

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR UV Y CLAE PARA LA
EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE PERÓXIDO DE BENZOÍLO Y ANHÍDRIDO
MALEICO EN UN BIOPOLÍMERO A BASE DE ALMIDÓN DE YUCA MODIFICADO**

SANDRA VIVIANA CUELLAR MORA

CLAUDIA MARCELA PAZ MERA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2013**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR UV Y CLAE PARA LA
EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE PERÓXIDO DE BENZOÍLO Y ANHÍDRIDO
MALEICO EN UN BIOPOLÍMERO A BASE DE ALMIDÓN DE YUCA MODIFICADO**

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

**SANDRA VIVIANA CUELLAR MORA
CLAUDIA MARCELA PAZ MERA**

DIRECTOR

Ph.D. Fabio Cabezas

ASESOR

M.Sc Fernando J. Hernández

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS BIOACTIVOS

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS (QCB)
POPAYÁN
2013**

Nota de aceptación.

Director.

Ph. D. Fabio Antonio Cabezas

Jurado.

Ph.D. Ricardo Benítez Benítez

Jurado.

Ph.D. Jaime Martin Franco

Popayán, 2 de mayo de 2013

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ECUACIONES	
LISTA DE ANEXOS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo General	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	19
3.1 Empaque	19
3.1.1 Clasificación de los empaques	19
3.2 Empaques activos y biodegradables	20
3.2.1 Características de los empaques biodegradables	21
3.3 Biodegradabilidad	21
3.4 Componentes poliméricos del empaque	22
3.4.1 Ácido poliláctico	22
3.4.2 Policaprolactona	22
3.5 Aditivos del empaque	23
3.5.1 Anhídrido maleico	23
3.5.2 Peróxido de benzoílo	24
3.6. Fundamentos y mecanismos de la migración	25
3.6.1 Migración	25
3.6.2 Factores que influyen en el fenómeno de la migración	27
3.6.3 Determinación de la migración	28
3.7 Legislación de la migración	28
3.7.1 Comunidad Europea	29
3.7.2 EE.UU	30
3.7.3 Mercosur	31
3.7.4 Normas Colombianas	32
3.8 Técnicas instrumentales para la determinación de la migración	32
3.8.1 Precisión	33
3.8.2 Repetibilidad	33
3.8.3 Precisión intermedia	33
3.8.4 Linealidad	33
3.8.5 Límite de detección LOD	33
3.8.6 Límite de cuantificación LOQ	33
3.9 Fundamentos de los diseños de experimentos para el análisis estadístico de los resultados	33

3.9.1	Diseño estadístico de experimentos	34
3.9.2	Diseños factoriales a dos niveles	35
3.9.3	Diseños factoriales con tres factores a dos niveles	35
3.10	Manejo estadístico de datos	37
3.10.1	pruebas paramétricas:	37
3.10.2	pruebas no paramétricas:	40
3.10.3	Estudio de la línea de tendencia central	39
4	METODOLOGÍA	43
4.1	Reactivos, equipos y material de vidrio	43
4.1.1	Reactivos	44
4.1.2.	Equipos	44
4.1.3	Material de Vidrio	44
4.2	Comprobación de la calibración del material volumétrico de vidrio	45
4.3	Implementación de los parámetros calidad para las técnicas analíticas en CLAE y UV-Vis	45
4.3.1	Límite de detección	45
4.3.2	Límite de cuantificación	46
4.3.3	Repetibilidad	46
4.3.4	Precisión intermedia	45
4.4	Preparación de soluciones estándar	46
4.4.1.	Curvas para el equipo de CLAE	46
4.4.2.	Curvas para el equipo de UV-Vis	46
4.5	Obtención de la muestra	47
4.6	Diseño experimental	48
4.7	Evaluación de la migración	48
4.7.1	Migración global	48
4.7.2	Migración específica	49
4.8	Cuantificación de compuestos evaluados en la migración	49
4.8.1.	Determinación de AM y PB por (CLAE)	48
4.8.2.	Determinación de AM y PB en el simulante D por Uv-Vis	47
4.9	Evaluación estadística de resultados	49
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1	Verificación de la calibración del material de vidrio	50
5.2	Determinación de parámetros de calidad para las técnicas analíticas	51
5.2.1.	Van Deemter	51
5.2.2.	Límite de detección y cuantificación	51
5.2.3	Repetibilidad	53
5.2.4	Precisión intermedia	53
5.3	Linealidad y Rango	54
5.3.1	Curvas para el equipo de CLAE	56
5.3.1.1	Análisis de la curva de AM y PB por CLAE.	56
5.3.2	Curvas para el equipo de UV-Vis	58
5.4	Extracción líquido-líquido.	59

5.5	Preparación de la muestra	60
5.6	Evaluación de la migración	60
5.6.1.	Migración global	60
5.6.2.	Migración específica	61
6	CONCLUSIONES	75
7	BIBLIOGRAFIA	76

Sandra Viviana Cuellar

AGRADECIMIENTOS

El presente documento que hace parte de un trabajo colectivo es producto de una continua reflexión como investigadores en pro de mejorar la realidad investigativa de nuestra Universidad. En ese camino de formación expreso mis agradecimientos a Dios, por otorgarme la vida para participar del devenir de las cosas, y entender y sentir mi función como sujeto social en el ámbito de la ciencia, igualmente siento junto a mi a mis padres, Henry Cuellar Tobar y Cecilia Mora Parra, a mis hermanos , Iván Fernando, Henry Andrés y a los maestros y maestras que a lo largo de mi camino universitario me brindaron sus conocimientos y me formaron como Químico de la Universidad del Cauca, a todos esos maestros y de manera especial a aquellos que han participado en la última etapa de este trabajo de investigación **“IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR UV Y CLAE PARA LA EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE PERÓXIDO DE BENZOÍLO Y ANHÍDRIDO MALÉICO EN UN BIOPOLÍMERO A BASE DE ALMIDÓN DE YUCA MODIFICADO”**director: Fabio A: Cabezas, asesor: Fernando J. Hernández y la Doctora: Elena *Stanchenko*, Universidad Industrial de Santander, quien nos acogió en su laboratorio para la realización de la investigación; A ellos mi mano firme de amistad y respeto, a Claudia M. Paz amiga en el duro afán de la investigación y la vida, y a mis amigos de carrera en el corazón.

Claudia Marcela Paz

DEDICATORIA

El esfuerzo y la dedicación en el presente trabajo dieron sus frutos y de todo corazón deseo dedicar este nuevo logro en mi vida a mis padres, Eduardo Antonio Paz y Eugenia Mera, quienes son el motor de mi vida y gracias a su apoyo y amor he logrado salir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme culminar este largo proceso en el cual he conocido personas que se llevan toda mi gratitud, en especial a nuestro director de trabajo de grado Fabio Cabezas, quien siempre estuvo dispuesto a atender nuestras inquietudes, a Fernando Hernández nuestro asesor sin el cual este proyecto no se hubiera podido realizar, a la doctora Elena Stanshenko y su equipo de trabajo por brindarnos su colaboración y recibirnos en el laboratorio CROMM-MASS en la Universidad Industrial de Santander, y por supuesto a mi Universidad del Cauca por brindarme educación superior de alta calidad.

Un agradecimiento especial a la familia Acosta Mera quienes se convirtieron en mí otra familia, a mi hermano Adrian Paz que siempre estuvo dispuesto a colaborarme y me dio un motivo más para seguir adelante, a mis compañeros de carrera y amigos, y por ultimo pero no menos importante a Sandra Viviana por permitirme ser su amiga y compartir todas las experiencias que nos deja este largo camino. Para ellos y todos los que han pasado por mi vida aportando su sabiduría GRACIAS DE TODO CORAZÓN, el señor los bendiga y los proteja siempre.

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1 Lista de monómeros u otras sustancias de partida autorizadas para usarse en la fabricación de materiales y objetos plásticos	29
Tabla 2 Cronología de la legislación Europea	30
Tabla 3 Condiciones temporales de la temperatura de uso	31
Tabla 4 Clasificación de los alimentos y simulante a usar	32
Tabla 5 Tabla de combinaciones de tratamientos del diseño experimental 2 ³	35
Tabla 6 Condiciones óptimas para los compuestos de acuerdo a la literatura	45
Tabla 7 Diseño experimental de preparación del polímero	48
Tabla 8 Calibración del material de vidrio	50
Tabla 9 t tabulado para 95% de confianza:	50
Tabla 10 Flujo Vs H (Van Deemter)	51
Tabla 11 LDO y LOQ para anhídrido maleico	52
Tabla 12 LDO y LOQ para Peróxido de benzoílo	52
Tabla 13 Valores Error típico y desviación estándar	53
Tabla 14 Repetibilidad del método	53
Tabla 15 Datos precision intermedia UV-Vis	54
Tabla 16 Precision intermedia Uv-Vis	54
Tabla 17 Concentraciones Linealidad y Rango CLAE	55
Tabla 18 Concentraciones Linealidad y Rango UV-Vis	56
Tabla 19 Curva calibración CLAE	57
Tabla 20 Prueba de normalidad para la curva de calibración CLAE	57
Tabla 21 Curva calibración UV-Vis	58
Tabla 22 Prueba de normalidad para la curva de calibración UV-Vis	59
Tabla 23 Porcentajes de recuperación con diferentes solventes	59
Tabla 24 Absorbancia a diferentes tiempos de extracción	60
Tabla 25 Parámetros para la extracción liquido- líquido	60
Tabla 26 ppm obtenidos para la migración global	61
Tabla 27 Cuantificación Simulante A	62
Tabla 28 Prueba de normalidad para simulante A, presentación bolsa	63
Tabla 29 Prueba Multivariante	63
Tabla 30 Pruebas de los efectos inter-sujetos	64
Tabla 31 Estadístico de Contraste-Prueba de Mann-Whitney	65
Tabla 32 Prueba de normalidad simulante A, presentación pellet	65
Tabla 33 Concentración de AM encontrada con la variación de factores	66
Tabla 34 Cuantificación Simulante B	67
Tabla 35 Variación de los factores AM y PB	69
Tabla 36 Cuantificación del simulante C	69
Tabla 37 Migración de AM con las diferentes condiciones de preparación del biopolímero.	71
Tabla 38 Cuantificación simulante D	72

LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1	Empaque primario	19
Figura 2	Empaque secundario	20
Figura 3	Empaque terciario	20
Figura 4	Empaque activo	20
Figura 5	Estructura Acido poliláctico	22
Figura 6	Estructura policaprolactona	22
Figura 7	Estructura del Anhídrido Maleico	23
Figura 8	Mecanismo de la reacción de acople del anhídrido Maleico con el ácido poliláctico y el almidón.	24
Figura 9	Estructura del Peróxido de benzoílo	24
Figura 10	Mecanismo de la reacción de peróxido de benzoílo en la polimerización del estireno	25
Figura 11	Interacciones entre el Entorno-Envase-Alimento y sus consecuencias	27
Figura 12	Representación de un sistema en estudio en DDE: factores (x), respuestas (y)	34
Figura 13	Representación gráfica del diseño de experimentos 2 ³	36
Figura 14	Posibles casos de interacción	37
Figura 15	Equipo Cromatografía líquida de alta Eficiencia (HP series 1200)	43
Figura 16	Equipo UV-Vis Génesis	43
Figura 17	Obtención del Biopolímero, Laboratorio de Reología, Universidad del Cauca	48
Figura 18	Curva Van Deemter H Vs Flujo	51
Figura 19	Cromatograma AM y PB	56
Figura 20	Muestras, tratamiento 8 (bolsa y pellet)	60

LISTA DE ECUACIONES

		pág.
Ecuación 1	Primera ley de Fick	26
Ecuación 2	Segunda ley de Fick	26
Ecuación 3	Test de Shapiro-Wilk	38
Ecuación 4	Prueba de Tukey	39
Ecuación 5	Prueba de Tukey	39
Ecuación 6	U de Mann Whitney – Wilcoxon	40
Ecuación 7	U de Mann Whitney – Wilcoxon	41
Ecuación 8	Estadístico de prueba Z	41
Ecuación 9	Coficiente de correlación de Spearman, ρ	41
Ecuación 10	Aproximación de ρ a la distribución t de Student	41
Ecuación 11	Límite de detección (LOD)	45
Ecuación 12	Límite de cuantificación (LOQ)	46
Ecuación 13	Porcentaje de migración global	49
Ecuación 14	Coficiente de variación	51
Ecuación 15	Repetibilidad	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva Precisión intermedia	53
Gráfico 2	Linealidad CLAE	55
Gráfico 3	Linealidad UV-Vis	55
Gráfico 4	Curva de calibración CLAE	57
Gráfico 5	Curva calibración UV-Vis	58
Gráfico 6	Interacción AM * PB, simulante A	64
Gráfico 7	Interacción AM * PB, Simulante B	68
Gráfico 8	Interacción AM * PB, simulante C	70
Gráfico 9	Interacción AM * PB, Simulante D	73

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo A	Curvas de calibración CLAE	81
Anexo B	Pruebas no paramétricos para los factores, simulante A	82
Anexo C	Pruebas simulante A, presentación pellet	82
Anexo D	Prueba de normalidad simulante B, presentación bolsa	84
Anexo E	Pruebas no paramétricas simulante B	86
Anexo F	Pruebas de normalidad simulante C	87
Anexo G	Pruebas multivariante simulante C	88
Anexo H	Pruebas no paramétricas simulante C	90
Anexo I	Pruebas de normalidad simulante D	92
Anexo J	Prueba multivariante simulante D	93
Anexo K	Pruebas no paramétricas simulante D	94
Anexo L	Prueba Anova de un factor curva de calibración UV-Vis	95
Anexo M	Cromatogramas	96

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
LMG	Límite de migración global
LME	Límite de migración específica
EE.UU	Estados Unidos
EU	Unión Europea
CEE	Comunidad económica europea
MERCOSUR	Mercado común del sur
FFDCA	Food additives amendment to the federal food, drug, and cosmetic act
NEPA	National environmental policy act
FDA	Food and drug administration
GRAS	Generally recognized as safe
FCS	Food contact substances
UV	Ultravioleta
FID	Detector de ionización de llama
SPSS	Statistical package for the social sciences
PLA	Acido poliláctico
PCL	Policaprolactona
NTC	Norma técnica colombiana
PVC	Cloruro de polivinil
PE	Polietileno
PP	Polipropileno
DEE	Diseño estadístico de experimentos
TDPA	Totally degradable plastic additives
BPM	Buenasprácticas de manufactura
LME (T)	Límite de migración en alimentos o en simulantes alimenticios expresados como grupo o sustancias indicadas
QM	cantidad máxima permitida de sustancias (residual) en el material u objeto expresado como grupo o sustancias indicadas
AM	Anhídrido maleico
PB	Peróxido de benzoílo
CAS	Chemical abstracts service
CFR	Code of federal regulations
TPS	Termoplástico
LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
Sig	Significancia estadística
W	Estadístico de Shapiro-Wilk
gl	Grados de libertad
ASMT	Sociedad americana para pruebas y materiales

RESUMEN

El objetivo principal de los empaques es la preservación y protección de todo tipo de productos, siendo los alimentos y las materias primas el área de mayor prioridad. Estos productos requieren atención dada la contaminación generada por microorganismos en el proceso de manipulación, esta protección se hace utilizando empaques, los cuales generalmente se elaboran a partir de polímeros sintéticos [1]. No obstante, el uso indiscriminado de esta clase de empaques ha generado serios problemas ecológicos fomentando la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos de baja degradabilidad, lo que ha impulsado a la búsqueda de biopolímeros naturales. El aprovechar los recursos naturales como fuente de conservación y reciclaje se convierte en una excelente opción e innovación en el desarrollo de nuevos productos biodegradables. La ventaja de estos nuevos biopolímeros frente a los sintéticos es su total biodegradación en productos como dióxido de carbono, agua y posteriormente en abono orgánico,

Por lo cual el uso de los plásticos biodegradables sirve como vía para controlar el efecto de contaminación, debido a su corto periodo de vida útil, generando pocas emisiones al medio ambiente.

