

**ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO Y PLOMO POR
ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN
TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES**



LEIDY FERNANDA ALVIRA MANIOS

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

**ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO Y PLOMO POR
ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN
TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES**

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

LEIDY FERNANDA ALVIRA MANIOS

Directora:

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

Asesores:

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

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

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

Nota de aceptación:

Directora _____
Maite Del Pilar Rada Mendoza, Ph.D.

Jurado _____
Fernando Hernández Blanco, M.Sc.

Jurado _____
Germán Cuervo Ochoa, Ph.D.

Fecha de sustentación: 24 de Abril del 2012

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por estar siempre conmigo y ser la fuente de mi energía y de mis éxitos, a mi mamá y mis hermanos por sus esfuerzos constantes, por creer siempre en mí y ser mi apoyo incondicional.

A mis angelitos de la guarda por guiar mi camino y enseñarme a soñar.

A mis amigos especialmente a Carolina, Edier, Jeyson, Lele, Evelyn, Vicky, Leydi y Marcela, por hacer de ésta carrera un camino de carnaval y por ayudarme a ver que hasta en los malos momentos siempre hay una palabra adecuada o un abrazo que nos hace sonreír.

A mis profesores de química, a las cuales les debo no sólo mi formación académica sino también por sus aportes a mi formación personal.

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

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

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE GRÁFICAS	14
LISTA DE ECUACIONES	15
LISTA DE REACCIONES	16
LISTA DE ANEXOS.....	17
LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	18
RESUMEN	20
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	24
3.1 MATERIAS PRIMAS EMPLEADAS PARA LA ELABORACIÓN DE BIOPOLÍMEROS	24
3.1.1 Harina y almidón de yuca.....	24
3.1.2 Fibras de fique	25
3.1.3 Plastificantes.....	26
3.1.4 Ácido Poliláctico (PLA)	26
3.2 BIODEGRADABILIDAD	26
3.2.1 Polímeros biodegradables a base de harina y almidón.....	28
3.2.1.1 Termoformados.....	28
3.2.1.2 Almidón termoplástico – películas flexibles.....	29

3.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS	30
3.4	DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO.....	31
3.5	METALES PESADOS TÓXICOS EN LOS POLÍMEROS BIODEGRADABLES	32
3.5.1	Arsénico	33
3.5.2	Plomo.....	33
3.6	ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	34
3.6.1	Atomización	34
3.6.2	Métodos	34
3.6.2.1	Generación de hidruros.....	34
3.6.2.2	Horno de grafito	35
3.7	ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	35
3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
3.8.1	Supuestos	37
3.8.1.1	Distribución Normal de las Poblaciones (Prueba de Shapiro-Wilk)....	37
3.8.1.2	Igualdad u Homogeneidad de Varianzas (Estadístico de Levene)	37
3.8.2	Análisis de Varianza (ANOVA).....	37
4.	METODOLOGÍA	39
4.1	EQUIPOS, MATERIALES y REACTIVOS.....	39
4.2	LIMPIEZA DEL MATERIAL.....	41
4.3	VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO.....	41
4.4	MUESTRAS	41
4.5	PRE-TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	41
4.6	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO	42
4.6.1	Optimización del peso de la muestra	42
4.6.2	Optimización del tiempo y temperatura	42
4.6.3	Optimización de la relación de ácidos	42

4.7	MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN.....	43
4.8	PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA.....	43
4.8.1	Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico y plomo	43
4.8.2	Disminución de interferencias para la determinación de As	44
4.9	ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO Y PLOMO.....	44
4.9.1	Intervalo de linealidad	44
4.9.2	Precisión.....	44
4.9.3	Sensibilidad.....	45
4.9.4	Límite de detección y de cuantificación	45
4.9.5	Exactitud.....	45
4.10	ESTABILIDAD DE LOS METALES.....	46
4.11	DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO POR ABSORCIÓN ATÓMICA MEDIANTE LA GENERACIÓN DE HIDRUROS	46
4.12	DETERMINACIÓN DE PLOMO POR ABSORCIÓN ATÓMICA MEDIANTE HORNO DE GRAFITO	46
4.13	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
5.1	VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO.....	48
5.2	OPTIMIZACIÓN DE LA DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO.....	48
5.2.1	Optimización del peso de la muestra	48
5.2.2	Optimización del tiempo y temperatura	49
5.2.3	Optimización de la relación de ácidos	51
5.3	PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA.....	53
5.3.1	Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico y plomo	53
5.3.2	Disminución de interferencias para la determinación de arsénico	54
5.4	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD	56

5.4.1	Intervalo de linealidad para arsénico y plomo	56
5.4.2	Precisión del método de arsénico y plomo	58
5.4.3	Sensibilidad para arsénico y plomo.....	61
5.4.4	Límite de detección y de cuantificación	61
5.4.5	Exactitud del método de arsénico y plomo.....	62
5.5	ESTABILIDAD DE LOS METALES.....	64
5.5.1	Estándares de arsénico y plomo.....	64
5.5.2	Estabilidad en muestras.....	65
5.6	DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO Y PLOMO POR ABSORCIÓN ATÓMICA ...	67
6.	CONCLUSIONES.....	73
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	74
	ANEXOS	80

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1.	Equipos empleados para la estandarización e implementación de los métodos analíticos.....	39
Tabla 2.	Relaciones de ácido nítrico y perclórico utilizadas para la optimización de la digestión ácida con reflujo.....	43
Tabla 3.	ANOVA de un factor para la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de As.....	53
Tabla 4.	ANOVA de un factor para la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de Pb.....	54
Tabla 5.	Absorbancias de arsénico en un estándar (8,0 µg/L) y en muestra digestada (CM 523-7) con o sin la adición de KI/ácido ascórbico y/o ácido sulfámico, intervalo de confianza y coeficiente de variación.....	54
Tabla 6.	Prueba de Tukey para los ensayos de disminución de interferencias al estándar de 8 µg As/L.....	55
Tabla 7.	Absorbancia de arsénico, intervalo de confianza y coeficiente de variación en el termoformado CM 523-7 con la adición de ácido sulfámico y tiempo de reacción.....	55
Tabla 8.	Coefficientes de Correlación de Pearson para el intervalo lineal de As y Pb.....	57
Tabla 9.	Coefficiente de Regresión, Coeficiente de Determinación y Coeficiente de Determinación Ajustado para el intervalo lineal de As y Pb.....	57
Tabla 10.	Grados de libertad para As y Pb empleados en la prueba de Levene de repetibilidad y precisión intermedia.....	59
Tabla 11.	Absorbancia media, intervalo de confianza y coeficiente de variación de la curva de calibración para la repetibilidad de As y Pb.....	59
Tabla 12.	Absorbancia media, intervalo de confianza y coeficiente de variación de la curva de calibración para la precisión intermedia de As y Pb.....	60
Tabla 13.	Pendiente de la repetibilidad y precisión intermedia de arsénico y plomo para la sensibilidad analítica.....	61
Tabla 14.	Ecuaciones de las curvas de calibración para el LD y LC de Arsénico y Plomo, pendiente, intercepto y sus medias con las respectivas desviaciones estándar.....	62
Tabla 15.	Límite de detección y de cuantificación de Arsénico y Plomo.....	62
Tabla 16.	Porcentaje de recuperación de arsénico en la muestra de termoformado CM 4575-7.....	62
Tabla 17.	Porcentaje de recuperación de plomo en el termoformado MPER 183.....	63
Tabla 18.	Porcentaje de recuperación de plomo en la película flexible CM 7138-7 nativa.....	63
Tabla 19.	Absorbancia, intervalo de confianza y coeficiente de variación de la estabilidad del estándar de As y Pb.....	64
Tabla 20.	Absorbancia, intervalo de confianza y coeficiente de variación de la estabilidad de As y Pb en muestras de termoformados y película flexible.....	66
Tabla 21.	Condiciones instrumentales en el EAA - Generador de Hidruros para determinación de Arsénico.....	67

Tabla 22.	Condiciones instrumentales en el EAA - Horno de Grafito para la determinación de Plomo.....	67
Tabla 23.	Condiciones de temperatura óptimas del Horno de Grafito para la determinación de Plomo.....	67
Tabla 24.	Concentración de As y Pb en µg/kg, intervalo de confianza y coeficiente de variación de siete muestras de termoformados biodegradables.....	69
Tabla 25.	Concentración de As y Pb en µg/kg, intervalo de confianza y coeficiente de variación de seis muestras de películas flexibles biodegradables.....	70
Tabla 26.	Concentración de As y Pb en µg/kg, intervalo de confianza y coeficiente de variación en las muestras de materia prima de los termoformados.....	71
Tabla 27.	Concentración de As y Pb en µg/kg, intervalo de confianza y coeficiente de variación, en las muestras de materia prima de las películas flexibles.....	71
Tabla 28.	Factor "Z" en mL/g para el control de materiales volumétricos.....	82
Tabla 29.	Datos de calibración del balón de 50 mL (vidrio de borosilicato).....	83
Tabla 30.	Datos de calibración de balones de 100 mL (vidrio de borosilicato).....	83
Tabla 31.	Datos de calibración de balones de 5 mL (vidrio de borosilicato).....	84
Tabla 32.	Datos de calibración de balones de 10 mL (vidrio de borosilicato).....	85
Tabla 33.	Porcentajes de humedad, intervalo de confianza y coeficiente de variación en muestras de termoformados biodegradables.....	86
Tabla 34.	Porcentajes de humedad, intervalo de confianza y coeficiente de variación en muestras de películas flexibles biodegradables.....	86
Tabla 35.	Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:0.....	87
Tabla 36.	Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 3:1.....	88
Tabla 37.	Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:1.....	89
Tabla 38.	Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:3.....	90
Tabla 39.	Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo de la película flexible SM 707-17 hidrolizado para la relación ácido nítrico:perclórico 3:1.....	91
Tabla 40.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico.....	92
Tabla 41.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de plomo.....	93
Tabla 42.	Estadístico de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico.....	93
Tabla 43.	Estadístico de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de plomo....	93
Tabla 44.	ANOVA de un factor para los ensayos de adición de KI/Ácido ascórbico y/o ácido sulfámico a un estándar de 8 µg As/L arsénico.....	94
Tabla 45.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en el Intervalo de linealidad de arsénico.....	94
Tabla 46.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en el Intervalo de linealidad de plomo.....	94
Tabla 47.	Estadístico de la curva de calibración para el intervalo de linealidad de As y Pb.....	95
Tabla 48.	Análisis de regresión para el modelo $y = \beta_0 + \beta_1x$ para el intervalo de linealidad de As y Pb.....	95
Tabla 49.	ANOVA de un factor para el intervalo de linealidad de As y Pb.....	95

Tabla 50.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en la Repetibilidad de As.....	96
Tabla 51.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración para la Repetibilidad de Pb.....	97
Tabla 52.	Coeficiente de Correlación de Pearson para la Repetibilidad de As y Pb..	98
Tabla 53.	Coeficiente de Regresión, Coeficiente de Determinación y Coeficiente de Determinación Ajustado para la Repetibilidad de As y Pb.....	98
Tabla 54.	Análisis de regresión para el modelo $y = \beta_0 + \beta_1x$ para la Repetibilidad de As y Pb.....	98
Tabla 55.	ANOVA de un factor para la Repetibilidad de As y Pb.....	98
Tabla 56.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en la precisión intermedia de As.....	99
Tabla 57.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en la precisión intermedia de Pb.....	100
Tabla 58.	Coeficiente de Correlación de Pearson para la Precisión Intermedia de As y Pb.....	102
Tabla 59.	Coeficiente de Regresión, Coeficiente de Determinación y Coeficiente de Determinación Ajustado para la Precisión Intermedia de As y Pb.....	102
Tabla 60.	Análisis de regresión para el modelo $y = \beta_0 + \beta_1x$ para la Precisión Intermedia de As y Pb.....	102
Tabla 61.	ANOVA de un factor para Arsénico y Plomo de la Precisión Intermedia...	103
Tabla 62.	Prueba de Levene para las tres curvas de calibración a emplear en el límite de detección y cuantificación de As y Pb.....	103
Tabla 63.	Prueba t para el porcentaje de recuperación de As en el termoformado CM 4575-7.....	103
Tabla 64.	Prueba t para el porcentaje de recuperación de Pb en termoformado MPER 183.....	104
Tabla 65.	Prueba t para el porcentaje de recuperación de Pb en película flexible CM 7138-7 nativa.....	104
Tabla 66.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la estabilidad durante 7 días de un estándar de 8,0 µg/L de As.....	104
Tabla 67.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la estabilidad durante 7 días de un estándar de 3,0 µg/L de Pb.....	105
Tabla 68.	Prueba t para la estabilidad durante 7 días de estándar de 8,0 µg/L de As y estándar de 3,0 µg/L de Pb	105
Tabla 69.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar parametricidad de la estabilidad de As en el termoformado CM 4574-7 durante 7 días.....	106
Tabla 70.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar parametricidad de la estabilidad de Pb en el termoformado CM 4574-7 durante 7 días.....	106
Tabla 71.	Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar parametricidad de la estabilidad de Pb en la Película Flexible CM 7138-7 nativo, durante 7 días.....	107
Tabla 72.	Prueba t para la estabilidad durante 7 días de As y Pb en el Termoformado CM 4574-7 y de Pb en la Película Flexible CM 7138-7 Nativo	107
Tabla 73.	Optimización de la temperatura de calcinación y atomización del horno de grafito para la determinación de Pb.....	108
Tabla 74.	ANOVA de un factor para las 5 muestras de termoformados (MBRA 383, MPER 183, CM 4574 – 7, CM 523 – 7 y CM 7951 – 5) con concentración	

	de $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Plomo.....	108
Tabla 75.	ANOVA de un factor para las 3 muestras de materia prima de termoformados (MBRA 383, CM 523 – 7 y FIBRA DE FIQUE) con concentración de $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Plomo.....	108

LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1.	Amilosa.....	24
Figura 2.	Amilopectina.....	25
Figura 3.	Ciclo de la vida de la biomasa.....	28
Figura 4.	Muestras: a) Termoformados, b) Películas flexibles... ..	42
Figura 5.	Digestión ácida con HNO ₃ :HClO ₄ (3:1) a 70°C por 180 minutos de: a) 2,0000 g, b) 1,0000 g de muestra de termoformado HMC1.....	49
Figura 6.	Digestión ácida con HNO ₃ :HClO ₄ (3:1) a 50°C por 60 minutos de: a) 5,0000 g, b) 1,0000g, c) 2,0000 g de películas flexible SM 707-17 hidrolizado	49
Figura 7.	Digestiones de 1,0000 g de películas flexible con HNO ₃ :HClO ₄ (3:1) durante 45 minutos y temperatura de a) 35°C, b) 50°C y c) 70°.....	50
Figura 8.	Digestiones ácidas de 1,000 g de termoformado (HMC 1) con HNO ₃ :HClO ₄ a 70°C, durante 180 minutos en la relación de ácidos: a) 1:0, b) 1:1, c) 1:3, d) 3:1 y e) 0:1.....	51

LISTA DE GRÁFICAS

		pág.
Gráfica 1.	Optimización de la cantidad de muestra de termoformado (HMC 1) a emplear en la digestión ácida con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1) a 70°C por 180 minutos.....	49
Gráfica 2.	Optimización de la temperatura a emplear en la digestión ácida con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1) por 180 minutos de la muestra termoformado (HMC 1).....	50
Gráfica 3.	Optimización relación de ácido nítrico-perclórico a emplear en la digestión ácida de 1,0000 g de termoformado (HMC 1) con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ a 70°C, durante 180 minutos.....	51
Gráfica 4.	Efectos de interacción del tiempo a 120 y 180 minutos, de la temperatura a 50 y 70°C y de la relación de ácidos 1:3 y 3:1 de $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$, en la digestión de 1,0000 g de termoformado HMC 1.....	52
Gráfica 5.	Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de: a) arsénico, b) plomo empleando el estándar 1 (4,0 µg As/L y 2,0 µg Pb/L), el estándar 2 (12,0 µg As/L y 2,5 µg Pb/L) y el estándar 3 (16,0 µg As/L y 3,5 µg Pb/L).....	53
Gráfica 6.	Curvas de calibración para el intervalo lineal de: a) arsénico, b) plomo.....	56
Gráfica 7.	Curvas de calibración para repetibilidad de: a) arsénico, b) plomo....	58
Gráfica 8.	Curvas de calibración para precisión intermedia de: a) arsénico, b) plomo.....	58
Gráfica 9.	Estabilidad del estándar de: a) As de 8,0 µg/L, b) Pb de 3,0 µg/L durante 7 días.....	64
Gráfica 10.	Estabilidad de: a) As en la muestra de termoformado CM 4574-7, b) Pb en el termoformado CM 4574-7, c) Pb en la película flexible CM 7138 - 7 Nativo.....	65
Gráfica 11.	Optimización de la temperatura de calcinación del horno de grafito.....	68
Gráfica 12.	Optimización de la temperatura de atomización del horno de grafito.....	69

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Ecuación de regresión lineal.....	38
Ecuación 2. Ecuación del coeficiente de determinación.....	38
Ecuación 3. Fórmula para calcular el porcentaje de humedad.....	42
Ecuación 4. Fórmula para calcular el límite de detección.....	45
Ecuación 5. Fórmula para calcular el límite de cuantificación.....	45
Ecuación 6. Fórmula para calcular el porcentaje de recuperación.....	45
Ecuación 7. Ecuación de recta de calibración de la repetibilidad de arsénico.....	61
Ecuación 8. Ecuación de recta de calibración de la repetibilidad de plomo.....	61
Ecuación 9. Ecuación de recta de calibración de la precisión intermedia de arsénico.....	61
Ecuación 10. Ecuación de recta de calibración de la precisión intermedia de plomo.....	61
Ecuación 11. Cálculo del límite de detección del arsénico.....	62
Ecuación 12. Cálculo del límite de cuantificación del arsénico.....	62

LISTA DE REACCIONES

	pág.
Reacción 1. Disminución de óxidos de nitrógeno.....	31
Reacción 2. Reducción de arsénico con borohidruro de sodio.....	34

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO 1. Verificación de la calibración del material de vidrio.....	80
ANEXO 2. Humedad de las muestras de termoformados y películas flexibles.....	86
ANEXO 3. Optimización del proceso de digestión ácida con reflujo.....	87
ANEXO 4. Puesta a punto de la técnica analítica.....	92
ANEXO 5. Determinación de los parámetros de calidad.....	94
ANEXO 6. Determinación de la estabilidad de los metales.....	104
ANEXO 7. Determinación de arsénico y plomo por absorción atómica.....	108
ANEXO 8. Certificados de presentación del trabajo.....	109
ANEXO 9. Carta de presentación de artículos a revista.....	113

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

α	Nivel de significancia
γ	Coefficiente de expansión de los balones aforados, expresado en 1/grado centígrado
μg	Microgramo
μL	Microlitro
ρ_G	Densidad de las pesas de ajuste en la balanza, expresado en gramo/mililitro
ρ_L	Densidad del aire en función de la presión atmosférica, expresado en gramo/mililitro
ρ_W	Densidad del agua a la temperatura de medida, expresado en gramo/mililitro
\bar{A}	Absorbancia media
ANOVA	Análisis de varianza
As	Arsénico
AsH₃	Arsina
\bar{b}	Media de la ordenada en el origen
b	Ordenada en el origen (intercepto)
BH₄⁻	Borohidruro
CRC	Cooperative Research Centre
CREPIC	Centro Regional de Productividad e Innovación del Cauca
CV	Coefficiente de variación
EAA	Espectrometría de absorción atómica
EAA-GH	Espectrometría de absorción atómica – Generador de hidruros
EAA-HG	Espectrometría de absorción atómica – Horno de grafito
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
F	Estadístico de Levene
Factor Z	Factor inverso a la densidad del agua, que en función de la temperatura, es corregido para considerar la presión atmosférica y el coeficiente de expansión del vidrio borosilicato (material de los balones aforados), expresado en mililitro/gramo
gl	Grados de libertad
H₀	Hipótesis nula
H₁	Hipótesis alternativa
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
H₃BO₃	Ácido bórico
HCl	Ácido clorhídrico
HClO₄	Ácido perclórico
HNO₃	Ácido nítrico
hPa	Hectopascal
HSO₃NH	Ácido sulfámico
IC	Intervalo de confianza
ICP-ES	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
K_D	Factor numérico para el límite de detección
K_Q	Factor numérico para el límite de cuantificación
KI	Yoduro de potasio

LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
\bar{m}	Media de la pendiente de la línea recta
m	Pendiente de línea recta
MADR	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
mL	Mililitro
NaBH₄	Borohidruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NIST	National Institute of Standards and Technology
P_{atm}	Presión atmosférica
Pb	Plomo
PLA	Ácido poliláctico
r	Coefficiente de correlación de regresión
R²	Coefficiente de determinación
s	Desviación estándar
S	Desviación estándar de las ordenadas
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SRM	Standard Reference Materials
TPS	Almidón termoplástico biodegradable
W	Estadístico de Shapiro-Wilk
W₁	Valor obtenido de la pesada del balón aforado sin carga (seco), expresado en gramos
W₂	Valor obtenido de la pesada del balón aforado con carga (lleno de agua), expresado en gramos
W₂-W₁	Masa de agua con la cual se ha llenado el balón aforado, expresado en gramos
\bar{X}	Valor medio de los datos
X	Concentración de la muestra más el estándar adicionado
X₁	Concentración inicial en la muestra
X_a	Concentración del estándar adicionado
X_{LC}	Concentración del límite de cuantificación
X_{LD}	Concentración del límite de detección
XRFS	Espectrometría de fluorescencia de rayos X

RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo la estandarización de dos métodos analíticos, para la determinación de arsénico y plomo por espectrometría de absorción atómica, en 7 muestras de termoformados y 6 de películas flexibles biodegradables, obtenidas durante el desarrollo de los proyectos “Producción y caracterización de empaques termoformados biodegradables a partir de harina de yuca, fibra de fique y plastificante” y “Producción y caracterización de películas flexibles biodegradables por extrusión de tornillo simple a partir de almidón de yuca, plastificante y PLA”; estos proyectos contaron con la financiación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), del Centro Regional de Productividad e Innovación del Cauca (CREPIC) y de la Universidad del Cauca.

Previamente a la determinación, se optimizó el proceso de digestión ácida mediante reflujo para las muestras ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$, relación 3:1 a 70°C durante 180 minutos para los termoformados y 45 minutos para las películas flexibles); posteriormente, se analizó el contenido de plomo y de arsénico por espectrometría de absorción atómica de horno de grafito y generador de hidruros, respectivamente; la cuantificación se realizó por curva de calibración a 193,7 nm para arsénico y 216,9 nm para plomo.

Previamente a ésta cuantificación, se realizó la estandarización del método analítico, determinando los parámetros de calidad estadística (intervalo lineal, precisión, sensibilidad, límite de detección y cuantificación, exactitud). La estandarización fue soportada por un tratamiento estadístico de los datos obtenidos por Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para cada uno de los métodos espectrométricos, demostrando que las metodologías son confiables para la determinación de arsénico y plomo en los polímeros biodegradables. El límite de detección y de cuantificación para el arsénico fue de 0,656 $\mu\text{g/L}$ y de 1,967 $\mu\text{g/L}$, respectivamente; para el plomo, el límite de detección fue de 0,618 $\mu\text{g/L}$ y el límite de cuantificación de 1,853 $\mu\text{g/L}$.

Con la implementación de los métodos analíticos, se logró detectar (mas no cuantificar) en las muestras de termoformados trazas de arsénico menores a 39,192 $\mu\text{g As/kg}$ y de plomo menores a 37,148 $\mu\text{g Pb/kg}$, a excepción de las muestras MBRA 383, MPER 183, CM 4574-7, CM 523-7 y CM 7951-5 ya que contienen trazas cuantificables de plomo entre 39,700 y 63,995 $\mu\text{g/kg}$; en las películas flexibles, las concentraciones de plomo fueron menores a 37,177 $\mu\text{g/kg}$, mientras que las de arsénico no fueron detectables.

Finalmente, se concluye que no hubo incidencia de los metales en los materiales elaborados, ya que aunque no hay una norma vigente que reglamente los niveles permitidos de arsénico para este tipo de biopolímeros, las cantidades de As presentes en las muestras son consideradas como bajas; en el caso del plomo, las cantidades encontradas fueron menores a 1 mg/kg (contenido máximo establecido por la NTC 4096 para plásticos en contacto con alimentos), lo que indica que estos polímeros cumplen con este nivel de calidad y por tanto pueden ser empleados como envoltentes y contenedores de alimentos.

Palabras clave: *Termoformados, Películas Flexibles, Polímeros biodegradables, Espectrometría de Absorción Atómica, Horno de Grafito, Generador de Hidruros, Arsénico, Plomo.*

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque desde hace muchos años, los plásticos sintéticos, basados en la petroquímica (como el tereftalato de polietileno, cloruro de polivinilo, polietileno, polipropileno, poliestireno y poliamida), han sido utilizados como materiales de embalaje debido a sus numerosos beneficios (gran disponibilidad y costo relativamente bajo, buen rendimiento mecánico, resistencia a la difusión de gases y compuestos volátiles, entre otros), sin embargo, su uso debe ser restringido [1], ya que una vez desechados al medio ambiente, no se degradan y pueden pasar muchos años sin que sean afectados por el entorno, causando *un gran problema ambiental* [1, 2, 3], debido a las miles de toneladas de residuos, que son depositados en vertederos, aumentando cada año la cantidad de residuos municipales [1]. Este problema ambiental, sumado a la tendiente disminución de los recursos del petróleo, ha incrementado la conciencia hacia la “eco-amistad”, cuyo interés consiste en maximizar el uso de materiales renovables [4] obtenidos a partir de compuestos naturales y que se emplearán para la elaboración de productos biodegradables, como son los termoformados y las películas flexibles, los cuales se caracterizan porque presentan una rápida y fácil degradación, sin la producción de residuos que causen un impacto desfavorable para los diferentes ecosistemas ambientales.

Las materias primas utilizadas para la elaboración de los polímeros biodegradables (termoformados y películas flexibles) que se analizaron en este proyecto, deben ser productos no tóxicos, con buenas propiedades físicas, químicas y organolépticas y con una adecuada propiedad de degradabilidad, ya que el polímero final, empleado para envolver y almacenar productos alimenticios, debe ser ambientalmente asimilable y amigable. Sin embargo, durante los procesos de manufactura de los termoformados y películas flexibles ó en la obtención de la materia prima (harina y almidón de yuca, fibra de fique, ácido poliláctico (PLA), glicerol, entre otros), puede adquirirse una posible contaminación de los polímeros [5, 6].

Algunos de los contaminantes indeseables que podrían encontrarse en estos polímeros biodegradables son los metales pesados, los cuales se caracterizan por ser tóxicos y porque pueden causar graves daños en los organismos vivos; adicionalmente, no son biodegradables y permanecen durante mucho tiempo en el entorno, bioacumulándose en los seres vivos al no ser metabolizados [7]; estos metales pueden incorporarse en el cuerpo humano a través de los alimentos, el agua, el aire, ó mediante la absorción a través de la piel, cuando por ejemplo, hay contacto directo en el desarrollo de las actividades agrícolas (provenientes de las lluvias radiactivas atmosféricas, las formulaciones de plaguicidas, la contaminación por fertilizantes químicos y el riego con agua de mala calidad) [8, 9, 10].

Dentro de los metales pesados tóxicos se encuentran el arsénico y el plomo, que son elementos químicos peligrosos, ya que no sólo se pueden acumular en organismos individuales, sino que también por los usos futuros de los polímeros biodegradables como envoltentes y contenedores de productos alimenticios, pueden entrar en las cadenas alimenticias, por un proceso de migración [7, 9].

Teniendo en cuenta el problema que puede surgir con la presencia de estos dos metales tóxicos en los plásticos que se encuentran en contacto con alimentos, la norma técnica colombiana para Plastificantes DOP y DOA grado alimento (NTC 4096) establece parámetros de calidad, entre ellos, la cantidad máxima de metales pesados permitida, los cuales establecen la calidad del producto. Considerando que los biopolímeros deben cumplir con estos requisitos, es necesario determinar, tanto la concentración como la procedencia (ya sea en la manufactura ó en la materia prima) de arsénico y plomo, con el fin de evaluar los procesos de elaboración de dichos productos determinando así su calidad. Por tal razón, se llevó a cabo en este estudio la estandarización del método de absorción atómica mediante la generación de hidruros y horno de grafito para la cuantificación de arsénico y plomo en termoformados y películas flexibles biodegradables.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar e implementar los métodos analíticos para la determinación de arsénico y plomo por espectrometría de absorción atómica empleando como métodos de atomización generación de hidruros y horno de grafito, respectivamente, en muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables obtenidos a partir de harina y almidón de yuca, fibra de fique y plastificantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer los parámetros de calidad para la determinación de Arsénico mediante la técnica analítica de espectrometría de absorción atómica, utilizando como método de atomización el generador de hidruros.
- Establecer los parámetros de calidad para la determinación de Plomo mediante la técnica analítica de espectrometría de absorción atómica, utilizando como método de atomización el horno de grafito.
- Determinar el contenido de arsénico y plomo en cada una de las muestras de termoformados biodegradables obtenidos de harina de yuca, fibra de fique y plastificantes.
- Determinar el contenido de arsénico y plomo en cada una de las muestras de películas flexibles biodegradables obtenidas de almidón de yuca, plastificantes y PLA.
- Analizar estadísticamente los resultados de cada una de las cuantificaciones analíticas de arsénico y plomo, con el fin de garantizar que los resultados obtenidos son confiables.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 MATERIAS PRIMAS EMPLEADAS PARA LA ELABORACIÓN DE BIOPOLÍMEROS

3.1.1 Harina y almidón de yuca

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta originaria de América del Sur, usada principalmente para el consumo humano y animal, y en un pequeño porcentaje en la obtención de almidón, harina y otros usos industriales [11].

La raíz tuberosa es la principal parte de la yuca que se emplea para el consumo, ya que en ella se acumula gran cantidad de componentes; su contenido de materia seca fluctúa entre un 30 y 40%, y corresponde a la harina de yuca que es obtenida mediante un proceso sencillo de selección y pesaje, lavado, troceado, secado, molienda y tamizado; el resto corresponde a la fibra (1,0 a 2,0%), grasa (0,5 a 1,0%), cenizas ó minerales (1,5 a 2,5%) y proteínas (alrededor de 2,0%) [12, 13, 14].

