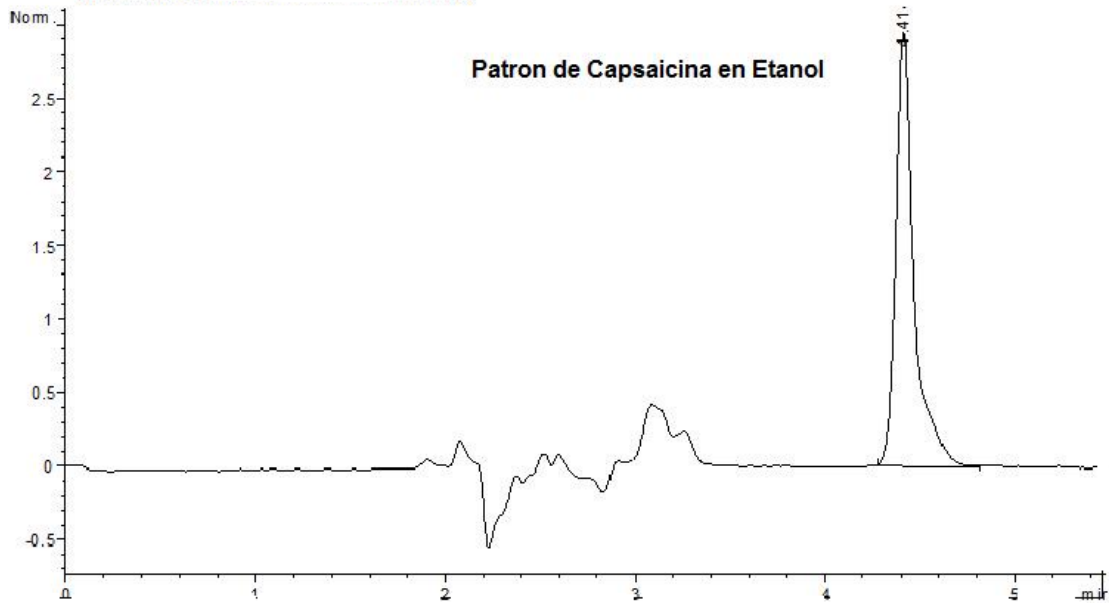
### CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA REPETIBILIDAD EN LA TECNICA UV



## ANEXO 11.

### CROMATOGRAMAS DE PATRONES DE CAPSAICINA EN HPLC





## ANEXO 12.

### CROMATOGRAMAS DE MUESTRAS