Debido a las ventajas de los plásticos biodegradables las investigaciones se centran actualmente en generar empaques activos donde se prueban diferentes mezclas poliméricas y aditivos, con el fin de obtener un material apropiado para ser utilizado en diferentes tipos de empaques. Dos ejemplos efectivos de las propiedades de los aditivos que permiten mejorar algunas características del biopolímero, debido a su capacidad de cambiar la forma y función son anhídrido maleico el cual hace el papel de agente acoplante para permitir la unión entre algunos componentes que no son compatibles ni química ni termodinámicamente [2], y peróxido de benzoilo componente utilizado como agente iniciador de la reacción entre el acoplante y los demás componentes [3], y que serán objeto de análisis en la presente propuesta. El uso de este tipo de sustancias en la fabricación de biopolímeros puede generar un proceso denominado migración, el cual puede alterar algunas características del producto que está en contacto con el empaque.

En éste proyecto se implementó un método analítico para la evaluación de la migración específica de anhídrido maleico y peróxido de benzoilo utilizados en la fabricación de un biopolímero obtenido a partir de almidón de yuca modificado destinado a proteger el fruto del plátano, teniendo presente que estos nuevos plásticos biodegradables deben cumplir internacionalmente con los requisitos legislativos vigentes tanto a nivel Europeo (Directivas 82/711/CEE, 85/572/CEE y 97/48/CE [4]) como en Colombia NTC 5022 [5] y 4606 [6]. En estas normas se exige no alterar las características organolépticas del alimento y ofrecer al producto una protección microbiana. La diversidad y complejidad en la composición de los alimentos obliga a trabajar con "simulantes de alimentos" para la realización de los análisis de migración. Estos simulantes pueden ser líquidos, disoluciones e incluso sólidos, los cuales deben poseer una capacidad de extracción de los migrantes similar al de los alimentos que simulan, y permitir un análisis más sencillo, ya que con los alimentos surgen limitaciones prácticas como el desconocimiento de la naturaleza de los migrantes, las bajas concentraciones de los mismos dentro de matrices complejas, o la posibilidad de

utilizar un mismo material polimérico para envasar productos de características muy diferentes [7].

En la Directiva Europea 93/8/CEE se definen cuatro tipos de simulantes de alimentos:

- ✓ Simulante A: Agua destilada, para alimentos acuosos con pH mayor a 4,5.
- ✓ Simulante B: Ácido acético al 3% (p/v) en solución acuosa, para alimentos acuosos con un pH menor a 4,5.
- ✓ Simulante C: Etanol al 10% (v/v) en solución acuosa, para alimentos alcohólicos. Esta concentración se ajustará a la graduación alcohólica real del alimento si es superior al 10% (v/v).
- ✓ Simulante D: aceite de oliva rectificado, aceite de girasol, mezcla sintética de triglicéridos (HB 307) para alimentos grasos.

Para realizar la cuantificación de los analitos de interés se uso cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) para los simulantes A, B y C; la cuantificación en el simulante D se llevo a cabo por Espectrofotometría de Ultravioleta Visible (UV- Vis).

Para la interpretación de los datos obtenidos con cada técnica analítica se realizaron estudios estadísticos paramétricos con la ayuda del paquete estadístico IBM SPSS 20 y las líneas de tendencia con la hoja de cálculo MICROSOFT EXCEL.

El análisis de resultados para los datos de migración para anhídrido maleico y peróxido de benzoílo por CLAE y UV-Vis, se basó en Diseños de experimentos factoriales 2³.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la vida moderna el plástico ha constituido un fenómeno de indudable trascendencia. Hoy en día el hombre vive rodeado de objetos plásticos que en siglos anteriores no eran necesarios para la vida cotidiana. De este modo, surge el problema asociado a la contaminación ambiental, muchas veces producto del desecho de los plásticos de alta y baja densidad, debido a las características moleculares de éstos, ya que presentan una gran resistencia a la degradación ambiental y con mayor razón a la biodegradación, razón por la cual se ha llevado a nuevas investigaciones tecnológicas en la implementación de empaques para cubrir alimentos, desarrollando alternativas para envases amigables con el medio ambiente, reduciendo así la contaminación ambiental.

En la búsqueda de nuevas técnicas para la generación de empaques amigables con el medio ambiente el grupo de investigación **APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS, RESIDUOS Y DESECHOS AGROINDUSTRIALES, ASUBAGROIN** en el laboratorio de reología de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca realizó el proyecto **“Obtención De Un Empaque Activo Para Plátano A Partir De Almidón De Yuca Capsaicina Y Glicerol Por Extrusión Soplado”**[8], para la elaboración de este empaque se utilizó anhídrido maleico y Peróxido de benzoílo, los cuales pueden migrar hacia el alimento y deteriorar algunas de sus propiedades organolépticas, por lo cual se hace necesario la evaluación completa de la migración en los simulantes establecidos por las normas y a temperaturas de 25 y 40°C teniendo en cuenta el clima de las zonas en las que se realiza el cultivo de plátano para el cual está diseñado el empaque.

El elaborar un nuevo polímero biodegradable con adición de compuestos químicos puede generar transferencia de masa de éstas sustancias hacia el alimento deteriorando su calidad, la cual no debe sobrepasar los límites que se han establecido en la legislación europea (Directivas 82/711/CEE, 85/572/CEE y 97/48/CE), y en Colombia por las normas NTC4606 y 5022; estos límites dependen de la toxicología de las sustancias migrantes [9].

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar mediante técnicas analíticas como CLAE y UV la posible migración de peróxido de benzoílo y anhídrido maleico utilizados en la fabricación de un polímero biodegradable generado a base de almidón de yuca modificado.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar los parámetros cromatográficos y las condiciones instrumentales para la implementación del método.
- Estudiar la influencia en la migración específica del peróxido de benzoílo y anhídrido maleico en la relación almidón de yuca modificado y otros copolímeros utilizados en la elaboración del empaque biodegradable utilizando como base las normas técnicas colombianas (NTC 4606 / 5022) y técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta eficiencia.
- Utilizar herramientas como el diseño experimental para planificar los experimentos, comprobar las hipótesis planteadas e identificar las causas de variación; y el paquete estadístico IBM SPSS 20.00 para identificar los principales factores que afectan la migración específica de las sustancias bajo estudio y su posible correlación.

3 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

La sociedad actual no es concebible sin la existencias de empaques, sin ellos sería imposible realizar la distribución de la mayoría de productos que consumimos y mucho menos en las condiciones adecuadas de salubridad, calidad y otras garantías [10]. A continuación se exponen algunas definiciones que serán tratadas en el desarrollo de esta investigación.

3.1 EMPAQUE

Empaque es el nombre genérico para un envase o embalaje. Puede explicarse como un sistema que comprende la preparación de mercancías para su transporte, distribución, almacenamiento, ventas y uso. Dependiendo de sus funciones puede clasificarse como:

- **Empaque al consumidor:** Será obtenido por el consumidor como unidad de venta, desde el punto de venta.
- **Empaque industrial:** Es un empaque para entregar bienes de fabricante a fabricante.

El tipo de empaque utilizado va a depender del producto y su calidad, ya que es un parámetro necesario para la conservación del producto desde el momento de producción hasta la entrega al consumidor o cliente final.

3.1.1 Clasificación de los empaques

Según la función que el envase cumpla, puede ser clasificado en envases primarios, secundarios o terciarios.

- a) **Envase primario o envase de venta:** unidad individual en contacto directo con el alimento, ejemplos de empaques primarios se muestran en la figura 1. Sus principales funciones son contener, proteger y facilitar la distribución y almacenamiento del alimento, además de cumplir con los requerimientos demandados por el consumidor en lo referente a su seguridad y comodidad de uso [11].

Figura 1. Empaque primario [12]



- b) **Envase secundario o colectivo:** utilizado a menudo como protección física del producto. Una caja de cartón corrugado en cuyo interior hay cualquier alimento unitariamente envasado en bolsas de plástico flexible es un ejemplo de envase secundario. Además de ser muy útil en cuestiones de mercadeo y logística, ya que puede llevar diferente información de producción (nº de lote, etc.), el envase secundario facilita el manejo del envase primario durante su almacenamiento y

distribución, protegiéndolo de daños mecánicos como se puede apreciar en la figura 2.

- c) *Envase terciario o de expedición*: incorpora el envase secundario al sistema final de transporte, figura 3. Por ejemplo: pallets, cajas, etc.

Figura 2. Empaque secundario [13]



Figura 3. Empaque terciario [14]



Un mismo envase puede cumplir todas o varias funciones y por lo tanto cumplir características de Envase Primario, Secundario y Terciario.

3.2 Empaques activos y biodegradables

Empaque Activo: tiene como objetivo extender la vida útil de un producto en un anaquel, alertar cuando éste se abre, detectar bacterias o cambiar de color según la temperatura, consumir menos energía. Ser biodegradables y reciclables son algunas de las características de los empaques “inteligentes” y “activos”, los cuales se han convertido en alternativas de uso, ejemplo en las industrias alimentaria y farmacéutica. Un ejemplo de empaque activo se muestra en la figura 4.

Figura 4. Empaque Activo [15]



Empaque biodegradable: Las bolsas biodegradables, a diferencia de las convencionales cuentan con un aditivo especial de última generación denominado TDPA (Totally degradable plastic additives), el cual les permite, una vez desechadas y después de aproximadamente un año que comiencen su proceso de degradación fragmentándose en pedazos cada vez más pequeños, haciendo posible que microorganismos como hongos o bacterias se alimenten del material de la bolsa convirtiéndolo en agua, biomasa (humus), sales minerales y dióxido de carbono. Así mismo las bolsas biodegradables mantienen las mismas características que una tradicional y se pueden reutilizar en casa para propósitos domésticos [16].

Las bolsas 100% biodegradables permiten una degradación completa, garantiza la calidad, la resistencia a la tracción y a la perforación. Al mismo tiempo, satisface la necesidad de control de la duración de la vida útil de los plásticos, tal como se define en la norma ASTM D6954-04. El número de lote impreso en el empaque indica la fecha de fabricación, éstas pueden ser conservadas en condiciones normales de almacenamiento y de utilización durante unos 18 meses, sin ningún tipo de alteración de la estructura o del material [17].

3.2.1 Características de los empaques biodegradables

Una gran cantidad de materiales de empaque están hechos de polietileno (PE) y polipropileno (PP). Estos son biodegradables, pero requieren una gran cantidad de tiempo y condiciones especiales para degradarse. Las empresas de empaque en todo el mundo están llegando a soluciones para sustituir el PE y PP con materiales naturales como el almidón, maíz, pasta de madera y el algodón, la papa, la remolacha de azúcar, soja, tabaco, caña de azúcar, la celulosa y el lignito.

Los elementos biodegradables poseen ciertas características:

- Se componen de recursos renovables.
- Pueden ser cosechados directamente de la naturaleza.
- Se descomponen por completo, con la ayuda de microorganismos cuando se coloca en un área de compostaje [18].

3.3 BIODEGRADABILIDAD

La norma ASTM D 5488-944 define la biodegradabilidad como la capacidad de un material de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua y componentes orgánicos o biomasa, en el cual el mecanismo predominante es la acción enzimática de microorganismos.

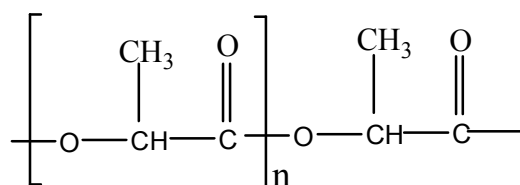
En general, un polímero es biodegradable si su degradación resulta de la acción natural de microorganismos como bacterias, hongos y algas [19]. Existen varios factores requeridos para que pueda darse un proceso de biodegradación: presencia de microorganismos, presencia de aire (en caso de que se requiera), humedad y minerales necesarios, temperatura adecuada dependiendo del tipo de microorganismo (entre 20 °C y 60 °C) y un valor de pH adecuado (entre 5 y 8) [20].

3.4 COMPONENTES POLIMÉRICOS DEL EMPAQUE

3.4.1 Ácido poliláctico (PLA)

Hace algún tiempo se desarrolló el ácido poliláctico, un nuevo polímero originado en el maíz y que puede aplicarse a todo tipo de productos, en los sectores de bebidas, verduras, frutas, granos y otras aplicaciones en medicina. El PLA se deriva de la esterificación de ácido láctico producido por la fermentación [21], en la figura 5 se observa la estructura del ácido poliláctico. En general, el PLA es resistente a la humedad, para los aceites de cocina, disolventes y olores; puede ser procesado por extrusión, inyección, moldeo por soplado o termoformado [22].

Figura 5. Estructura Acido poliláctico



La degradación de éste se lleva a cabo por ruptura en unidades pequeñas de ácido láctico que se encuentra presente en los procesos metabólicos de los seres vivos y se utiliza para síntesis de otros compuestos importantes.

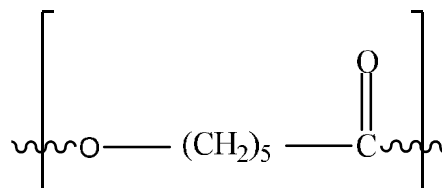
Las sustancias migrantes del PLA pueden incluir ácido láctico, ácido lactoil láctico, otros pequeños oligómeros de PLA y láctidos [23].