La harina está constituida en su mayor parte (90 a 95%) por la fracción no nitrogenada (almidón y azúcares); por su bajo costo y alto contenido de almidón (que representa la mayor parte de los carbohidratos (96%)), puede ser utilizada en la fabricación de diferentes productos de la industria alimentaria (panificación) y no alimentaria (adhesivos), y como materia prima para la elaboración de los termoformados biodegradables a analizar en este trabajo [12, 13].

El almidón de yuca, que es empleado en la elaboración de las películas flexibles biodegradables de este proyecto, es un polímero natural cuyos gránulos consisten de estructuras macromoleculares ordenadas en capas y cuyas características en cuanto a composición, cantidad y forma varían de acuerdo al tipo de fuente de la que provengan, que en el caso del almidón, puede variar de 5 a 35 μm en tamaño, su forma es redonda y achatada y su contenido de amilosa es alrededor del 17% [15].

Los gránulos de almidón están compuestos por capas internas de amilosa y capas externas de amilopectina; la estructura de la amilosa (como se muestra en la figura 1), consta de unidades de D-glucosa unidas linealmente por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$; la amilopectina es la molécula predominante del almidón, y es un polisacárido ramificado (ver figura 2) compuesto por segmentos lineales de D-glucosa unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ conectados por ramificaciones de enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ [16].

Figura 1. Amilosa

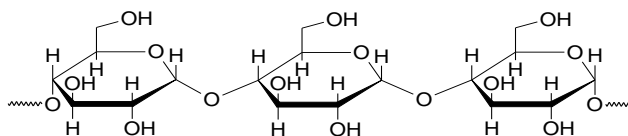
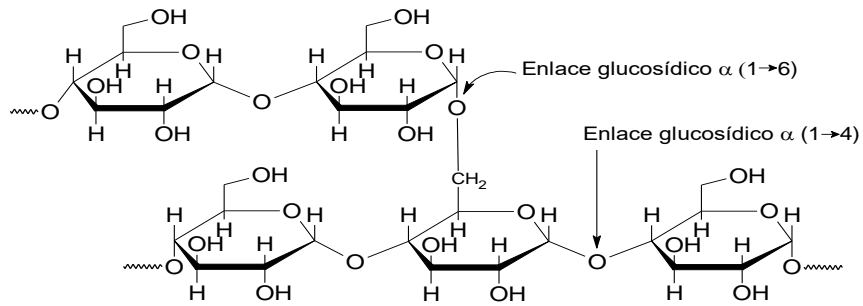


Figura 2. Amilopectina



La longitud de las cadenas de almidón variará con la fuente de la planta, pero en general, la cantidad promedio se encuentra entre 500 y 2000 unidades de glucosa. El vínculo α de la amilosa, le permite al almidón ser flexible y fácil de digerir [17].

El almidón de yuca puede clasificarse como agrio y nativo (dulce). El almidón agrio sufre un proceso de fermentación que le otorga propiedades deseables a los alimentos; el almidón nativo ó dulce no es sometido a un proceso de fermentación, y es el que se usa generalmente en la industria para la fabricación de una amplia gama de productos no alimenticios (películas de plásticos biodegradables, adhesivos, cosméticos, farmacéuticos, textiles, entre otros) [15, 18].

Una de las principales propiedades del almidón nativo (polímero natural hidrofílico) es su semicristalinidad, donde la amilopectina es el componente dominante de la cristalización en la mayoría de los almidones. La porción cristalina está compuesta por estructuras de doble hélice, formadas por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo en las cadenas lineales de la molécula de amilopectina y por cadenas externas de amilopectina unidas con porciones de amilosa [15]; dicha conformación dificulta su asociación regular con otras cadenas, haciendo que sea difícil de procesar debido a su comportamiento quebradizo, por lo que se hace necesario el uso de un plastificante para mejorar dichas propiedades [11].

3.1.2 Fibras de fique

Las fibras naturales se pueden clasificar en función de su origen (vegetal, animal o mineral). Según Eichhorn [19], las fibras naturales que se destacan son las de origen vegetal, como la fibra de fique, por sus excelentes propiedades mecánicas (resistencia, rigidez y dureza) [20], lo que le dá un importante uso comercial para la elaboración de materiales compuestos; éstas son fibras renovables que se consideran a menudo sólo para los mercados que requieren bajos costos, altos índices de producción y que puedan aceptar bajo rendimiento. Además, ofrecen ventajas en comparación con las fibras sintéticas, ya que son biodegradables, el material no es abrasivo para la transformación [16], su producción no necesita energía, cuando se queman ó se someten a compostaje, la emisión de CO_2 es inferior a la emitida por las fibras sintéticas [20] y son una fuente importante de ingresos para las sociedades agrícolas [21].

Las fibras vegetales están compuestas por las siguientes macromoléculas naturales: celulosa, hemicelulosa y lignina. Las microfibrillas de celulosa rígida, orientadas en

espiral, juegan un importante papel de refuerzo en la matriz de un compuesto, como en el caso de los termoformados [22], debido a que la interface existente entre la fibra y la matriz polimérica, permite transferir las cargas aplicadas desde el exterior hacia las fibras rígidas, lo cual le proporciona dureza al material; sin embargo, para conseguir este refuerzo, se requiere de enlaces fuertes, capaces de transferir adecuadamente las tensiones aplicadas a las fibras naturales [20], ya que una mala adherencia en la interface, implica que todas las capacidades del compuesto no puedan ser explotadas y la hacen vulnerable a los ataques del medio ambiente, reduciendo de esta manera su vida útil [23].

3.1.3 Plastificantes

Los plastificantes como el agua y los glicoles (como el glicerol), que son adicionados durante la elaboración de los biopolímeros a analizar en este proyecto, permiten la lubricación de los almidones, haciéndolos aptos para ser transformados en termoplásticos [4]. Con la incorporación de plastificantes al almidón, se logra la separación de las cadenas poliméricas (rompimiento de las interacciones entre las cadenas de los polímeros), ya que las pequeñas moléculas de plastificante penetran al interior de los gránulos del almidón, disminuyendo así las fuerzas de atracción molecular, lo que se traduce en un aumento de la movilidad de las cadenas poliméricas, una disminución en el esfuerzo y una mayor elongación al momento de estirarse [24, 25].

3.1.4 Ácido Poliláctico (PLA)

El PLA es un poliéster alifático lineal, obtenido por la policondensación del ácido láctico y producido de forma natural ó por la apertura del anillo catalítico del grupo láctico. Los vínculos de éster en el PLA son sensibles a la hidrólisis química y enzimática. La primera etapa de la degradación del PLA (dos semanas) es a través de la hidrólisis de compuestos solubles en agua y ácido láctico, seguida de la metabolización llevada a cabo por los microorganismos, con producción de CO₂, agua y biomasa [17].

El PLA es totalmente biodegradable y permite generar abono en operaciones a gran escala con temperaturas de 60°C o más [17]; se mezcla con el almidón para aumentar la biodegradabilidad. Sin embargo, la fragilidad del almidón-PLA es una desventaja importante en muchas aplicaciones y para solucionar esta limitación, se adicionan una serie de plastificantes de bajo peso molecular como el glicerol (empleado en este proyecto), sorbitol o citrato de trietilo [17].

3.2 BIODEGRADABILIDAD

Los plásticos biodegradables son aquellos capaces de ser degradados medioambientalmente, representando una nueva generación de materiales capaces de reducir significativamente el impacto ambiental en términos de consumo de energía y de generación de residuos después de su utilización [17]; estos plásticos biodegradables se clasifican en función de su mecanismo de degradación, y entre ellos tenemos a los biodegradables y los compostables:

- Biodegradables

Un plástico biodegradable es definido como *“un plástico degradable en el cual la degradación resulta de la actividad natural que se produce con microorganismos, tales como bacterias, hongos y algas”*; esto significa que la degradación es causada por la actividad biológica, especialmente por la acción enzimática que conduce a cambios significativos en la estructura química de los materiales. En esencia, los plásticos biodegradables deben romperse limpiamente, en un período de tiempo definido, produciendo sólo moléculas simples como son el dióxido de carbono y el agua [17], como sucede con los termoformados y las películas flexibles que son analizadas en este trabajo.

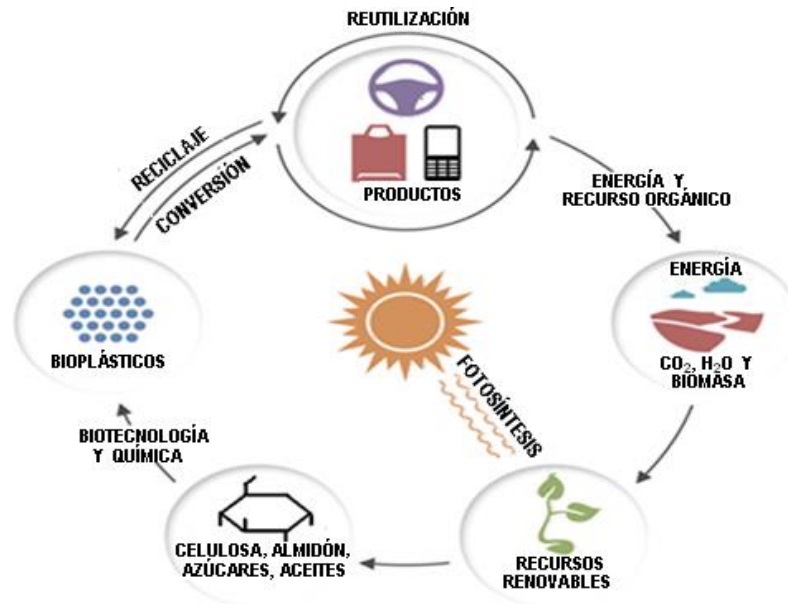
- Compostables

Un plástico compostable es definido como *“un plástico que experimenta degradación biológica durante la formación de compost para producir dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos y biomasa, a una rapidez consistente con otros materiales compostables y hojas, sin residuos distinguibles visualmente ni residuos tóxicos”*, o sea, que debe ser también biodegradable, pero un plástico biodegradable no necesita ser compostable. La compostabilidad requiere que el plástico se biodegrade aeróbicamente a una rapidez similar a la de otros materiales compostables, que los residuos no se distingan (como plásticos) y que no sean a su vez tóxicos, mientras que un plástico biodegradable simplemente se tiene que biodegradar [17].

Los plásticos biodegradables pueden ser producidos naturalmente ó sintetizados a partir de los recursos renovables (como la harina y el almidón de yuca), pero como cualquier otro producto comercial, deberán cumplir con una serie de requerimientos orientados a la función a la que van a ser destinados; es por esto, que los plásticos biodegradables como los termoformados y las películas flexibles, elaborados a partir de harina y almidón de yuca, respectivamente, se mezclan con otros polímeros como la fibra de fique y el PLA, para obtener un producto final cuyas propiedades funcionales sean adecuadas para el mercado. Sin embargo, la biodegradabilidad de estos plásticos (clasificados como compostables), dependen tanto de la estructura química del material, como de la constitución del producto final y no sólo de las materias primas utilizadas para su fabricación [17].

En general, el objetivo de estos bioplásticos es imitar el ciclo de vida de la biomasa (ver figura 3), la cual incluye la conservación de los recursos fósiles, el agua y la producción de CO₂ [26].

Figura 3. Ciclo de la vida de la biomasa [27].



3.2.1 Polímeros biodegradables a base de harina y almidón

Los plásticos biodegradables encontrados en el mercado, son principalmente elaborados a base de almidón (proveniente de cultivos agrícolas como el maíz, el trigo o la yuca) [17, 28], donde el contenido de este carbohidrato puede encontrarse desde un 10% a más del 90% de la composición de estos bioplásticos; dicho contenido de almidón debe superar el 60%, para: evitar que se produzca la rotura del material (esto hace que la matriz polimérica sea inestable, al poderse desintegrar fácilmente en pequeños fragmentos), ser más biodegradables y dejen menos residuos recalcitrantes (compuestos inertes al ataque microbiano). Por lo general, los polímeros a base de almidón se mezclan con los polímeros de alto rendimiento (por ejemplo, poliésteres alifáticos y alcoholes de polivinilo) para obtener las propiedades de desempeño necesarios para sus diferentes aplicaciones [17].

La biodegradación de los polímeros a base de almidón, es el resultado de un ataque enzimático en las uniones entre los grupos glucosídicos de azúcar que lo componen, que conllevan a una reducción de la longitud de la cadena y a la ruptura de las unidades de azúcar (monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos) que son fácilmente utilizados en las vías bioquímicas [17, 28].

Dentro de estos polímeros biodegradables elaborados a partir de harina y almidón de yuca, se encuentran los termoformados y las películas flexibles.

3.2.1.1 Termoformados

Termoformado es un término genérico que engloba varias técnicas de procesamiento, entre ellas, el moldeo por compresión, mediante las cuales se obtienen artículos plásticos a partir de láminas planas de distintos polímeros empleando máquinas con moldes específicos. Esta técnica de moldeo por compresión involucra tres etapas fundamentales:

(a) Calentamiento de láminas del material polimérico hasta la temperatura de procesamiento, (b) Deformación de las láminas hacia la superficie de un molde, a menor temperatura, y con la forma deseada, (c) Retiro de la lámina del área de formado y remoción del exceso de material para obtener la pieza final, cuando la lámina se ha enfriado lo suficiente para mantener la forma del molde [23].

El termoformado requiere que la lámina del material polimérico sea lo suficientemente flexible para ser moldeada, pero a su vez, debe poseer suficiente estabilidad para mantener la forma que le es suministrada. Es por ello que la temperatura a la cual se realiza el proceso de formado tiene gran relevancia [23].

La mayoría de las láminas utilizadas en termoformados son producidas mediante el proceso de extrusión, donde se pueden obtener espesores desde 0,1 hasta 50,0 mm; en este proceso, la extrusora calienta, mezcla y, si es necesario, desgasifica el material a ser procesado (granulado ó peletizado, en polvo, aglomerados ó molidos), para luego extruirlo bajo presión a través de un cabezal en forma de ranura. A través de este proceso pueden fabricarse láminas de una o varias capas de material, así como láminas de un material espumado [23].

Los productos termoformados son clasificados en dos grandes categorías: productos permanentes ó industriales y productos desechables. En el mercado de empaques para alimentos, los artículos termoformados gozan de gran popularidad debido a su bajo costo, gran área superficial por volumen y extraordinario desempeño bajo un amplio rango de temperaturas [23].

Con todo lo anterior, avances en los materiales y en los procesos de producción, así como de mejoras sustanciales en las máquinas utilizadas, han permitido que los productores de artículos termoformados conquisten el mercado de empaques para alimentos y productos para consumo humano [23].

3.2.1.2 Almidón termoplástico – películas flexibles

El almidón termoplástico biodegradable (TPS), es un material que se obtiene por la disrupción (modificación) estructural que se da dentro del gránulo de almidón cuando este es procesado con un bajo contenido de agua y por la acción de fuerzas térmicas y mecánicas en presencia de plastificantes que no se evaporan fácilmente durante el procesamiento. El TPS presenta varios atributos, además de su biodegradabilidad, ya que es un material renovable, flexible y que se puede acondicionar muy fácilmente a diferentes procesos de termoplastificación, empleando equipos estándar tales como: extrusión por soplado, moldeo por inyección, moldeo por compresión y extrusión de película plana [29].

La transformación del almidón granular está influenciada por las condiciones del proceso: temperatura y contenido del plastificante. Al calentar la suspensión de almidón, las moléculas vibran rigurosamente rompiendo los enlaces intramoleculares y permitiendo así la formación de puentes de hidrógeno con el agua, lo cual origina una serie de modificaciones irreversibles a partir de una temperatura predeterminada [30]; en el caso del agua y el glicerol que son los plastificantes más usados en los diferentes procesos de termoplastificación, debido a que provocan una acción lubricante, estos facilitan la

movilidad de las cadenas poliméricas y retardan la retrogradación de los productos termoplastificados [29].

Durante la manufactura de las películas flexibles por extrusión de tornillo simple, el almidón crudo es premezclado con agua, y es introducido en una extrusora en cuyo interior se encuentra un tornillo sin fin, capaz de impartir un corte intensivo, y que opera a altas temperaturas (por encima del punto de ebullición del agua). En estas condiciones de corte y de temperatura, el almidón pierde su cristalinidad, siendo plastificado con el agua (resultando en una masa amorfa homogénea). Cuando este almidón gelatinizado en presencia de los aditivos (plastificantes y PLA) sale de la extrusora, a través de una boquilla (forma redonda para la obtención de películas), su volumen es expandido por la acción de un gradiente de temperatura y por la caída repentina en la presión, resultando en la pérdida del agua, y terminando con la formación de la masa plastificada (material espumado), que es estirado y alisado por medio de rodillos mientras se embobina al mismo tiempo [3, 20].

En general, las mezclas de almidón, plastificante y poliéster sintético biodegradable alifático, se utilizan para la extrusión de láminas y películas planas (utilizadas para la elaboración de películas estirables para cuidado personal, para productos de repostería, etc) o películas sopladas de alta calidad, usadas en la elaboración de una gran variedad de productos, desde simples películas monocapa hasta estructuras multicapa utilizadas en empaques de alimentos (vasos, copas, platos, botellas para bebidas, bandejas, etc) [17, 31].

En la actualidad, la Cooperative Research Centre (CRC) for International Food Manufacture and Packaging Science of Australia, ha desarrollado su propia versión de TPS plásticos biodegradables, a partir de almidón natural y de origen vegetal, que cuentan con un contenido de amilosa superior al 70%. Los ensayos han sido llevados a cabo utilizando polímeros de almidón de maíz como acolchado, para la fabricación de las películas de polietileno, con la ventaja de que la película puede ser simplemente desechada al suelo [17].

3.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS

Diferentes técnicas de análisis se han utilizado para la determinación de metales pesados en los polímeros, como son la espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRFS), la espectrometría de absorción atómica (EAA) y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-EM). La XRFS ofrece la posibilidad de analizar los materiales sólidos sin un tratamiento previo de la muestra, sin embargo, esta ventaja se ve limitada por la necesidad de utilizar adecuados materiales de referencia certificados para la calibración, convirtiéndola en una técnica costosa. En ICP-EM y EAA, generalmente se requieren muestras líquidas disueltas, por lo que las muestras tienen que ser digeridas. Este procedimiento puede ser tedioso, consume tiempo y genera errores sistemáticos debido a la extracción incompleta o a la solubilidad del analito [1].

La espectrometría de absorción atómica por horno de grafito comparada con el método de atomización por llama, es más adecuada para la determinación de elementos como el Pb, en concentraciones al nivel de traza en las muestras de polímeros, ya que es sensible, con menores límites de detección en el rango de los $\mu\text{g/L}$ a ng/L , es muy tolerante a las

matrices complejas, hay mínimas pérdidas de analito y se emplean pocos volúmenes de muestra, además de que permite obtener un riesgo reducido en la contaminación del analista [1]; en esta técnica, las muestras se introducen a menudo en forma de solución, sin embargo, se ha reportado la técnica EAA-HG con muestras sólidas, como un método simple y rápido para la determinación de plomo y cadmio en las muestras de polímero [1], también se ha analizado plomo en muestras biodegradables hechas de materiales plásticos de poliolefinas, empleadas como empaques de alimentos, sin embargo el plomo no fue detectable en dichas muestras [32].

Para la determinación de arsénico, se prefiere el uso de la espectrometría de absorción atómica por generador de hidruros y absorción atómica con horno de grafito, donde el límite de detección es menor para el caso del generador de hidruros [33].

3.4 DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO

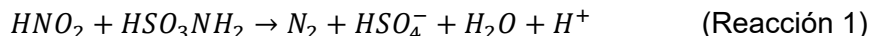
Cuando un analito no se encuentra en el estado apropiado para su determinación, debe sufrir un tipo de transformación que lo lleve a un estado en el cual se pueda aplicar una técnica apropiada de identificación y cuantificación; estas transformaciones suelen ser disoluciones o digestiones, las cuales implican el paso de la muestra de un estado sólido a líquido, en presencia de un disolvente apropiado (ácidos ó bases de diferente fuerza, agentes oxidantes ó enzimas, etc); en este proceso energético, el calentamiento y la agitación aumentan la velocidad de transferencia de masa, unificándose la descomposición y eliminación de la materia orgánica, quedando en solución los componentes traza de nuestro interés (los iones metálicos) [34, 35].

Con este procedimiento, la destrucción de la materia orgánica se realiza por vía húmeda y la muestra se digiere (con una mezcla ácido-oxidante), combinando ácido sulfúrico, nítrico, perclórico ó peróxido de hidrógeno, en un sistema que puede ser abierto o de reflujo [36]; generalmente, se prefiere ésta técnica a la de oxidación seca (donde se calienta a 450-500°C), ya que la presencia de volúmenes grandes de ácidos, produce menos pérdida de los elementos traza por evaporación. No obstante, existe también el peligro de pérdidas por evaporación de elementos (antimonio, arsénico, boro, cromo, estaño, germanio, mercurio, osmio, renio y selenio), aunque ajustando perfectamente las condiciones, tales como el montaje de reflujo, el control de temperatura y el tiempo, pueden prevenirse dichas pérdidas [34, 35].

En la literatura, se reporta una amplia gama de procedimientos de digestión ácida, en las que se han empleado varias mezclas de ácidos inorgánicos y, en algunos casos, peróxido de hidrógeno (HNO_3 , $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$, $\text{HNO}_3\text{-HF}$, $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3\text{-HF-H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$, y $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$) [8, 37, 38, 39]. Aunque de los ácidos minerales, el ácido nítrico es el que ofrece el mejor resultado de digestión para todo tipo de muestras, no existe consenso en cuanto a la adición de otros aditivos, como el ácido perclórico ó el peróxido de hidrógeno, para acelerar el proceso y reducir el volumen de ácido nítrico utilizado. Cabe mencionar que la utilización de ácido sulfúrico en muestras que puedan contener metales alcalinotérreos no es conveniente, ya que facilita la precipitación de estos iones en forma de sulfatos, provocando pérdidas por coprecipitación de elementos traza tales como el plomo [35].

La presencia de óxidos de nitrógeno, que provienen de la digestión de las muestras con ácido nítrico:ácido perclórico, afectan la lectura espectrométrica de las muestras a

analizar en el EAA-GH, ya que impiden detectar el As allí presente [40]. La ebullición es efectiva para su eliminación, pero no es conveniente, ya que se pueden presentar pérdidas de analito, por lo que Harris y William [41, 42], recomiendan el uso de ácido sulfámico, según la siguiente reacción:



3.5 METALES PESADOS TÓXICOS EN LOS POLÍMEROS BIODEGRADABLES

El acelerado proceso de industrialización que se ha llevado a cabo en los países en vía de desarrollo, combinado con su rápido crecimiento demográfico, el empleo de técnicas de agricultura intensiva, además de la mala eliminación de residuos, han provocado un incremento en los niveles de sustancias consideradas nocivas o tóxicas para los seres vivos, lo cual hace necesario realizar un seguimiento durante todo el proceso de manufactura, para determinar la presencia de metales pesados tóxicos en el medio ambiente, con el fin de proteger la salud pública frente a la exposición de los mismos, ya que estos son capaces de causar graves daños a los organismos vivos [43, 44].

Los metales pesados que se encuentran en los polímeros biodegradables, se pueden deber a: contaminación de la materia prima que es utilizada para la obtención de los mismos ó contaminación cruzada durante la fabricación de los biopolímeros.

La contaminación de la materia prima (harina y almidón de yuca, fibra de fique), puede proceder de forma natural de la corteza terrestre, de las prácticas de cultivo que requieren el uso de plaguicidas y, de la exposición al humo de los carros (presencia de Pb en la gasolina) [44, 45]; los vegetales pueden acumular los metales pesados en la pared celular, evitando de esta forma su presencia en el interior celular pero en otros son absorbidos en cantidades muy pequeñas, siendo las vacuolas su principal lugar de acumulación [44]. Por otra parte, la contaminación cruzada se puede atribuir al desgaste de la maquinaria de manufactura (tornillo sin fin, mezclador, extrusor, entre otros), lo que puede provocar la migración de posibles trazas de metales contenidos en dichos equipos (debido a las aleaciones empleadas en la industria metalúrgica con el fin de mejorar las propiedades mecánicas) a los biopolímeros (termoformados y películas flexibles).

Una de las principales desventajas de los metales (en nuestro caso, As y Pb) es que no son biodegradables y permanecen durante mucho tiempo en el entorno, acumulándose en el medio y en los seres vivos [46], causando efectos nocivos en los ecosistemas, siendo esto un factor a tener en cuenta en la economía y la salud pública.

Los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados son: 1) El desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales, 2) modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos, 3) ruptura de la integridad de biomoléculas y 4) modificación de otros agentes biológicamente activos [47]; en cuanto a la respuesta del ser humano tras un contacto con un metal pesado se encuentran: los efectos agudos o crónicos que dependen de la duración de dicho contacto y que pueden producir dermatitis, afecciones respiratorias, cardiovasculares, gastrointestinales, hematológicas, hepáticas, renales, neurológicas, trastornos en el desarrollo, consecuencias en la reproducción, enfermedades inmunológicas, genéticas ó efectos mutagénicos y

carcinogénicos [43]. Debido a los efectos nocivos que causan los metales pesados, se hace importante realizar el estudio del As y Pb.

3.5.1 Arsénico

El arsénico (As) es un metal venenoso que se encuentra en forma inorgánica y orgánica en el agua, los alimentos, suelo, polvo, madera y otros materiales. En la industria metalúrgica se utiliza en muy pequeñas cantidades para la producción de algunas aleaciones, ya que tiene la propiedad de aumentar la dureza y la resistencia al calor de algunos aceros, bronces, etc [48]. Los plaguicidas y otros productos agrícolas que contienen arsénico, pueden acumularlos en los suelos, alimentos y piensos [33, 49].

A continuación, se muestran las formas químicas del arsénico, de importancia toxicológica, en orden decreciente a su toxicidad [48]:

Arsina/>Arsénico inorgánico (As (III)/>As (V))/>Arsénico orgánico/>Arsénico elemental

El arsénico (III) presenta mayor toxicidad que el arsénico (V), debido a que interacciona directamente con las enzimas que intervienen en el ciclo del ácido cítrico, donde tiene lugar una inactivación de la piruvato deshidrogenasa por una complejación con el ión As (III). El sistema enzimático implicado contiene una proteína que presenta restos sulfhidrilo en los carbonos α y β ; el arsénico reacciona con estos grupos y se origina un complejo cíclico de seis átomos que produce la inactivación de la enzima, por lo que no se produce ATP y la concentración de piruvato en sangre aumenta [43]. Por otra parte, la acción de los reductores fuertes (como el borohidruro de sodio) sobre algunos compuestos del arsénico, en estado de oxidación III y V, lo transforman en arsina (AsH_3), que es un gas que ebulle a -55°C y solidifica a -119°C . Dicho gas presenta un elevado poder reductor en todo el intervalo de pH y una gran inestabilidad térmica; se descompone en As elemental (de color pardo oscuro) e hidrógeno cuando se calienta a temperaturas superiores a 230°C en ausencia de aire [48].

3.5.2 Plomo

El plomo (Pb) es un metal pesado con propiedades tóxicas bien referenciadas [50]. Un exceso de plomo ingerido es un peligro real para la salud, ya que afecta tanto al sistema nervioso como a la biosíntesis de la hemoglobina debido a la inhibición enzimática, causada por la afinidad del Pb por los sulfhidrilos de las enzimas ferroquelatasa y la δ -aminolevulínico deshidratasa [51].

Las principales fuentes de contaminación por Pb, además de la gasolina son: las emisiones de diferentes procesos industriales, los plaguicidas utilizados, y el riego de las plantas con agua contaminada, entre otras [44]; sin embargo, el uso más amplio de este metal, se encuentra en la fabricación de acumuladores, la industria de la construcción (debido a su excelente resistencia a la corrosión), pigmentos, soldadura suave y municiones. Además, es resistente al ataque de muchos ácidos, porque forma su propio revestimiento protector de óxido [46], aunque actualmente su uso está regulado por su alto grado de toxicidad.

3.6 ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Mediante la espectroscopía de absorción atómica, es posible determinar de forma cuantitativa la presencia de metales pesados a niveles de traza; esta técnica se basa en la medida de la radiación absorbida por los átomos libres en su estado fundamental, en el cual el átomo pasa desde un estado energético inferior a otro superior, y la diferencia entre la energía incidente y la transmitida se recoge en un detector, permitiendo realizar una determinación cuantitativa del elemento. Para que esto ocurra, es necesario suministrar energía a una longitud de onda específica del elemento al cual se quiere excitar. La fuente de radiación consiste en una lámpara que contiene un cátodo del elemento que se pretende analizar. Este cátodo emite las radiaciones típicas de ese elemento. Al hacer incidir esta radiación a través de la muestra, los átomos absorberán parte de la energía emitida [52].

Para hacer esta determinación espectrométrica, el metal debe estar presente en forma de átomo, por lo que es necesario realizar la atomización de la muestra.

3.6.1 Atomización

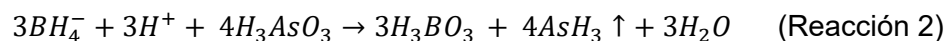
Es un proceso en el cual la muestra se convierte en vapor atómico, es decir, en átomos ó átomos ionizados en estado gaseoso, que pueden determinarse midiendo su absorción. La precisión y la exactitud de los métodos atómicos, depende principalmente de la etapa de atomización y del método de introducción de la muestra en la zona de atomización [52].

3.6.2 Métodos

3.6.2.1 Generación de hidruros

La técnica de espectrometría de absorción atómica por generador de hidruros (EAA-GH), se basa en la reacción del NaBH_4 con la muestra acidificada y la separación de la sustancia analizada como hidruro de la matriz antes de la medición. Una de sus principales ventajas, es que reduce significativamente la posibilidad de las interferencias [33], y permite la determinación, en nuestro caso, de la concentración de arsénico en los biopolímeros, pero también se emplea en muestras que contienen otros elementos como antimonio, bismuto, estaño, plomo y selenio utilizando un atomizador con forma de T. Dicho procedimiento mejora los límites de detección de 10 a 100 veces.

Debido a que varias de estas especies son muy tóxicas, es muy importante su determinación a concentraciones bajas, lo cual obliga también a que los gases producidos durante la atomización, deban eliminarse de una manera segura y eficaz; generalmente, los hidruros volátiles se generan adicionando una solución acuosa acidificada de la muestra a un volumen pequeño de borohidruro de sodio al 0,5% en un frasco de plástico; la reacción característica que se puede representar es [52]:



El hidruro volátil (la arsina) es arrastrado por un gas inerte (nitrógeno) a la cámara de atomización (tubo de sílice calentado en una llama, donde se descompone el hidruro y se originan los átomos del analito). Su concentración se determina por la señal analítica que

es obtenida del máximo de la absorción ó por la altura de pico y que proporciona la información cuantitativa deseada [52].

La etapa de reducción del arsénico con el borohidruro de sodio se da de forma rápida y completa cuando las especies del arsénico se encuentran en estado de oxidación +3, ya que instantáneamente se convertirán en arsina; para ello, se adiciona yoduro de potasio/ácido ascórbico, que ayuda a la pre-reducción del As^{+5} , debido a que esta especie tiene una cinética de la reacción muy lenta con el borohidruro; sin embargo, para el Standard Methods [39], el “yoduro de potasio se ha encontrado innecesario en los diseños de celdas de reacción para la pre-reducción del arsénico, ya que la disminución (del 20 al 30%) presentada en la sensibilidad instrumental no es muy considerable, y se puede controlar estrictamente estableciendo las condiciones de acidez, temperatura y volumen de los ácidos” [48].

3.6.2.2 Horno de grafito

La espectrometría de absorción atómica por horno de grafito (EAA-HG), es también conocida como espectrometría de absorción atómica electrotérmica, en la cual se emplea un atomizador electrotérmico llamado horno de grafito, colocado en la trayectoria de la radiación de la fuente (lámpara de cátodo hueco) [52].

Esta técnica, fue empleada en este trabajo para la determinación de concentraciones de plomo; para ello, se inyectan en la celda de grafito unos pocos microlitros de muestra, los cuales se evaporan primero a baja temperatura (100°C) y luego se calcinan a una temperatura algo más alta (500 a 800°C). Tras la calcinación, la corriente se incrementa rápidamente a varios cientos de amperios, lo que eleva la temperatura a unos 1.000 ó 1.700°C , en un período de tiempo en el rango de los segundos. En estas condiciones, se mide la absorción de las partículas atomizadas en la zona situada inmediatamente por encima de la superficie calentada [52, 53].

La corriente del gas inerte (argón), no sólo elimina el aire sino que sirve también para desalojar los vapores generados a partir de la matriz de la muestra durante las dos primeras etapas de calentamiento. Algunos hornos incluyen en su interior una plataforma de grafito, denominada plataforma L'vov (también de grafito), que se encuentra debajo del orificio de entrada de la muestra y permite que la misma una vez evaporada, se calcine sobre ella; esta atomización tiene lugar en un medio en el que no se produce un cambio rápido de temperatura, de este modo, se obtienen picos más reproducibles [52, 53].

3.7 ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Mediante la aplicación del protocolo de estandarización, se obtienen en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterio de confianza del método analítico, lo cual permitirá reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza; estos parámetros son: intervalo de linealidad, precisión, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud [54, 55, 56]. Adicionalmente a la estandarización, se realizan ensayos para obtener información sobre: interferencias, limitaciones, tiempo de vida útil de la muestra para el analito de interés y tiempo de análisis.

- Intervalo de linealidad: El intervalo de un método analítico es el rango entre los niveles superior e inferior del analito (límite de cuantificación), determinado con un nivel adecuado de precisión, exactitud y buena linealidad, ya que el rango de trabajo debe estar contenido en el mismo [54].
- Precisión: Indica el grado de concordancia de los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental, bajo condiciones prefijadas. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar y se evalúa a dos niveles [54]: repetibilidad y precisión intermedia, los cuales se describen a continuación:
 - a. Repetibilidad: Corresponde a los datos obtenidos por un solo operador, trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos), dentro de un período corto (en un solo día).
 - b. Precisión intermedia: Corresponde a los datos obtenidos por un solo operador, trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos), pero en días distintos (mínimo cinco días).
- Sensibilidad: Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración y se mide como la pendiente de la curva de calibración [54].
- Límite de detección: Se define como la menor cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente se pueda cuantificar bajo las condiciones experimentales seleccionadas. Esta cantidad de analito, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente a la señal producida por el blanco [54, 55, 56].
- Límite de cuantificación: Es la concentración más baja de analito presente en una muestra, que al detectarse puede cuantificarse con precisión y exactitud aceptable, bajo las condiciones experimentales establecidas de trabajo [54].
- Exactitud: Mide la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor real ó aceptado; normalmente se expresa en términos de error y puede ser determinado como el porcentaje de recuperación del analito [54].

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Para el contraste de hipótesis, como es el caso de variables cuantitativas, se cuenta con dos tipos de análisis: los 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, y los no paramétricos, que son menos restrictivos para poder ser aplicados [57, 36].

Antes de utilizar las pruebas paramétricas, es indispensable comprobar ciertos requisitos (supuestos) para su aplicación:

3.8.1 Supuestos

3.8.1.1 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, de la cual se puede definir si es posible trabajar con el valor promedio de los datos obtenidos ó si por el contrario, no es posible y se debe utilizar otro tipo de variables. Así, si una muestra aleatoria que procede de cierta distribución desconocida y denotada por $F_{(x)}$, se le va a verificar si los datos fueron generados por un proceso normal, es necesario plantear las siguientes hipótesis estadísticas [36]:

Nula H_0 : “El conjunto de datos sigue una distribución normal”.

Alternativa H_1 : “El conjunto de datos no sigue una distribución normal”.

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

3.8.1.2 Igualdad u Homogeneidad de Varianzas (Estadístico de Levene)

Este supuesto es crucial, ya que garantiza la calidad de los procedimientos estadísticos utilizados tanto en pruebas de hipótesis, como en la construcción de intervalos de confianza. Una vez comprobada la normalidad de los datos, se determina si las varianzas en tales muestras son iguales (es decir, que sí cumple con la condición de homogeneidad de varianzas), ya que de si se cumple o no con esta condición dependerá la formulación que empleemos en el contraste de medias. El cálculo de la prueba de Levene requiere la comprobación de igualdad de varianzas, la cual define el estadístico de prueba de Levene [58], planteando las siguientes hipótesis:

Nula H_0 : “El conjunto de datos es homogéneo”.

Alternativa H_1 : “El conjunto de datos no es homogéneo”.

Al realizar el cálculo de F y si el valor calculado es mayor que el valor tabulado para un valor crítico superior al de la distribución F a un nivel de significancia α , la hipótesis nula se rechaza.

3.8.2 Análisis de Varianza (ANOVA)

El *análisis de varianza*, se utiliza como una técnica de comparación de más de dos grupos, es decir, como un método para comparar más de dos tratamientos; si queremos comparar dos grupos (dos tratamientos) y se dispone de medidas cuantitativas continuas, que se pueden suponer como procedentes de una distribución de probabilidad normal, se utiliza la prueba estadística de contraste de medias basado en la *t Student* [36, 57].

La prueba paramétrica más usada para verificar si dos o más medias muestrales proceden de la misma población es el **ANOVA** y para su aplicación es necesario cumplir con los siguientes supuestos: a) Las muestras son aleatorias, b) Las muestras son independientes, c) La distribución de la población a la cual pertenecen las muestras es Normal y d) Sus varianzas son iguales.

Dentro del análisis estadístico también se debe buscar el mejor ajuste entre las dos variables (absorbancia y concentración), para poder representar los datos y evaluar qué tipo de relación existe entre la variable dependiente y la independiente; por 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 [36, 57].

La **correlación** evalúa la asociación o relación entre dos variables cuantitativas, e indica además la dirección de ésta asociación, de forma que se puede saber si al aumentar el valor de una de ellas aumenta también el valor de la otra variable (relación directa) o por el contrario disminuye (relación indirecta), proporcionando un coeficiente de correlación (**r de Pearson**), que es un valor adimensional que oscila entre -1 y +1 [36, 57].

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 [36, 57].

El coeficiente de correlación mide 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 [36, 57].

La regresión lineal simple es un modelo matemático que explora la dependencia entre dos variables cuantitativas (**y** es la variable dependiente y **x** la independiente), tratando de verificar si la citada relación es lineal y aportando unos coeficientes (**m** y **b**) que sirven para construir la ecuación de la recta de predicción [36, 57]. El modelo de regresión lineal simple intenta ajustar con los datos de la muestra, a la ecuación 1:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x \quad (1)$$

Donde β_0 es el mismo valor de la ordenada en el origen (**b**) y es el valor que adoptará **y** cuando **x** valga cero; β_1 es la misma pendiente (**m**) de la recta, que se interpreta como el cambio de **y** por cada unidad de cambio de **x**; una vez encontrados estos parámetros, es necesario hacer el análisis de dicho modelo de regresión para confirmar la existencia de la relación lineal entre las variables **x** y **y**. Se tiene en cuenta que la recta del modelo tendría pendiente cero cuando **x** no pueda predecir la variabilidad de **y**, lo que permite plantear las siguientes hipótesis [56, 57]:

Nula **H₀**: “La pendiente de la recta es igual a cero”.

Alternativa **H₁**: “La pendiente de la recta es diferente de cero”.

Se acepta la hipótesis nula si el valor del estadístico calculado es menor que el valor tabulado y por tanto no existe una relación lineal significativa entre **x** y **y** ó la relación es de otro tipo [56, 57].

Otra forma de cuantificar el ajuste del modelo lineal a los datos, es a través del llamado **Coefficiente de Determinación (R²)**, que compara lo explicado por la regresión con la variabilidad total de **y**, interpretándose como el porcentaje de la variabilidad total de la variable dependiente **y**, que es explicada por la variable independiente **x**. En la ecuación 2 es claro que $0 < R^2 \leq 1$ [56, 57].

$$R^2 = \frac{\text{Variabilidad explicada por el modelo}}{\text{Variabilidad total}} \quad (2)$$

4. METODOLOGÍA

4.1 EQUIPOS, MATERIALES y REACTIVOS

La metodología de este trabajo se desarrolló para llevar a cabo la estandarización del método analítico para la determinación de arsénico y plomo por espectrometría de absorción atómica en muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables. A continuación se nombran los equipos, reactivos y materiales empleados.

- EQUIPOS

Tabla 1. Equipos empleados para la estandarización e implementación de los métodos analíticos

Equipo	Marca
Espectrómetro de Absorción Atómica	Thermo S4 AA
Generador de Hidruros	Thermo Vapour System, VP100
Horno de Grafito con Automuestreador	Thermo Furnace Autosampler, GFS97
Lámpara cátodo hueco As	Thermo Electron Corporation, 12 mA
Lámpara cátodo hueco Pb	VWR Scientific, 10 mA
Cubetas Electrografito normal	Thermo Elemental Solaar
Balanza Analítica	Mettler AE 200 ($\pm 0,0001g$)
Micropipeta	Brand 0,5-10 μL
Micropipeta	Brand 2-200 μL
Horno	Fisher Isotemp (50 a 325°C)
Desionizador	E & Q
Destilador	GFL
Conductímetro	Thermo Orion 105
Nevera	Haceb
Plancha de Calentamiento	Corning PC 420D

- MATERIAL DE VIDRIO y PLÁSTICO

Balones volumétricos clase A (Pyrex USA de 5 mL, Brand de 10, 50, 100 mL, Schott Duran de 250, 500, 1000 mL), balones fondo plano (Schott Duran de 100 mL), crisol de filtración (Schott Duran porosidad 2), erlenmeyer (Schott Duran de 100 mL), condensador liso 24/40, cajas de petri, mortero de porcelana, desecador (Schott Duran), pipetas graduadas clase A (Brand de 10 mL), vaso de precipitados (Schott Duran de 250, 600 mL), recipientes ámbar de Polietileno de 60 mL, termómetro (BRAND (-10 a 110°C)), tamiz (Newark USA Standard Series No. 18, tamaño de partícula 1,135 mm).

- REACTIVOS y SOLUCIONES

Todos los reactivos fueron grado analítico de alta pureza. Para la digestión se emplearon mezclas de ácido nítrico (65% v/v, Merck) y perclórico (70% v/v, Merck). Los estándares de calibración fueron: As (1000 mg/L de H_3AsO_4 en HNO_3 , Merck) y Pb (1000 mg/L de $Pb(NO_3)_2$ en HNO_3 , Merck), que cuentan con trazabilidad SRM de NIST lo que permite disminuir la desviación en la exactitud de la medida con respecto a la preparación de las

soluciones. Se utilizaron disoluciones de ácido nítrico al 0,2% v/v, de ácido clorhídrico al 1,0% v/v (Merck) y ácido sulfámico al 10% (Carlo Erba) para la disminución de interferencias; el borohidruro de sodio al 0,5% m/v (Merck) en 0,5% m/v de hidróxido de sodio (Merck) y una solución de ácido clorhídrico al 10% v/v, fueron empleados para reacción de reducción del arsénico.

El agua desionizada que se utilizó en la preparación de las soluciones presentó una conductividad de 0,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 22°C.

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

Solución stock de arsénico, 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ de As: Se preparó diluyendo 50 μL de la solución patrón de 1000 mg/L de arsénico con ácido clorhídrico al 1,0%, en un balón volumétrico de 50 mL.

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

Solución stock de plomo, 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Pb: Se preparó diluyendo 50 μL de la solución patrón de 1000 mg/L de plomo con ácido nítrico al 0,2%, en un balón volumétrico de 50 mL.

Estas soluciones fueron empleadas para la construcción de las curvas de calibración de arsénico y plomo.

Solución de ácido perclórico, 48,0%: En un vaso de precipitados que contenía agua desionizada, se adicionó 342,86 mL de ácido perclórico al 70%; cuando la solución se encontró a temperatura ambiente, se diluyó a 500 mL en un balón aforado; esta solución fue empleada en la digestión de las muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables.

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

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

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

Solución de ácido sulfámico, 10%: En un vaso de precipitados se disolvió 10,0 g de ácido sulfámico (sólido) con agua desionizada; cuando el sólido estuvo disuelto completamente, se diluyó a 100 mL en un balón aforado; esta solución fue empleada para la disminución de interferencias en la determinación de arsénico.

4.2 LIMPIEZA DEL MATERIAL

Para minimizar las trazas de metales, los materiales de vidrio del laboratorio, al igual que los recipientes para almacenar las muestras fueron sometidos a un procedimiento de limpieza con agua regia (HCl:HNO₃, 3:1 concentrado) durante 12 horas a temperatura ambiente y posteriormente, se enjuagaron con agua desionizada.

4.3 VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO

La verificación de la calibración de los balones aforados utilizados para la preparación de las soluciones stock y de los estándares de calibración, se realizó mediante un control gravimétrico planteado para los aparatos volumétricos (ajustados para contenido "IN"), indicado en el protocolo de estandarización certificado por la ISO 9001-14001 y el cual esta aprobado por los Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración (ISO/IEC 17025:2005) [59, 60], siguiendo las siguientes etapas: a) Determinación de la temperatura del agua del ensayo, b) Determinación del peso del balón seco (W_1), c) Llenado del balón con el agua de ensayo hasta el aforo, d) Limpieza con un paño de celulosa la pared del balón por encima del menisco, e) Como resultado, el punto más bajo del menisco debe encontrarse a la misma altura que el borde superior del aforo, f) Determinación del peso del balón aforado con el agua de ensayo (W_2).

En el anexo 1, se muestran los respectivos cálculos para la verificación de la calibración de los balones aforados.

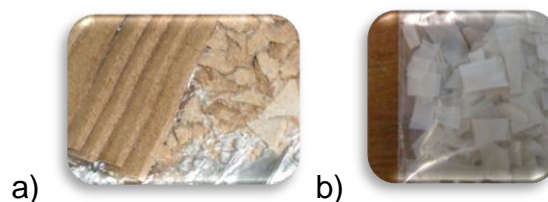
4.4 MUESTRAS

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

4.5 PRE-TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras (figuras 4a y 4b) se llevaron a un tamaño de partícula más pequeño, mediante métodos mecánicos, iniciando con una ruptura manual. Los termoformados se maceraron hasta un tamaño de partícula menor a 1,135 mm (tamiz No. 18) y finalmente se les eliminó el contenido de agua mediante un proceso de secado en horno a 70°C durante 4 horas y media para los termoformados y cuatro horas para las películas flexibles [61, 62, 63, 64].

Figura 4. Muestras: a) Termoformados, b) Películas flexibles



A partir de los pesos obtenidos (tablas 36 y 37, anexo 2), se determinó el porcentaje de humedad de las muestras por triplicado (ver ecuación 3).

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso}_{\text{muestra húmeda}} - \text{Peso}_{\text{muestra seca}}}{\text{Peso}_{\text{muestra húmeda}}} * 100 \quad (3)$$

4.6 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO

La optimización de la digestión ácida con reflujo para las muestras de termoformados y películas flexibles, se realizó con la determinación de As, con seis lecturas de la absorbancia, teniendo en cuenta las variables de temperatura, tiempo de digestión, cantidad de muestra y la relación de ácidos. La combinación entre las tres primeras variables, permitió plantear 27 ensayos, los cuales se aplicaron a cada una de las relaciones de ácido nítrico:perclórico, como se muestra en las tablas 38, 39, 40, 41 y 42 (ver anexo 3).

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

4.6.1 Optimización del peso de la muestra

Se determinó la cantidad de muestra, variando de 0,5000 ($\pm 0,0001$) g, 1,0000 ($\pm 0,0001$) g y 2,0000 ($\pm 0,0001$) g, con el termoformado HMC 1 y la película flexible SM 707-17 hidrolizada en base seca, ya que esto permite la uniformidad (igual interacción de toda la muestra con el ácido) en la digestión y la generalización de los resultados.

4.6.2 Optimización del tiempo y temperatura

La temperatura óptima de digestión de las muestras se determinó experimentalmente a tres temperaturas diferentes de calentamiento (35, 50 y 70°C), al igual que el tiempo de digestión, que para los termoformados fueron de 60, 120 y 180 minutos y para las películas flexibles de 30, 45 y 60 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, todas las soluciones digestadas se filtraron a través de un crisol de filtración, y luego se almacenaron en recipientes de polietileno a 4°C para su análisis de arsénico por EAA.

4.6.3 Optimización de la relación de ácidos

La digestión de cada una de las muestras se realizó con la relación de ácidos óptima, la cual se determinó experimentalmente, realizando las siguientes variaciones en la cantidad de los ácidos minerales: HNO₃ al 65% (20 a 5 mL) y HClO₄ al 48% (5 a 20 mL),

obteniendo relaciones de 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 y 0:1 (HNO₃:HClO₄), como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Relaciones de ácido nítrico y perclórico utilizadas para la optimización de la digestión ácida con reflujo

Relación HNO ₃ :HClO ₄	Ácido Nítrico (mL)	Ácido Perclórico (mL)
1:0	20,0	---
3:1	15,0	5,0
1:1	10,0	10,0
1:3	5,0	15,0
0:1	---	20,0

Para poder analizar mejor los efectos de interacción, garantizando que las variables de tiempo, temperatura y relación de ácidos, pueden afectar de manera independiente la calidad de la digestión ácida de las muestras, se planteó un diseño factorial 2³ utilizando el paquete estadístico MINITAB versión 15.1.20.0, con los valores más altos de dichos factores: tiempo (120 y 180 minutos), temperatura (50 y 70°C) y relación de ácidos (1:3 y 3.1) y empleando la cantidad óptima de muestra de los termoformados (1,0000 g).

4.7 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de As y Pb en las muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables, se realizó por el método de curva de calibración.

Arsénico:

A partir de la solución stock de 1000 µg/L de arsénico, se construyó la curva de calibración, mediante la preparación de 10 mL de 8 estándares de arsénico en el rango de 2,0 a 20,0 µg/L en una solución de HCl al 1,0%. Para cada estándar de As se realizaron seis lecturas de absorbancia en el EAA - GH.

Plomo:

A partir de la solución stock de 1000 µg/L de plomo, se construyó la curva de calibración mediante la preparación de 5 mL de 9 estándares de plomo en el rango de concentración de 2,0 a 7,0 µg/L en una solución de HNO₃ al 0,2%. A cada estándar de Pb se le realizaron cuatro lecturas de absorbancia en el EAA - HG.

4.8 PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

4.8.1 Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico y plomo

Para la determinación de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico y plomo, se realizó un seguimiento cada 30 minutos durante tres horas del valor de la absorbancia de tres estándares de cada elemento: estándar 1 de 4,0 µg As/L y de 2,0 µg Pb/L, estándar 2 de 12,0 µg As/L y de 2,5 µg Pb/L y estándar 3 de 16,0 µg As/L y de 3,5 µg Pb/L. A cada estándar de As y Pb se le realizaron seis y cuatro lecturas de absorbancia, respectivamente.

Posteriormente, se aplicó un tratamiento estadístico por ANOVA de un factor, para saber si existían diferencias significativas entre las absorbancias obtenidas de cada estándar durante las tres horas de análisis.

4.8.2 Disminución de interferencias para la determinación de As

Con el objetivo de obtener una buena disminución de las interferencias producidas por los óxidos de nitrógeno durante la digestión de las muestras, se realizaron varios ensayos por triplicado con o sin adición de yoduro de potasio/ácido ascórbico (100 µL de solución de KI al 10% (m/v) y 100 µL de solución de ácido ascórbico al 10%) y de ácido sulfámico (100 µL) a un estándar de 8,0 µg As/L y a una muestra de termoformado (CM 523-7); además, se optimizó la cantidad adicionada de ácido sulfámico a la muestra digestada, con adiciones de 100, 200, 300 y 400 µL y variación en el tiempo de reacción (5, 30 y 60 minutos) antes de hacer el respectivo análisis espectrométrico (6 lecturas de absorbancia en cada solución).

Mediante las pruebas estadísticas (ANOVA de un factor y la prueba de Tukey), se analizó en qué ensayo se obtuvo la máxima absorbancia de arsénico.

4.9 ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO Y PLOMO

Para llevar a cabo la estandarización de los dos métodos analíticos, fue necesario en primer lugar, determinar los parámetros de calidad estadística:

4.9.1 Intervalo de linealidad

Para ello, se preparó una curva de calibración en el intervalo de concentración de 2,0 a 50,0 µg/L para el Arsénico y de 2,0 a 12,0 µg/L para el Plomo, realizando seis lecturas de absorbancia para cada estándar de As y cuatro para los de Pb; se evaluó estadísticamente el coeficiente de correlación, la pendiente e intercepto, mediante un tratamiento estadístico de los datos paramétricos obtenidos para cada nivel de concentración. Una vez corroborada la respuesta lineal del equipo en dicho intervalo, se estableció dentro de este intervalo, el rango de trabajo para la determinación de arsénico (2,0 a 20,0 µg/L) y plomo (2,0 a 7,0 µg/L) (ver ítem 4.7).

4.9.2 Precisión

Es determinada con respecto a la repetibilidad y a la precisión intermedia:

Repetibilidad: se prepararon en un mismo día cinco curvas de calibración de As (2,0, 4,0, 8,0, 12,0, 14,0, 16,0, 18,0 y 20,0 µg/L) (ver ítem 4.7) y de Pb (2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 y 7,0 µg/L) (ver ítem 4.7) analizándolas por EAA.

Precisión Intermedia: se prepararon ocho curvas de calibración de As (2,0, 4,0, 8,0, 12,0, 14,0, 16,0, 18,0 y 20,0 µg/L) (ver ítem 4.7) y de Pb (2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 y 7,0 µg/L) (ver tabla 4) durante ocho días diferentes, analizándolas por EAA.

De estos procedimientos se obtuvieron los respectivos coeficientes de variación y se aplicó un tratamiento estadístico adecuado para deducir si el método fue preciso ó no a un

nivel de confianza del 95%; para ello, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y de Homogeneidad de varianzas (planteando las correspondientes hipótesis nulas y alternativas (ver ítem 3.8.1.1 y 3.8.1.2)) a cada uno de los niveles de concentración (estándar) de las curvas de calibración.

4.9.3 Sensibilidad

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

4.9.4 Límite de detección y de cuantificación

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) para arsénico y plomo, fueron determinados a través del procedimiento sugerido por la IUPAC [65], utilizando los resultados de los interceptos y las pendientes obtenidas de las ecuaciones de tres curvas de calibración de baja concentración (2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 y 7,0 µg/L) para el As y (1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 y 4,0 µg/L) para el Pb (preparadas exclusivamente para la determinación del LD y del LC, realizando seis y cuatro lecturas de la absorbancia para cada estándar de As y Pb, respectivamente); se calculó el LD como indica la siguiente ecuación:

$$X_{LD} = \frac{K_D S}{\bar{m}} \quad (4)$$

Siendo S la desviación estándar de las ordenadas, \bar{m} la media de las pendientes y $K_{D(n-1, \alpha)}$ con un valor de 3,36 un factor numérico el cual está relacionado con la t-Student, al 99% de confianza y 5 grados de libertad (n-1, donde n es el número de niveles de la curva de calibración).

El límite de cuantificación se calculó teniendo en cuenta la ecuación 5, donde $K_Q = 3 * K_D$, tomando un valor de 10,08.

$$X_{LC} = \frac{K_Q S}{\bar{m}} \quad (5)$$

4.9.5 Exactitud

La exactitud del método fue determinada en términos del porcentaje de recuperación, adicionando por triplicado cantidades conocidas (80, 160 y 240 µL) de un estándar de 1000 µg/L de arsénico a la muestra CM 4574-7 y (50, 60 y 70 µL) de un estándar de 1000 µg/L de plomo a las muestras MPER 183 y CM 7138-7 nativo, antes del proceso de digestión; se midió por EAA la muestra dopada y el estándar adicionado a la muestra. Para calcular el porcentaje de recuperación, como indica la ecuación (6), a las muestras se les determinó previamente la concentración de arsénico y plomo.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{X - X_i}{X_a} * 100 \quad (6)$$

Donde, X es la concentración de la muestra más el estándar adicionado, X_i es la concentración inicial en la muestra y X_a la concentración del estándar adicionado.

4.10 ESTABILIDAD DE LOS METALES

Para evaluar la estabilidad del arsénico en un estándar de 8,0 µg As/L y en la muestra de termoformado CM 4574-7 y la estabilidad del plomo en un estándar de 3,0 µg Pb/L y en las muestras CM 4574-7 (termoformado) y CM 7138-7 Nativo (película flexible), se analizaron tres réplicas de cada uno (almacenándolas en la nevera a 4°C y las respectivas lecturas de As y Pb se hacen cuando las soluciones están a temperatura ambiente), midiéndolas en el EAA durante siete días consecutivos.

4.11 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO POR ABSORCIÓN ATÓMICA MEDIANTE LA GENERACIÓN DE HIDRUROS

Para la determinación de As, el espectrómetro de absorción atómica con generador de hidruros, se programó con las condiciones instrumentales que se muestran en los resultados (ver ítem 5.6, tabla 24).

A 300 µL de una solución de ácido sulfámico al 10% se les aforó a 10 mL con cada una de las 7 muestras de termoformados y 6 películas flexibles (además de las 7 muestras de harina, 6 de almidón de yuca y la fibra de fique) obtenidas en la digestión ácida con reflujo; se cuantificó el arsénico por curva de calibración.

4.12 DETERMINACIÓN DE PLOMO POR ABSORCIÓN ATÓMICA MEDIANTE HORNO DE GRAFITO

En la determinación de Pb, el espectrómetro de absorción atómica por horno de grafito, se trabajó en las condiciones instrumentales que se muestran en los resultados (ver ítem 5.6, tablas 25 y 26), cuantificando el plomo por curva de calibración en las 7 muestras de termoformados y 6 películas flexibles (además de las 7 muestras de harina, 6 de almidón de yuca y la fibra de fique).

La optimización de la temperatura de calcinación se realizó en el rango de 500 a 800°C, manteniendo fija a 1500°C la temperatura de atomización. Inicialmente se incrementó la temperatura cada 50°C, pero en el rango de 650 a 740°C se incrementó cada 10°C. Esta etapa se realizó en presencia de un flujo de gas inerte (argón), para expulsar los productos de la pirólisis. Manteniendo fija la temperatura de calcinación a 800°C, se optimizó la temperatura de atomización en el rango de 1000 a 1700°C, realizando incrementos cada 100°C.

Una vez determinadas las temperaturas óptimas de calcinación y de atomización, empleando un estándar de 6,0 µg Pb/L, se inyectaron en la cámara de grafito las muestras concentradas obtenidas en la digestión ácida con reflujo.

4.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la estandarización y la implementación, están soportados por un tratamiento estadístico por SPSS versión 11,5 para Windows y Microsoft Office Excel 2007. Inicialmente, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de igualdad de varianzas aplicando Levene. Posteriormente, se realizó el análisis de los resultados empleando ANOVA de un factor, y se analizó la correlación de Pearson, el coeficiente de

determinación y el análisis de relación para cada una de las curvas de calibración preparadas [58].

El ANOVA de un factor se aplicó a las muestras de termoformados y de películas flexibles que contenían Arsénico o Plomo cuantificable, para determinar si había diferencias significativas en las concentraciones del metal entre las muestras [58].

Para el análisis del diseño de experimentos de la digestión ácida de las muestras, se utilizó el paquete estadístico MINITAB versión 15.1.20.0 desarrollado por Minitabinc, el cual permitió crear los gráficos de efectos de interacción entre las variables.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO

La verificación de la calibración del material de vidrio empleado en la estandarización es necesaria, ya que se pueden producir variaciones en la precisión de la medición del material volumétrico, debido a la utilización de productos químicos agresivos (ej. ácidos fuertes); sin embargo, en los resultados de ésta verificación, la dispersión de los valores para cada uno de los balones aforados (mostrados en las tablas 29, 30, 31 y 32 (ver anexo 1)), son menores que un cuarto del límite de error (0,0225 para el balón de 50 mL, 0,0375 para el de 100 mL, 0,0150 para el de 10 mL y 0,0040 para el de 5 mL) admisible para el material de vidrio correspondiente a dicha medida, lo que significa que la incertidumbre de trabajo debida a este material es aceptable.