3.4.2 Policaprolactona (PCL)

Es un polímero con baja viscosidad y es fácil de procesar [24], es biodegradable de origen petroquímico. Se degrada hidrolíticamente y bajo la acción de algunos microorganismos, y su principal atractivo está en su alta solubilidad, bajo punto de fusión y su gran capacidad de producir mezclas [25].

La policaprolactona tiene una alta permeabilidad del agua, el oxígeno y el dióxido de carbono y sus propiedades mecánicas son comparables a las de polietileno de baja densidad, por consiguiente, es un buen candidato para mejorar las propiedades mecánicas de otros polímeros biodegradables actuando como un aditivo.

Figura 6. Estructura policaprolactona



Al igual que en el caso anterior se degradan por hidrólisis y la velocidad de éste proceso depende de la forma, del tamaño del dispositivo y de los aditivos, la estructura

de PLC se muestra en la figura 6. En el proceso de degradación primero ocurre una ruptura de cadenas, de forma que disminuye el peso molecular, y como resultado, estas cadenas se vuelven más pequeñas [26]. El homopolímero puede degradarse en un período comprendido entre dos y cuatro años, pero la velocidad de degradación puede aumentarse por copolimerización con ácido poliláctico, o por adición de ácido oleico o aminas terciarias, que catalizan la reacción de hidrólisis [27].

3.5 ADITIVOS DEL EMPAQUE

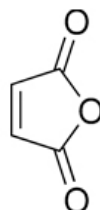
En la industria de los plásticos se conoce desde hace mucho tiempo que la obtención de productos verdaderamente útiles solo es posible si a la matriz polimérica se añaden ciertos aditivos. En general, se consideran aditivos aquellos materiales que van dispersos físicamente en una matriz polimérica, sin afectar a su estructura molecular.

La función que puede cumplir un aditivo en una mezcla polimérica o película biodegradable depende del tipo de aditivo a agregar y del resultado que se desea obtener. Así, entre los aditivos más comunes para polímeros biodegradables se encuentran estabilizantes contra rayos ultravioleta (UV), sustancias inflamables, fungicidas, herbicidas, antioxidantes, fertilizantes, estabilizantes, y otros [28]

3.5.1 ANHÍDRIDO MALEICO

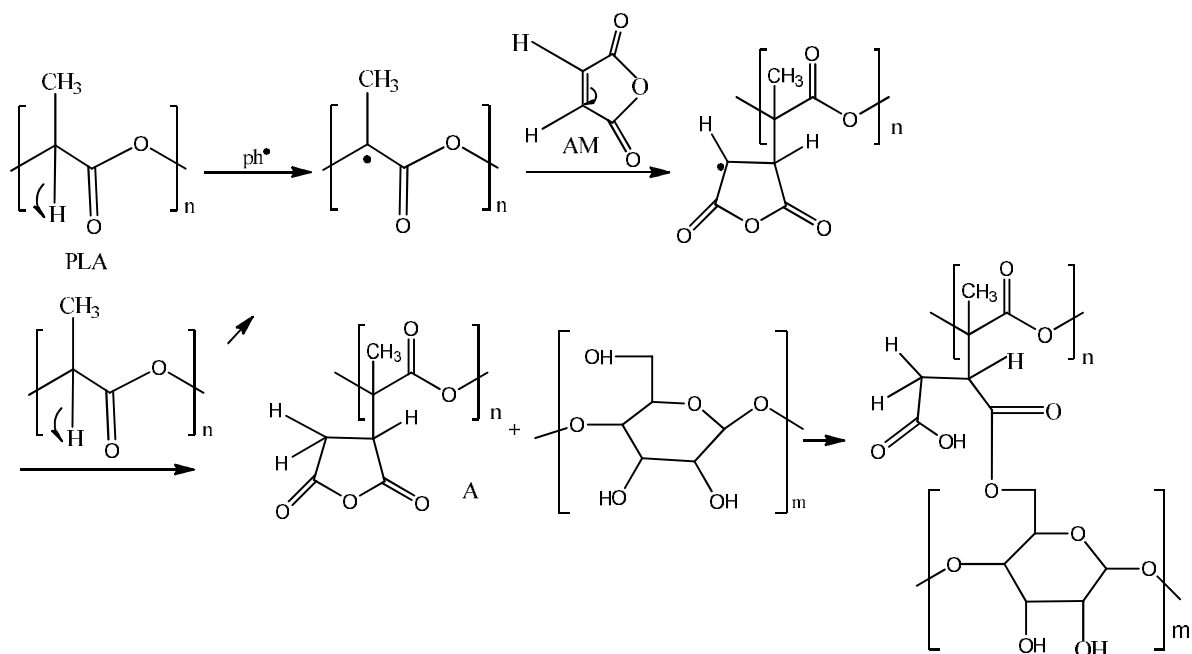
El anhídrido maleico actúa como agente acoplante, el cual tiene como función servir como mediador de fases, es decir, es una sustancia que facilita el acople molecular entre dos fases. Como el ácido Poliláctico y el almidón son incompatibles, en la elaboración del biopolímero a base de almidón de yuca modificado se utilizó anhídrido maleico en diferentes concentraciones como acoplante, éste logra mejorar las propiedades mecánicas y mejora la morfología de las películas resultantes. En la figura 8 puede observarse el mecanismo de la reacción entre el ácido poliláctico, el anhídrido maleico y el almidón. En la figura 7 se muestra la estructura del anhídrido maleico.

Figura 7. Estructura del Anhídrido Maleico



Las principales aplicaciones de anhídrido maleico incluyen la fabricación de resinas de poliéster insaturadas (UPR), que a su vez se utilizan en la producción de ligeros, más fuertes, materiales compuestos de fibra de vidrio para barcos, automóviles, construcción, palas de turbina eólica y una diversa gama de productos de consumo. Es un ingrediente clave en la fabricación de copolímeros que permiten el uso de materias primas más sostenibles [29].

Figura 8. Mecanismo de la reacción de acople del anhídrido maleico con el ácido poliláctico y el almidón.

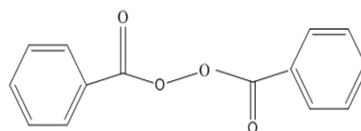


3.5.2 PEROXIDO DE BENZOÍLO

Se emplea en la elaboración de plásticos, cauchos, tintas, productos farmacéuticos y cremas para la piel.

Es usado como iniciador de polimerización y para curar agentes como vinil monómero, acrílicos, estireno y resinas poliéster insaturadas, donde el plastificante y el contenido de agua puede ser tolerado. Éste actúa como un agente iniciador de la reacción, el cual interviene como un tipo de catalizador, para que la reacción acoplante del anhídrido maleico se logre [30].

Figura 9. Estructura del Peróxido de benzoílo

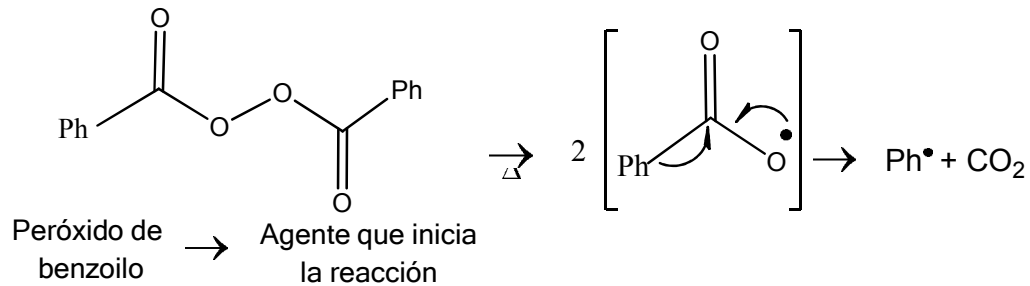


Los radicales peróxido cuya estructura se muestra en la figura 9 son capaces de abrir los dobles enlaces, tanto en el monómero como en la cadena del polímero. Por apertura de un doble enlace y la adición del radical al monómero o cadena de polímero, se genera un nuevo radical el cual, en su turno es capaz de abrir un nuevo doble enlace. Este proceso continua hasta que todos los dobles enlaces se abren y la reacción se detiene automáticamente. Teóricamente esto puede ser posible, pero de hecho las reacciones se van haciendo gradualmente más lentas y eventualmente se

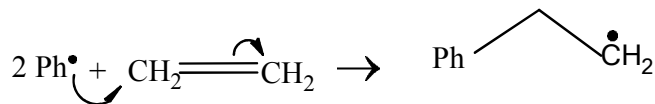
detienen, debido al incremento de inmovilidad de los reactivos en la red entrecruzada creciente [31].

Un ejemplo de reacción usando el peróxido de benzoilo es la polimerización del estireno.

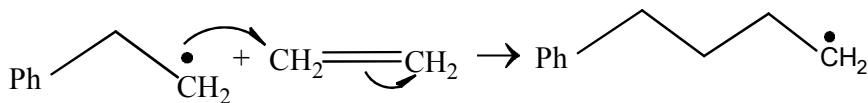
Figura 10. Mecanismo de la reacción de peróxido de benzoilo en la polimerización del estireno



Los radicales libres fenilos se adicionan al doble enlace del alqueno en la reacción de adición generando un mismo radical



Crecimiento de la cadena de alcanos



3.6 FUNDAMENTOS Y MECANISMOS DE LA MIGRACIÓN

3.6.1 MIGRACIÓN:

La migración se define como la transferencia de materia desde el envase al alimento durante su almacenamiento o preparación. La incorporación de las sustancias migrantes al producto envasado puede incidir en su calidad y seguridad, al alterarse sus propiedades organolépticas, y en su seguridad en el caso de que los compuestos que migran tienen carácter tóxico. Del mismo modo, la pérdida de componentes del envase puede afectar a su estabilidad. El estudio de los mecanismos básicos de migración en materiales poliméricos consta de tres etapas diferenciadas, aunque relacionadas entre sí [32].

1. 1. Difusión de los migrantes desde el interior del material de envase hasta la interfase. Proceso gobernado por la primera y segunda ley de Fick para estado estacionario y estado no estacionario respectivamente.

La condición para que exista estado estacionario es que el flujo de difusión no cambie con el tiempo. Un ejemplo clásico de la difusión en estado estacionario es la difusión de átomos de un gas a través de una lámina metálica cuyas concentraciones (o presiones) de las sustancias que difunden se mantienen constantes a ambos lados de

la lámina. En la ecuación 1 se presenta la primera ley de Fick para el estado estacionario.

La expresión matemática de la difusión en estado estacionario en una dirección (x) es relativamente sencillo. El flujo es proporcional al gradiente de concentración:

Ecuación 1

$$J = -D \frac{dC}{dx}$$

La constante de proporcionalidad D se denomina coeficiente de difusión y se expresa en metros cuadrados por segundo. El término $\frac{dC}{dx}$ es el gradiente de concentración, el signo negativo de esta expresión indica que la dirección de difusión es contraria a gradiente de concentración: va desde elevada concentración a baja concentración.

La mayoría de las situaciones prácticas de difusión son en estado no estacionario. En una zona determinada del sólido el flujo de difusión y el gradiente de difusión varían con el tiempo, generando acumulación o agotamiento de las sustancias que difunden. En condiciones no estacionarias no es conveniente utilizar la ecuación 1 si no la ecuación de derivadas parciales, esta ecuación se denomina segunda ley de Fick (ecuación 2):

Ecuación 2

$$\frac{dC}{dt} = \frac{dC}{dx} \left(D \frac{dC}{dx} \right)$$

Donde,

J: Velocidad molar de difusión por unidad de área

D: Coeficiente de difusión del elemento soluto que difunde

C: concentración del elemento

X: Distancia desde la superficie

t: Tiempo

2. Transferencia de materia en la interfase entre el envase y el alimento. Tiene lugar mediante un mecanismo de disolución o solvatación de los migrantes en el alimento. Se producirá una mayor transferencia de materia cuanto mayor sea el coeficiente de reparto de la sustancia que migra en el alimento.

3. Dispersión de los migrantes en el seno del alimento. Proceso gobernado por la primera y segunda ley de Fick. Dado que los coeficientes de difusión en los alimentos son, por lo general, mayores que en los polímeros, esta etapa no interviene a efectos prácticos ni en el equilibrio, ni en la cinética de la migración [33].

Las sustancias del material del envase que pueden migrar al alimento son los compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en la matriz polimérica. Básicamente:

- Residuos (monómeros, oligómeros, disolventes) y coayudantes de la polimerización (catalizadores, aceleradores, inhibidores).
- Aditivos o sustancias adicionadas para facilitar el procesamiento o modificar las características del material final, y que deben estar presentes en el producto acabado,
- Compuestos procedentes de la descomposición, degradación o bien reacciones colaterales del polímero o aditivos.

- Sustancias adyacentes al material, tales como adhesivos en películas laminadas, barnices y tintas de impresión.

En la figura 11 se presentan las posibles interacciones entre el empaque y el alimento, y sus consecuencias.

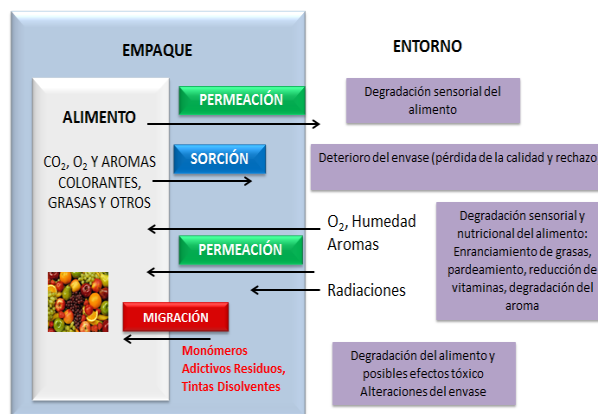
En la práctica, se distinguen tres conceptos asociados al fenómeno de migración:

Migración Global: Se refiere a la cantidad total de los componentes del material de envase que son transferidos al alimento, sean conocidos o no, en las condiciones de preparación y almacenamiento menos favorable. Así pues, esta definición engloba a todos los compuestos que son transferidos al alimento, independientemente de que presenten un interés particular, como pueden ser sus características toxicológicas, e incluirá sustancias que resulten fisiológicamente inertes. Límite de migración global (LMG) 10 mg/dm² o 60 mg/Kg. [NTC 5022 (2003)].

Migración Específica: Representa la cantidad de una sustancia concreta e identificable que es transferida al alimento y que presenta un interés especial por su posible efecto tóxico sobre el organismo.