5.2 OPTIMIZACIÓN DE LA DIGESTIÓN ÁCIDA CON REFLUJO

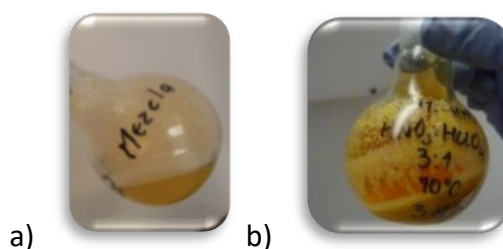
Los termoformados y películas flexibles biodegradables analizados en este trabajo, están principalmente compuestos por materia orgánica (harinas y almidones de yuca, fibra de fique), la cual interfiere en la determinación de As y Pb, debido a que los metales pueden estar incrustados en el polímero ó interactuando con él, lo que dificulta su liberación y posterior determinación. Por tal razón, se hace necesario realizar una digestión húmeda en presencia de HNO_3 y HClO_4 , ya que de esta manera se logran reducir las interferencias causadas por la presencia de dicha materia orgánica, además de convertir dichos metales en una forma apropiada (ión metálico libre) para que puedan ser determinados por EAA. Para la optimización del proceso de digestión ácida, se realizaron pruebas experimentales (con variación de: cantidad de muestra, temperatura, tiempo de digestión y relaciones de los ácidos) utilizando las muestras en base seca. Los porcentajes de humedad (anexo 2) encontrados están entre el 3,71 al 5,80% para los termoformados (tabla 33, anexo 2) y de 8,34 a 10,35% para las películas flexibles (tabla 34, anexo 2), los cuales están dentro del rango de humedad de los polímeros empleados para envolturas [61].

5.2.1 Optimización del peso de la muestra

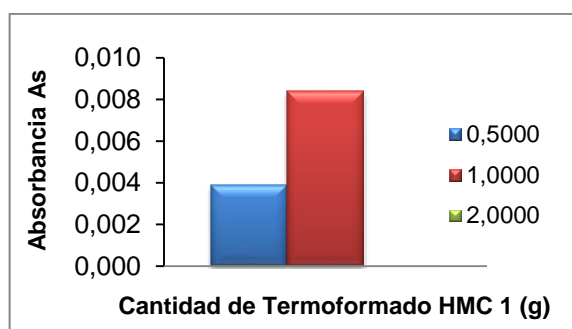
Termoformados:

La cantidad de muestra (HMC 1) afecta directamente la calidad de la digestión en 20 mL de la mezcla de ácidos, debido a que: Al emplear 2,0000 g sin importar la temperatura, el tiempo de digestión ó la mezcla de los ácidos nítrico y perclórico, no se consigue una buena digestión, lo cual se observa con la presencia de muestra sin oxidar (figura 5.b); al utilizar 0,5000 y 1,0000 g (figura 5.a) de muestra hubo digestión de la misma (anexo 3, tabla 36, ensayos 25, 26 y 27). Con 1,0000 g se obtuvo la mayor absorbancia de As (gráfica 1), por lo que se empleó 1,0000 g como el peso óptimo para la digestión de los termoformados (anexo 3, tabla 36, ensayo 26).

Figura 5. Digestión ácida con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1) a 70°C por 180 minutos de: a) 1,000 g, b) 2,000 g de muestra de termoformado HMC 1



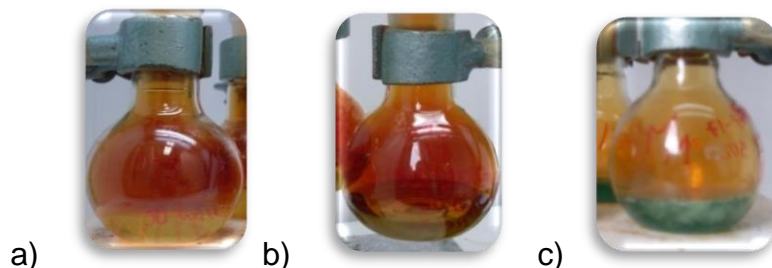
Gráfica 1. Optimización de la cantidad de muestra de termoformado (HMC 1) a emplear en la digestión ácida con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1) a 70°C por 180 minutos



Películas Flexibles:

Al igual que para los termoformados, cuando se utilizó 2,0000 g de película flexible (SM 707-17 hidrolizado), no se consiguió una buena digestión (figura 6.c) y al utilizar 0,5000 g de muestra, aunque no había presencia de muestra sin oxidar (figura 6.a), la cantidad de muestra no fue suficiente para obtener una absorbancia atribuida al metal (ensayos 16, 17 y 18, tabla 39, anexo 3), por tanto, se decidió emplear 1,0000 g de la películas flexible para la digestión, ya que se obtuvo una solución translúcida (figura 6.b) y una mayor absorbancia (ensayo 23, tabla 39, anexo 3).

Figura 6. Digestión ácida con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1) a 50°C por 60 minutos de: a) 5,0000 g, b) 1,0000g, c) 2,0000 g de película flexible SM 707-17 hidrolizado

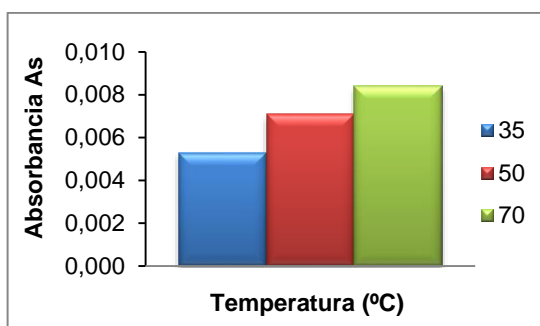


5.2.2 Optimización del tiempo y temperatura

Como se observa en la gráfica 2, correspondiente a los ensayos 8, 17 y 26 de la tabla 36 (ver anexo 3), con 1,0000 g de termoformado (HMC 1) y 180 minutos de digestión, el

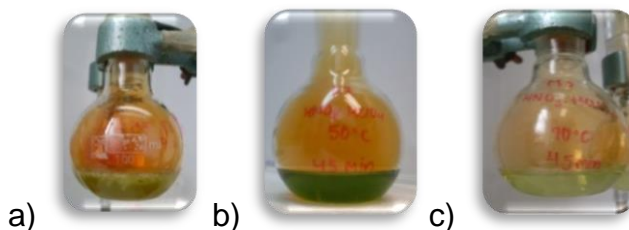
poder oxidante de los ácidos minerales (HNO_3 y HClO_4), se incrementa significativamente con el aumento de la temperatura; esto también se aplica para las películas flexibles (ensayos 5, 14 y 23, tabla 39, anexo 3), para 1,0000 g de muestra y 45 minutos de digestión.

Gráfica 2. Optimización de la temperatura a emplear en la digestión ácida con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1) por 180 minutos de la muestra termoformado (HMC 1)



Como se muestra en la figura 7, a 35°C no se consigue la digestibilidad completa de la muestra, a 50°C no se observan partículas en suspensión, pero la solución toma una coloración verde oscuro, atribuida a la posible presencia de compuestos de furfural (productos coloreados) que pueden quelatar a los iones de arsénico, afectando su determinación, y a 70°C la muestra se torna de una apariencia mucho más traslúcida, indicando que hay una buena digestión de la muestra.

Figura 7. Digestión de 1,0000 g de película flexible con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1) durante 45 minutos y temperaturas de: a) 35°C, b) 50°C y c) 70°C



La temperatura óptima para realizar la digestión ácida de los termoformados y de películas flexibles es 70°C, ya que a temperaturas mayores hay una gran pérdida de los ácidos por evaporación, lo cual produce, además de una disminución en la eficiencia de la digestión, pérdida de analito.

El tiempo de la digestión de los termoformados tiene influencia directa en la absorbancia del arsénico (como es observa en los ensayos 20, 23 y 26 de la tabla 36 (ver anexo 3) que emplean la misma cantidad de muestra, y temperatura de digestión), la cual se incrementa con el aumento del tiempo de digestión; 60 minutos de digestión (20 de la tabla 36) no fue suficiente para conseguir una completa oxidación de la muestra; con 120 minutos de digestión (23 de la tabla 36), no se observaron partículas en suspensión, pero cuando se realizó la digestión en un tiempo de 180 minutos, como se indica en el ensayo 26 (tabla 36), la solución tuvo una apariencia más traslúcida. De acuerdo a esto, la

digestión de todas las muestras de termoformados se realizó durante 180 minutos, siendo éste el tiempo óptimo.

En el caso de las películas flexibles, como se muestra en los ensayos 20, 23 y 26 (tabla 39, anexo 3), 30 minutos de digestión (ensayo 20) no son suficientes para obtener una completa digestión debido a la presencia aún de pequeñas partículas de muestra; con 45 minutos de digestión (ensayo 23) la solución fue traslúcida y hay un aumento en la lectura de la absorbancia, por lo que se decidió emplear 45 minutos como tiempo de digestión para las películas flexibles, ya que cuando se aumentó este tiempo a 60 minutos (ensayo 26) se pudo presentar pérdida del metal por volatilización, por lo que se produce una disminución de la absorbancia.

5.2.3 Optimización de la relación de ácidos

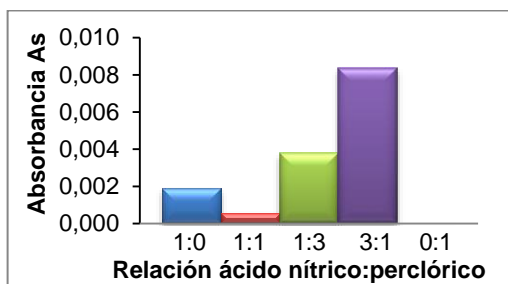
La mayor influencia para una mejor digestión ácida por reflujo de los termoformados, está dada por la relación de ácidos nítrico:perclórico que se emplean (ver figura 8), en donde las absorbancias obtenidas (ensayos 26 en las tablas 35, 36, 37 y 38, anexo 3) se ven directamente afectadas por la eficiencia de la relación de estos ácidos.

Figura 8. Digestión ácida de 1,0000 g de termoformado (HMC 1) con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ a 70°C , durante 180 minutos en la relación de ácidos: a) 1:0, b) 1:1, c) 1:3, d) 3:1 y e) 0:1



Como se muestra en la gráfica 3, la mayor absorbancia de As se presenta cuando la digestión de los termoformados se realizó con la relación 3:1 de ácido nítrico:perclórico. Para las películas flexibles se realizó solamente la relación de ácidos 3:1 ya que ésta es la que mejor respuesta presentó el termoformado.

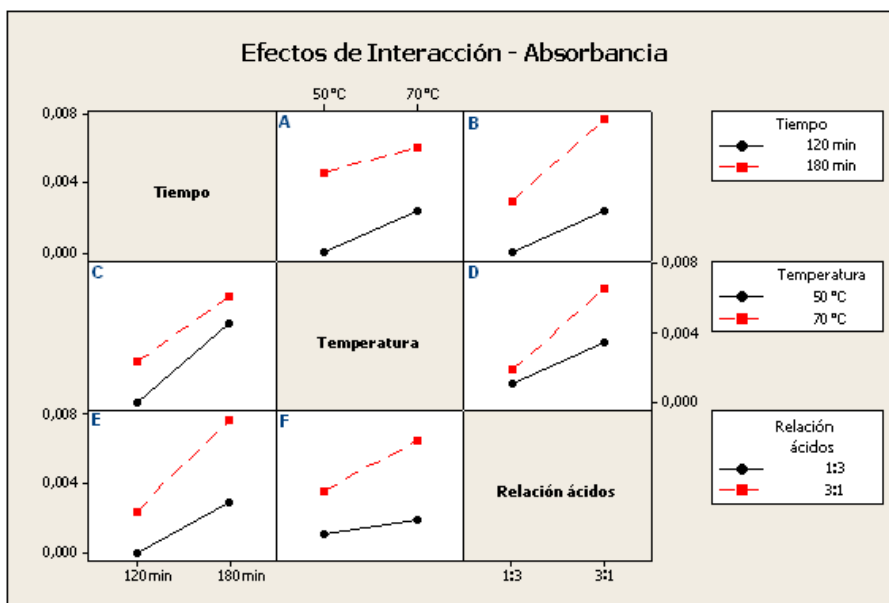
Gráfica 3. Optimización relación de ácido nítrico-perclórico a emplear en la digestión ácida de 1,0000 g de termoformado (HMC 1) con $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ a 70°C , durante 180 minutos



La relación 0:1 ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$) no se empleó, debido a que la digestión de la muestra (sin importar la cantidad de muestra, temperatura o tiempo de digestión) no fue completa, mostrando una coloración café oscura debido a la carbonización de la materia orgánica (figura 8.e).

Al realizar el diseño experimental y teniendo en cuenta que en algunas condiciones de digestión (como a 35°C, 60 minutos y relaciones de ácidos 1:0 y 1:1 (HNO₃:HClO₄)) es evidente que no hay una buena digestión de la muestra, lo cual provoca una incorrecta determinación de As y Pb, se obtuvo la gráfica de efectos de interacción (gráfica 4) del tiempo a 120 y 180 minutos, con la temperatura a 50 y 70°C, y con la relación 1:3 y 3:1 de ácidos nítrico:perclórico.

Gráfica 4. Efectos de interacción del tiempo a 120 y 180 minutos, de la temperatura a 50 y 70°C y de la relación de ácidos 1:3 y 3:1 de HNO₃:HClO₄, en la digestión de 1,0000 g de termoformado HMC 1



En la gráfica 4 se observa que ninguna de las curvas de los efectos de interacción se cruzan, indicando que no hay interacción entre el tiempo, la temperatura y la relación de ácidos empleadas para la digestión ácida del termoformado, por lo que se pueden trabajar como variables independientes en el momento de hacer la optimización de la digestión; también es de tener en cuenta que, en las condiciones empleadas, el efecto producido por estas variables es positivo, es decir, que a alta temperatura (70°C), tiempo (180 minutos) y cantidad de ácido nítrico en la relación de ácidos (3:1), se obtiene una mayor respuesta del equipo en términos de absorbancia de arsénico.

Esto corrobora los resultados obtenidos, ya que para la determinación de arsénico, el procedimiento de digestión ácida de mayor eficiencia para la disolución de 1,0000 g de muestra, es la mezcla HNO₃:HClO₄ en la relación 3:1, a 70°C durante 180 minutos para los termoformados; para las películas flexibles, el tiempo de digestión empleado fue de 45 minutos.

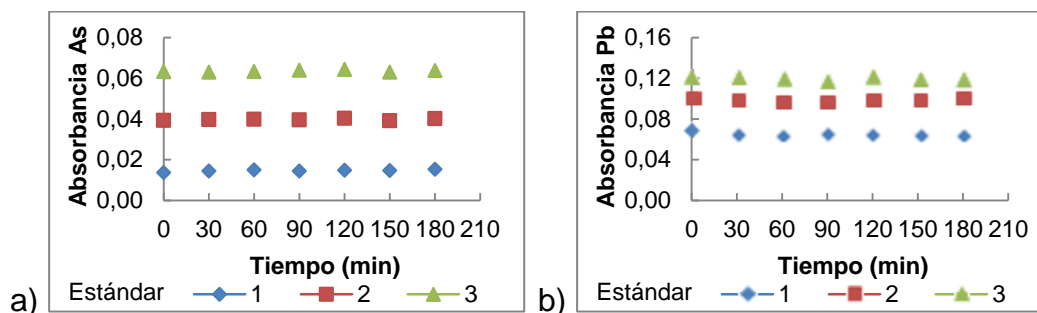
Al igual que para la determinación de arsénico, en el plomo se empleó el mismo proceso optimizado para la digestión de los termoformados y de las películas flexibles biodegradables.

5.3 PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

5.3.1 Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico y plomo

En la gráfica 5, se muestran las absorbancias paramétricas obtenidas para los tres estándares (de arsénico y de plomo), frente al tiempo de medida de la estabilidad (3 horas), en las cuales se aceptó la H_0 de Shapiro Wilk, con $W_{\text{calculado}}$ menor al W_{tabulado} (0,986 para arsénico y 0,999 para plomo) y la homogeneidad de varianzas con $F_{\text{calculado}}$ menor al F_{tabulado} (5,900 para arsénico y de 2,570 para plomo) (ver tabla 40 y 41, anexo 4), lo que indica que las medias mostradas en las tablas 42 y 43 (ver anexo 4), son los valores representativos de las absorbancias de cada uno de los estándares de ambos metales, con sus respectivos intervalos de confianza (empleados para hacer un control de la estabilidad de las lámparas para tiempos de análisis más prolongados) y con buenos coeficientes de variación (< 3,68% para As y < 2,71% para Pb).

Gráfica 5. Estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de: a) arsénico, b) plomo empleando el estándar 1 (4,0 $\mu\text{g/L}$ As/L y 2,0 $\mu\text{g/L}$ Pb/L), el estándar 2 (12,0 $\mu\text{g/L}$ As/L y 2,5 $\mu\text{g/L}$ Pb/L) y el estándar 3 (16,0 $\mu\text{g/L}$ As/L y 3,5 $\mu\text{g/L}$ Pb/L)



Lo anterior, indica que las lámparas no presentaron fluctuaciones significativas ni con el tiempo (durante tres horas) ni con la concentración (alta, media ó baja de arsénico y plomo) lo que permite realizar los análisis de arsénico y plomo sin que se presenten fluctuaciones significativas de la absorbancia; esto se corrobora con el ANOVA de un factor (tablas 3 y 4), donde los valores de F calculados son menores que los tabulados para un 95% de confianza, lo que nos permitió aceptar la hipótesis nula ($H_0 = \text{“No hay diferencia entre el promedio de las absorbancias en los diferentes tiempos de análisis de un estándar”}$).

Tabla 3. ANOVA de un factor para la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de As

Elemento	Estándar		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabulado}
As	1 (4,0 $\mu\text{g/L}$)	Inter-grupos	0,000	6	0,000	1,330	2,340
		Intra-grupos	0,000	35	0,000		
		Total	0,000	41			
	2 (12,0 $\mu\text{g/L}$)	Inter-grupos	0,000	6	0,000	0,705	2,340
		Intra-grupos	0,000	35	0,000		
		Total	0,000	41			
	3 (16,0 $\mu\text{g/L}$)	Inter-grupos	0,000	6	0,000	1,804	2,340
		Intra-grupos	0,000	35	0,000		
		Total	0,000	41			

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

Tabla 4. ANOVA de un factor para la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de Pb

Elemento	Estándar		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculado	F tabulado
Pb	1 (2,0 µg/L)	Inter-grupos	0,000	6	0,000	0,903	2,570
		Intra-grupos	0,000	21	0,000		
		Total	0,000	27			
	2 (2,5 µg/L)	Inter-grupos	0,000	6	0,000	0,328	2,570
		Intra-grupos	0,001	21	0,000		
		Total	0,001	27			
	3 (3,5 µg/L)	Inter-grupos	0,000	6	0,000	1,232	2,570
		Intra-grupos	0,000	21	0,000		
		Total	0,000	27			

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

5.3.2 Disminución de interferencias para la determinación de arsénico

De los ensayos realizados con o sin la adición de yoduro de potasio/ácido ascórbico y/o ácido sulfámico al estándar de arsénico (ver tabla 5), se obtuvieron bajos coeficientes de variación (< 6,30%) y como se observa en el ANOVA de un factor en la tabla 44 (anexo 4), estadísticamente no hubo diferencias significativas en las absorbancias del estándar de 8 µg As/L ($F_{\text{calculado}}$ de 3,657 < F_{tabulado} 3,680).

Tabla 5. Absorbancias de arsénico en un estándar (8 µg/L) y en muestra digestada (CM 523-7) con o sin la adición de KI/ácido ascórbico y/o ácido sulfámico, intervalo de confianza y coeficiente de variación

Solución	Ensayo	KI/Ácido ascórbico	Ácido sulfámico	$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
Estándar	1			0,0354 ± 0,0004	2,82
	2	✓		0,0358 ± 0,0007	4,75
	3		✓	0,0349 ± 0,0009	6,30
	4	✓	✓	0,0342 ± 0,0005	3,51
Muestra digestada	1			0,0001 ± 0,0002	400,00
	2	✓		0,0012 ± 0,0002	41,67
	3		✓	0,0053 ± 0,0002	7,55
	4	✓	✓	0,0035 ± 0,0003	22,86

Para comprobar la afirmación anterior, se aplicó la prueba de Tukey de comparación múltiple (a posteriori), como se muestra en la tabla 6, en la cual se obtuvieron dos subconjuntos que fueron estadísticamente homogéneos, lo que significa que no hay diferencias significativas en la absorbancia del estándar de arsénico con o sin adición de KI/ácido ascórbico o ácido sulfámico y la falta de eficiencia en la reducción del arsénico (forma en la que se encuentra presente en el estándar H_3AsO_4) con el yoduro de potasio como reductor.

Tabla 6. Prueba de Tukey para los ensayos de disminución de interferencias al estándar de 8 µg As/L.

Ensayo	N	Subconjunto para $\alpha=0,05$	
		1	2
8 µg As/L + KI/ác. ascórbico + ác. sulfámico	18	0,0342	
8 µg As/L + ác. sulfámico	18	0,0349	0,0349
8 µg As/L	18	0,0354	0,0354
8 µg As/L + KI/ác. ascórbico	18		0,0358
Sig.		0,105	0,289

Donde N = (3 réplicas de cada ensayo) x (6 lecturas de la absorbancia).

Lo anterior, se puede atribuir a que en muestras tratadas con ácidos fuertemente oxidantes (caso de mineralizaciones de las muestras) o que contengan agentes oxidantes, se forman grandes cantidades de I_2 , por lo que se necesitan elevadas concentraciones de KI para la reducción efectiva de As (V) a As (III), además de una serie de inconvenientes que surgen con la presencia de I_2 ó I_3^- formado en la muestra [32]. Al tener en cuenta el bajo coeficiente de variación de 2,82% que se obtuvo en el ensayo del estándar sólo, se decide no adicionar ácidos ni sales a los estándares de las curvas de calibración.

Para la muestra CM 523-7 (tabla 5), se obtuvieron coeficientes de variación considerablemente altos, los cuales son atribuidos a la presencia de los óxidos de nitrógeno que reaccionan con la arsina, produciendo su oxidación, y por tanto, el As no puede ser determinado; sólo se obtuvo un CV aceptable de 7,55%, correspondiente al ensayo de adición de ácido sulfámico y con el cual se encontró la mayor absorbancia. Posteriormente, se realizó una optimización en la cantidad a adicionar de ácido sulfámico y el tiempo de reacción antes del análisis por absorción atómica, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Absorbancia de arsénico, intervalo de confianza y coeficiente de variación en el termoformado CM 523-7 con la adición de ácido sulfámico y tiempo de reacción

Ensayo + Ácido sulfámico	Tiempo de Reacción (min)	Ácido sulfámico (µL)	$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
	5	100	0,0040 ± 0,0000	---
		200	0,0052 ± 0,0003	15,38
		300	0,0058 ± 0,0002	6,90
		400	0,0045 ± 0,0002	13,33
CM 523-7 + Ácido sulfámico	30	100	0,0022 ± 0,0003	36,36
		200	0,0042 ± 0,0002	9,52
		300	0,0057 ± 0,0002	8,77
		400	0,0047 ± 0,0002	10,64
	60	100	0,0030 ± 0,0000	---
		200	0,0042 ± 0,0002	9,52
		300	0,0052 ± 0,0003	15,38
		400	0,0045 ± 0,0002	13,33

De ésta optimización, teniendo en cuenta la mayor absorbancia y el menor CV (6,90%), se obtiene que la máxima eficiencia para la determinación de arsénico en los termoformados es con la adición de 300µL de HSO₃NH₂, dejando transcurrir 5 minutos antes de realizar la lectura en el EAA-GH.

En el caso de las muestras de las películas flexibles el arsénico no fue detectable aun con la adición de KI/ácido ascórbico y/o ácido sulfámico.

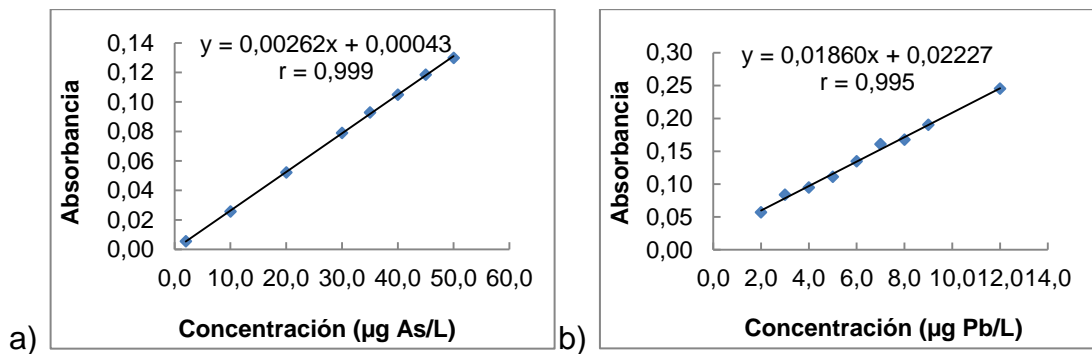
5.4 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD

Se determinaron los parámetros de calidad estadística (intervalo lineal, precisión, sensibilidad, límite de detección y de cuantificación, exactitud), los cuales establecen el rendimiento del método para así poder determinar el arsénico y plomo en cada una de las muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables.

5.4.1 Intervalo de linealidad para arsénico y plomo

Las curvas de calibración obtenidas, con niveles de concentración en el rango de 2,0, 10,0, 20,0, 30,0, 35,0, 40,0, 45,0 y 50,0 µg/L para Arsénico y de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 y 12,0 µg/L para Plomo frente a la absorbancia de cada uno de estos estándares, se muestran en las gráficas 6.a y 6.b, respectivamente.

Gráfica 6. Curvas de calibración para el intervalo lineal de: a) arsénico, b) plomo



Para comprobar la respuesta lineal del equipo en el intervalo de concentraciones de arsénico y plomo, fue necesario realizar el siguiente tratamiento estadístico:

Los datos obtenidos son paramétricos para todos los niveles de concentración de As y Pb (tablas 45 y 46, anexo), ya que se cumplió con la H₀ de Shapiro Wilk (con W calculado menores al W tabulado de 0,986 para As y de 0,999 para Pb) y con la homogeneidad de varianzas al ser el F calculado < F tabulado (1,300 < 5,900 para As y 2,1130 < 5,100 para Pb), además, en estos intervalos de concentración se obtuvieron buenos coeficientes de variación entre 1,43 y 5,00% para arsénico y 1,41 y 3,71% para plomo (tabla 47 en anexo 5), lo que indica que las medias mostradas en la tabla 47 (ver anexo 5) si son valores representativos de cada uno de los niveles de las curvas.

Adicionalmente, se verificó la linealidad de la curva de calibración de arsénico y plomo, mediante la obtención de los *coeficientes de correlación de pearson* (ver tabla 8).

Tabla 8. Coeficientes de *Correlación de Pearson* para el intervalo lineal de As y Pb

	As	Pb
<i>Correlación de Pearson</i>	0,999	0,995
N	48	36

As: N = (8 niveles de la curva de calibración) x (6 lecturas de la absorbancia)
Pb: N = (9 niveles de la curva de calibración) x (4 lecturas de la absorbancia)

Con los resultados de la tabla 8, se demuestra que existe una correlación positiva entre la absorbancia del arsénico o plomo con la concentración de cada uno de ellos, debido a que la absorbancia crece proporcionalmente a la concentración.

El ajuste del modelo es bueno, según la información de la tabla 9, ya que los valores del coeficiente de determinación (R^2) son cercanos a 1, lo que significa que el 99,8% y el 99,0% de la variabilidad de la absorbancia de As y Pb, está dada por la concentración de arsénico y plomo, respectivamente.

Tabla 9. Coeficiente de Regresión, Coeficiente de Determinación y Coeficiente de Determinación Ajustado para el intervalo lineal de As y Pb

Elemento	r	R^2	R^2 ajustada
As	0,999	0,998	0,998
Pb	0,995	0,990	0,990

Adicionalmente, es necesario confirmar si este grado de relación es significativamente lineal mediante el análisis de regresión para el modelo $y = \beta_0 + \beta_1x$; en la tabla 48 (ver anexo 5), se observa, además del coeficiente que define la pendiente de la recta de regresión (*coeficientes no estandarizados*), los estadísticos t para el arsénico y el plomo, que permiten contrastar la hipótesis nula (H_0) de que el coeficiente de regresión tiene un valor de cero en la población; éste estadístico se distribuye según el modelo de probabilidad del t Student ($t_{(\alpha/2, N-2)}$) con 46 y 34 grados de libertad para arsénico ($t_{(0,025, 46)}$) y plomo ($t_{(0,025, 34)}$), respectivamente. El estadístico calculado fue mayor que el estadístico tabulado ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$) para el arsénico y el plomo, lo que permite afirmar que los coeficientes de regresión (pendientes), son significativamente distintos de cero y por tanto, la absorbancia está significativamente relacionada con la concentración.

Para confirmar, que sí existe asociación entre las dos variables (absorbancia y concentración) mediante una regresión lineal para arsénico y plomo, se aplicó el ANOVA de un factor, como se muestra en la tabla 49 (ver anexo 5), y de acuerdo con el valor de $F_{\text{calculado}}$ de 27743,465 y 3509,836 ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$) para arsénico y plomo respectivamente, se rechaza la hipótesis nula planteada (H_0 = “No existe relación lineal significativa entre la absorbancia y la concentración”).