Migración Potencial (límite de composición): Es la cantidad máxima de una sustancia presente en un material polimérico, que potencialmente podría ser transferida al alimento envasado [35]. Esta migración se calcula a partir del dato de concentración de un determinado monómero o aditivo en el material plástico, suponiendo que este se encuentre en las condiciones más desfavorables, una completa transferencia hacia el alimento o su simulante [36].

Figura 11. Interacciones entre el Entorno-Envase-Alimento y sus consecuencias [34]



3.6.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL FENÓMENO DE MIGRACIÓN

Son numerosos los factores que influyen sobre el proceso de migración, entre estos se pueden señalar que la migración es directamente proporcional a la concentración del migrante en el material de envase, está influenciada por el tipo y composición del alimento (la migración en alimentos acuosos es normalmente muy baja, mientras que en alimentos grasos es apreciablemente más alta), el tipo y procesamiento del plástico, el tipo de componentes del migrante (polaridad, peso molecular), y las condiciones de tiempo y temperatura para el procesamiento, distribución y

almacenamiento durante la vida útil del alimento envasado [37]. No obstante, se pueden señalar como los más importantes:

- Densidad del plástico, relacionado con su volumen libre y, por tanto, con los espacios a través de los cuales puede tener lugar la migración, es decir, mientras más denso sea el polímero, menor es la migración.
- Concentración del migrante, por debajo de ciertos valores influye sobre el coeficiente de difusión, además a medida que aumenta la concentración de migrantes, mayores serán los niveles de migración.
- Tiempo de contacto, a medida que el tiempo de contacto aumenta se favorece el proceso de migración, ya que se incrementa no sólo la disolución del migrante desde la superficie del envase al producto, sino también se ve beneficiado el proceso de difusión en la estructura interna del plástico [38].
- Temperatura, siguiendo la ecuación de Arrhenius afecta al coeficiente de difusión, por lo tanto, se favorece el fenómeno de difusión como el de disolución de los migrantes y aumentan los niveles de migración global.
- Naturaleza de la fase de contacto, incide sobre la velocidad de difusión y el coeficiente de partición, sobretodo en alimentos grasos, ya que favorecen la migración por tener un mayor poder de absorción de componentes del material polimérico que otros alimentos.

Es importante destacar que la migración no es sólo una propiedad de un aditivo o componente englobados en un polímero, sino que se ven involucrados aditivos, polímeros, alimento en contacto y las condiciones ambientales (temperatura y factores mecánicos, ya mencionados) que afectan a todo el conjunto [35].

3.6.3 DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN

La diversidad y complejidad en la composición de los alimentos obliga a trabajar con “simulantes de alimentos” para la realización de los análisis de migración. Estos simulantes pueden ser líquidos, disoluciones e incluso sólidos, los cuales deben poseer una capacidad de extracción de los migrantes similar al de los alimentos que simulan, y permitir un análisis más sencillo, ya que con los alimentos surgen limitaciones prácticas como el desconocimiento de la naturaleza de los migrantes, las bajas concentraciones de los mismos dentro de matrices complejas, o la posibilidad de utilizar un mismo material polimérico para envasar productos de características muy diferentes [39]. En la página 16 se describió los cuatro tipos de simulantes de alimentos establecidos en la Directiva Europea 93/8/CEE.

En cuanto al simulante que debe escogerse para cada tipo de alimento, la legislación lo establece en forma precisa. No obstante, en el caso de materiales poliméricos que vayan a utilizarse con cualquier tipo de alimento, los simulantes que deberán emplearse son el B, C y D, quedando el A, restringido a aquellos materiales que únicamente van a contener alimentos acuosos [40].

3.7 Legislación de la Migración

Siempre ha existido una gran preocupación relativa a cualquier clase de contaminación en el alimento tanto física, química o biológica. La utilización de materiales de envasado adecuados que protejan al alimento es esencial para su

conservación, transporte y distribución. Sin embargo en el íntimo contacto existente entre el envase y el alimento introduce la posibilidad de transferir constituyentes procedentes del envase a éstos. Con el fin de asegurar que este fenómeno no produzca ningún daño a la salud del consumidor, los materiales plásticos están sometidos a investigación y a legislaciones específicas.

3.7.1 Comunidad Europea: En la Comunidad Europea las sustancias permitidas en envasado de alimentos están publicadas en la Directiva 90/128/CEE como una lista positiva con límites de migración específica. Mediante esta Directiva se ha establecido como límite de migración global válido para todo tipo de productos 10 mg/dm² de material (o 60 mg/Kg de alimento). En cuanto a los límites de migración específica se dan individualmente para aquellos productos en que se ha establecido, así como las cantidades máximas autorizadas para la fabricación de polímeros (listas positivas). Los procedimientos para las pruebas de migración se dan en la Directiva 82/711/CEE [41].

Tabla 1. Lista de monómeros u otras sustancias de partida autorizadas para usarse en la fabricación de materiales y objetos plásticos [42]

CAS	NOMBRE	RESTRICCIONES
000108-05-4	Acetato de vinilo	LEM:12mg/Kg
0000107-13-1	Acrilonitrilo	LEM:no detectable(LD:0,02mg/Kg)
0000108-31-6	Anhídrido Maleico	LEM(T) :30mg/Kg (expresado como ácido maleico)
047465-97-4	3,3-Bis(3-metil-4-hidroxifenil)-2-indolina	LEM:1,8mg/Kg
000106-99-0	Butadieno	QM:1 mg/Kg
000080-05-7	2,2-(4hidroxifenil)butane	LEM:1,8mg/Kg
000111-46-6	Dietilenglicol	LEM:30mg/Kg
000120-80-9	1,2-Dihidroxibenceno	LEM:6mg/Kg
000611-99-4	4,4'-Dihidroxibenzofenona	LEM:6mg/Kg
000108-01-0	Dimetilaminoetanol	LEM:18mg/Kg
000107-15-3	Etilendiamina	LEM:13mg/Kg
000050-00-0	Formaldehido	LEM:15mg/Kg
000124-09-4	Hexametildiamina	LEM:2,4mg/Kg
00078-93-3	Metiletil cetona	LME = 5 mg/kg.
000109-99-9	Tetrahidrofurano	LME = 0,6 mg/kg

En la tabla 1 se observa que el límite de migración en alimentos o simulantes alimenticios es 30mg/Kg; el peróxido de benzoílo no se encuentra en la lista de sustancias de partida autorizadas en la directiva 82/711/CEE.

En la tabla 2 se presentan los cambios generados en la legislación europea a través del tiempo.

3.7.2 EE.UU: En Estados Unidos las reglamentaciones para aditivos alimentarios (los materiales de envasado se consideran aditivos indirectos de alimentos) respecto al envasado de alimentos se presentan como listas positivas en el Título 21 del CFR (Code of federal regulations) en las partes 174-179. En estas regulaciones se encuentran los límites de migración específica (LME) para sustancias así como límites de migración global. Las reglamentaciones establecen la identidad del aditivo y las condiciones de inocuidad para su uso. Frecuentemente, se incluyen especificaciones

respecto a su identidad, pureza y propiedades físicas. Para las resinas poliméricas se especifican comúnmente los límites de todas las sustancias extraíbles de la resina o artículo acabado. Cuando se estipulan tales límites, generalmente se dan los métodos analíticos y las condiciones de tiempo y temperatura del análisis.

Tabla 2. Cronología de la legislación europea [43]

Legislación Europea	Año	Exigencias más importantes
Directiva 2002/72/CE	2002	- Obligaciones específicas para materiales plásticos - Fusionan y derogan los documentos anteriores, convirtiéndose en la legislación marco -Artículo 1 Criterios generales para los materiales plásticos -Artículo 2 Límites de migración -Artículos 3 y 4 Listas positivas
Directiva 2004/1/CE	2004	Primera enmienda a la directiva 2002/72/CE -Artículo 1 Suspensión de la azodicarbanamida
Directiva 2004/19/CE	2004	Segunda enmienda a la directiva 2002/72/CE - Artículo 1 Modificaciones de la directiva 2002/72/CE, completa las sustancias de doble uso - Artículo 1 Limita la fecha de solicitud de aditivos al 31/12/2006 y prohíbe la fabricación e importación de los materiales que no cumplan la legislación desde el 1 de marzo de 2006
Reglamento (CE) 1935/2004	2004	Artículo 3 Requisitos generales Artículo 5 Medidas específicas para grupos de materiales y objetos Artículo 15 Etiquetado Artículo 16 Declaración de conformidad Artículo 17 Trazabilidad
Directiva 2005/79/CE	2005	Tercera enmienda a la directiva 2002/72/CE Artículo 1 Ampliación de las listas positivas Artículo 2 Limitación de LME para el ESBO en preparados para lactantes
Reglamento (CE) 2023/2006	2006	Artículo 1 Guía de buenas prácticas de trabajo Artículos 5 y 6 Establece la necesidad de tener implantado un sistema de control y aseguramiento de la calidad
Directiva 2007/19/CE	2007	Cuarta enmienda a la directiva 2002/72/CE Artículo 1 Modificaciones de la Directiva 2007/72/CE, incluyendo el concepto de barrera funcional Artículo 2 Ampliación de las listas positivas Artículo 3 Ampliación de fecha para completar la lista de aditivos Anexo VII. Contenido de la declaración de conformidad
Directiva 2008/39/CE	2008	Quinta enmienda a la directiva 2002/72/CE Modificación de las listas positivas Fecha de cierre de las listase aditivos (31/12/2009)

En estas regulaciones también se señala el uso de los aditivos bajo condiciones de Buenas Prácticas de Manufactura (BMP) en concentraciones que no excedan lo mínimo necesario para conseguir el efecto técnico deseado [44].

Las condiciones de uso previsto de la FCS (es decir, el nivel de utilización, tipos de alimentos y condiciones de tiempo/temperatura) son cruciales para la determinación

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

Tabla3. Condiciones temporales de la temperatura de uso, de un solo uso y repetición de uso.

DESIGNACIÓN	DESCRIPCIÓN	PROTOCOLO
Uso individual		
A	Una alta temperatura, el calor esterilizado o por encima de 100°C	120°C/2h, 40°C/238h
B	Hervir el agua esterilizada	100°C/2h, 40°C/238h
C	Llenado en caliente o pasteurizada por encima de 66°C	100°C/0.5h, 40°C/239,5h o 66°C/2h, 40°C/238h
D	Llenado en caliente o pasteurizados por debajo de 66 °C	66°C/0.5h, 40°C/239,5h
E	Llenado y almacenado a temperatura ambiente (Sin tratamiento térmico en el envase)	40°C/240h
F	Almacenamiento en refrigerador (sin tratamiento térmico en el envase)	20°C/240h
G	Congelados (sin tratamiento térmico en el envase)	20°C/120h
H	Almacenamiento refrigerado o congelado Alimentos previamente elaborados destinados a recalentarse en un contenedor en el tiempo de uso	100°C/2h
Repita el uso		
	Repetir el uso en contacto con los alimentos	Con la temperatura más alta y el tiempo más prolongado
Alto uso de temperatura	Bandeja doble para horno	Con la temperatura más alta y el tiempo más prolongado

3.7.3 MERCOSUR: Atendiendo al concepto de aptitud sanitaria, para la fabricación de envases y equipamientos alimentarios, sólo se permite el uso de sustancias que estén enumeradas en las llamadas listas positivas. Estas sustancias son tanto materiales básicos, como aditivos y otros componentes menores. En estas listas positivas pueden especificarse restricciones en el uso de ciertos componentes de los materiales de envasado. Estas restricciones pueden adoptar la forma de límites de composición, límites de migración específica, prohibiciones de usar determinadas sustancias para contacto con un tipo de alimentos, o autorizaciones para usar determinadas sustancias sólo en ciertos materiales de envasado. Otro factor a tener en cuenta es el límite de migración total o global, para lo cual se realizan ensayos de cesión en los que se cuantifica la cantidad total de componentes que se han transferido al simulante del alimento. Finalmente se establece que los materiales de envasado no deben modificar

los caracteres sensoriales de los productos que contienen, para el caso del peróxido de benzoilo se establece el límite de migración específico de 3mg/Kg [45].

Desde el punto de vista de la integración con los embalajes y equipos plásticos, los alimentos se clasifican de la siguiente forma y se define el tipo de simulante a usar para cada clasificación y se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de los alimentos y simulantes a usar

CLASIFICACIÓN	ALIMENTO	SIMULANTE ^[46]
TIPO I	alimentos acuosos no ácidos (pH > 5)	A
TIPO II	alimentos acuosos ácidos (pH < 5)	B
TIPO III	a. alimentos acuosos no ácidos que contienen aceite o grasa. b. alimentos acuosos ácidos que contienen aceite o grasa	TIPO IIIa A,D TIPO IIIb BD
TIPO IV	alimentos aceitosos o grasosos	D
TIPO V	alimentos alcohólicos (contenido de alcohol superior al 5% (v/v))	C
TIPO VI	alimentos sólidos secos o de acción extractiva poco significativa	Ninguno, u ocasionalmente A,B,C o dependiendo del tipo de alimento

3.7.4 Normas Colombianas: en Colombia las legislaciones se basan en las normas Icontec, que se conocen como Norma Técnica Colombiana (NTC). Las NTC que se deben tener en cuenta para la migración de empaques en contacto con alimentos están las normas NTC 5022, NTC 4606.

NTC 5022: Esta norma establece el método para determinar la migración global de los compuestos no volátiles de los materiales o plásticos destinados a estar en contacto directo con alimentos o bebidas [47].

NTC 4606: Esta norma específica un método para determinar la tendencia de los plastificantes a migrar desde los plásticos en los que se encuentran, hacia otros materiales u otros plásticos, con los que se encuentran en contacto estrecho además de la toma y tratamiento de muestras [48].

3.8 TECNICAS INSTRUMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN

Con el fin de realizar la determinación de la migración en el Empaque Activo Para Plátano, se buscan las técnicas más adecuadas para poder llevar a cabo la evaluación y cuantificación de los compuestos bajo estudio, de acuerdo con los protocolos establecidos en las normas técnicas colombianas. De acuerdo a los analitos y a los simulantes las técnicas escogidas son cromatografía líquida de alta eficiencia CLAE y espectrometría UV.

En la actualidad la técnica CLAE ha llegado a ser una de las técnicas del laboratorio moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Para establecer los parámetros de la cuantificación se

realizaron pruebas con la fase móvil, haciendo algunas variaciones con respecto a lo encontrado en la literatura.

Los estudios de confiabilidad en la cuantificación de los compuestos en estudio para las técnicas CLAE y UV se establecieron por medio de pruebas de precisión.

3.8.1 Precisión

Expresa el grado de conformidad con que un grupo de mediciones realizadas bajo las mismas condiciones experimentales, para una misma sustancia, no diverge mucho de la encontrada, es decir, presenta un coeficiente de variación pequeño.

3.8.2 Repetibilidad

La repetibilidad expresa la precisión (dispersión de los datos, la variabilidad) bajo las mismas condiciones de operación durante un corto intervalo de tiempo, se denomina también intra-ensayo de precisión

3.8.3 Precisión Intermedia

La precisión intermedia se expresa dentro de los laboratorios de variaciones, diferentes días, diferentes analistas, diferente (fabricación) de equipos, etc.

3.8.4 Linealidad

Capacidad (dentro de un rango especificado) para obtener resultados de ensayo que sean directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra

3.8.5 Límite de detección LOD

Menor cantidad de un analito en una muestra que se puede detectar pero no necesariamente ser cuantificada.

3.8.6 Límite cuantificación LOQ

Es el valor mínimo de concentración que se puede cuantificar con exactitud y precisión en las condiciones de evaluación, se expresa en unidades de concentración [49].

3.9 FUNDAMENTOS DE LOS DISEÑOS DE EXPERIMENTOS PARA EL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis de los resultados experimentales permitirá obtener conclusiones sobre el sistema en estudio y decidir actuaciones futuras. Tanto por la importancia de las decisiones que se pueden tomar, como por el costo elevado de la experimentación no parece adecuado dejar la elección de los experimentos y la evaluación de los resultados a la mera intuición del experimentador. Parece más razonable utilizar una metodología matemática y estadística que indique como planificar (diseñar, organizar) la secuencia de experimentos de una forma óptima, de modo que se minimice tanto el costo de la experimentación como la influencia del error experimental sobre la información buscada [50].

3.9.1 Diseño Estadístico de Experimentos

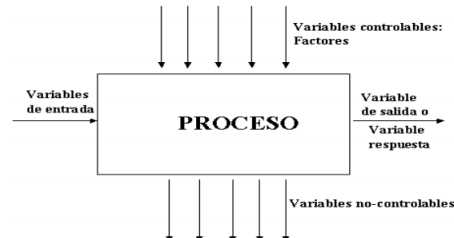
El *Diseño Estadístico de Experimentos* (DEE), también denominado diseño experimental, es una metodología basada en útiles matemáticos y estadísticos cuyo objetivo es ayudar al experimentador a:

1. Seleccionar la estrategia experimental óptima que permita obtener la información buscada con el mínimo costo.
2. Evaluar los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan.

Aplicación del Diseño Estadístico de Experimentos

Las situaciones en las que se puede aplicar el DEE son muy numerosas. De forma general, se aplica a sistemas como el mostrado en la figura 12, en los cuales se observan una o más variables experimentales *dependientes* o *respuestas* (y) cuyo valor depende de los valores de una o más variables *independientes* (x) controlables llamadas *factores*. Las respuestas además pueden estar influidas por otras variables que no son controladas por el experimentador. La relación entre x e y no tiene porqué ser conocida [50].

Figura 12. Representación de un sistema en estudio en DDE: factores (x), respuestas (y)



La aplicación del diseño de experimentos requiere considerar las siguientes etapas:

1. Comprender el problema y definir claramente el objetivo.
2. Identificar los factores que potencialmente podrían influir en la función objetivo, y los valores que éstos pueden tomar. Entre estos valores se buscará la información necesaria.
3. Establecer una estrategia experimental, llamada plan de experimentación.
4. Efectuar los experimentos con los valores de los factores decididos en el punto 3 para obtener los valores de las respuestas estudiadas.
5. Responder las preguntas planteadas, sea directamente o utilizando un modelo matemático [51].

3.9.2 Diseños factoriales a dos niveles

En el estudio sobre la mejora de procesos industriales (control de calidad) es usual trabajar en problemas en los que hay muchos factores que pueden influir en la variable de interés.

La utilización de experimentos completos en estos problemas tiene el gran inconveniente de necesitar un número elevado de observaciones, además puede ser una estrategia ineficaz porque, por lo general, muchos de los factores en estudio no son influyentes y mucha información recogida no es relevante. En este caso una estrategia mejor es utilizar una técnica secuencial donde se comienza por trabajar con unos pocos factores y según los resultados que se obtienen se eligen los factores a estudiar en la segunda etapa.

Los diseños factoriales 2^k son diseños en los que se trabaja con k factores, todos ellos con dos niveles (se suelen denotar + y -). Estos diseños son adecuados para tratar el tipo de problemas descritos porque permiten trabajar con un número elevado de factores y son válidos para estrategias secuenciales [52].

3.9.3 Diseños factoriales con tres factores a dos niveles

Los diseños 2^3 son diseños en que hay tres factores, cada uno con dos niveles. El número de combinaciones de tratamientos ahora es 8. Al introducir un tercer factor en el experimento, con dos niveles, se duplica el número total de corridas.

En un experimento 2^3 , el número de combinaciones distintas de niveles de los tres factores, o combinaciones de tratamientos, que se pueden aplicar, los simbolizamos de la forma siguiente en la tabla 5 [53]:

Tabla 5. Tabla de Combinaciones de Tratamientos del Diseño Experimental 2^3

CORRIDA EXPERIMENTAL	COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS	RESPUESTA
1	$a_1b_1c_1$	Y_{111}
2	$a_2b_1c_1$	Y_{211}
3	$a_1b_2c_1$	Y_{121}
4	$a_2b_2c_1$	Y_{221}
5	$a_1b_1c_2$	Y_{122}
6	$a_2b_1c_2$	Y_{212}
7	$a_1b_2c_2$	Y_{122}
8	$a_2b_2c_2$	Y_{222}

El símbolo $a_1b_2c_1$ representa a la combinación de tratamientos en que el factor A está al nivel a_1 , B está al nivel b_2 y C está al nivel c_1 . O bien, también representa al número Y, la respuesta de esa particular combinación de tratamientos. La figura13 ilustra en forma esquemática, los elementos de este diseño [54].

En una buena interpretación de los resultados obtenidos en la etapa de diseño experimental, se encuentra la credibilidad de dichos resultados, este se da en apoyo a formulaciones matemáticas de probabilidad que conocemos como estadística. La estadística es la herramienta más eficaz para la interpretación de datos, ya que con ella se puede ver el comportamiento de los mismos entre sí, o comparándolos con otro conjunto de datos de diferentes tratamientos experimentales.

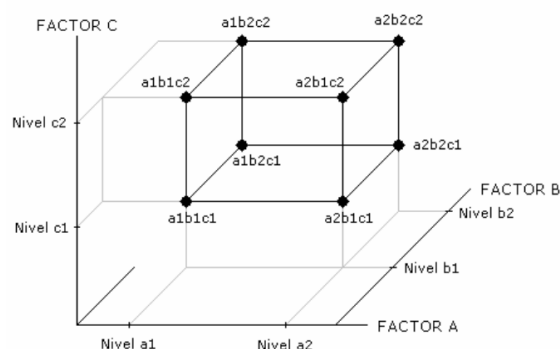
El análisis de los datos obtenidos por el diseño experimental consiste en estudiar los efectos que tienen los factores. El efecto de un factor es la respuesta medida ocasionada por un cambio en el nivel de ese factor

A continuación se describen los efectos principales en un experimento factorial.

Efecto de los experimentos Factoriales

1. Efecto principal: Es el efecto que se produce al comparar los resultados de un nivel con la media total. Tenemos un efecto principal cuando el efecto de una variable independiente es el mismo en todos los niveles de otra variable independiente, prescindiendo de los niveles de la otra variable independiente.
2. Efecto interacción: Es una medida de cambio que expresa el efecto adicional resultante de la influencia combinada de dos o más factores. La interacción de los factores se representa gráficamente; la tendencia indica el grado de interacción entre los factores, la cual aumenta a medida que las líneas tiendan a cruzarse. A continuación se muestran los casos posibles de interacción en dos factores: A con 3 niveles y B con 2 niveles. En el eje "X" se registra los valores de A y en el eje "Y" los promedios de la interacción de "A" y "B". Los puntos son unidos por una línea de tendencia para cada nivel de "B"
3. Efecto simple: Es una medida de cambio en los promedios de los niveles de un factor, manteniendo constante uno de los niveles del otro factor [56].

Figura 13. Representación gráfica del diseño de experimentos 2^3



En la figura 14 se muestran las posibles interacciones de los factores A y B, en el caso de la figura **a** las líneas son paralelas, lo que indica que no hay interacción entre b_1 y b_0 ; en la figura **b** se observa que las líneas b_0 y b_1 tienen la tendencia a cortarse, esto indica que hay una interacción débil, es decir, un factor afecta al otro de forma poco significativa, y en la figura **c** se puede ver que las líneas b_0 y b_1 se cruzan en un punto, lo que indica una fuerte interacción entre los factores, esto nos dice que la variación de un factor (A) afecta en forma directa al otro (B).

3.10 MANEJO ESTADISTICO DE DATOS

Durante la realización de un análisis cuantitativo es muy importante tomar en cuenta todas las variables que pueden afectar nuestro resultado, dentro de estos están los factores provocados por los instrumentos utilizados y los errores provocados por quien maneja el material.

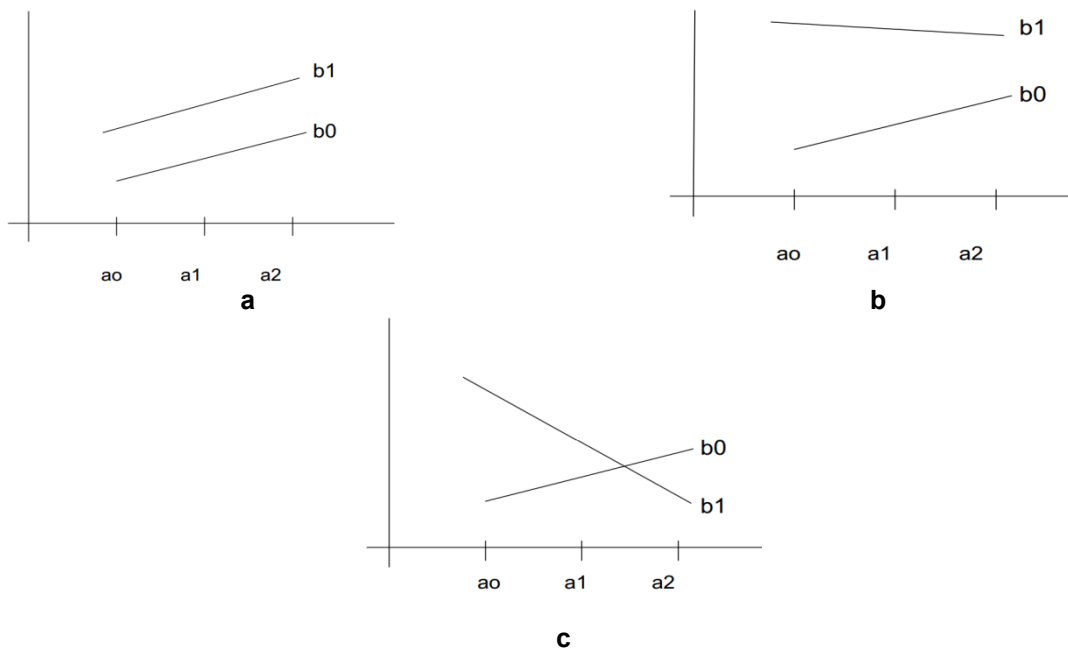
En el reporte de cualquier análisis químico, es importante tomar en cuenta este tipo de errores, hacer un análisis de los resultados y así se podrá concluir sobre él.

Para llevar a cabo esta serie de análisis estadísticos se dispone de varios paquetes estadísticos, los cuales nos dan resultados para poder comparar el contraste de las hipótesis formuladas.

En la presente investigación se usó el paquete estadístico IBM SPSS 20 desarrollado por Win Wrap Basic.

Figura14. Posibles casos de interacción [55]

a) Sin interacción b) Interacción débil c) Interacción fuerte



3.10.1 Pruebas paramétricas:

Las pruebas estadísticas paramétricas, como la de la “t” de Student o el análisis de la varianza (ANOVA), se basan en que se supone una forma determinada de la distribución de valores, generalmente la distribución normal, en la población de la que se obtiene la muestra experimental.

En contraposición de la técnicas no paramétricas, las técnicas paramétricas si presuponen una distribución teórica de probabilidad subyacente para la distribución de los datos y son más potentes que las no paramétricas.

Dentro de las pruebas paramétricas, las más habituales se basan en la distribución de probabilidad normal, y al estimar los parámetros del modelo se supone que los datos constituyen una muestra aleatoria de esa distribución, por lo que la elección del estimador y el cálculo de la precisión de la estimación, elementos básicos para construir intervalos de confianza y contrastar hipótesis, dependen del modelo probabilístico supuesto.

Cuando un procedimiento estadístico es poco sensible a alteraciones en el modelo probabilístico supuesto, es decir que los resultados obtenidos son aproximadamente válidos cuando éste varía, se dice que es un procedimiento robusto [57].

➤ **TEST DE SHAPIRO WILK.**

Se considera uno de los test más eficientes para el contraste de normalidad, sobre todo para muestras pequeñas ($n < 30$). Se tiene el siguiente contraste de hipótesis:

H_0 = La muestra sigue una distribución normal.

H_1 = La muestra no la sigue

Dada la muestra aleatoria simple de tamaño n $\{X_1, X_2, \dots, X_n\}$ que se supondrá ordenada de mayor a menor, se calcula el estadístico de contraste que se presenta en la ecuación 3

Ecuación 3

$$W = \frac{1}{nS^2} \left(\sum a_{in} X_{n-i+1} - X_i \right)$$

Donde S^2 es la varianza muestral,

$$h = \begin{cases} \frac{n}{2} & \text{si } n \text{ es par} \\ \frac{n-1}{2} & \text{si } n \text{ es impar} \end{cases}$$

Y las a_{ni} se encuentran tabuladas en los manuales. Se rechaza la normalidad cuando el estadístico es menor que el valor de las tablas de la bibliografía [60].

➤ **ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA)**

Es una técnica estadística que sirve para decidir o determinar si las diferencias que existen entre las medias de tres o más grupos (niveles de clasificación) son estadísticamente significativas. Estas técnicas se basan en la partición de la varianza para establecer si la varianza explicada por los grupos formados es suficientemente mayor que la varianza residual o no explicada.