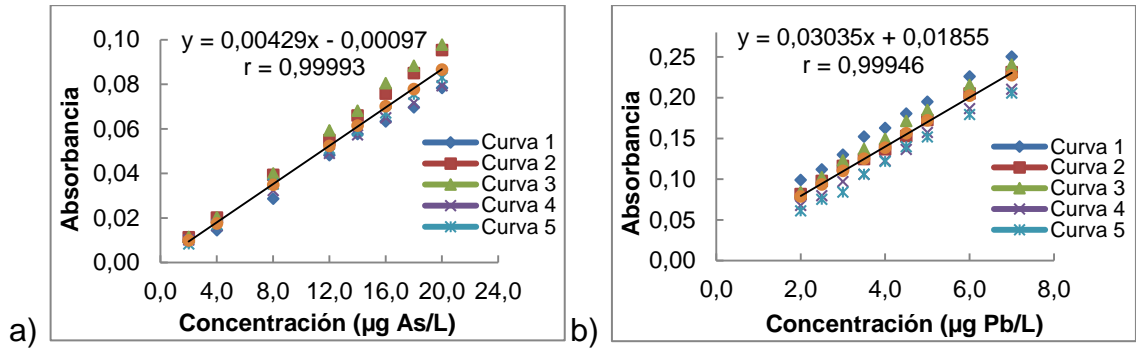
Finalmente, se concluye que sí existe un buen intervalo lineal para el rango de concentraciones de 2,0 hasta 50,0 $\mu\text{g/L}$ para arsénico y de 2,0 hasta 12,0 $\mu\text{g/L}$ para plomo, ya que para ambos metales se obtiene una buena respuesta lineal del equipo en dichos rangos de concentraciones.

5.4.2 Precisión del método de arsénico y plomo

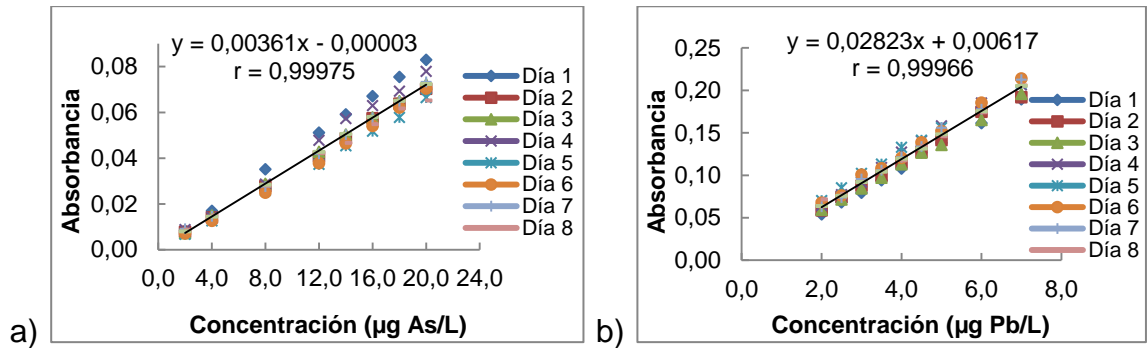
Repetibilidad y Precisión Intermedia

En las gráficas 7 y 8, se representa la concentración (en $\mu\text{g/L}$) de arsénico y plomo frente a la absorbancia, correspondiente a cada uno de los estándares preparados y analizados para la repetibilidad y la precisión intermedia.

Gráfica 7. Curvas de calibración para repetibilidad de: a) arsénico, b) plomo



Gráfica 8. Curvas de calibración para precisión intermedia de: a) arsénico, b) plomo



Se aplicó la prueba de Shapiro-wilk para los niveles de concentración que componen la curva de calibración de 2,0 a 20,0 $\mu\text{g/L}$ para arsénico (ver tablas 50 y 56, anexo 5) y de 2,0 a 7,0 $\mu\text{g/L}$ para plomo (ver tablas 51 y 57, anexo 5), obteniéndose que a un nivel de confianza del 95% los estadísticos $W_{\text{calculados}}$ son menores que el W_{tabulado} (0,986 y 0,999 para todos los niveles de concentración de arsénico y plomo, respectivamente), por tanto, la H_0 se acepta. Los grados de libertad para arsénico fueron 5, debido a que se realizaron seis lecturas de absorbancia para cada estándar y para el plomo fueron 3. Al aplicar la prueba de Levene a la repetibilidad (tablas 50 y 51, anexo 5) y precisión intermedia (tablas 56 y 57, anexo 5) con los grados de libertad (gl_1 y gl_2) mostrados en la tabla 10, se encontró que el estadístico calculado para todos los niveles de concentración tanto de arsénico como de plomo, es menor que el tabulado y por tanto, se acepta la hipótesis nula (H_0) de igualdad de varianzas.

Tabla 10. Grados de libertad para As y Pb empleados en la prueba de Levene de repetibilidad y precisión intermedia

Elemento	Repetibilidad, (K=5)		Precisión intermedia, (K=8)	
	gl1	gl2	gl1	gl2
As, (N=6)	4	25	7	40
Pb, (N=4)	4	15	7	24

gl1 y gl2 calculado como K-1 y (K*N)-K, respectivamente. N: número de lecturas de la absorbancia. K: número de curvas de calibración.

Lo cual nos permite concluir que las absorbancias de As y Pb de cada uno de los niveles de concentración de las cinco curvas de calibración de repetibilidad y ocho de precisión intermedia, provienen de la misma población normal y se puede emplear la media de cada una de ellas (tabla 11 y 12) como el valor representativo; estos valores son aceptables en precisión, con coeficientes de variación en los rangos de 2,44 a 5,05% para As, 2,64 a 4,45% para Pb en la repetibilidad (tabla 11) y de 3,87 a 5,00% para As, 2,41 a 4,70% para Pb en la precisión intermedia (tabla 12).

Tabla 11. Absorbancia media, intervalo de confianza y coeficiente de variación de la curva de calibración para la repetibilidad de As y Pb

Elemento	Estándar ($\mu\text{g/L}$)	Estadístico	
		$\bar{A} \pm \text{IC}$	CV (%)
Arsénico	2,0	0,0099 \pm 0,0002	5,05
	4,0	0,0175 \pm 0,0002	4,57
	8,0	0,0349 \pm 0,0005	4,30
	12,0	0,0523 \pm 0,0004	2,68
	14,0	0,0615 \pm 0,0005	2,44
	16,0	0,0702 \pm 0,0007	3,13
	18,0	0,0778 \pm 0,0008	3,21
	20,0	0,0866 \pm 0,0009	3,23
Plomo	2,0	0,0789 \pm 0,0012	3,93
	2,5	0,0936 \pm 0,0015	4,06
	3,0	0,1102 \pm 0,0019	4,45
	3,5	0,1253 \pm 0,0016	3,35
	4,0	0,1389 \pm 0,0016	2,95
	4,5	0,1564 \pm 0,0023	3,84
	5,0	0,1724 \pm 0,0022	3,31
	6,0	0,2027 \pm 0,0023	2,96
7,0	0,2277 \pm 0,0023	2,64	

Tabla 12. Absorbancia media, intervalo de confianza y coeficiente de variación de la curva de calibración para la precisión intermedia de As y Pb

Elemento	Estándar (µg/L)	Estadístico	
		$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
Arsénico	2,0	0,0080 ± 0,0001	5,00
	4,0	0,0144 ± 0,0002	4,86
	8,0	0,0284 ± 0,0003	4,22
	12,0	0,0428 ± 0,0005	4,91
	14,0	0,0506 ± 0,0006	4,74
	16,0	0,0580 ± 0,0006	4,14
	18,0	0,0650 ± 0,0006	4,00
	20,0	0,0724 ± 0,0007	3,87
Plomo	2,0	0,0638 ± 0,0009	4,70
	2,5	0,0758 ± 0,0008	3,43
	3,0	0,0920 ± 0,0011	4,13
	3,5	0,1043 ± 0,0010	3,26
	4,0	0,1196 ± 0,0012	3,34
	4,5	0,1339 ± 0,0010	2,61
	5,0	0,1481 ± 0,0013	3,04
	6,0	0,1756 ± 0,0013	2,51
	7,0	0,2033 ± 0,0015	2,41

Así, los dos métodos para determinar arsénico y plomo, presentan dispersión de los datos con una variación menor al 5,05% en todos los estándares de concentración, por lo que se puede concluir que hay repetibilidad y precisión intermedia, y por tanto, confiabilidad en los métodos para su implementación.

Gracias a la parametricidad existente entre cada nivel de concentración de arsénico y plomo, se obtuvo una curva de calibración promedio para la repetibilidad (de cinco curvas calibración) y precisión intermedia (de ocho curvas calibración) de cada uno de los elementos analizados, por lo que fue necesario comprobar la respuesta lineal del equipo respecto a estas curvas de calibración; para ello, se realizó el siguiente tratamiento estadístico por SPSS:

Los *coeficientes de correlación de pearson* (r) en la repetibilidad (de 0,99993 para arsénico y de 0,99946 para plomo) (ver tabla 52, anexo 5) y en la precisión intermedia (de 0,99975 para arsénico y 0,99966 para plomo) (ver tabla 58, anexo 5), indican que existe una correlación positiva entre la absorbancia del arsénico o del plomo con respecto a la concentración de cada uno de ellos, con un buen ajuste del modelo, como lo indican los valores del coeficiente de determinación (R^2) muy cercanos a 1 tanto en la reptibilidad (de 0,99986 para As y 0,99892 para Pb) (tabla 53, anexo 5) como en la precisión intermedia (de 0,99986 para As y 0,99892 para Pb) (tabla 59, anexo 5), lo que significa que el 99,9% de la variabilidad de la absorbancia está dada por la concentración de arsénico y plomo; además, con el análisis de regresión para el modelo $y = \beta_0 + \beta_1x$ (tablas 54 y 60, anexo 5), se confirmó que este grado de relación es significativamente lineal, debido a que los estadísticos calculados son mayores que los estadísticos tabulados, lo que permite afirmar que las pendientes, son significativamente distintas de cero y por tanto, la absorbancia As y Pb están significativamente relacionadas con sus concentraciones.

Para confirmar si existe asociación entre las dos variables (absorbancia y concentración) mediante la regresión lineal de arsénico y plomo, se aplicó el ANOVA de un factor (ver tablas 55 y 61, anexo 5), y de acuerdo con los valores de $F_{\text{calculado}}$ para As y Pb ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$), se rechaza la hipótesis nula planteada ($H_0 =$ “No existe relación lineal significativa entre la absorbancia y la concentración”), por tanto, se concluye que las ecuaciones de las rectas de calibración de la repetibilidad (7 para arsénico y 8 para plomo) y de la precisión intermedia (9 para arsénico y 10 para plomo), si representan una adecuada respuesta lineal para la precisión de cada uno de los métodos.

$$y_{As} = 0,00429(\pm 0,00002)x - 0,00097(\pm 0,00026) \quad (7)$$

$$y_{Pb} = 0,03035(\pm 0,00036)x + 0,01855(\pm 0,00160) \quad (8)$$

$$y_{As} = 0,00361(\pm 0,00002)x - 0,00003(\pm 0,00029) \quad (9)$$

$$y_{Pb} = 0,02823(\pm 0,00019)x + 0,00617(\pm 0,00083) \quad (10)$$

5.4.3 Sensibilidad para arsénico y plomo

Este parámetro, se midió teniendo en cuenta la capacidad de discriminar las pequeñas diferencias de concentración de arsénico y plomo, relacionándolas directamente con la pendiente de la curva de calibrado de cada uno de estos metales (gráficas 7 y 8). En la tabla 13, se relacionan los valores de las pendientes obtenidas en las determinaciones de repetibilidad y precisión intermedia (ítem 5.4.2), con el fin de comparar cuál de ellas presenta mejor sensibilidad analítica para el análisis de arsénico y plomo.

Tabla 13. Pendiente de la repetibilidad y precisión intermedia de arsénico y plomo para la Sensibilidad analítica

Elemento	Pendiente Repetibilidad $\pm s$	Pendiente Precisión Intermedia $\pm s$
As	0,00429 \pm 0,00002	0,00361 \pm 0,00002
Pb	0,03035 \pm 0,00036	0,02823 \pm 0,00083

Como se observa, hay una mayor respuesta para los cambios de concentración de arsénico y plomo en la repetibilidad, lo que significa que la sensibilidad del método para arsénico es de 0,00429 y para el plomo es de 0,03035.

5.4.4 Límite de detección y de cuantificación

En la tabla 14 se muestran las ecuaciones de las tres rectas de calibración preparadas para la determinación del límite de detección y de cuantificación de As y Pb. Al aplicar la prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) para todos los niveles de concentración entre las tres curvas tanto de arsénico como de plomo, como se muestra en la tabla 62 (anexo 5), el $F_{\text{calculado}}$ fue menor que el tabulado (4,900 para As y 5,700 para Pb) al 95% de confianza, lo que permitió aceptar la hipótesis nula y por tanto, se pueden emplear las tres curvas de calibración ya que no hay diferencias significativas entre sus niveles de concentración.

Tabla 14. Ecuaciones de las curvas de calibración para el LD y LC de Arsénico y Plomo, pendiente, intercepto y sus medias con las respectivas desviaciones estándar

Curva	Ecuaciones de las curvas de calibración	m	b	\bar{m} (s)	\bar{b} (s)	
As	1	$y = 0,0040x - 0,0023$	0,0040	-0,0023	0,0041 (0,0002)	-0,0018 (0,0008)
	2	$y = 0,0041x - 0,0023$	0,0041	-0,0023		
	3	$y = 0,0043x - 0,0009$	0,0043	-0,0009		
Pb	1	$y = 0,0275x + 0,0004$	0,0275	0,0004	0,0272 (0,0009)	0,0045 (0,0050)
	2	$y = 0,0276x + 0,0030$	0,0279	0,0030		
	3	$y = 0,0262x + 0,0101$	0,0262	0,0101		

El LD y LC se calculó como se indicó para el Arsénico en las ecuaciones 11 y 12.

$$X_{LD} = \frac{3,36 * 0,0008}{0,0041} = 0,656 \mu g/L \quad (11)$$

$$X_{LC} = \frac{10,08 * 0,0008}{0,0041} = 1,967 \mu g/L \quad (12)$$

En la tabla 15 se muestran los valores (en $\mu g/L$) de la cantidad de arsénico y plomo presente, que se deriva de la menor señal analítica que puede detectarse con certeza razonable (límite de detección) y la que puede ser medida con precisión y exactitud (límite de cuantificación).

Tabla 15. Límite de detección y de cuantificación de Arsénico y Plomo

Elemento	Límite de Detección ($\mu g/L$)	Límite de Cuantificación ($\mu g/L$)
As	0,656	1,967
Pb	0,618	1,853

5.4.5 Exactitud del método de arsénico y plomo

En la exactitud del método, se tiene en cuenta el proceso de digestión, la preparación de la muestra y el análisis por absorción atómica. Para ello, se obtuvieron los porcentajes de recuperación del arsénico y plomo para las muestras de termoformado y película flexible, los cuales se muestran en las tablas 16, 17 y 18, con sus correspondientes desviaciones estándar y coeficientes de variación.

Tabla 16. Porcentaje de recuperación de arsénico en la muestra de termoformado CM 4575-7

Alícuota de As (μL)	Alícuota adicionada a 20 mL de ácido ($\mu g/L$)	CM 4574 - 7 + Alícuota en 20 mL de ácido ($\mu g/L$)	Recuperación (%)	Media Recuperación (%) \pm IC	CV (%)
80	2,285	3,878	95,98	100,77 \pm 1,97	4,77
	2,285	4,267	105,60		
	2,635	4,422	100,73		
160	3,723	5,471	99,87	96,67 \pm 1,80	4,55
	3,839	5,510	98,49		
	3,917	5,199	91,66		
240	6,636	8,229	98,06	97,17 \pm 0,37	0,94
	6,831	8,346	97,20		
	6,714	8,152	96,25		
PROMEDIO				98,20 \pm 1,57	

Tabla 17. Porcentaje de recuperación de plomo en el termoformado MPER 183

Alícuota de Pb (μL)	Alícuota adicionada a 20 mL de ácido ($\mu\text{g/L}$)	MPER 183 + Alícuota en 20 mL de ácido ($\mu\text{g/L}$)	Recuperación (%)	Media Recuperación (%) \pm IC	CV (%)
50	2,453	4,199	94,54	94,79 \pm 0,13	0,26
	2,535	4,290	94,82		
	2,560	4,323	95,03		
60	2,675	4,455	95,50	96,01 \pm 0,83	1,67
	2,766	4,504	94,72		
	2,684	4,570	97,80		
70	3,301	5,138	97,12	98,52 \pm 0,66	1,29
	3,203	5,171	99,61		
	3,236	5,163	98,82		
PROMEDIO				96,44 \pm 1,01	

Tabla 18. Porcentaje de recuperación de plomo en la película flexible CM 7138-7 nativa.

Alícuota de Pb (μL)	Alícuota adicionada a 20 mL de ácido ($\mu\text{g/L}$)	CM 7138-7 nativa + Alícuota en 20 mL de ácido ($\mu\text{g/L}$)	Recuperación (%)	Media Recuperación (%) \pm IC	CV (%)
50	2,585	4,125	102,22	102,75 \pm 0,32	0,60
	2,601	4,191	103,43		
	2,610	4,166	102,61		
60	2,939	4,586	104,48	106,50 \pm 1,29	2,34
	2,708	4,545	109,28		
	2,684	4,372	105,75		
70	3,285	4,916	103,80	106,23 \pm 1,19	2,16
	3,203	4,957	106,53		
	3,063	4,891	108,37		
PROMEDIO				105,16 \pm 1,30	

Para comparar la proximidad que hay entre el 100% y las medias de los porcentajes de recuperación obtenidos para el arsénico (98,20 \pm 1,57) (tabla 16) y plomo (96,44 \pm 1,01) (tabla 17) en el termoformado y el plomo (105,16 \pm 1,30) en la película flexible (tabla 18), se aplicó la prueba *t para una muestra (t Student)* (tablas 63, 64 y 65, anexo 5) usando una $|t_{\text{tabulada}}|$ ($t_{(0,05, 8)} = 1,860$) para 8 grados de libertad (9 porcentajes de recuperación obtenidos) y planteando como la hipótesis nula: “Las medias son significativamente diferentes del 100%”.

La $|t_{\text{calculada}}|$ para el As en el termoformado ($t_{(\alpha, n-1)} = 1,411$) (tabla 63, anexo 5) fue menor que la $|t_{\text{tabulada}}|$, por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula, considerando que estadísticamente no hay diferencias significativas entre el porcentaje de recuperación de arsénico en la muestra de termoformado y el 100%. En el caso del porcentaje de recuperación de plomo en el termoformado y en la película flexible, se obtuvo las $|t_{\text{calculada}}|$ (5,507 en el termoformado y 6,199 en la película flexible) (ver tablas 64 y 65, anexo 5), las cuales son mayores que la $|t_{\text{tabulada}}|$, lo que permite considerar que estadísticamente si hay diferencia significativa entre el 100% y la media del porcentaje de recuperación de plomo en las muestras, lo cual se puede atribuir a errores aleatorios (preparación de soluciones y pérdida del analito durante la digestión), sin embargo, en el

caso del porcentaje de recuperación de plomo en la muestra de película flexible, esta diferencia se atribuye principalmente a que la cantidad de plomo presente en dicha muestra, es detectable, mas no cuantificable, lo que hace que la concentración detectada por el equipo en la muestra tenga siempre pequeñas variaciones y por tanto, hay una incidencia en el momento de hacer el porcentaje de recuperación; sin embargo, estos porcentajes de recuperación de plomo son aceptables ya que están dentro del rango (90 y el 110%) de los porcentajes de recuperación aceptados como buenos.

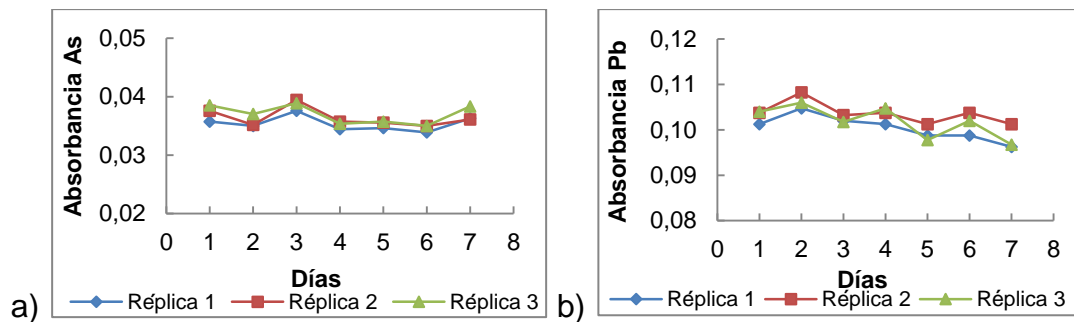
Lo anterior nos lleva a concluir que existe una buena exactitud de los métodos para la determinación de arsénico y plomo en este tipo de muestras biodegradables.

5.5 ESTABILIDAD DE LOS METALES

5.5.1 Estándares de arsénico y plomo

Se evaluó la estabilidad del arsénico con un estándar de 8,0 µg As/L y de plomo con un estándar de 3,0 µg Pb/L, como se muestra en las gráficas 9.a y 9.b, respectivamente.

Gráfica 9. Estabilidad del estándar de: a) As de 8,0 µg/L, b) Pb de 3,0 µg/L durante 7 días



Las absorbancias de cada una de las réplicas del estándar de arsénico y plomo, tuvieron una tendencia paramétrica durante los 7 días de análisis, lo que indica que las medias mostradas en la tabla 19, con coeficientes de variación menores al 4,84% para arsénico y de 4,27% para plomo, sí son valores representativos de cada una de las réplicas, ya que se cumplió (ver tabla 66 y 67, anexo 6) con la H_0 de Shapiro Wilk (con W calculados menores al W tabulado de 0,986 para As y 0,999 para Pb) y con la homogeneidad de varianzas al ser el F calculado $<$ F tabulado ($F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = 5,900$ para As y 5,100 para Pb, donde $K= 7$ número de días, $N=$ número de lecturas de la absorbancia, 6 para As y 4 para Pb).

Tabla 19. Absorbancia, intervalo de confianza y coeficiente de variación de la estabilidad del estándar de As y Pb

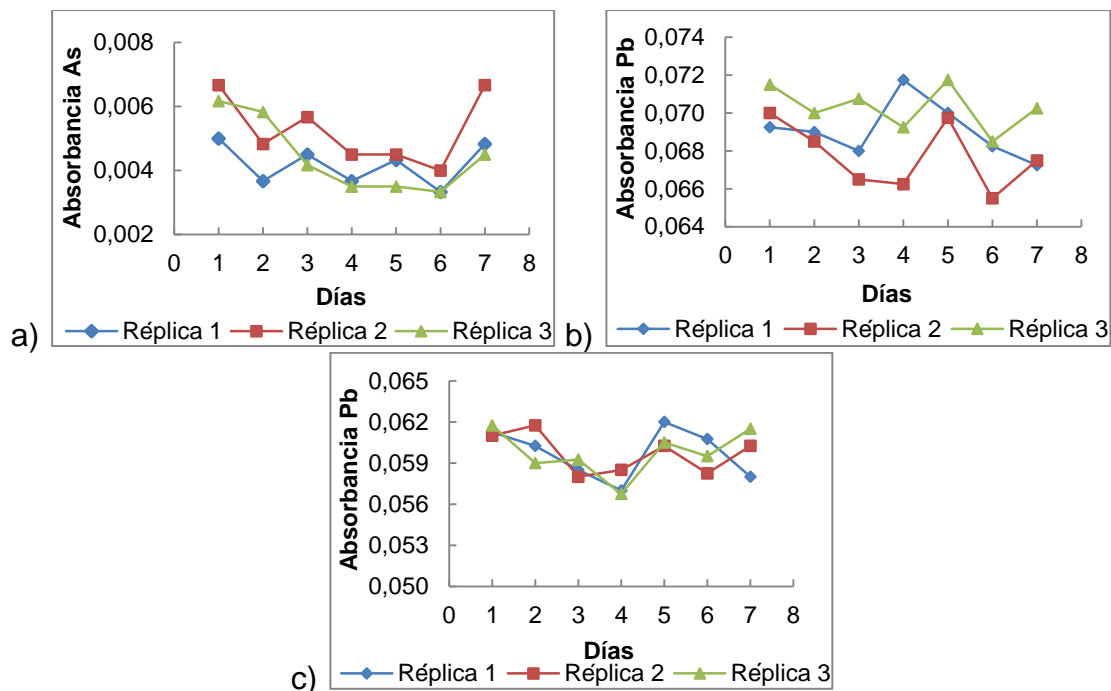
Réplica	Estándar	$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
1	8,0 µg As/L	0,0336 ± 0,0012	4,17
2		0,0343 ± 0,0012	4,08
3		0,0351 ± 0,0014	4,84
1	3,0 µg Pb/L	0,1006 ± 0,0051	4,27
2		0,1038 ± 0,0041	3,37
3		0,1025 ± 0,0046	3,81

Los buenos coeficientes de variación obtenidos para los estándares (tabla 19), indican que existe una buena estabilidad de los mismos durante los 7 días de análisis, ya que mantienen una concentración promedio de $8,229 \pm 0,168 \mu\text{g/L}$ para As y de $2,759 \pm 0,062 \mu\text{g/L}$ para Pb; sin embargo, es necesario corroborarlo con la prueba t para una muestra (tabla 68, anexo 6), donde los valores de las $|t_{calculadas}|$ ($t_{(\alpha, n-1)} = 0,037$ para As y $0,059$ para Pb) fueron menores que la $|t_{tabulada}|$ lo que permitió rechazar la hipótesis nula ($H_0 =$ "Hay diferencia entre el promedio de las absorbancias en los diferentes días de las réplicas del estándar") y por tanto, se concluye que no hay diferencias significativas en la concentración durante los 7 días en que se realizó cada una de las mediciones de los estándares de arsénico y plomo. De esta forma, se pueden almacenar de manera adecuada (a 4°C) los estándares durante 7 días, sin que estos presenten variaciones significativas en la concentración.

5.5.2 Estabilidad en muestras

Se evaluó la estabilidad del arsénico en la muestra de termoformado CM 4574-7, de plomo en el termoformado CM 4574-7 y en la película flexible CM 7138 - 7 Nativo, como se muestra en la gráfica 10.a, b y c.

Gráfica 10. Estabilidad de: a) As en la muestra de termoformado CM 4574-7, b) Pb en el termoformado CM 4574-7, c) Pb en la película flexible CM 7138 - 7 Nativo



Con los resultados de las pruebas estadísticas (tabla 69, 70 y 71, anexo 6) de Shapiro Wilk (con $W_{calculado}$ menores al $W_{tabulado}$ de 0,986 para As y 0,999 para Pb) y de Levene (con $F_{calculado} < F_{tabulado}$, $F_{(\alpha, k-1, (K \cdot N) - K)} = 5,900$ para As y 5,100 para Pb, donde $K = 7$ número de días, $N =$ número de lecturas de las absorbancia, 6 para As y 4 para Pb), se aceptaron sus respectivas H_0 , lo que confirmó que las absorbancias de cada una de las réplicas de las muestras de termoformado y película flexible con respecto a los días,

tuvieron un comportamiento paramétrico durante los 7 días de análisis, lo que indica que las medias mostradas en la tabla 20, con coeficientes de variación menores al 27,27% para Arsénico en el termoformado CM 4574-7 y menores al 4,97% y al 4,85% para el plomo en el termoformado CM 4574-7 y la película flexible CM 7138-7 Nativo respectivamente, sí son valores representativos de cada una de las réplicas. No se realizó la estabilidad del arsénico en las muestras de película flexible, ya que este metal no fue detectable en dichas muestras.

Tabla 20. Absorbancia, intervalo de confianza y coeficiente de variación de la estabilidad de As y Pb en muestras de termoformados y película flexible

Elemento	Réplica	Muestra	$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
Arsénico	1	CM 4574-7	0,0042 ± 0,0008	23,81
	2		0,0053 ± 0,0011	24,53
	3		0,0044 ± 0,0010	27,27
Plomo	1	CM 4574-7	0,0692 ± 0,0038	4,62
	2		0,0678 ± 0,0037	4,57
	3		0,0704 ± 0,0041	4,97
	1	CM 7138 - 7 Nativo	0,0598 ± 0,0034	4,85
	2		0,0596 ± 0,0022	3,19
	3		0,0594 ± 0,0026	3,70

Debido a la considerable dispersión de los valores (> al 5%) en el arsénico presente en el termoformado CM 4574-7, se aplicó la t para una muestra (tabla 72, anexo 6); se obtuvo que la $|t_{calculada}|$ ($t_{(\alpha, n-1)} = 0,241$) es menor a la $|t_{tabulada}|$ ($t_{(0,05, 125)} = 1,645$), lo que indicó que para ésta muestra no hay diferencia significativa en la absorbancia de As durante los siete días de análisis. Aunque la muestra es estable por 7 días, los altos coeficientes de variación de la absorbancia indican que se presentaron errores sistemáticos y aleatorios atribuidos principalmente a la presencia aún de óxidos de nitrógeno, y en una menor medida a la homogenización de la muestra, estabilidad de la temperatura de las muestras antes de realizar el análisis, y conservación de la temperatura de almacenamiento (4°C), por lo que se recomienda tener un mayor cuidado en el tratamiento de la muestra digestada para la disminución de los óxidos de nitrógeno.

En el caso de la estabilidad del plomo en la muestra de termoformado y de película flexible (tabla 20), se obtuvieron buenos coeficientes de variación (< al 4,97%), indicando que existe una buena estabilidad de las muestras durante los 7 días de análisis; para corroborar dicha estabilidad, se aplicó la t para una muestra (ver tabla 72, anexo 6), donde los valores de $|t_{calculada}|$ fueron menores que la $|t_{tabulada}|$ ($t_{(0,05, 83)} = 1,658$), lo que permitió rechazar la hipótesis nula ($H_0 =$ "Hay diferencias entre el promedio de las absorbancias durante los 7 días que se analizaron las tres réplicas de cada una de las muestras") y por tanto, se concluye que no hay diferencias significativas entre los 7 días en que se realizaron cada una de las mediciones de la concentración de plomo en las muestras de termoformados y películas flexibles.

En conclusión, las muestras digestadas de termoformados y películas flexibles biodegradables son estables hasta con 7 días de almacenamiento (a 4°C) hasta su análisis de As y Pb por EAA; además, para la estabilidad del As en el termoformado los

errores sistemáticos y aleatorios se deben minimizar para evitar la pérdida de estabilidad de dichas muestras.

5.6 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO Y PLOMO POR ABSORCIÓN ATÓMICA

Para la determinación de As y Pb en las muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables, el EAA-HG y el EAA-GH se programó teniendo en cuenta las condiciones mostradas en las tablas 21 y 22.