El análisis de la varianza (ANOVA) es una técnica estadística de contraste de hipótesis.

Tradicionalmente estas técnicas, conjuntamente con las técnicas de regresión lineal múltiple, de las que prácticamente son una extensión natural, marcan el comienzo de las técnicas multivalentes. Con estas técnicas se manejan simultáneamente más de dos variables, y la complejidad del aparato matemático se incrementa proporcionalmente con el número de variables en juego.

El análisis de la varianza de un factor es el modelo más simple: una única variable nominal independiente, con tres o más niveles, explica una variable dependiente continua.

Otra alternativa, que aparentemente es más lógica e intuitiva, consiste en comparar, en todas las posibles combinaciones de dos en dos, las medias de todos los subgrupos formados.

En el ANOVA se comparan medias, no varianzas: medias de los subgrupos o estratos originados por los factores de clasificación estudiados. Un ANOVA entonces prueba si la variación asociada a una fuente explicada es grande concerniente a la variación inexplicada.

Si ese cociente (la estadística de F) es tan grande que la probabilidad que ocurrió por casualidad es baja (por ejemplo, $P \leq 0.05$), podemos concluir (en ese nivel de la probabilidad) que esa fuente de la variación tenía un efecto significativo [57].

➤ PRUEBA DE TUKEY

Cuando realizamos un análisis de varianza, un valor de F significativo nos indica que no todas las condiciones producen el mismo efecto sobre la variable independiente. Con el fin de tener mayores elementos para la toma de decisiones es importante saber dónde se encuentran dichas diferencias significativas y si éstas siguen unas tendencias que nos permitan una mejor toma de decisiones. Una prueba que nos permite evaluar dicha diferenciación es la prueba de Tukey, que mide la diferencia de los valores de las medias de dos grupos en términos de la varianza intragrupal.

Tukey (1953) propuso un procedimiento para testar la hipótesis nula, con α siendo exactamente el nivel global de significancia, cuando las muestras tienen tamaños iguales, y en el máximo α , cuando las muestras tienen tamaños diferentes como se muestra en las ecuaciones 4 y 5.

El test de Tukey utiliza la distribución de la estadística de amplitud en la forma de **Student**.

Ecuación 4

$$q = \frac{\bar{Y}_{max} - \bar{Y}_{min}}{\sqrt{\frac{MQE}{n}}}$$

Siendo $\bar{Y}_{max} - \bar{Y}_{min}$ la mayor y la menor medida respectivamente.

Ecuación 5

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(\alpha, f) \sqrt{\frac{MQE}{n}}$$

Siendo f : el número de grados de libertad, asociado con MQE y $q_{\alpha}(\alpha, f)$ se halla en las tablas estadísticas.

Si el valor absoluto de la diferencia entre dos medidas fuera mayor que T_{α} entonces H_0 debe ser rechazada.

La versión para muestras de tamaños diferentes es a veces llamada procedimiento de Tukey-Kramer [61].

3.10.2 Pruebas no paramétricas:

Se denominan pruebas no paramétricas aquellas que no presuponen una distribución de probabilidad para los datos, por ello se conocen también como de distribución libre.

En la mayor parte de ellas los resultados estadísticos se derivan únicamente a partir de procedimientos de ordenación y recuento, por lo que su base lógica es de fácil comprensión. Cuando trabajamos con muestras pequeñas ($n < 10$) en las que se desconoce si es válido suponer la normalidad de los datos, conviene utilizar pruebas no paramétricas, al menos para corroborar los resultados obtenidos a partir de la utilización de la teoría basada en la normal.

En estos casos se emplea como parámetro de centralización la mediana, que es aquel punto para el que el valor de X está el 50% de las veces por debajo y el 50% por encima.

Las pruebas no paramétricas no requieren asumir normalidad de la población y en su mayoría se basan en el ordenamiento de los datos, la población tiene que ser continua. El parámetro que se usa para hacer las pruebas estadísticas es la Mediana y no la Media [58].

➤ U DE MANN WHITNEY – WILCOXON

En la prueba U de Mann Whitney-Wilcoxon se comparan 2 grupos independientes y que no tienen distribución normal o que sean ordinales; paralela a la prueba t de contraste para muestras independientes. Contrasta si dos poblaciones muestreadas son equivalentes en su posición.

La hipótesis nula del contraste es que las dos muestras, de tamaño n_1 y n_2 , respectivamente, proceden de poblaciones continuas idénticas: $H_0 = f_1(x) = f_2(x)$.

La hipótesis alternativa puede ser unilateral o bilateral y únicamente supone que la tendencia central de una población difiere de la otra, pero no una diferencia de forma o de dispersión. Por esta razón esta prueba es el equivalente no paramétrico de la prueba t para la diferencia de dos medias cuando las muestras son independientes pero no puede suponerse la normalidad de las poblaciones de origen.

Para realizar el contraste se ordenan conjuntamente las observaciones de las dos muestras, de menor a mayor, y se les asignan rangos de 1 a n_1+n_2 , ecuación 6. Si la tendencia central de ambas poblaciones es la misma los rangos deberían distribuirse aleatoriamente entre las dos muestras y el rango medio correspondiente a las observaciones de una muestra debería ser muy similar al correspondiente a las observaciones de la otra. El estadístico de prueba U de Mann-Whitney se construye a partir de la suma de rangos de una de las muestras, R_i , elegida arbitrariamente:

Ecuación 6

$$U_i = n_1 n_2 + \frac{n_i (n_i + 1)}{2} - R_i \text{ donde } i = 1, 2$$

Para tamaños de muestra pequeños la distribución del estadístico U, bajo el supuesto de que la hipótesis nula sea cierta, es discreta y está tabulada. Si los tamaños son suficientemente grandes la distribución del estadístico se aproxima a una normal de parámetros como se muestra en la ecuación 7.

Ecuación 7

$$\mu_u = \frac{n_1 n_2}{2}$$

$$\sigma_u^2 = \frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}$$

La aproximación a la normal, z , cuando tenemos muestras lo suficientemente grandes viene dada por la ecuación 8.

Ecuación 8

El estadístico de prueba es el valor Z :

$$Z = \frac{U - \mu}{\sigma_U}$$

La región de rechazo de H_0 se localiza en las dos colas de la normal tipificada si H_1 no es direccional o en una de las colas si H_1 es direccional.

➤ COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN, ρ

Es una medida de la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias continuas. Para calcular ρ , los datos son ordenados y reemplazados por su respectivo orden [59].

El estadístico ρ viene dado por la ecuación 9:

Ecuación 9

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{N(N^2 - 1)}$$

Donde D es la diferencia entre los correspondientes estadísticos de orden de x y y . N es el número de parejas.

Se tiene que considerar la existencia de datos idénticos a la hora de ordenarlos, aunque si éstos son pocos, se puede ignorar tal circunstancia.

Para muestras mayores de 20 observaciones, podemos utilizar la siguiente aproximación (ecuación 10) a la distribución t de Student.

Ecuación 10

$$t = \frac{\rho}{\sqrt{\frac{(1-\rho^2)}{(n-2)}}}$$

La interpretación de coeficiente de Spearman es igual que la del coeficiente de correlación de Pearson. Oscila entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente, 0 cero, significa no correlación pero no independencia.

3.10.3 Estudio de la Línea de tendencia central para la evaluación de la líneas de tendencia central para las curvas de calibrado se utilizó el software de cálculo Microsoft excel 2007 desarrollado por Microsoft Corp, con esta se determinó las ecuaciones de las curvas para anhídrido maleico y peróxido de benzoílo.

4. METODOLOGIA

A continuación se describe la metodología utilizada en la determinación de la migración de Anhídrido Maleico y Peróxido de Benzoílo, empleando las técnicas analíticas de CLAE y UV.

4.1 REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL DE VIDRIO

Los reactivos utilizados en la parte experimental para la cuantificación de Anhídrido Maleico y Peróxido de Benzoílo por CLAE y en el simulante graso por espectrometría de Ultravioleta visible fueron de grado analítico.

Los equipos empleados para el estudio de la migración de los compuestos en el biopolímero se muestran en las figuras 15 y 16, se encuentran en la Unidad de análisis Industrial de la Universidad del Cauca y en el centro de cromatografía y espectrometría de masas, CROM-MASS (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia CLAE) en la Universidad Industrial de Santander.

Figura 15. Equipo Cromatografía líquida de alta Eficiencia Agilent 1200 con detector UV-Visible

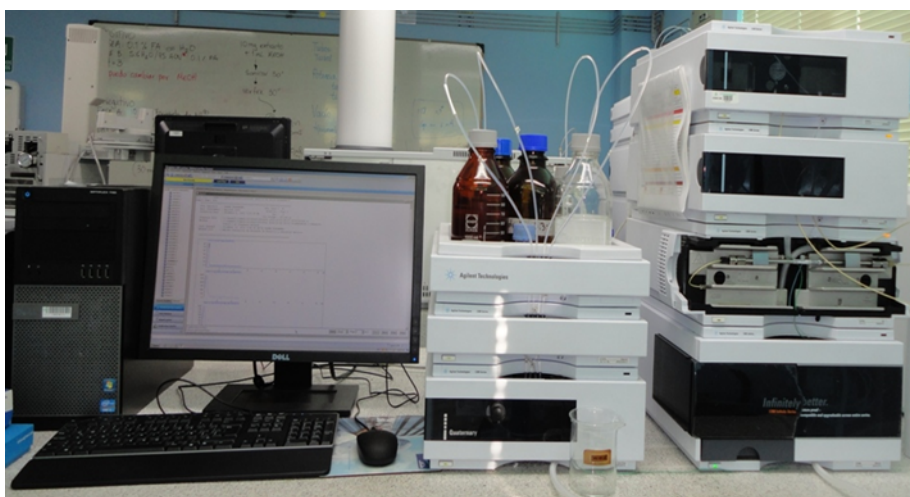


Figura 16. Equipo UV-Vis Génesis
Espectrofotómetro UV-Visible ThermoScientific Serie GENESYS 10S



4.1.1 Reactivos: Todos los patrones y solventes utilizados son de grado analítico.

- Aceite de girasol
- Acetonitrilo (ACN)
- Ácido Acético 99-100% Glacial
- Alcohol Etilico Absoluto
- Anhídrido Maleico
- Peróxido de Benzoilo 25% H₂O
- Metanol grado
- Hexano
- Ácido Benzoico
- Ácido Maleico

4.1.2 Equipos

- Balanza analítica Mettler Toledo AL204, (220 g / 0.0001 g), Balanza analítica precisa OHAUS, (210 g / 0.0001 g).
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (CLAE) HEWLETT PACKARD 1100, Desgasificador G 1322^a, Bomba Cuaternaria G 1311^a, Detector UV-VIS G1314A, Columna LC Agilent Prep-C18 Scalar; 4.6 x 250 mm, 5 µm. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (CLAE) Agilent serie 1200.
- Espectrofotómetro Ultravioleta Visible THERMO, GENESIS 6
- Estufa, FISHER SCIENTIFIC

4.1.3 Material de Vidrio

- Balones aforados clase A, Brand de 10, 25, 50 y 100 mL
- Erlenmeyer de 125 mL
- Frascos ámbar 80 mL
- Micropipeta OXFORD BenchMate II 10-100 µL y 100-1000 µL
- Pipeta graduada clase A, Brand de 5 y 10 mL
- Probeta 50 mL
- Viales Agilent para CLAE 1.5 mL

4.2 COMPROBACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DEL MATERIAL VOLUMÉTRICO DE VIDRIO

El control estándar utilizado para los laboratorios de ensayo y calibración en el análisis se rige según la ISO IEC/17025, la cual exige el conocimiento y la documentación de la precisión y tolerancia de las mediciones de todos estos medios antes de calificar su uso.

Para realizar la calibración del material volumétrico de vidrio se tomaron 10 mediciones empleando agua destilada con una densidad de 0.99 g/mL como solvente de calibración, la cual fue determinada con la técnica del picnómetro.

Se empleó el protocolo de estandarización 48 certificados por la ISO 9001-14001 para la calibración de los balones aforados.

4.3 IMPLEMENTACIÓN DE LOS PARAMETROS CALIDAD PARA LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS EN CLAE Y UV-VIS

Inicialmente se realizaron pruebas de solubilidad de los compuestos en los 4 simulantes, para establecer los parámetros de separación y cuantificación por CLAE se realizaron corridas en el equipo con soluciones de los compuestos por separado y en mezclas para conocer la mejor fase móvil, flujo óptimo, tiempo de retención y longitud de onda, haciendo algunas variaciones con respecto a lo encontrado en la literatura, estas condiciones se especifican en la Tabla 6.

Tabla 6 Condiciones óptimas para los compuestos de acuerdo a la literatura

Condiciones	Anhídrido Maleico	Peróxido de Benzoilo
Tiempo de retención	2.405 min	4.195 min
Fase Móvil	Acetonitrilo:Agua (60:40)	Acetonitrilo:Agua (60:40)
Flujo óptimo	1.1 mL/min	1.1 mL/min
Longitud de onda	250nm	254nm

Para obtener el flujo óptimo se realizó la curva de Van Deemter, variando los flujos de 0.5 a 1.5 mL/min, fase móvil 60:40 y una longitud de onda de 280 nm, preparándose una mezcla de los patrones en 100% acetonitrilo con concentraciones de 1000 ppm de AM y 250 ppm de PB, para graficar se tomó en cuenta el tiempo de retención del peróxido, ya que es el compuesto que más tarda en ser eluido.

Posteriormente se realizaron curvas para el anhídrido maleico y peróxido de benzoilo en 100% Acetonitrilo y se pasó por triplicado en el equipo de CLAE para conocer su linealidad, utilizándose concentraciones para la curva de: 48, 100, 200, 300, 400, 504, 608 ppm.

Para establecer los parámetros de la cuantificación por UV-Vis, se evaluó el tiempo de agitación y el mejor solvente para llevar a cabo la estandarización, realizándose también diferentes pruebas de solubilidad de los compuestos. Posteriormente se realiza la lectura en el equipo y se determina la longitud de onda de máxima absorción del anhídrido maleico y peróxido de benzoilo.

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

4.3.1 Límite de detección

El límite de detección (LOD) para los equipos se encontró por medio de las curvas de calibración, empleando la ecuación 11.

Ecuación 11

$$LOD = \frac{3 \times S_{intercepto}}{Promedio\ pendiente}$$

Dónde: S es la desviación estándar del intercepto

4.3.2 Límite de cuantificación

Para hallar el límite de cuantificación (LOQ), se multiplicó por 10 el valor de la desviación del intercepto sobre el promedio de la pendiente, como se muestra en la ecuación 12.

Ecuación 12

$$LOQ = \frac{10 \times S_{intercepto}}{Promedio\ pendiente}$$

4.3.3 Repetibilidad

Se preparó una curva por triplicado y se analizó en el equipo realizando tres lecturas de cada nivel de concentración. Además se realizó la lectura de una de las concentraciones 8 veces.

4.3.5 Precisión intermedia

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

4.4 PREPARACION DE SOLUCIONES ESTANDAR

4.4.1 Curvas para el equipo de CLAE

El solvente en el cual se realizan las curvas de calibración es acetonitrilo, ya que los compuestos de interés no son solubles en los simulantes establecidos para este tipo de estudios.

- Preparación de la curva de los compuestos en acetonitrilo

Se realizó una curva de AM y PB por triplicado en 100% Acetonitrilo, la cual se pasó por el equipo de CLAE, los niveles de la curva fueron: 5, 10, 25, 70, 100, 250, 500, 650 ppm. Además, se leyó un punto de la curva (100 ppm) 8 veces para calcular la repetibilidad.

4.4.2 Curvas para el equipo de UV-vis

Se preparó una curva de calibración de AM y PB por triplicado en acetonitrilo con 6 niveles de concentración. Para determinar la repetibilidad se leyó 8 veces un punto de la curva, y la precisión intermedia se determinó realizando curvas y leyéndolas en el equipo día por medio durante el proceso de migración.

Para la lectura de las muestras por el equipo de UV-vis se estandarizó el tiempo de agitación, el solvente de extracción y además fue necesario realizar un lavado con Hexano para eliminar impurezas

4.5 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El empaque biodegradable activo se obtuvo mediante la modificación del almidón de yuca por hidroxipropilación, plastificación con glicerol, como agente microbiano (componente activo) se utiliza extracto de capsaicina en estado líquido, la extrusión para obtener el almidón termoplástico (TPS) se realiza usando un equipo con tres zonas de calentamiento independientes y con calentamiento en el dado.

Para la formación de la película a partir de almidón, éste se mezcla con otras sustancias las cuales permitirán generar un material continuo y de propiedades mecánicas aceptables. Para esto, se elabora una mezcla polimérica binaria a partir del polímero que confiere aumento de la tensión junto con el que aporta la elongación del material (PLA y PLC), se utiliza anhídrido maleico como agente acoplante, para que la reacción se logre se utilizó peróxido de benzoílo como iniciador de la reacción, el cual actúa como un tipo de catalizador. Para dar color al material se utiliza una mezcla colorante que consiste de una ftalocianina color verde y de dióxido de titanio (TiO₂).

Para procesar los componentes de la mezcla binaria en el extrusor se tienen las siguientes temperaturas: 125 °C en la zona 1, 145 °C en la zona 2, 150 °C en la zona 3 y 140 °C en el dado de moldeo. Se alimenta el material al extrusor y se procesa a velocidad de tornillo constante igual a 40 rpm.

El TPS y la mezcla binaria se cortan en pellets con una longitud final inferior a 0.5 cm y, con el fin de obtener el material que da forma al empaque, se debe hacer una extrusión de soplado donde el TPS se procesa con la mezcla binaria a las siguientes temperaturas: 145 °C en la zona 1, 150 °C en la zona 2, 155 °C en la zona 3 y 150 en el dado de soplado. Una vez el material sale del extrusor se aplica aire para formar el tubular el cual se recibe en el embobinador del equipo. Por último, se obtiene un rollo de material el cual posteriormente es cortado para formar bolsas o empaques, el procedimiento para obtener el biopolímero muestra en la figura 17.

El biopolímero fue elaborado en el laboratorio de Reología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, el cual fue obtenido por un proceso de extrusión de tornillo simple (Thermo Scientific Poly Lab OS), posteriormente se sometió la muestra a los distintos tratamientos según la norma Colombiana y Europea para la determinación de la migración global y específica del anhídrido maleico y peróxido de benzoílo, recolectándose 8 muestras en presentación de pellet y 8 en presentación de bolsa debido al diseño experimental 2³ que se implementó en dicho laboratorio, como se presenta en la Tabla 7.

4.6 Diseño experimental

Después de tener las muestras, se estableció un diseño experimental en el cual se estudiaron los parámetros necesarios en cada uno de los tratamientos del biopolímero obtenido, en el que se implementó las condiciones requeridas por las normas, la cual establece dos temperaturas (25 y 40°C) siendo analizadas por triplicado el décimo día de migración; en los cuatro simulantes (agua, ácido acético 3%, etanol 15% y aceite).

4.7 Evaluación de la migración

Las muestras son sumergidas totalmente en 50 mL de cada simulante establecido por las normas durante un periodo de 10 días a 25 y 40°C, el día decimo se retira la muestra de biopolímero, se deja secar para realizar su pesaje final y determinar la migración global. Se tomó 2mL de los simulante A (agua), B (ácido acético 3%), C (etanol 10%) y se realizó su respectiva lectura por CLAE para determinar la migración específica.

4.7.1 Migración global

Se estableció por diferencia de pesos antes y después del paso de inmersión teniendo en cuenta el porcentaje de humedad higroscópica del biopolímero, empleándose la ecuación 13 para la migración global.

Ecuación 13

$$\%mg = \frac{P_i - P_f}{p_i}$$

Donde

% mg: porcentaje de migración global

P_i: peso inicial de la muestra

P_f: peso final de la muestra, pasados los 10 días en el simulante

Figura 17. Obtención del Biopolímero, Laboratorio de Reología, Universidad del Cauca



Tabla 7. Diseño experimental de preparación del polímero

ORDEN	TRATAMIENTO	% PB	ppm PB	% AM	ppm AM	% MB	Ppm MB
1	-1	0,10	1,00	0,784	7,840	25	250
2	A	0,40	4,00	0,784	7,840	25	250
3	B	0,10	1,00	3,136	31,360	25	250
4	AB	0,40	4,00	3,136	31,360	25	250
5	C	0,10	1,00	0,784	7,840	35	350
6	AC	0,40	4,00	0,784	7,840	35	350
7	BC	0,10	1,00	3,136	31,360	35	350
8	ABC	0,40	4,00	3,136	31,360	35	350

4.7.2 Migración específica

Esta migración que representa la cantidad de una sustancia específica e identificable, se evaluó por análisis en los diferentes equipos (CLAE y UV-Vis), teniendo en cuenta las curvas de calibración con patrones y sus respectivos blancos.

El simulante graso fue cuantificado en el equipo de UV-Vis, pero antes fue necesario estandarizar una técnica de extracción líquido-líquido.

4.8 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EVALUADOS EN LA MIGRACIÓN

4.8.1 Determinación de Anhídrido maleico y Peróxido de benzoílo por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

Las muestras tratadas a las dos temperaturas establecidas en los 3 simulantes fueron analizadas por el equipo de CLAE al décimo día, realizándose su lectura por triplicado.

4.8.2 Determinación de Anhídrido maleico y Peróxido de benzoílo en el simulante D (aceite de girasol) por espectroscopia de ultravioleta-visible

Las muestras que se encontraban a las dos temperaturas fueron analizadas al décimo día, realizándose su respectiva extracción para poder ser leídas por triplicado por el equipo UV-Vis.

4.9 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE RESULTADOS

Se empleó el paquete estadístico IBM SPSS 20.00 para la evaluación de la normalidad (Shapiro-Wilk) de los datos obtenidos y poder establecer qué pruebas se deben aplicar ya sean paramétricas o no paramétricas, para las líneas de tendencia se utilizó la hoja de cálculo MICROSOFT EXCEL.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan y analizan los resultados obtenidos en la determinación de la migración de peróxido de benzoílo y anhídrido maleico en el polímero biodegradable objeto de la presente investigación.

5.1 Verificación de la calibración del material de vidrio

La calibración de los recipientes volumétricos de vidrio para laboratorio consiste en determinar el volumen de agua contenida o entregada por el recipiente. Este volumen de agua se conoce midiendo la masa de agua y determinado su densidad a la temperatura de prueba, para lo cual se mide la masa del recipiente vacío y después del recipiente lleno con agua destilada hasta la marca de aforo; la diferencia de masa de ambas mediciones será la masa de agua contenida en el recipiente. Los análisis cuantitativos clásicos se llevan a cabo partiendo de dos mediciones básicas: la masa y el volumen. De allí que, análisis exactos exijan siempre dispositivos de medición altamente confiables.

Según los datos obtenidos en la calibración del material se observa que la incertidumbre asociada al método es aceptable (0.053 % en la determinación de AM y PB en los simulante A, B y C por CLAE y, AM y PB en el simulante D de 0.052 % por UV), lo que indica que en el momento de preparar soluciones vamos a tener un error máximo de 0.053 y 0.052 para CLAE y Uv-Vis respectivamente. Siguiendo con el protocolo de estandarización, los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Calibración del material de vidrio

Material	Valor Aforo (mL)	Valor Real (mL)	Intervalo de Confianza
Balón Aforado	10.0	9.99	± 6.88E-03 ●
	10.0	9.94	± 1.65E-02 *
	25.0	24.94	± 1.34E-02 *
	25.0	24.93	± 9.05E-03 ●
	50.0	49.83	± 1.12E-02 ●
	100.0	99.68	± 1.52E-02 ●
Pipeta Graduada	10.0	9.98	± 2.14E-02 ● *

● CLAE * Uv-Vis

Se utilizaron 2 balones de 10 mL para la preparación de las diferentes curvas, los dos se calibraron (10 datos para cada uno, t para 10 datos) y su coeficiente de variación es < 5.0%, de igual manera se realizó para el resto del material. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos

Tabla 9. t tabulado para 95% de confianza:

Numero de muestras	Intervalo de confianza	t tabulado
10	95%	1.812

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

$$S_{CLAE} = 0.053$$

$$S_{UV-VIS} = 0.052$$

Aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 14.

$$s = \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$$

Teniendo en cuenta que las curvas de anhídrido maleico y peróxido de benzoílo se prepararon a partir de 0.2011 g de los patrones, el coeficiente de variación del método para la cuantificación de migración de estos compuestos por CLAE es de 0.26 %. Las curvas por Uv-Vis se prepararon a partir de 0.25 mg de los patrones, presentando un coeficiente de variación del método de 0.21 %.

5.2 Determinación de parámetros de calidad para las técnicas analíticas

5.2.1 Van Deemter

Con el fin de establecer un flujo óptimo en la columna se realizó la curva de Van Deemter, se hicieron análisis con una solución de PB y una variación de flujo de 0.6 a 1,3 mL y se obtuvo el menor valor de altura del plato teórico H en 1,1mL/min, por lo que se decidió agregar este parámetro al método creado para realizar la determinación de los analitos.

A continuación en la figura 18 y la tabla 10 se presentan los datos obtenidos en la curva de Van Deemter, con la cual se determinó que el flujo óptimo para llevar a cabo el análisis de los analitos de interés es 1,1mL/min.

Figura 18. Curva Van Deemter H Vs Flujo

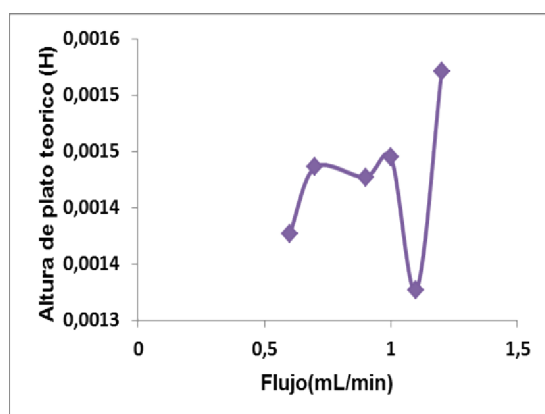


Tabla10. Flujo Vs H

Flujo (mL/min)	H
0.6	0.0014
0.7	0.0014
0.9	0.0014
1	0.0014
1.1	0.0013
1.2	0.0015

5.2.2 Límite de detección y cuantificación.

Para un resultado analítico que es muy cercano al valor del blanco, se plantea la duda de si el valor corresponde a valores aleatorios del blanco o a la presencia real del analito ya que la señal de fondo es producida por el blanco y exhibe ruido. El límite de detección (LOD) corresponde a una señal k veces la desviación estándar del ruido de fondo. Los valores por encima del LOD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables.

Límite de detección (LOQ) hace referencia a la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un dado nivel de confianza.

Para el análisis cuantitativo debe quedar absolutamente claro que sólo se emplean valores atribuibles al analito, el límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el límite de detección según cada caso.

Se determinó LOD y LOQ para AM (CLAE) utilizando las ecuaciones 11 y 12 respectivamente, en las tablas 11 y 12 se presentan los valores encontrados para cada analito. Para el límite de cuantificación se multiplicó por 10 el valor encontrado para la relación señal/ruido.

Tabla 11. LDO y LOQ para anhídrido maleico

	Pendiente	Intercepto	LOD	LOQ
CLAE	0,932	9,958	1,869	6,230
	0,931	10,160		
	0,932	9,069		
Promedio	0,932	9,729		
Desviación	0,0006	0,580		
% CV	0,062	5,966		
UV-Vis	0,063	0,080	0,054	0,181
	0,064	0,080		
	0,064	0,082		
Promedio	0,064	0,080		
Desviación	0,0005	0,001		
% CV	0,817	1,303		

- Límite de detección y cuantificación para PB (CLAE)

Tabla 12. LOD y LOQ para peróxido de benzoílo

	Pendiente	Intercepto	LOD	LOQ
CLAE	0,676	22,610	1,107	3,690
	0,679	22,230		
	0,673	22,70		
Promedio	0,676	22,513		
Desviación	0,003	0,249		
% CV	0,444	1,108		
UV-Vis	0,077	0,043	0,029	0,088
	0,077	0,041		
	0,077	0,042		
Promedio	0,077	0,042		
Desviación	0,0002	0,0008		
% CV	0,225	1,793		

5.2.3 Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad del método en cada uno de los equipos se realizó la lectura de un punto de la curva de calibración 8 veces.

Con la ayuda de ANOVA de un factor se obtuvo los valores para la desviación estándar y el error típico, y con la ecuación 15 se obtienen los datos que se presentan en la tabla 13.

Ecuación 15

$$r_i = \frac{E}{E + D}$$

Donde, r_i = Repetibilidad

E = Error típico

S = desviación estándar

Tabla 13. Valores E y S

	AM	PB
Desviación típica	1196,346	22,440
Error típico	452,176	7,934

Tabla 14. Repetibilidad del método

Desviación		Error típico		r_i UV		r_i CLAE	
AM	PB	AM	PB	AM	PB	AM	PB
1196.346	22.438	452.176	7.934	0.779	0.262	0.274	0.261

Con el valor obtenido para cada uno de los compuestos se puede ver en la tabla 14 la consistencia entre los datos en cada repetición, lo cual indica que la medida es consistente y repetible [67].