Tabla 21. Condiciones instrumentales en el EAA - Generador de Hidruros para determinación de Arsénico

Método	EAA - Generador de Hidruros
Atomización	Llama
Elemento	As
Lámpara	Cátodo Hueco As
Corrección de Fondo	Deuterio
Longitud de onda (nm)	193,7
Flujo de Gas N ₂ (mL/min)	200
Altura Mechero (mm)	15,0
Slit (nm)	0,5
Matriz ácida	HCl (10%)
Reducción	NaBH ₄ (0,5%) en NaOH (0,5%)

Tabla 22. Condiciones instrumentales en el EAA - Horno de Grafito para la determinación de Plomo

Método	EAA - Horno de Grafito
Atomización	Electrotérmica
Elemento	Pb
Lámpara	Cátodo Hueco Pb
Corrección de Fondo	D ₂ Quadline
Longitud de onda (nm)	216,9
Volumen Inyección (µL)	20
Slit (nm)	0,5

En cuanto a las condiciones de temperatura del EAA-HG para la determinación de Pb (ver tabla 23), la programación de las mismas se realizaron después de la optimización del programa, como se muestra a continuación:

La temperatura de secado y de limpieza se programó de acuerdo a los reportes en la literatura [66, 67, 68, 69].

Tabla 23. Condiciones de temperatura óptimas del Horno de Grafito para la determinación de Plomo

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de Gas Argón (L/min)
Secado	100	30	0,2
Calcinación	700	20	0,2
Atomización	1500	3	Apagado
Limpieza	2500	3	0,2

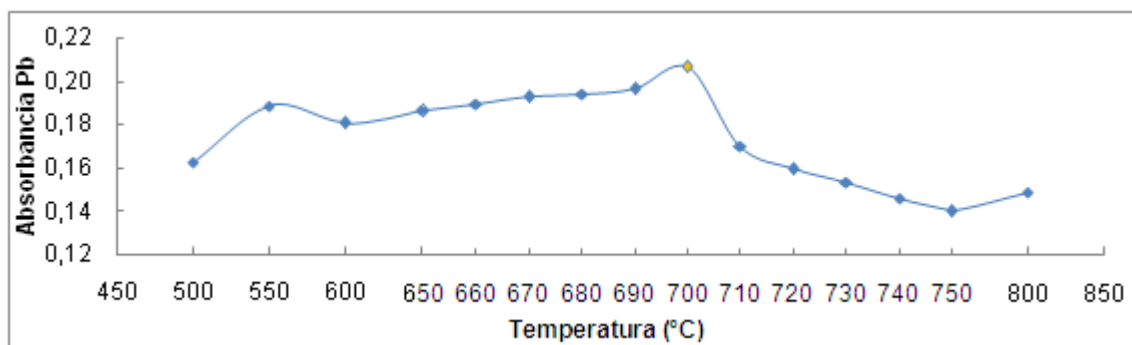
✓ **Calcinación**

Esta etapa térmica permite volatilizar a los componentes orgánicos de la matriz de la muestra para removerlos, y obtener así una forma menos compleja del analito; por tanto, hace que se disminuya la posibilidad de encontrar interferencias químicas y reducir la magnitud de la señal de fondo.

Se graficó (gráfica11) la temperatura a la cual se ha realizado la calcinación frente a la media de la absorbancia, obteniéndose coeficientes de variación entre 1,16 y 6,80% (tabla 73, anexo 7). Cuando la temperatura de pirólisis, como se muestra en la gráfica 10, es superior a 700°C, hay una disminución considerable de la absorbancia, lo cual se puede atribuir a la volatilización del analito; las temperaturas menores a 700°C, no son suficientes para eliminar por completo los componentes indeseables, los cuales dificultan las etapas posteriores y por tanto, la detección del analito.

La máxima absorbancia del Pb se obtiene cuando la temperatura de calcinación es de 700°C, con un coeficiente de variación aceptable de 1,16%, que es la temperatura óptima de calcinación en el programa del EAA-HG.

Gráfica 11. Optimización de la temperatura de calcinación del horno de grafito para la determinación de Pb



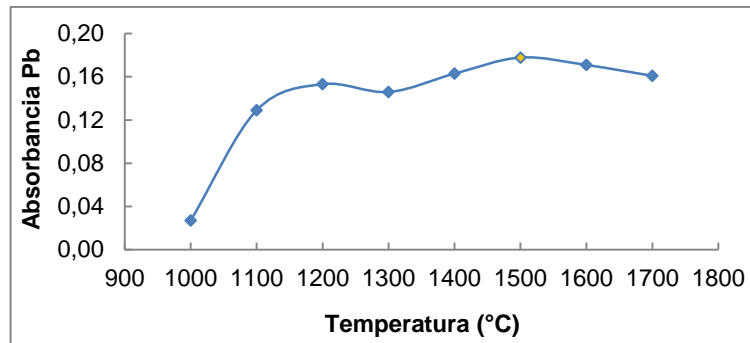
✓ **Atomización**

La temperatura de atomización se debe incrementar hasta lograr la disociación completa de los enlaces de la especie volatilizada.

En la gráfica 12, se observa el rango de temperaturas a las cuales se ha realizado la atomización frente a la absorbancia obtenida; los coeficientes de variación estuvieron comprendidos entre 4,44 y 22,95% (ver tabla 73, anexo 7). A temperaturas superiores a 1500°C, disminuye el tiempo de residencia del analito en el atomizador, lo cual conduce a la pérdida de sensibilidad; a temperaturas inferiores a 1500°C, pudo ocurrir que una parte del analito no se atomizó, y por tanto, se obtienen resultados erróneos, reflejados en los altos coeficientes de variación.

La máxima absorbancia de Pb, se obtiene cuando la temperatura de atomización es de 1500°C, con un coeficiente de variación aceptable de 3,88%.

Gráfica 12. Optimización de la temperatura de atomización del horno de grafito para la determinación de Pb



Una vez estandarizadas las técnicas analíticas por absorción atómica para las determinaciones de arsénico y plomo en los biopolímeros, se realizó la implementación de los mismos con el fin de cuantificar arsénico y plomo en muestras reales de termoformados y películas flexibles biodegradables; para ello, se tuvo en cuenta la ecuación de la recta que presentó mayor sensibilidad en cada uno de los métodos, mostradas en las ecuaciones 7 y 8 del apartado 5.4.2 para la repetibilidad de los métodos.

En la tabla 24, se reportan las concentraciones de arsénico (en $\mu\text{g}/\text{kg}$), presentes en las siete muestras de termoformados biodegradables analizados, las cuales son inferiores al límite de cuantificación de arsénico ($1,967 \mu\text{g}/\text{L}$) el cual correspondería a una concentración máxima de $39,192 \mu\text{g}$ de As por kg de muestra, lo que significa que estas concentraciones al nivel de trazas son detectables más no cuantificables; esto mismo ocurre con las trazas de Pb en las muestras NATAIMA 31 y HMC 1, las cuales son menores al LC ($1,853 \mu\text{g}/\text{L}$) que corresponderían a $37,148$ y $37,133 \mu\text{g}$ de Pb por kg de muestra, respectivamente.

En ésta misma tabla, se presentan los μg de plomo por kg de muestra que fueron cuantificados para cinco termoformados (MBRA 383, MPER 183, CM 4574-7, CM 523-7 y CM 7951-5), los cuales son significativamente diferentes entre ellos, ya que al aplicar el ANOVA de un factor como se muestra en la tabla 74 (ver anexo 7), el valor de F calculado fue mayor que el tabulado al 95% de confianza, lo que permitió rechazar la hipótesis nula ($H_0 = \text{“No hay diferencia entre las concentraciones de plomo en las muestras”}$).

Tabla 24. Concentración de As y Pb en $\mu\text{g}/\text{kg}$, intervalo de confianza y coeficiente de variación de siete muestras de termoformados biodegradables

Termoformado	ARSÉNICO		PLOMO	
	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm IC	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm IC	CV (%)
MBRA 383	< 39,173		$52,834 \pm 0,977$	3,57
MPER 183	< 39,176		$39,700 \pm 0,886$	4,30
CM 4574 - 7	< 39,184		$44,247 \pm 0,986$	4,30
CM 523 - 7	< 39,167		$63,995 \pm 1,254$	3,78
CM 7951 - 5	< 39,153		$49,101 \pm 0,996$	3,91
NATAIMA 31	< 39,139		< 37,148	----
HMC 1	< 39,192		< 37,133	----

En la tabla 25, se muestra la concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de plomo en todas las muestras de películas flexibles biodegradables analizados (SM 707-17 Nativo e hidrolizado, CM 7138-7 Nativo e hidrolizado y SM 1498-4 Nativo e hidrolizado), las cuales son inferiores al límite de cuantificación ($1,853 \mu\text{g Pb/L}$), el cual correspondería a concentración de Pb entre $37,139$ y $37,177 \mu\text{g}$ por kg de muestra; mientras que en las mismas seis muestras de termoformados el arsénico no fue detectable.

Tabla 25. Concentración de As y Pb en $\mu\text{g}/\text{kg}$, intervalo de confianza y coeficiente de variación de seis muestras de películas flexibles biodegradables.

Película flexible	ARSÉNICO	PLOMO
	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
SM 707 - 17 Nativo	< LD	< 37,170
SM 707 - 17 Hidrolizado	< LD	< 37,176
CM 7138 - 7 Hidrolizado	< LD	< 37,139
CM 7138 - 7 Nativo	< LD	< 37,152
SM 1498 - 4 Hidrolizado	< LD	< 37,163
SM 1498 - 4 Nativo	< LD	< 37,177

Aunque no hay una norma vigente que reglamente los niveles permitidos de arsénico para este tipo de biopolímeros, las cantidades de As presentes en las muestras son consideradas como bajas, ya que son menores al LC en los termoformados y no fueron detectadas en las películas flexibles; en el caso del plomo, la NTC-4096 [70] es la norma que reglamenta a $1,0 \text{ mg}/\text{kg}$ como el nivel máximo permitido de Pb en este tipo de biopolímeros, lo que indica que las concentraciones de plomo en el rango de $39,700$ a $63,995 \mu\text{g Pb}/\text{kg}$ encontradas en los termoformados (tabla 24) y las concentraciones de plomo menores al LC en las películas flexibles (tabla 25), son menores al límite permitido por la norma, por tanto, se espera que no haya incidencia de estos metales en el producto final.

Aunque los termoformados y películas flexibles biodegradables analizados en este trabajo cumplen con los requisitos de calidad (nivel máximo permitido de metales pesados) para productos que estarán en contacto con alimentos [70], es necesario, para garantizar dicha calidad, conocer la procedencia tanto del Plomo en los termoformados y en las películas flexibles, como del arsénico detectado (< LC) en los termoformados. Para ello se realizó la determinación de estos elementos en las materias primas (harinas y almidón de yuca, fibra de fique) de cada uno de los termoformados y películas flexibles.

Como se muestra en la tabla 26, para las harinas de yuca MBRA 383, CM 7951-5, NATAIMA 31 y HMC 1 se reporta una concentración de arsénico menor a su LC (correspondiente a trazas menores de $39,163 \mu\text{g}/\text{kg}$), siendo que para las demás muestras empleadas como materia prima para la elaboración de los termoformados, el arsénico no fue detectable.

El plomo en la mayoría de las harinas de yuca empleadas en la elaboración de los termoformados (tabla 26), fue menor al límite de cuantificación, el cual correspondería a concentraciones no mayores de $37,174 \mu\text{g}$ de Pb por kg de muestra, mientras que en las harinas MBRA 383, CM 523 - 7 y la fibra de fique, se reportaron concentración desde $39,548$ hasta $46,206 \mu\text{g}/\text{kg}$. Al aplicar el ANOVA de un factor (ver tabla 75, anexo 7) entre

las muestras MBRA 383, CM 523-7 y la fibra de fique, se encontró que el valor del F calculado (13,533) fue mayor al F tabulado con un 95% de confianza, por lo que se rechazar la hipótesis nula planteada ($H_0 =$ “No hay diferencia entre las concentraciones de plomo en las muestras”), esto indica que sí hay diferencia significativa entre las concentraciones de dichas muestras y por tanto, la fibra de fique es la materia prima que más aporta plomo a los termoformados.

Tabla 26. Concentración de As y Pb en $\mu\text{g}/\text{kg}$, intervalo de confianza y coeficiente de variación en las muestras de materia prima de los termoformados.

Harina	ARSÉNICO	PLOMO	
	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm IC	CV (%)
MBRA 383	< 39,079	39,548 \pm 0,691	3,37
MPER 183	< LD	< 37,147	----
CM 4574 - 7	< LD	< 37,174	----
CM 523 - 7	< LD	46,140 \pm 1,060	4,43
CM 7951 - 5	< 39,163	< 37,165	----
NATAIMA 31	< 39,136	< 37,139	----
HMC 1	< 39,137	< 37,141	----
FIBRA DE FIQUE	< LD	46,206 \pm 1,006	4,20

El As tanto en las películas flexibles como en todos los almidones empleados para la elaboración de dichas películas flexibles (tablas 25 y 27), no fue detectable, lo que significa que la posible presencia de As en estos biopolímeros, siguiendo el mismo proceso de fabricación, se atribuiría principalmente a la contaminación en las materias primas y no a causas externas.

Tabla 27. Concentración de As y Pb en $\mu\text{g}/\text{kg}$, intervalo de confianza y coeficiente de variación, en las muestras de materia prima de las películas flexibles.

Almidón	ARSÉNICO	PLOMO
	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
SM 707 - 17 Nativo	< LD	< LD
SM 707 - 17 Hidrolizado	< LD	< LD
CM 7138 - 7 Hidrolizado	< LD	< 37,118
CM 7138 - 7 Nativo	< LD	< 37,172
SM 1498 - 4 Hidrolizado	< LD	< 37,148
SM 1498 - 4 Nativo	< LD	< 37,139

Con las concentraciones de Pb en la materia prima de las películas flexibles, mostradas en la tabla 27, se podría inferir que el plomo encontrado en las películas flexibles (ver tabla 25) proviene del almidón de yuca empleado para su fabricación, de la misma manera que las harinas de yuca, principalmente la fibra de fique, aportan arsénico y plomo a los termoformados. Sin embargo, no se puede hacer una relación entre las cantidades de As y Pb encontradas en las materias primas de los termoformados ni de las películas flexibles, ya que en algunos casos, éstas cantidades no son cuantificables; además, no se conoce con certeza las proporciones utilizadas de cada una de las materias primas empleadas para la elaboración de los termoformados y películas flexibles analizados.

Las cantidades de arsénico y plomo encontradas en los biopolímeros analizados, se pueden considerar como bajos, lo que indica que estos materiales no serán tóxicos y podrán ser empleados como envoltentes y contenedores de alimentos sin riesgos para el consumidor. Sin embargo, sí es muy importante tener cuidado en la obtención y manipulación de las materias primas, ya que se cree que el plomo puede llegar a la harina, al almidón de yuca y a la fibra de fique (polvillo que se obtuvo de los residuos agroindustriales suministrados por la empresa Empaques del Cauca de la ciudad de Popayán, Cauca, Colombia) por la exposición al humo de los carros, a las emisiones de diferentes procesos industriales, al presente en el suelo y al contacto de la planta con aguas contaminadas [45, 71, 72], y el arsénico, por las formulaciones de plaguicidas, la contaminación por fertilizantes químicos, el riego con agua de mala calidad, del presente en el suelo y por la contaminación cruzada del aire [49, 50, 71, 72].

6. CONCLUSIONES

- ❖ Se establecieron los parámetros de calidad estadística para la estandarización del método analítico para la determinación de arsénico y de plomo (buen intervalo de linealidad que permitió establecer que entre 2,0 a 20,0 $\mu\text{g/L}$ y entre 2,0 a 7,0 $\mu\text{g/L}$ son los rangos de trabajo óptimos para estos elementos, muy buena precisión evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia, ya que se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 5,05% para As y al 4,45% para plomo, buena sensibilidad analítica, bajos límites de detección (0,656 $\mu\text{g/L}$ y 0,618 $\mu\text{g/L}$ para el arsénico y plomo, respectivamente) y de cuantificación (1,967 $\mu\text{g/L}$ y 1,853 $\mu\text{g/L}$ para el arsénico y plomo, respectivamente) y porcentajes de recuperación que están dentro de los criterios de aceptación, aportando una buena exactitud a los métodos) en polímeros biodegradables, los cuales permitieron obtener un método analítico sensible y preciso, por lo cual puede ser implementado con resultados confiables.
- ❖ Los estándares de calibración de arsénico y plomo, al igual que las muestras digeridas de termoformados y películas flexibles en medio ácido, se pueden almacenar de manera adecuada (4°C) durante 7 días sin presentar variaciones significativas. Sin embargo, se recomienda minimizar los errores sistemáticos y aleatorios, ya que estos pueden afectar la estabilidad de arsénico en las muestras.
- ❖ El procedimiento de digestión ácida por vía húmeda que resultó ser más efectivo para disolver los termoformados y las películas flexibles fue aquel en el cual se empleó 1,0000 g de muestra con una mezcla $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ en relación 3:1 a 70°C durante 180 min para termoformados y 45 min para las películas flexibles.
- ❖ La concentración de arsénico encontrada en los termoformados y en sus materias primas son muy bajas, menores a 39,192 $\mu\text{g/kg}$, mientras que en las películas flexibles, no fue detectable, lo cual indica que no habrá incidencia del metal en el material elaborado; sin embargo, se debe tener un especial cuidado en la obtención y manipulación de la materia prima, ya que las trazas de arsénico en los termoformados se atribuye principalmente a la harina de yuca y la fibra de fique.
- ❖ La concentración de plomo encontrada en el rango de 39,700 a 63,995 $\mu\text{g Pb/kg}$ en cinco muestras de termoformados (MBRA 383, MPER 183, CM 4574-7, CM 523-7 y CM 7951-5) y las trazas detectables pero no cuantificables (menores a 37,177 $\mu\text{g/kg}$) presentes en las películas flexibles, proviene de las materias primas empleadas (harinas y almidones de yuca y la fibra de fique) para la elaboración de dichos biopolímeros, sin embargo, se encuentran por debajo del nivel máximo permitido por la norma NTC-4096, por lo cual se espera que no haya incidencia de este metal en la calidad del producto final.
- ❖ El paquete estadístico SPSS, empleado para aplicar pruebas paramétricas (como Shapiro Wilk, Levene, Pearson, Análisis de Varianza, etc.) a los resultados obtenidos en la estandarización de los métodos analíticos permitió comprobar la confiabilidad y repetibilidad de dichos resultados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ALVARO, T. Morgana, B. Marcia, M. Goreti, R. Welz, B. Determination of cadmium and lead in plastic material from waste electronic equipment using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. En: Microchemical Journal. 2010, vol. 96, p. 102-107.
- [2] SHIMAO, M. Biodegradation of plastics. En: Current Opinion in Biotechnology. 2001, vol. 12, p. 242-247.
- [3] RUIZ, G. Montoya, C. Paniagua, M. Degradabilidad de un polímero de almidón de yuca. En: Revista EIA, Medellín, 2009, no. 12, ISSN 1794-1237, p. 67-78.
- [4] GRAEME, K. Pollack, C. Heavy metal toxicity, part II: lead and metal fume fever. En: The Journal of Emergency Medicine. 1998, vol.16, no. 2, p. 171-177.
- [5] OBANIJESU, E. Olajide, J. Trace Metal Pollution Study on Cassava Flour's Roadside Drying Technique in Nigeria. En: Appropriate Technologies for Environmental Protection in the Developing World. 2009, vol. 1, p. 333-339.
- [6] IDODO-UMEH, G. Ogbeibu, A. Bioaccumulation of the Heavy Metals in Cassava Tubers and Plantain Fruits Grown in Soils Impacted with Petroleum and Non-Petroleum Activities. En: Research Journal of Environmental Sciences. 2010, vol. 4, p. 33-41.
- [7] SATYANARAYANA, K. Arizaga, G. Wypych, F. Biodegradable composites based on lignocellulosic fibers—An overview. En: Progress in Polymer Science. 2009, vol. 34, p. 982-1021.
- [8] BAKKALI, K. Ramos, N. Souhail, B. Ballesteros, E. Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion. En: Food Chemistry. 2009, vol. 116, p. 590-594.
- [9] ULUOZLU, O. Tuzen, M. Mendil, D. Soylak, M. Determination of As(III) and As(V) species in some natural water and food samples by solid-phase extraction on Streptococcus pyogenes immobilized on Sepabeads SP 70 and hydride generation atomic absorption spectrometry. En: Food and Chemical Toxicology. 2010, vol. 48, p. 1393-1398.
- [10] MONTOYA, C. Fabricación y determinación de las propiedades físicas y químicas de las mezclas de termoplástico de almidón y poliolefinas. Proyecto de Investigación. Medellín: Universidad Escuela de Administración, Finanzas y Tecnología EAFIT, 2009.
- [11] GOTTRET, V. Escobar, Z. Pérez, S. El sector yuquero en Colombia: desarrollo y competitividad. En: OSPINA, B. y CEBALLOS, H. La yuca en el tercer milenio, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, 2002, p. 340-376.
- [12] CEBALLOS, H. De la cruz, G. Taxonomía y morfología de la yuca. En: OSPINA, B. y CEBALLOS, H. La yuca en el tercer milenio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, 2002, p. 16-32.

- [13] BONILLA, A. Estudio de la viabilidad técnica para la obtención de adhesivos a partir de harina refinada extraída en forma artesanal e industrial, evaluando tres variedades de yuca. Tesis Pregrado. Cali: Universidad de San Buenaventura, 2002, p. 19-115.
- [14] NAVIA, D. Villada, H. Torres, G. Caracterización morfológica de harina de siete variedades de yuca y polvillo de fique por microscopía óptica de alta resolución -moar-. En: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2010, vol. 8, no. 2, p. 79-85.
- [15] MENESES, J. Corrales, C. Valencia, M. Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. En: Revista EIA, Medellín. 2007, no. 8, ISSN 1794-1237, p. 57-67.
- [16] PEIJS, T. Composites turn green. En: e-Polymers. 2002, no. T_002, p. 1-12.
- [17] NOLAN-ITU Pty Ltd. Biodegradable Plastics – Developments and Environmental Impacts. Environment Australia, Australia, 2002, p. 3-10.
- [18] MARTÍNEZ, H. Agroindustria y competitividad: Estructura y dinámica en Colombia 1992 - 2005. Observatorio Agrocadenas, Ministerio de agricultura y desarrollo rural, Bogotá, 2006, p. 261.
- [19] EICHHORN, S. Baillie, C. Zafeiropoulos, N. Mwaikambo, L. Ansell, M. Dufresne, A. Entwistle, K. *et al.* Current international research into cellulosic fibers and composites. En: Journal of Materials Science. 2001; vol. 36, no. 9, p. 2107–31.
- [20] MORIANA, R. Desarrollo y caracterización de biocomposites enfibrados procedentes de recursos renovables. Estudio de su degradación en tierra. Tesis Doctoral. España: Universidad Politécnica de Valencia, 2010, p. 42-69.
- [21] ALVES, C. Ferrão, J. Silva, A. Reis, L. Freitas, M. Rodrigues, L. Alves, D. Ecodesign of automotive components making use of natural jute fiber composites. En: Journal of Cleaner Production. 2010, vol. 18, p. 313-327.
- [22] ZHANG, M. Rong, M. Lu, X. Fully biodegradable natural fiber composites from renewable resources: All-plant fiber composites. En: Composites Science and Technology. 2005, vol. 65, p. 2514-2525.
- [23] WAMBUA, P. Ivens, J. Verpoest, I. Natural fibres: can they replace glass in fibre reinforced plastics. En: Composites Science and Technology. 2003, vol. 63, p. 1259-1264.
- [24] ACOSTA, H. Samuel, H., *et al.* Efecto de las variables de operación de un extrusor de uso Sencillo sobre las propiedades mecánicas de almidón Termoplástico hecho de almidón agrío de yuca. En: Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2004, vol. 2, no. 1, p. 18-26.
- [25] MÜLLER, C. Yamashita, F. Laurindo, J. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. En: Carbohydrate Polymers. 2008, vol. 72, p. 82-87.

- [26] SIRACUSA, V. Rocculi, P. Romani, S. Dalla, M. Biodegradable polymers for food packaging: a review. En: Trends in Food Science & Technology. 2008, vol. 19, p. 634-643.
- [27] VON POGRELL, H. European Bioplastics. <http://en.european-bioplastics.org/environment/lcelca/>. 23 Agosto 2010.
- [28] VILPOUX, O. Avérous, L. Starch-based plastics. En: CEREDA, M. y VILPOUX, O. Technology, use and potentialities of Latin American starchy tubers. Collection Latin American Starchy Tuber, Brasil, 2004, p. 521-553.
- [29] VILLADA, H. Acosta, H. Velasco, R. Investigación de Almidones Termoplásticos, Precursores de Productos Biodegradables. En: Información Tecnológica. 2008, vol. 19, no. 2, p. 3-14.
- [30] LUNA, W. Mera, J. Producción de dextrinas de yuca a partir de almidón nativo en la rallandaría Todoyuca ubicada en el corregimiento pescador (municipio de Caldoño, departamento del Cauca). Clayuca. Tesis Pregrado. Popayán: Universidad del Cauca, 2006, p. 35.
- [31] WEBER, C. Biobased Packaging Materials for the Food Industry. The Royal Veterinary and Agricultural University, Dinamarca, 2000, p. 11-135.
- [32] ISHIWATA, H. Sugita, T. Takeda, M. Food hygienic indexes on biodegradable polymers. En: Eisei Shikenjo Hokoku. 1992, vol. 110, p. 80-83
- [33] KAZI, T. Arain, M. Jamali, M. Afridi, H. Jalbani, N. kandhro, G. Baig, J. Sarfraz, R. Ansari, R. Comparison of electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of total arsenic in broiler chicken. En: Food Chemistry. 2009, vol. 113, p. 1351-1355.
- [34] SANCHES, M. Vilanova, E. Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Diaz de Santos, España, 2004, p. 12-13.
- [35] VALCÁRCEL, M. Técnicas analíticas de separación. Reverté, Barcelona, 1988, p. 164-165.
- [36] GUTIERREZ, H. Salazar, R. Análisis y Diseño de Experimentos. Mc Graw – Hill, México, 2004, p.103-105.
- [37] MARIN, B. Chopin, E. Jupinet, B. Gauthier, D. Comparison of microwave-assisted digestion procedures for total trace element content determination in calcareous soils. En: Talanta. 2008, vol. 77, p. 282-288.
- [38] MARK, J. Polymer Data Handbook. Oxford University Press, ed. 1, 1999, p. 145, 707.
- [39] CROMPTO, R. Determination of Additives in Polymers and Rubbers. Rapra Technolog, ed. 1, 2007, p. 337- 345.
- [40] STANDARD METHODS. Manual Method 3114B Arsenic and selenium by hydride generation/atomic Absorption spectrometry. 3000 Metals, 1997, p. 3-34.

- [41] HARRIS, H. Herbert, A. Análisis químico. Reverté, España, 1982, p. 384.
- [42] WILLIAMS, D. Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide. Elsevier, ed. 5, 2004, p. 54.
- [43] VÍLCHEZ, R. Eliminación de metales pesados de aguas subterráneas mediante sistemas de lechos sumergidos: Estudio microbiológico de las biopelículas. Tesis Doctoral. España: Universidad de Granada. 2005, p. 1-7, 28.
- [44] NÚÑEZ, A. Martínez, S. Moreno, S. Cárdenas, M. García, G. Hernández, J. Rodríguez, A. Castillo, I. Determinación de metales pesados (aluminio, plomo, cadmio y níquel) en rábano (*Raphanus sativus* L.), brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) y calabacín (*Cucurbita pepo* L. var. *italica*). Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México. 2008, p. 1-5.
- [45] CARRASQUERO-DURÁN, A. Determinación de los niveles de contaminación con plomo en los suelos y polvo de las calles de la ciudad de Maracay. En: Agronomía Tropical. 2006, vol. 56, no. 2, p. 237-252.
- [46] NRIAGU, J. A History of Global Metal Pollution. En: Science. 1996, vol. 272, no. 5259, p. 222-225.
- [47] VILLANUEVA, R. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. En: Revista Latinoamericana de Microbiología. 2000, vol. 42, p. 131-143.
- [48] TORRALBA, M. Mejoras al sistema de generación de hidruros-absorción Atómica para la determinación de arsénico total en Materiales biológicos. Determinación simultánea de sus Especies tóxicas mediante procedimientos de calibración Multivariante. Tesis Doctoral. España: Universidad Complutense de Madrid, 1996, p. 7-11, 48, 99-100.
- [49] TUZEN, M. Saygi, K. Karaman, I. Soylak, M. Selective speciation and determination of inorganic arsenic in water, food and biological samples. En: Food and Chemical Toxicology. 2010, vol. 48, p. 41-46.
- [50] JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. En: British Medical Bulletin. 2003, vol. 68, p. 167-182.
- [51] ELÇI, L. Arslan, Z. Tyson, J. Determination of lead in wine and rum samples by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry. En: Journal of Hazardous Materials. 2009, vol. 162, p. 880-885.
- [52] SKOOG, D.; *et al.*, Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, España, ed. 5, 2001, p. 212, 215, 223-227.
- [53] VILLEGAS, W. ACERETO, P. Análisis ultravioleta-visible Teoría y práctica en el ejercicio. Universidad autónoma de Yucatán. México, 2006, p. 50-59, 66-67, 72.
- [54] COY, G. Protocolo de estandarización de métodos analíticos. IDEAM, Bogotá, 1999, p. 3-9.

- [55] FRANSON, M. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Díaz de Santos, España, 1992, ed. 17, p. 19-21.
- [56] MONGAY, C. Quimiometría. Universitat de Valencia, España, 2005, p. 302-303.
- [57] GONZÁLES, C. Tratamiento de datos. Díaz de Santos, España, 2006, p. 15-71.
- [58] CORREA, J. Rojas, L. Estudio de Potencia de Pruebas de Homogeneidad de Varianza. En: Revista Colombiana de Estadística. 2006, vol. 29, p. 57-76.
- [59] BLAUDBRAND. Aparatos volumétricos y picnómetros, con certificado de conformidad. ISO 9001-14001 Instrucciones de Calibrado (SOP), 2011, p. 6, 9-12.
- [60] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración: NTC/ISO/IEC 17025. Santafé de Bogotá D.C.: ICONTEC, 2005, p. 16-17.
- [61] CHA, J. Chung, D. Seib, P. Flores, R. Hanna, M. Physical properties of starch-based foams as affected by extrusion temperature and moisture content. En: Industrial Crops and Products. 2001, vol, 14, issue, 1, p. 23-30.
- [62] GUNARATNE, A. Hoover, R. Effect of heat moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. En: Carbohydrate Polymers. 2002, vol. 49, issue. 4, p. 425-437.
- [63] TÄBI, T. The analysis of processing and usage of injection moulded biodegradable polymers made of starch and poly(lactic acid). Tesis Doctoral. Budapest: Budapest University of Technology and Economics, Departamento de Ingenieria de Polímeros, 2010, p. 3, 10.
- [64] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Determination of moisture content. En: Official Methods of Analysis. AOAC 950.43. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.
- [65] IUPAC. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. En: Química pura y aplicada. 1995, vol. 67, p.1699-1723.
- [66] VALDEBENITO, G. Desarrollo de un método para la determinación directa de Pb mediante Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica en suspensiones de pelo y uña "slurries" como biomarcadores de exposición. Tesis Pregrado. Santiago de Chile: Universidad de Chile, 2008, p. 12-13.
- [67] CAO, J. Liang, P. Liu, R. Determination of trace lead in water samples by continuous flow microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry. En: Journal of Hazardous Materials. 2008, vol. 152, p. 910 – 914.
- [68] BENTLIN, F. Pozebon, D. Mello, P. Flores, E. Determination of trace elements in paints by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. En: Analytica Chimica Acta. 2007, vol. 602, p. 23–31.

[69] SANTOS, M. Nóbrera, J. Baccan, N. Cadote, S. Determination of toxic elements in plastics from waste electrical and electronic equipment by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. En: Talanta. 2010, vol 81, p. 1781–1787.

[70] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Plásticos. Plastificantes DOP y DOA grado alimento. NTC 4096. Santafé de Bogotá D.C.: ICONTEC, 2006, p. 3.

[71] ALLOWAY, B. Heavy metals in soils. Springer, ed. 2, 1995, p. 105-114.

[72] CURTIS, L. Smith, B. Heavy metal in fertilizers: considerations for setting regulations in Oregon. Oregon State University, Estados Unidos, 2002, p. 9-10.

ANEXOS

ANEXO 1. Verificación de la calibración del material de vidrio

El control de los aparatos volumétricos está descrito en la norma DIN EN ISO 4787 [58], donde también está indicada la fórmula general de cálculo:

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

Tomando en cuenta la aplicación muy complicada de esta fórmula y el gran número de tablas necesarias, el cálculo ha sido simplificado por la introducción del factor "Z".

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

Donde, V_{20} (mL) es el volumen del balón de medida a 20°C, W_1 (g) es el valor obtenido de la pesada del balón de medida sin carga (antes de llena el balón con agua), W_2 (g) es el valor obtenido de la pesada del balón de medida lleno (balón aforado con agua) y Z (mL/g) es el factor de los parámetros de control resumidos (ver tabla 28, anexo 1); el factor "Z" se puede leer en función de temperaturas de 15 a 30°C y de las presiones atmosféricas de 980 hPa a 1040 hPa, con respecto al vidrio DURAN.

El factor "Z" contiene los parámetros siguientes:

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

Vidrio borosilicato 3.3 (SCHOTT DURAN, PYREX)	$y = 9,9 \times 10^{-5} 1/^\circ C$
Vidrio de soda (Vidrio AR-Glas)	$y = 27 \times 10^{-5} 1/^\circ C$
Plástico (PP)	$y = 450 \times 10^{-5} 1/^\circ C$
Plástico (PMP)	$y = 351 \times 10^{-5} 1/^\circ C$
Plástico (PFA)	$y = 330 \times 10^{-5} 1/^\circ C$

CÁLCULO DEL VOLUMEN V_{20}

A continuación, se muestra un ejemplo representativo para calcular el volumen verdadero V_{20} , para el triplicado del balón aforado 1 de 10 mL, con un límite de error <0,0150. Es de tener en cuenta que la presión atmosférica de Popayán es de 1017,6 hPa y por tanto, ésta se ubica dentro de la gama de presión atmosférica media y los valores del factor Z serían: $Z_{22^\circ C, DURAN} = 1,00323$ mL/g y $Z_{24^\circ C, DURAN} = 1,00371$ mL/g

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

Peso del balón aforado con carga (H_2O): $W_2 = 25,3521 \text{ g}, 25,3538 \text{ g}, 25,3488 \text{ g}.$

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

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

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

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

$$1) (10,0139 \text{ mL} - 10,0156 \text{ mL}) * \frac{1}{4} = 4,30 \times 10^{-4}$$

$$2) (10,0139 \text{ mL} - 10,0219 \text{ mL}) * \frac{1}{4} = 2,00 \times 10^{-3}$$

$$3) (10,0139 \text{ mL} - 10,0043 \text{ mL}) * \frac{1}{4} = 2,40 \times 10^{-3}$$

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

Tabla 28. Factor "Z" en mL/g para el control de materiales volumétricos.

T de control (°C)	Gama de P _{atm} inferior 980 a 1000 hPa		Gama de P _{atm} media 1000 a 1020 hPa		Gama de P _{atm} superior 1020 a 1040 hPa	
	material: vidrio					
	Vidrio de Borosilicato	Vidrio de soda	Vidrio de Borosilicato	Vidrio de soda	Vidrio de Borosilicato	Vidrio de soda
	Z (mL/g)					
15,0	1,00200	1,00208	1,00202	1,00211	1,00204	1,00213
15,5	1,00207	1,00215	1,00209	1,00217	1,00211	1,00219
16,0	1,00214	1,00221	1,00216	1,00223	1,00218	1,00225
16,5	1,00222	1,00228	1,00224	1,00230	1,00226	1,00232
17,0	1,00230	1,00235	1,00232	1,00237	1,00234	1,00239
17,5	1,00238	1,00242	1,00240	1,00245	1,00242	1,00247
18,0	1,00246	1,00250	1,00248	1,00252	1,00251	1,00254
18,5	1,00255	1,00258	1,00257	1,00260	1,00260	1,00262
19,0	1,00264	1,00266	1,00266	1,00268	1,00268	1,00270
19,5	1,00274	1,00275	1,00276	1,00277	1,00278	1,00279
20,0	1,00283	1,00283	1,00285	1,00285	1,00287	1,00287
20,5	1,00293	1,00292	1,00295	1,00294	1,00297	1,00296
21,0	1,00303	1,00301	1,00305	1,00303	1,00307	1,00305
21,5	1,00313	1,00311	1,00316	1,00313	1,00318	1,00315
22,0	1,00321	1,00318	1,00323	1,00320	1,00325	1,00322
22,5	1,00335	1,00331	1,00337	1,00333	1,00339	1,00335
23,0	1,00346	1,00341	1,00348	1,00343	1,00350	1,00345
23,5	1,00358	1,00352	1,00360	1,00354	1,00362	1,00356
24,0	1,00369	1,00362	1,00371	1,00364	1,00373	1,00366
24,5	1,00381	1,00373	1,00383	1,00375	1,00385	1,00377
25,0	1,00393	1,00384	1,00395	1,00386	1,00397	1,00389
25,5	1,00405	1,00396	1,00408	1,00398	1,00410	1,00400
26,0	1,00418	1,00408	1,00420	1,00410	1,00422	1,00412
26,5	1,00431	1,00420	1,00433	1,00422	1,00435	1,00424
27,0	1,00444	1,00432	1,00446	1,00434	1,00448	1,00436
27,5	1,00457	1,00444	1,00459	1,00447	1,00461	1,00449
28,0	1,00471	1,00457	1,00473	1,00459	1,00475	1,00461
28,5	1,00485	1,00470	1,00487	1,00472	1,00489	1,00474
29,0	1,00499	1,00483	1,00501	1,00485	1,00503	1,00487
29,5	1,00513	1,00497	1,00515	1,00499	1,00517	1,00501
30,0	1,00527	1,00510	1,00529	1,00512	1,00531	1,00514

Tabla 29. Datos de calibración del balón de 50 mL (vidrio de borosilicato).

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

Tabla 30. Datos de calibración de balones de 100 mL (vidrio de borosilicato).

Balón 100 mL	W ₁	W ₂	T Agua (°C)	Factor Z	(W ₂ -W ₁)*Z	\bar{X}	s	CV (%)	Prueba (1/4)	Resultado <0,0375
1	59,5555	159,1109	23	1,00348	99,9019	99,8876	0,0179	0,02	0,0143	0,0036
	59,5556	159,1026	23	1,00348	99,8934				0,0058	0,0014
	59,5545	159,0758	23	1,00348	99,8676				0,0200	0,0050
2	59,6967	159,3019	23	1,00348	99,9518	99,9009	0,0455	0,05	0,0509	0,0127
	59,6974	159,2376	23	1,00348	99,8866				0,0143	0,0036
	59,6971	159,2151	23	1,00348	99,8643				0,0366	0,0092
3	59,3370	158,9060	23	1,00348	99,9155	99,9028	0,0110	0,01	0,0127	0,0032
	59,3388	158,8899	23	1,00348	99,8975				0,0053	0,0013
	59,3378	158,8868	23	1,00348	99,8954				0,0074	0,0019

Tabla 31. Datos de calibración de balones de 5 mL (vidrio de borosilicato).

Balón 5 mL	W_1	W_2	T Agua (°C)	Factor Z	$(W_2-W_1)*Z$	\bar{X}	s	CV (%)	Prueba (1/4)	Resultado <0,0040
1	13,5031	18,4986	23	1,00348	5,0129	5,0125	0,0028	0,06	0,0004	$1,00 \times 10^{-04}$
	13,5031	18,5008	23	1,00348	5,0151				0,0026	$6,50 \times 10^{-04}$
	13,5033	18,4955	23	1,00348	5,0096				0,0029	$7,30 \times 10^{-04}$
2	13,5120	18,5019	23	1,00348	5,0073	5,0090	0,0019	0,04	0,0017	$4,30 \times 10^{-04}$
	13,5119	18,5031	23	1,00348	5,0086				0,0004	$1,00 \times 10^{-04}$
	13,5121	18,5057	23	1,00348	5,0111				0,0021	$5,30 \times 10^{-04}$
3	13,7243	18,7023	23	1,00348	4,9953	4,9965	0,0046	0,09	0,0012	$3,00 \times 10^{-04}$
	13,7245	18,7087	23	1,00348	5,0016				0,0051	$1,28 \times 10^{-03}$
	13,7275	18,7029	23	1,00348	4,9927				0,0038	$9,50 \times 10^{-04}$
4	13,4087	18,4021	23	1,00348	5,0108	5,0045	0,0055	0,11	0,0063	$1,58 \times 10^{-03}$
	13,4087	18,3920	23	1,00348	5,0006				0,0039	$9,80 \times 10^{-04}$
	13,4087	18,3936	23	1,00348	5,0022				0,0023	$5,80 \times 10^{-04}$
5	12,8304	17,8096	23	1,00348	4,9965	5,0039	0,0072	0,14	0,0074	$1,85 \times 10^{-03}$
	12,8305	17,8240	23	1,00348	5,0109				0,0070	$1,75 \times 10^{-03}$
	12,8304	17,8173	23	1,00348	5,0042				0,0003	$8,00 \times 10^{-05}$
6	13,4430	18,4282	23	1,00348	5,0026	5,0053	0,0033	0,07	0,0027	$6,80 \times 10^{-04}$
	13,4440	18,4356	23	1,00348	5,0090				0,0037	$9,30 \times 10^{-04}$
	13,4438	18,4307	23	1,00348	5,0043				0,0010	$2,50 \times 10^{-04}$
7	14,3999	19,3872	23	1,00348	5,0047	5,0012	0,0032	0,06	0,0035	$8,80 \times 10^{-04}$
	14,4001	19,3812	23	1,00348	4,9984				0,0028	$7,00 \times 10^{-04}$
	14,4001	19,3833	23	1,00348	5,0005				0,0007	$1,80 \times 10^{-04}$
8	13,2606	18,2319	23	1,00348	4,9886	4,9942	0,0050	0,10	0,0056	$1,40 \times 10^{-03}$
	13,2607	18,2414	23	1,00348	4,9980				0,0038	$9,50 \times 10^{-04}$
	13,2615	18,2403	23	1,00348	4,9961				0,0019	$4,80 \times 10^{-04}$
9	13,6523	18,6496	23	1,00348	5,0147	5,0102	0,0050	0,10	0,0045	$1,13 \times 10^{-03}$
	13,6558	18,6495	23	1,00348	5,0111				0,0009	$2,30 \times 10^{-04}$
	13,6548	18,6423	23	1,00348	5,0049				0,0053	$1,33 \times 10^{-03}$
10	13,0497	18,0266	23	1,00348	4,9942	4,9939	0,0010	0,02	0,0003	$8,00 \times 10^{-05}$
	13,0498	18,0273	23	1,00348	4,9948				0,0009	$2,30 \times 10^{-04}$
	13,0522	18,0277	23	1,00348	4,9928				0,0011	$2,80 \times 10^{-04}$

Tabla 32. Datos de calibración de balones de 10 mL (vidrio de borosilicato).

Balón 10 mL	W ₁	W ₂	T Agua (°C)	Factor Z	(W ₂ -W ₁)*Z	\bar{X}	s	CV (%)	Prueba (1/4)	Resultado <0,0150
1	15,3688	25,3521	22	1,00323	10,0156	10,0139	0,0089	0,09	0,0017	4,30x10 ⁻⁰⁴
	15,3689	25,3538	24	1,00371	10,0219				0,0080	2,00x10 ⁻⁰³
	15,3815	25,3488	24	1,00371	10,0043				0,0096	2,40x10 ⁻⁰³
2	16,0987	26,0681	22	1,00323	10,0016	10,0112	0,0085	0,09	0,0096	2,40x10 ⁻⁰³
	16,1015	26,0823	24	1,00371	10,0178				0,0066	1,65x10 ⁻⁰³
	16,1052	26,0825	24	1,00371	10,0143				0,0031	7,80x10 ⁻⁰⁴
3	15,7398	25,7104	22	1,00323	10,0028	10,0100	0,0070	0,07	0,0072	1,80x10 ⁻⁰³
	15,7399	25,7132	24	1,00371	10,0103				0,0003	8,00x10 ⁻⁰⁵
	15,7399	25,7197	24	1,00371	10,0168				0,0068	1,70x10 ⁻⁰³
4	15,4984	25,4580	22	1,00323	9,9918	9,9931	0,0093	0,09	0,0013	3,30x10 ⁻⁰⁴
	15,5036	25,4696	24	1,00371	10,0030				0,0099	2,48x10 ⁻⁰³
	15,5033	25,4510	24	1,00371	9,9846				0,0085	2,13x10 ⁻⁰³
5	16,0543	26,0344	22	1,00323	10,0123	10,0072	0,0088	0,09	0,0051	1,28x10 ⁻⁰³
	16,0546	26,0298	24	1,00371	10,0122				0,0050	1,25x10 ⁻⁰³
	16,0569	26,0170	24	1,00371	9,9970				0,0102	2,55x10 ⁻⁰³
6	15,6541	25,6166	22	1,00323	9,9947	9,9987	0,0035	0,04	0,0040	1,00x10 ⁻⁰³
	15,6544	25,6187	24	1,00371	10,0013				0,0026	6,50x10 ⁻⁰⁴
	15,6573	25,6203	24	1,00371	10,0000				0,0013	3,30x10 ⁻⁰⁴
7	15,2244	25,1840	22	1,00323	9,9918	10,0001	0,0147	0,15	0,0083	2,08x10 ⁻⁰³
	15,2245	25,2046	24	1,00371	10,0171				0,0170	4,25x10 ⁻⁰³
	15,2248	25,1793	24	1,00371	9,9914				0,0087	2,18x10 ⁻⁰³
8	15,1529	25,1134	22	1,00323	9,9927	10,0002	0,0065	0,07	0,0075	1,88x10 ⁻⁰³
	15,1531	25,1206	24	1,00371	10,0045				0,0043	1,08x10 ⁻⁰³
	15,1537	25,1202	24	1,00371	10,0035				0,0033	8,30x10 ⁻⁰⁴
9	15,4791	25,4347	22	1,00323	9,9878	9,9995	0,0101	0,10	0,0117	2,93x10 ⁻⁰³
	15,4800	25,4489	24	1,00371	10,0059				0,0064	1,60x10 ⁻⁰³
	15,4822	25,4499	24	1,00371	10,0047				0,0052	1,30x10 ⁻⁰³
10	15,9391	25,9022	22	1,00323	9,9953	10,0026	0,0076	0,08	0,0073	1,83x10 ⁻⁰³
	15,9452	25,9186	24	1,00371	10,0104				0,0078	1,95x10 ⁻⁰³
	15,9449	25,9100	24	1,00371	10,0021				0,0005	1,30x10 ⁻⁰⁴

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

Tabla 33. Porcentajes de humedad, intervalo de confianza y coeficiente de variación en muestras de termoformados biodegradables.

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

*En la literatura los porcentajes de humedad se reportan con tres o cuatro cifras significativas

Tabla 34. Porcentajes de humedad, intervalo de confianza y coeficiente de variación en muestras de películas flexibles biodegradables.

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

*En la literatura los porcentajes de humedad se reportan con tres o cuatro cifras significativas

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

Tabla 35. Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:0

#	Variables			Digestión	\bar{A}
	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)	Peso Muestra (g)		
1	35	60	0,5000	No	-----
2	35	60	1,0000	No	-----
3	35	60	2,0000	No	-----
4	35	120	0,5000	No	-----
5	35	120	1,0000	No	-----
6	35	120	2,0000	No	-----
7	35	180	0,5000	No	-----
8	35	180	1,0000	Si	0,0038
9	35	180	2,0000	No	-----
10	50	60	0,5000	No	-----
11	50	60	1,0000	No	-----
12	50	60	2,0000	No	-----
13	50	120	0,5000	No	-----
14	50	120	1,0000	No	-----
15	50	120	2,0000	No	-----
16	50	180	0,5000	Si	0,0022
17	50	180	1,0000	Si	0,0023
18	50	180	2,0000	No	-----
19	70	60	0,5000	No	-----
20	70	60	1,0000	No	-----
21	70	60	2,0000	No	-----
22	70	120	0,5000	Si	0,0017
23	70	120	1,0000	No	-----
24	70	120	2,0000	No	-----
25	70	180	0,5000	Si	0,0023
26	70	180	1,0000	Si	0,0019
27	70	180	2,0000	No	-----

No: no hubo digestión; -----: no hubo lectura de absorbancia

Tabla 36. Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 3:1

#	Variables			Digestión	\bar{A}
	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)	Peso Muestra (g)		
1	35	60	0,5000	No	-----
2	35	60	1,0000	No	-----
3	35	60	2,0000	No	-----
4	35	120	0,5000	No	-----
5	35	120	1,0000	No	-----
6	35	120	2,0000	No	-----
7	35	180	0,5000	No	-----
8	35	180	1,0000	Si	0,0053
9	35	180	2,0000	No	-----
10	50	60	0,5000	No	-----
11	50	60	1,0000	No	-----
12	50	60	2,0000	No	-----
13	50	120	0,5000	No	-----
14	50	120	1,0000	No	-----
15	50	120	2,0000	No	-----
16	50	180	0,5000	Si	0,0037
17	50	180	1,0000	Si	0,0071
18	50	180	2,0000	No	-----
19	70	60	0,5000	No	-----
20	70	60	1,0000	No	-----
21	70	60	2,0000	No	-----
22	70	120	0,5000	Si	0,0017
23	70	120	1,0000	Si	0,0048
24	70	120	2,0000	No	-----
25	70	180	0,5000	Si	0,0039
26	70	180	1,0000	Si	0,0084
27	70	180	2,0000	No	-----

No: no hubo digestión; -----: no hubo lectura de absorbancia

Tabla 37. Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:1

#	Variables			Digestión	\bar{A}
	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)	Peso Muestra (g)		
1	35	60	0,5000	No	-----
2	35	60	1,0000	No	-----
3	35	60	2,0000	No	-----
4	35	120	0,5000	No	-----
5	35	120	1,0000	No	-----
6	35	120	2,0000	No	-----
7	35	180	0,5000	No	-----
8	35	180	1,0000	Si	0,0014
9	35	180	2,0000	No	-----
10	50	60	0,5000	No	-----
11	50	60	1,0000	No	-----
12	50	60	2,0000	No	-----
13	50	120	0,5000	No	-----
14	50	120	1,0000	No	-----
15	50	120	2,0000	No	-----
16	50	180	0,5000	Si	-0,0005
17	50	180	1,0000	Si	0,0013
18	50	180	2,0000	No	-----
19	70	60	0,5000	No	-----
20	70	60	1,0000	No	-----
21	70	60	2,0000	No	-----
22	70	120	0,5000	Si	0,0014
23	70	120	1,0000	No	-----
24	70	120	2,0000	No	-----
25	70	180	0,5000	Si	-0,0009
26	70	180	1,0000	Si	0,0006
27	70	180	2,0000	No	-----

No: no hay digestión. -----: no hay lectura de absorbancia

Tabla 38. Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo del termoformado HMC 1 para la relación ácido nítrico:perclórico 1:3

#	Variables			Digestión	\bar{A}
	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)	Peso Muestras (g)		
1	35	60	0,5000	No	-----
2	35	60	1,0000	No	-----
3	35	60	2,0000	No	-----
4	35	120	0,5000	No	-----
5	35	120	1,0000	No	-----
6	35	120	2,0000	No	-----
7	35	180	0,5000	No	-----
8	35	180	1,0000	No	-----
9	35	180	2,0000	No	-----
10	50	60	0,5000	No	-----
11	50	60	1,0000	No	-----
12	50	60	2,0000	No	-----
13	50	120	0,5000	No	-----
14	50	120	1,0000	No	-----
15	50	120	2,0000	No	-----
16	50	180	0,5000	Si	0,0002
17	50	180	1,0000	Si	0,0021
18	50	180	2,0000	No	-----
19	70	60	0,5000	No	-----
20	70	60	1,0000	No	-----
21	70	60	2,0000	No	-----
22	70	120	0,5000	No	-----
23	70	120	1,0000	No	-----
24	70	120	2,0000	No	-----
25	70	180	0,5000	Si	0,0003
26	70	180	1,0000	Si	0,0038
27	70	180	2,0000	No	-----

No: no hubo digestión; -----: no hubo lectura de absorbancia

Tabla 39. Absorbancia de arsénico obtenida para la digestión ácida con reflujo de la película flexible SM 707-17 hidrolizado para la relación ácido nítrico:perclórico 3:1

#	Variables			Digestión	\bar{A}
	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)	Peso Muestra (g)		
1	35	30	0,5000	Si	-----
2	35	30	1,0000	Si	-----
3	35	30	2,0000	No	-----
4	35	45	0,5000	Si	-----
5	35	45	1,0000	Si	-----
6	35	45	2,0000	No	-----
7	35	60	0,5000	Si	-----
8	35	60	1,0000	Si	-----
9	35	60	2,0000	No	-----
10	50	30	0,5000	Si	-----
11	50	30	1,0000	Si	-----
12	50	30	2,0000	No	-----
13	50	45	0,5000	Si	-----
14	50	45	1,0000	Si	-----
15	50	45	2,0000	No	-----
16	50	60	0,5000	Si	-----
17	50	60	1,0000	Si	0,000
18	50	60	2,0000	No	-----
19	70	30	0,5000	Si	-----
20	70	30	1,0000	Si	-----
21	70	30	2,0000	Si	-----
22	70	45	0,5000	Si	-----
23	70	45	1,0000	Si	0,003
24	70	45	2,0000	Si	0,000
25	70	60	0,5000	Si	-----
26	70	60	1,0000	Si	-0,001
27	70	60	2,0000	Si	-----

No: no hubo digestión; -----: no hubo lectura de absorbancia

ANEXO 4. Puesta a punto de la técnica analítica

✓ ESTABILIDAD DE LA LAMPARA DE CATODO HUECO DE ARSÉNICO Y PLOMO

Tabla 40. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico

Estándar As	Tiempo (minutos)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
1 (4,0 µg/L)	0	0,666	5	0,986	0,370	6	35	5,900
	30	0,496	5					
	60	0,915	5					
	90	0,701	5					
	120	0,960	5					
	150	0,701	5					
	180	0,866	5					
2 (12,0 µg/L)	0	0,915	5	0,986	1,046	6	35	5,900
	30	0,861	5					
	60	0,827	5					
	90	0,683	5					
	120	0,853	5					
	150	0,853	5					
	180	0,814	5					
3 (16,0 µg/L)	0	0,822	5	0,986	0,199	6	35	5,900
	30	0,866	5					
	60	0,853	5					
	90	0,853	5					
	120	0,853	5					
	150	0,775	5					
	180	0,822	5					

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

Tabla 41. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de plomo

Estándar Plomo	Tiempo (minutos)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
1 (2,0 µg/L)	0	0,827	3	0,999	2,003	6	21	2,570
	30	0,945	3					
	60	0,957	3					
	90	0,940	3					
	120	0,860	3					
	150	0,840	3					
	180	0,863	3					
2 (2,5 µg/L)	0	0,790	3	0,999	2,413	6	21	2,570
	30	0,899	3					
	60	0,928	3					
	90	0,807	3					
	120	0,993	3					
	150	0,863	3					
	180	0,863	3					
3 (3,5 µg/L)	0	0,630	3	0,999	2,529	6	21	2,570
	30	0,782	3					
	60	0,860	3					
	90	0,926	3					
	120	0,801	3					
	150	0,895	3					
	180	0,945	3					

Shapiro-Wilk: $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 6)}$ // Levene: $F_{(\alpha, k-1, (K \cdot N) - K)} = F_{(0,05, 6, 35)}$, donde, K = 7 tiempos, N = 4 lecturas de la absorbancia

Tabla 42. Estadístico de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de arsénico

Concentración del estándar de As	Estadístico	
	$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
Estándar 1 (4,0 µg/L)	0,0136 ± 0,0004	3,68
Estándar 2 (12,0 µg/L)	0,0397 ± 0,0003	1,01
Estándar 3 (16,0 µg/L)	0,0636 ± 0,0004	0,79

Tabla 43. Estadístico de la estabilidad de la lámpara de cátodo hueco de plomo

Concentración del estándar de Pb	Estadístico	
	$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
Estándar 1 (2,0 µg/L)	0,0590 ± 0,0019	2,71
Estándar 2 (2,5 µg/L)	0,1010 ± 0,0011	1,39
Estándar 3 (3,5 µg/L)	0,1322 ± 0,0015	0,98

- ✓ DISMINUCIÓN DE INTERFERENCIAS PARA LA DETERMINACION DE ARSÉNICO

Tabla 44. ANOVA de un factor para los ensayos de adición de KI/Ácido ascórbico y/o ácido sulfámico a un estándar de 8 µg As/L arsénico.

Estándar		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculado	F tabulado
8 µg As/L	Inter-grupos	0,000	3	0,000	3,657	2,680
	Intra-grupos	0,000	68	0,000		
	Total	0,000	71			

$F_{\text{calculado}} (\alpha, n-1, n*(k-1)) > F_{\text{tabulado}} (0,05, 3, 68)$, donde, $n = 4$ ensayos del estándar y $k = 3$ réplicas en cada grupo x 6 lecturas de absorbancia

ANEXO 5. Determinación de los parámetros de calidad

- ✓ INTERVALO DE LINEALIDAD PARA ARSÉNICO Y PLOMO

Tabla 45. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en el intervalo de linealidad de Arsénico

Estándar (µgAs/L)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
	W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
2,0	0,866	5	0,986	1,300	7	40	5,900
10,0	0,831	5					
20,0	0,902	5					
30,0	0,979	5					
35,0	0,961	5					
40,0	0,958	5					
45,0	0,850	5					
50,0	0,912	5					

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

Tabla 46. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en el intervalo de linealidad de Plomo

Estándar (µg Pb/L)	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
	W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
2,0	0,895	3	0,999	2,1130	8	27	5,100
3,0	0,729	3					
4,0	0,989	3					
5,0	0,865	3					
6,0	0,863	3					
7,0	0,851	3					
8,0	0,808	3					
9,0	0,908	3					
12,0	0,866	3					

Shapiro-Wilk: $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 4)}$ // Levene: $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 8, 27)}$, donde, $K = 9$ niveles de la curva, $N = 4$ lecturas de la absorbancia

Tabla 47. Estadístico de la curva de calibración para el intervalo de linealidad de As y Pb

Elemento	Estándar (µg/L)	Estadístico	
		$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
Arsénico	2,0	0,0058 ± 0,0002	3,45
	10,0	0,0260 ± 0,0011	5,00
	20,0	0,0525 ± 0,0012	2,86
	30,0	0,0793 ± 0,0021	3,28
	35,0	0,0932 ± 0,0014	1,82
	40,0	0,1052 ± 0,0012	1,43
	45,0	0,1188 ± 0,0015	1,52
	50,0	0,1302 ± 0,0016	1,46
Plomo	2,0	0,0568 ± 0,0015	2,29
	3,0	0,0835 ± 0,0020	2,04
	4,0	0,0945 ± 0,0025	2,22
	5,0	0,1108 ± 0,0035	2,71
	6,0	0,1345 ± 0,0022	1,41
	7,0	0,1605 ± 0,0053	2,80
	8,0	0,1672 ± 0,0039	1,97
	9,0	0,1900 ± 0,0067	3,00
	12,0	0,2450 ± 0,0107	3,71

Tabla 48. Análisis de regresión para el modelo $y = \beta_0 + \beta_1x$ para el intervalo de linealidad de As y Pb

Elemento		Coeficientes no estandarizados		t calculado	t tabulado
		B	Error típ.		
As	Estándar	0,00262	1,5723x10 ⁻⁰⁵	116,564	2,000
Pb	Estándar	0,01860	0,00031	56,244	2,021

As: $t_{(\alpha/2, N-2)} = t_{(0,025, 46)}$, donde, N = (8 niveles de la curva de calibración)x(6 lecturas de la absorbancia) // Pb: $t_{(\alpha/2, N-2)} = t_{(0,025, 34)}$, donde, N = (9 niveles de la curva de calibración)x(4 lecturas de la absorbancia)

Tabla 49. ANOVA de un factor para el intervalo de linealidad de As y Pb

Elemento		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculado	F tabulado
As	Regresión	0,083	1	0,083	27743,465	4,000
	Residual	0,000	46	0,000		
	Total	0,084	47			
Pb	Regresión	0,110	1	0,110	3509,836	4,080
	Residual	0,001	34	0,000		
	Total	0,111	35			

As: $F_{(\alpha, 1, n-2)} = F_{(0,05, 1, 46)}$, donde, N = (8 niveles de la curva de calibración)x(6 lecturas de la absorbancia) // Pb: $F_{(\alpha, 1, n-2)} = F_{(0,05, 1, 34)}$, donde, N = (9 niveles de la curva de calibración)x(4 lecturas de la absorbancia)

✓ PRECISIÓN

• REPETIBILIDAD

Tabla 50. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en la Repetibilidad de As

Estándar ($\mu\text{g As/L}$)	Curva	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
2,0	1	0,254	5	0,986	0,265	4	25	5,100
	2	0,333	5					
	3	0,277	5					
	4	0,401	5					
	5	0,407	5					
4,0	1	0,254	5	0,986	1,643	3	20	4,900
	2	0,254	5					
	3	0,285	5					
	4	0,319	5					
	5	----	---					
8,0	1	0,927	5	0,986	2,629	4	25	5,100
	2	0,831	5					
	3	0,907	5					
	4	0,640	5					
	5	0,496	5					
12,0	1	0,775	5	0,986	2,884	4	25	5,100
	2	0,866	5					
	3	0,823	5					
	4	0,853	5					
	5	0,866	5					
14,0	1	0,918	5	0,986	2,875	4	25	5,100
	2	0,915	5					
	3	0,908	5					
	4	0,822	5					
	5	0,866	5					
16,0	1	0,827	5	0,986	2,052	4	25	5,100
	2	0,960	5					
	3	0,908	5					
	4	0,827	5					
	5	0,773	5					
18,0	1	0,907	5	0,986	2,615	4	25	5,100
	2	0,920	5					
	3	0,890	5					
	4	0,822	5					
	5	0,701	5					
20,0	1	0,853	5	0,986	5,013	4	25	5,100
	2	0,853	5					
	3	0,776	5					
	4	0,822	5					
	5	0,683	5					

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

Tabla 51. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración para la Repetibilidad de Pb

Estándar ($\mu\text{g Pb/L}$)	Curva	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
2,0	1	0,982	3	0,999	0,292	4	15	4,900
	2	0,980	3					
	3	0,927	3					
	4	0,927	3					
	5	0,849	3					
2,5	1	0,630	3	0,999	1,699	4	15	4,900
	2	0,923	3					
	3	0,744	3					
	4	0,840	3					
	5	0,993	3					
3,0	1	0,982	3	0,999	3,716	4	15	4,900
	2	0,925	3					
	3	0,818	3					
	4	0,963	3					
	5	0,971	3					
3,5	1	0,820	3	0,999	0,820	4	15	4,900
	2	0,808	3					
	3	0,807	3					
	4	0,927	3					
	5	0,849	3					
4,0	1	0,916	3	0,999	2,852	4	15	4,900
	2	0,982	3					
	3	0,983	3					
	4	0,882	3					
	5	0,945	4					
4,5	1	0,863	3	0,999	3,236	4	15	4,900
	2	0,630	3					
	3	0,993	3					
	4	0,864	3					
	5	0,944	3					
5,0	1	0,908	3	0,999	2,787	4	15	4,900
	2	0,993	3					
	3	0,973	3					
	4	0,831	3					
	5	0,882	3					
6,0	1	0,827	3	0,999	0,672	4	15	4,900
	2	0,801	3					
	3	0,849	3					
	4	0,920	3					
	5	0,918	3					
7,0	1	0,863	3	0,999	4,845	4	15	4,900
	2	0,971	3					
	3	0,863	3					
	4	0,895	3					
	5	0,958	3					

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

Tabla 52. Coeficiente de Correlación de Pearson para la Repetibilidad de As y Pb

	As	Pb
Correlación de Pearson	0,99993	0,99946
N	8	9

N = niveles de la curva de calibración

Tabla 53. Coeficiente de Regresión, Coeficiente de Determinación y Coeficiente de Determinación Ajustado para la Repetibilidad de As y Pb

Elemento	r	R ²	R ² ajustada
As	0,99993	0,99986	0,99984
Pb	0,99946	0,99892	0,99877

Tabla 54. Análisis de regresión para el modelo $y = \beta_0 + \beta_1x$ para la Repetibilidad de As y Pb

Elemento		Coeficientes no estandarizados		t calculado	t tabulado
		B	Error típico		
As	Estándar	0,00429	2,0401x10 ⁻⁰⁵	210,267	2,000
Pb	Estándar	0,03035	0,00038	11,071	2,021

As: $t_{(\alpha/2, N-2)} = t_{(0,025, 46)}$, donde, N = (8 niveles de la curva de calibración)x(6 lecturas de la absorbancia) // Pb: $t_{(\alpha/2, N-2)} = t_{(0,025, 34)}$, donde, N = (9 niveles de la curva de calibración)x(4 lecturas de la absorbancia)

Tabla 55. ANOVA de un factor para la Repetibilidad de As y Pb

Elemento		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculado	F tabulado
As	Regresión	0,006	1	0,006	44212,033	5,990
	Residual	0,000	6	0,000		
	Total	0,006	7			
Pb	Regresión	0,020	1	0,020	6482,423	5,590
	Residual	0,000	7	0,000		
	Total	0,020	8			

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

Pb: $F_{(\alpha, 1, n-2)} = F_{(0,05, 1, 34)}$, donde, N = (9 niveles)x(4 lecturas de la absorbancia)

- PRECISIÓN INTERMEDIA

Tabla 56. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en la precisión intermedia de As

Estándar ($\mu\text{g As/L}$)	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
2,0	1	0,640	5	0,986	0,751	7	40	5,900
	2	0,866	5					
	3	0,822	5					
	4	0,866	5					
	5	0,866	5					
	6	0,921	5					
	7	0,496	5					
	8	0,496	5					
4,0	1	----		0,986	0,984	5	30	5,100
	2	0,773	5					
	3	0,982	5					
	4	0,866	5					
	5	0,640	5					
	6	0,640	5					
	7	0,496	5					
	8	----						
8,0	1	0,496	5	0,986	1,908	7	40	5,900
	2	0,496	5					
	3	0,866	5					
	4	0,927	5					
	5	0,827	5					
	6	0,831	5					
	7	0,915	5					
	8	0,853	5					
12,0	1	0,866	5	0,986	1,643	7	40	5,900
	2	0,775	5					
	3	0,775	5					
	4	0,775	5					
	5	0,822	5					
	6	0,869	5					
	7	0,982	5					
	8	0,773	5					
14,0	1	0,866	5	0,986	3,556	7	40	5,900
	2	0,805	5					
	3	0,927	5					
	4	0,918	5					
	5	0,683	5					
	6	0,683	5					
	7	0,851	5					
	8	0,822	5					

Tabla 56. (Continuación)

Estándar ($\mu\text{g As/L}$)	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
16,0	1	0,773	5	0,986	2,542	7	40	5,900
	2	0,861	5					
	3	0,496	5					
	4	0,827	5					
	5	0,866	5					
	6	0,496	5					
	7	0,915	5					
	8	0,908	5					
18,0	1	0,701	5	0,986	1,853	7	40	5,900
	2	0,908	5					
	3	0,853	5					
	4	0,907	5					
	5	0,866	5					
	6	0,958	5					
	7	0,958	5					
	8	0,797	5					
20,0	1	0,683	5	0,986	1,503	7	40	5,900
	2	0,866	5					
	3	0,640	5					
	4	0,853	5					
	5	0,683	5					
	6	0,701	5					
	7	0,927	5					
	8	0,866	5					

----: absorbancia es una constante, por lo que se ha desestimado. Shapiro-Wilk: $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 6)}$
 // Levene: $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 7, 40)}$, donde, K = 8 número de días, N = 6 lecturas de la absorbancia

Tabla 57. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la curva de calibración en la precisión intermedia de Pb

Estándar ($\mu\text{g Pb/L}$)	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
2,0	1	0,849	3	0,999	1,047	7	24	5,100
	2	0,911	3					
	3	0,791	3					
	4	0,926	3					
	5	0,971	3					
	6	0,971	3					
	7	0,945	3					
	8	0,946	3					

Tabla 57. (Continuación)

Estándar ($\mu\text{g Pb/L}$)	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
2,5	1	0,863	3	0,999	0,512	7	24	5,100
	2	0,848	3					
	3	0,895	3					
	4	0,945	3					
	5	0,895	3					
	6	0,827	3					
	7	0,849	3					
	8	0,971	3					
3,0	1	0,895	3	0,999	1,602	7	24	5,100
	2	0,993	3					
	3	0,963	3					
	4	0,827	3					
	5	0,895	3					
	6	0,827	3					
	7	0,895	3					
	8	0,946	3					
3,5	1	0,863	3	0,999	1,516	7	24	5,100
	2	0,729	3					
	3	0,895	3					
	4	0,827	3					
	5	0,993	3					
	6	0,863	3					
	7	0,807	3					
	8	0,895	3					
4,0	1	0,963	3	0,999	2,638	7	24	5,100
	2	0,927	3					
	3	0,630	3					
	4	0,827	3					
	5	0,927	3					
	6	0,827	3					
	7	0,849	3					
	8	0,848	3					
4,5	1	0,801	3	0,999	1,248	7	24	5,100
	2	0,885	3					
	3	0,946	3					
	4	0,811	3					
	5	0,939	3					
	6	0,976	3					
	7	0,962	3					
	8	0,791	3					
5,0	1	0,918	3	0,999	2,328	7	24	5,100
	2	0,789	3					
	3	0,827	3					
	4	0,860	3					
	5	0,908	3					
	6	0,863	3					
	7	0,807	3					
	8	0,926	3					

Tabla 57. (Continuación)

Estándar ($\mu\text{g Pb/L}$)	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
6,0	1	0,849	3	0,999	2,374	7	24	5,100
	2	0,801	3					
	3	0,927	3					
	4	0,630	3					
	5	0,848	3					
	6	0,827	3					
	7	0,953	3					
	8	0,840	3					
7,0	1	0,920	3	0,999	0,967	7	24	5,100
	2	0,939	3					
	3	0,916	3					
	4	0,842	3					
	5	0,958	3					
	6	0,946	3					
	7	0,924	3					
	8	0,895	3					

Shapiro-Wilk: $W_{(\alpha, N-1)} = W_{(0,05, 4)}$ // Levene: $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 7, 24)}$, donde, K = 8 número de días, N = 4 lecturas de la absorbancia

Tabla 58. Coeficiente de Correlación de Pearson para la Precisión Intermedia de As y Pb

	As	Pb
Correlación de Pearson	0,99975	0,99966
N	8	9

N = niveles de la curva de calibración

Tabla 59. Coeficiente de Regresión, Coeficiente de Determinación y Coeficiente de Determinación Ajustado para la Precisión Intermedia de As y Pb

Elemento	r	R ²	R ² ajustada
As	0,99975	0,99949	0,99941
Pb	0,99966	0,99931	0,99921

Tabla 60. Análisis de regresión para el modelo $y = \beta_0 + \beta_1 x$ para la Precisión Intermedia de As y Pb

Elemento		Coeficientes no estandarizados		t calculado	t tabulado
		B	Error típico.		
As	Estándar	0,00361	$3,3138 \times 10^{-05}$	108,895	2,000
Pb	Estándar	0,02823	0,00028	100,790	2,021

As: $t_{(\alpha/2, N-2)} = t_{(0,025, 46)}$, donde, N = (8 niveles de la curva de calibración)x(6 lecturas de la absorbancia) // Pb: $t_{(\alpha/2, N-2)} = t_{(0,025, 34)}$, donde, N = (9 niveles de la curva de calibración)x(4 lecturas de la absorbancia)

Tabla 61. ANOVA de un factor para Arsénico y Plomo de la Precisión Intermedia

Elemento		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculado	F tabulado
As	Regresión	0,004	1	0,004	11858,077	5,990
	Residual	0,000	6	0,000		
	Total	0,004	7			
Pb	Regresión	0,017	1	0,017	10158,530	5,590
	Residual	0,000	7	0,000		
	Total	0,017	8			

As: $F_{(\alpha, 1, n-2)} = F_{(0,05, 1, 46)}$, donde, N = (8 niveles de la curva de calibración)x(6 lecturas de la absorbancia) // Pb: $F_{(\alpha, 1, n-2)} = F_{(0,05, 1, 34)}$, donde, N = (9 niveles de la curva de calibración)x(4 lecturas de la absorbancia)

- LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Tabla 62. Prueba de Levene para las tres curvas de calibración a emplear en el Límite de detección y cuantificación de As y Pb

Elemento	Estándar (µg/L)	Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		F calculado	gl1	gl2	F tabulado
As	2,0	0,000	2	15	4,900
	3,0	2,321	2	15	4,900
	4,0	0,000	2	15	4,900
	5,0	1,344	2	15	4,900
	6,0	0,625	2	15	4,900
	7,0	4,333	2	15	4,900
Pb	1,5	0,250	2	9	5,700
	2,0	2,437	2	9	5,700
	2,5	0,250	2	9	5,700
	3,0	0,661	2	9	5,700
	3,5	1,000	2	9	5,700
	4,0	5,475	2	9	5,700

As: $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 2, 15)}$, // Pb: $F_{(\alpha, k-1, (K*N)-K)} = F_{(0,05, 2, 9)}$, donde, K = 3 curvas de calibración, N= lecturas de la absorbancia (6 para As y 4 para Pb)

- EXACTITUD DEL MÉTODO DE ARSÉNICO Y PLOMO

Tabla 63. Prueba t para el porcentaje de recuperación de As en el termoformado CM 4575-7

Termoformado	Valor de prueba = 100					
	t calculada	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
CM 4575-7	-1,411	8	0,196	-1,7956	-4,7296	1,1384

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

Tabla 64. Prueba t para el porcentaje de recuperación de Pb en termoformado MPER 183

Termoformado	Valor de prueba = 100					
	t calculada	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
MPER 183	-5,507	8	0,001	-3,5600	-5,0507	-2,0693

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

Tabla 65. Prueba t para el porcentaje de recuperación de Pb en película flexible CM 7138-7 nativa

Película flexible	Valor de prueba = 100					
	t calculada	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
CM 7138-7 nativa	6,199	8	0,000	5,1633	3,2425	7,0841

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

ANEXO 6. Determinación de la estabilidad de los metales

Tabla 66. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la estabilidad durante 7 días de un estándar de 8,0 µg/L de As

Réplica	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
1	1	0,912	5	0,986	0,853	6	35	5,900
	2	0,958	5					
	3	0,809	5					
	4	0,920	5					
	5	0,907	5					
	6	0,958	5					
	7	0,853	5					
2	1	0,842	5	0,986	5,500	6	35	5,900
	2	0,640	5					
	3	0,827	5					
	4	0,927	5					
	5	0,831	5					
	6	0,866	5					
	7	0,827	5					
3	1	0,950	5	0,986	0,813	6	35	5,900
	2	0,876	5					
	3	0,751	5					
	4	0,958	5					
	5	0,866	5					
	6	0,815	5					
	7	0,920	5					

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

Tabla 67. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar la parametricidad de la estabilidad durante 7 días de un estándar de 3,0 µg/L de Pb

Réplica	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
1	1	0,982	3	0,999	2,511	6	21	5,100
	2	0,848	3					
	3	0,763	3					
	4	0,724	3					
	5	0,979	3					
	6	0,849	3					
	7	0,982	3					
2	1	0,841	3	0,999	1,861	6	21	5,100
	2	0,895	3					
	3	0,895	3					
	4	0,938	3					
	5	0,894	3					
	6	0,991	3					
	7	0,989	3					
3	1	0,827	3	0,999	2,401	6	21	5,100
	2	0,945	3					
	3	0,933	3					
	4	0,927	3					
	5	0,971	3					
	6	0,863	3					
	7	0,895	3					

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

Tabla 68. Prueba t para la estabilidad durante 7 días de estándar de 8,0 µg/L de As y estándar de 3,0 µg/L de Pb

Estándar	Valor de prueba = 0,0359 (As) y 0,1023(Pb)						
	t calculada	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
					Inferior	Superior	
8,0 µg As/L	0,037	125	0,971	0,0000	-0,0006	0,0006	
3,0 µg Pb/L	-0,059	83	0,953	-0,0000	-0,0009	-0,0008	

As: $t_{(\alpha, n-1)} = t_{(0,05, 125)}$, donde, n = (7días)x(3 réplicas)x(6 lecturas absorbancia), $t_{\text{tabulada}} = 1,645$ // Pb: $t_{(\alpha, n-1)} = t_{(0,05, 83)}$, donde, n = (7días)x(3 réplicas)x(4 lecturas absorbancia), $t_{\text{tabulada}} = 1,658$

✓ DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD EN MUESTRAS

Tabla 69. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar parametricidad de la estabilidad de As en el termoformado CM 4574-7 durante 7 días

Réplica	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W Tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
1	1	0,831	5	0,986	3,513	6	35	5,900
	2	0,640	5					
	3	0,827	5					
	4	0,640	5					
	5	0,822	5					
	6	0,640	5					
	7	0,496	5					
2	1	0,866	5	0,986	1,384	6	35	5,900
	2	0,866	5					
	3	0,640	5					
	4	0,683	5					
	5	0,683	5					
	6	0,853	5					
	7	0,496	5					
3	1	0,775	5	0,986	4,783	6	35	5,900
	2	0,775	5					
	3	0,496	5					
	4	0,683	5					
	5	0,683	5					
	6	0,640	5					
	7	0,683	5					

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

Tabla 70. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar parametricidad de la estabilidad de Pb en el termoformado CM 4574-7 durante 7 días

Réplica	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
1	1	0,854	3	0,999	1,913	6	21	5,100
	2	0,827	3					
	3	0,860	3					
	4	0,630	3					
	5	0,979	3					
	6	0,895	3					
	7	0,989	3					
2	1	0,849	3	0,999	0,840	6	21	5,100
	2	0,840	3					
	3	0,991	3					
	4	0,963	3					
	5	0,895	3					
	6	0,927	3					
	7	0,939	3					
3	1	0,963	3	0,999	0,696	6	21	5,100
	2	0,827	3					
	3	0,911	3					
	4	0,963	3					
	5	0,807	3					
	6	0,979	3					
	7	0,992	3					

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

Tabla 71. Prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para evaluar parametricidad de la estabilidad de Pb en la Película Flexible CM 7138-7 nativo, durante 7 días

Réplica	Día	Shapiro-Wilk			Homogeneidad de Varianzas (Levene)			
		W calculado	gl	W tabulado	F calculado	gl1	gl2	F tabulado
1	1	0,630	3	0,999	4,698	6	21	5,100
	2	0,781	3					
	3	0,863	3					
	4	0,827	3					
	5	0,811	3					
	6	0,863	3					
	7	0,729	3					
2	1	0,849	3	0,999	1,545	6	21	5,100
	2	0,840	3					
	3	0,630	3					
	4	0,630	3					
	5	0,945	3					
	6	0,863	3					
	7	0,863	3					
3	1	0,849	3	0,999	4,110	6	21	5,100
	2	0,907	3					
	3	0,729	3					
	4	0,863	3					
	5	0,895	3					
	6	0,729	3					
	7	0,945	3					

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

Tabla 72. Prueba t para la estabilidad durante 7 días de As y Pb en el Termoformado CM 4574-7 y de Pb en la Película Flexible CM 7138-7 Nativo

Estándar	Valor de prueba = 0,0046 (As), 0,0691 (Pb en termoformado) y 0,0598 (Pb en película flexible)					
	t calculada	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
As en Termoformado CM 4574-7	0,241	125	0,810	0,0000	-0,0002	0,0003
Pb en Termoformado CM 4574-7	0,083	83	0,954	0,0000	-0,0007	0,0008
Pb en Película Flexible CM 7138-7 Nativo	-0,057	83	0,954	-0,0000	-0,0005	-0,0005

As: $t_{(\alpha, n-1)} = t_{(0,05, 125)}$, donde, n = (7días)x(3 réplicas)x(6 lecturas absorbancia), t tabulada = 1,645 // Pb: $t_{(\alpha, n-1)} = t_{(0,05, 83)}$, donde, n = (7días)x(3 réplicas)x(4 lecturas absorbancia), t tabulada = 1,658

ANEXO 7. Determinación de arsénico y plomo por absorción atómica

- ✓ OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DEL HORNO DE GRAFITO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO

Tabla 73. Optimización de la temperatura de calcinación y atomización del horno de grafito para la determinación de Pb

Etapa	Temperatura (°C)	$\bar{A} \pm IC$	CV (%)
Calcinación	500	0,1628 ± 0,0093	4,85
	550	0,1887 ± 0,0087	3,92
	600	0,1808 ± 0,0145	6,80
	650	0,1864 ± 0,0084	3,81
	660	0,1899 ± 0,0053	2,37
	670	0,1930 ± 0,0072	3,16
	680	0,1942 ± 0,0032	1,39
	690	0,1968 ± 0,0058	2,49
	700	0,2069 ± 0,0028	1,16
	710	0,1703 ± 0,0037	1,82
	720	0,1598 ± 0,0075	4,01
	730	0,1540 ± 0,0086	4,74
	740	0,1461 ± 0,0107	6,23
	750	0,1409 ± 0,0037	2,20
Atomización	800	0,1495 ± 0,0055	3,14
	1000	0,0270 ± 0,0068	21,48
	1100	0,1290 ± 0,0348	22,95
	1200	0,1532 ± 0,0080	4,44
	1300	0,1459 ± 0,0175	10,21
	1400	0,1629 ± 0,0135	7,06
	1500	0,1778 ± 0,0081	3,88
	1600	0,1709 ± 0,0151	7,49
	1700	0,1609 ± 0,0117	6,15

Tabla 74. ANOVA de un factor para las 5 muestras de termoformados (MBRA 383, MPER 183, CM 4574 – 7, CM 523 – 7 y CM 7951 – 5) con concentración de µg/Kg de Plomo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculado	F tabulado
Inter-grupos	1031,779	4	257,945		
Intra-grupos	39,265	10	3,927	65,693	3,480
Total	1071,045	14			

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

Tabla 75. ANOVA de un factor para las 3 muestras de materia prima de termoformados (MBRA 383, CM 523 – 7 y FIBRA DE FIQUE) con concentración de µg/Kg de Plomo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculado	F tabulado
Inter-grupos	87,744	2	43,872		
Intra-grupos	19,451	6	3,242	13,533	5,140
Total	107,195	8			

$F_{\text{calculado}}(\alpha, n-1, n*(k-1)) \leq F_{\text{tabulado}}(0,05, 25, 6)$, donde, n = 3 muestras y k = 3 réplicas de muestra

ANEXO 8. Certificados de presentación del trabajo

Certificado de presentación modalidad oral (ingles) en el **43rd IUPAC World Chemistry Congress** – Chemistry and the Environment, General Oral Session V, 4 de Agosto del 2011 a las 11:10 am.

El abstract se encuentra en: IUPAC 2011 Abstracts Book, pag 393, ref 1102. En: http://www.iupac2011.org/Pages/Abstracts_Book.pdf

1102. Determination of arsenic in flexible thermoformed and biodegradable films by atomic absorption spectrometry.

Leidy F Alvira⁽¹⁾, lefam28@hotmail.com, Calle 5 No. 4 - 70, Popayán Cauca 190002, Colombia ; Maite Rada-Mendoza⁽¹⁾; Olga L Hoyos⁽¹⁾; Héctor S Villada⁽²⁾. (1) Departamento de Química, Universidad del Cauca, Popayán 190002, Colombia (2) Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca, Popayán 190002, Colombia.

Arsenic was determined in samples of thermoformed and flexible biodegradable films obtained from natural compounds (cassava flour and starch, sisal fiber, PLA, and glycerol, among others), which developed as an industrial solution, with the objective of replacing synthetic plastics, as they have the advantage of quick and easy degradation of waste, without causing an adverse impact on the environment; however during the obtaining of raw materials or in the manufacturing process, can be acquire a possible contamination with heavy metals, making the determination necessary of them. Arsenic, particularly hazardous, can interact with the molecular mechanisms and by future applications of the biopolymers, can enter in the food chain, and accumulate in living organisms Samples of thermoformed (HMC 1, Nataima 31, CM 4574-7) and biodegradable flexible films (SM 707-17 Hydrolyzed, SM Native 707-17, CM 7138-7 Native) were analyzed by atomic absorption spectrometry-generator hydride, making the quantification by calibration curve at 193.7 nm; prior to this quantification, we performed the implementation and standardization of the analytical method, determining the statistical quality parameters (LOD, LOC, linear range, sensitivity calibration, precision and accuracy). Additionally, acid digestion with reflux was optimized for samples (HNO₃: HClO₄ ratio 3:1 at 70°C for 3 hours for thermoformed and 45 minutes for flexible films.) The results were analyzed using SPSS. Arsenic concentrations determined are in the order of ppb, however, there is no existing a legislation to establish the allowable values for these biopolymers about this element.

Keywords: *Thermoformed, Flexible Films, Biodegradable Polymers, AAS, Hydride Generator, Arsenic.*



*The International Union of Pure and Applied Chemistry
and
The Puerto Rico Chemists' Association*



recognize

Leidy Alvira

*for presenting a scientific paper/poster during the
43rd IUPAC World Chemistry Congress*

*held in San Juan, Puerto Rico
July 31st - August 5th, 2011*

Gabriel Infante, PhD
President, 43rd World Chemistry Congress



Jorge L. Colón, PhD
Chair, Scientific Program Committee

Certificado de presentación modalidad oral (español) en el **XIII Encuentro Nacional de Estudiantes de Química** – 14 de Abril del 2011 a las 10:30 am.

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

Determinación de arsénico en termoformados y películas flexibles biodegradables por EAA.

F. Alvira^(a), M. Rada-Mendoza^(a); O. L Hoyos^(a); H. Villada^(b). (a) Departamento de Química, FACNED, Universidad del Cauca, Popayán. (b) Departamento de Ing. Agroindustrial, FACA, Universidad del Cauca, Popayán.

Introducción. Los termoformados y las películas flexibles biodegradables obtenidos a partir de compuestos naturales, se han desarrollado como una solución industrial, cuyo objetivo es el de sustituir los plásticos sintéticos que causan *un gran problema ambiental*^{1, 2}. Estos productos biodegradables, presentan una rápida y fácil degradación, y no producen residuos que causen un impacto desfavorable para el ambiente; sin embargo, durante la obtención de la materia prima (harina y almidón de yuca, fibra de fique, PLA, glicerol, entre otros) ó en el proceso de manufactura, puede adquirirse una posible contaminación con metales pesados, por lo que se hace necesario realizar la determinación de los mismos.

Metodología. Se determinó arsénico en muestras de termoformados y películas flexibles biodegradables por espectrometría de absorción atómica-generador de hidruros; previo a ésta cuantificación, se realizó la implementación y estandarización del método analítico, en el cual se determinaron los parámetros de calidad estadística (LD, LC, intervalo lineal, sensibilidad de calibración, precisión y exactitud), quienes establecen el rendimiento del método para así poder cuantificar el arsénico en cada una de las muestras. Durante la estandarización, se realizó una digestión ácida con reflujo, optimizando las condiciones de mezcla de ácidos nítrico:perclórico, la temperatura y el tiempo de digestión. Posteriormente, a la muestra digestada se le adicionó ácido

sulfámico, eliminando la presencia de óxidos de nitrógeno. Finalmente, se cuantificó por curva de calibración a 193,7 nm.

Resultados. Para la digestión de los termoformados y las películas flexibles se escogió la mezcla de HNO₃:HClO₄ (3:1) a 70°C, durante 3 horas para los termoformados y 45 minutos para las películas flexibles, obteniendo el rango de concentraciones de arsénico que se muestran en la Tabla 1.

Muestra Biodegradable		Rango [As] (ppb)
Termoformados	HMC-1	1 - 5
	Nataima 31	
	CM 7951-5	
Películas Flexibles	SM 707-17 Hidrolizado	1 - 4
	SM 707-17 Nativo	
	CM 7138-7 Nativo	

Tabla 1. Rango de concentración (ppb) en las muestras de biopolímeros.

Conclusión. Se estandarizó un método analítico sensible, que permitió cuantificar el arsénico en los polímeros biodegradables. Las concentraciones de As encontradas, se pueden considerar como bajas, del orden de ppb, sin embargo no hay una normativa vigente para dichos biopolímeros.

Bibliografía.¹ SHIMAO, M. Biodegradation of plastics. Current Opinion in Biotechnology, 2001, vol. 12, p. 242-247.

² RUIZ, G. Montoya, C. Paniagua, M. Degradabilidad de un polímero de almidón de yuca. Revista EIA, Medellín, 2009, ISSN 1794-1237, no. 12, p. 67-78.



Universidad de Nariño



International Year of
CHEMISTRY
2011

CERTIFICAN QUE:

Leydi Fernanda Alvira Manios
C.C 1.061.705.866

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



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

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

JUAN JOSÉ LOZADA CASTRO
Director Departamento de Química

ESTEFANNI CAGUAZANGO MONTENEGRO
Presidenta AEQU
COMITÉ ORGANIZADOR

ANEXO 9. Carta de presentación de artículo a revista

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial



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

CERTIFICA QUE:

Los autores **Leidy Fernanda Alvira M., Maite Del Pilar Rada-Mendoza, Olga Lucía Hoyos S. y Héctor Samuel Villada C.** postularon en la Revista Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial de la Universidad del Cauca el artículo titulado **"CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO POR ABSORCIÓN ATÓMICA EN TERMOFORMADOS Y PELÍCULAS FLEXIBLES BIODEGRADABLES ELABORADAS A PARTIR DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)"**, el cual posterior a un proceso de evaluación y corrección fue aprobado para publicarse en el Volumen 10 No 1 de la revista

Para constancia se firma en Popayán a los veintiséis (26) días del mes de Marzo de 2012.

Atentamente,

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

HÉCTOR SAMUEL VILLADA CASTILLO, Ph. D.
Director