5.2.4 Precisión intermedia

Para hallar la precisión intermedia se prepararon y analizaron curvas en diferentes días durante la evaluación del proceso de la migración. Se realizó el promedio de las absorbancias a sus respectivas concentraciones, obteniendo los resultados presentados en la gráfica 1 y la tabla 15.

Tabla 16. Precisión intermedia Uv-Vis

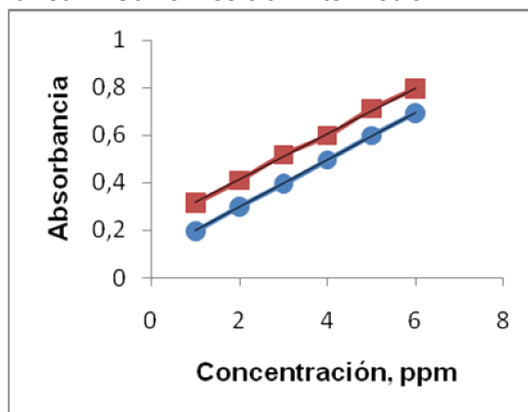
	AM	PB
Desviación	2,196	1,759
% CV	3,284	3,326

En términos de precisión intermedia el método es preciso en los niveles de concentración establecidos; con las medidas realizadas los días 1,3,5,7 y 9 hallamos un coeficiente de variación inferior a 5% y una desviación estándar muy cercana a 2 considerada aceptable para métodos espectrofotométricos.

Tabla 15. Datos precisión intermedia UV-Vis

Concentración, ppm	Absorbancia AM	Absorbancia PB
1	0,314	0,197
2	0,41	0,301
3	0,518	0,395
4	0,599	0,496
5	0,711	0,598
6	0,797	0,693

Gráfica 1. Curva Precisión intermedia



● Anhídrido maleico $y = 0.097x + 0.218$
 $R^2 = 0.998$

■ Peróxido de benzoílo $y = 0.099x + 0.099$
 $R^2 = 0.999$

5.3 Linealidad y Rango

La linealidad de un método define su aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito y el rango lineal nos da el rango de concentraciones de analito para las cuales el método brinda resultados proporcionales a la concentración, esta proporcionalidad hace referencia al rango de concentraciones en las soluciones que se están midiendo más que a las concentraciones de analito en las muestra original.

En el extremo inferior del rango de concentraciones, los factores limitantes son los valores del LOD o de LOQ. En el extremo superior del rango de concentraciones, las limitaciones aparecen por efectos varios que dependen de la respuesta del instrumento.

Para determinar la linealidad del método cromatográfico y espectrofotométrico con los compuesto estudiados, se realizaron curvas con diferentes concentraciones de los patrones. Se obtuvieron los siguientes resultados presentados en la gráfica 2, 3 y las tablas 16 y 17 para CLAE y Uv-Vis respectivamente.

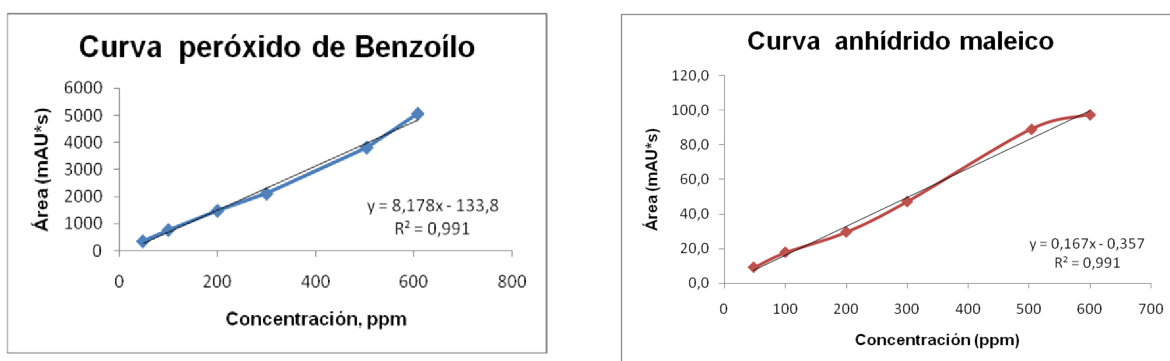
Tabla 17. Concentraciones Linealidad y Rango CLAE

Concentración, ppm	Área PB (mAU*s)	Área AM (mAU*s)
48	347,352	9,218
100	766,494	17,903
200	1477,921	29,716
300	2111,307	47,303
504	3817,505	89,812
608	5069,745	97,604

La curva de calibración área en función de la concentración, resulto ser lineal en el rangode 48 a 608 mg/L. Para este intervalo de trabajo el coeficiente de correlacion (r) para AM y PB fue 0,995 y 0,996 respectivamente, lo que indica una buena linealidad del sistema. Ya que r por si solo no justifica la linealidad utilizamos el coeficiente de determinacion r^2 , 0,991 para AM y 0,992 para PB que indica una fuerte relación entre las variables; la curva de calibracion absorbancia en función de la concentración sigue el mismo comportamiento con coeficientes de correlacion y de determinacion altos, como se aprecia en la gráfica 3.

● AM ■ PB

Gráfica 2. Linealidad CLAE



Gráfica 3. Linealidad UV-Vis

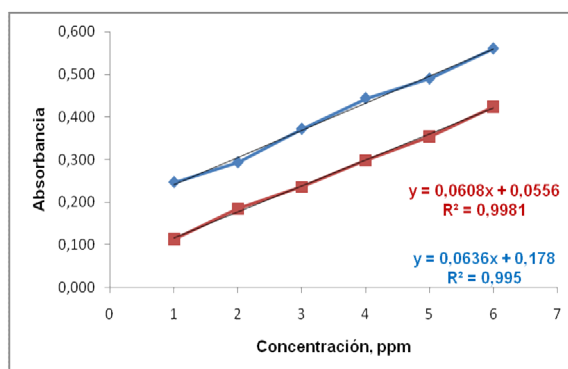


Tabla 18. Concentraciones Linealidad y Rango UV-Vis

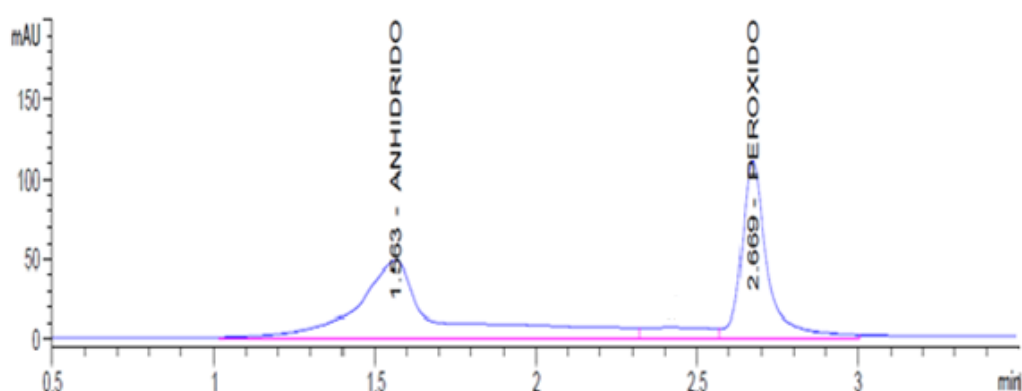
Concentración, ppm	Absorbancia AM	Absorbancia PB
1	0,248	0,114
2	0,295	0,186
3	0,374	0,237
4	0,445	0,299
5	0,491	0,355
6	0,561	0,426

Podemos decir entonces que en el momento de realizar la cuantificación por interpolación obtendremos un valor altamente confiable.

5.3.1 Curvas para el equipo de CLAE.

Debido a que los compuestos no presentaron solubilidad en los simulantes, se procedió a preparar las soluciones en acetonitrilo, ya que los compuestos presentaron una alta solubilidad y con pruebas cromatograficas se determinó que no se presentaban interferencias a la hora de realizar la cuantificación, como se muestra en la figura 19.

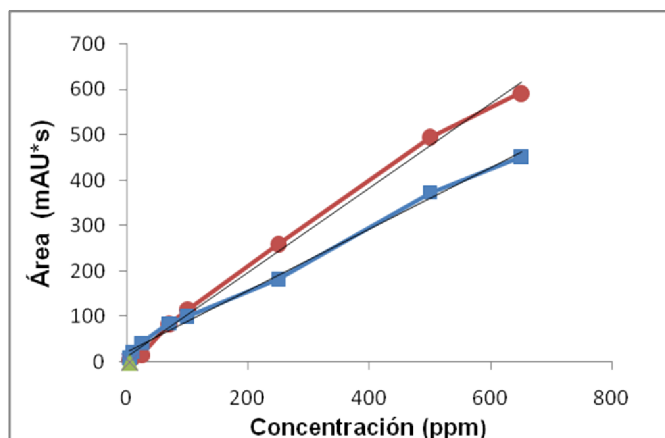
Figura 19. Cromatograma AM y PB en Acetonitrilo



5.3.1.1 Análisis de la curva de AM y PB por CLAE.

Para realizar la cuantificación del peróxido de benzoilo y anhídrido maleico se prepararon tres curvas de calibración las cuales se nombran como Curvas 1, 2 y 3, (anexo A) con concentraciones de 5 a 650 ppm y se estableció el tiempo de retención de los compuestos: 1,248 y 2,631 minutos para AM y PB respectivamente, en la gráfica 4 se presenta la curva de calibración 1 y en la tabla 19 los datos de concentración y áreas.

Gráfica 4. Curva de calibración CLAE



● Anhídrido maleico $y = 0.933x + 9.7313$
 $R^2 = 0.995$

■ Peróxido de benzoílo $y = 0.676x + 22.518$
 $R^2 = 0.995$

Tabla 19. Curva calibración CLAE

Concentración (ppm)	Área AM (mAU*s)	Área PB (mAU*s)
5	4,693	9,244
10	9,994	22,665
25	16,285	41,846
70	84,923	85,252
100	115,876	101,389
250	260,008	182,719
500	495,205	373,612
650	592,502	452,473

En la tabla 20 se presentan los datos obtenidos en la prueba de normalidad para la curva de calibración para el Cromatógrafo líquido de alta eficiencia.

Tabla 20. Prueba de normalidad para la curva de calibración CLAE

Concentración	Shapiro-Wilk AM			Shapiro-Wilk PB		
	Estadístico Wcal*	gl	Sig	Estadístico Wcal*	gl	Sig
5	1,000	3	0,999	0,824	3	0,174
10	0,795	3	0,102	0,765	3	0,034
25	0,959	3	0,612	0,932	3	0,498
70	0,752	3	0,060	0,893	3	0,363
100	0,762	3	0,270	0,834	3	0,198
250	0,993	3	0,842	0,782	3	0,071
500	0,796	3	0,106	0,926	3	0,474
650	0,974	3	0,691	0,897	3	0,375

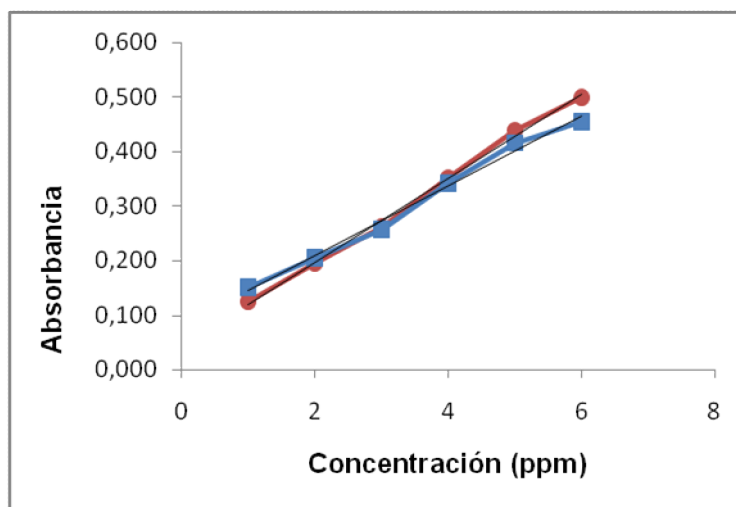
* Estadístico de Shapiro-Wilk para 3 gl $W_{tab} = 0,999$

Para la normalidad de los datos se tiene que $W_{cal} < W_{tab}$, aceptando la hipótesis nula, la cual nos dice que los datos de las concentraciones encontradas tienen un comportamiento normal, con un 95% de confianza ($Sig. \geq 0,05$), a pesar que un nivel para AM presenta valor mayor al W tabulado.

5.3.1.2 Curvas para el equipo de UV-Vis

Para realizar la cuantificación del peróxido de benzoílo y anhídrido maleico se prepararon tres curvas de calibración las cuales se nombran como Curvas 1, 2 y 3, con concentraciones de 1 a 6 ppm y se determinó la longitud de onda de máxima absorción para los compuestos 209 y 235 nm para AM y PB respectivamente. Se obtuvo la curva de calibración que se muestra en la gráfica 5 y la tabla 21. A la curva de calibración obtenida se le realiza la prueba de Shapiro-Wilk, los resultados se presentan en la tabla 20.

Grafica 5. Curva calibración UV-Vis



● Anhidrido maleico $y = 0.063x + 0.080$
 $R^2 = 0.991$

■ Peróxido de benzoilo $y = 0.077x + 0.042$
 $R^2 = 0.996$

Tabla 21. Curva calibración UV-Vis

Concentración (ppm)	Absorbancia AM	Absorbancia PB
1	0,151	0,125
2	0,205	0,195
3	0,257	0,262
4	0,342	0,352
5	0,416	0,439
6	0,455	0,500

Tabla 22. Prueba de normalidad para la curva de calibración UV-Vis

Concentración	Shapiro-Wilk AM			Shapiro-Wilk PB		
	Estadístico Wcal*	gl	Sig	Estadístico Wcal*	gl	Sig
1	1,000	3	1,000	1,000	3	1,000
2	0,750	3	0,000	0,750	3	0,000
3	1,000	3	1,000	1,000	3	1,000
4	0,964	3	0,637	1,000	3	1,000
5	1,000	3	1,000	1,000	3	1,000
6	1,000	3	1,000	1,000	3	1,000

* Estadístico de Shapiro-Wilk para 3 gl/Wtab= 0,999

Para la normalidad de los datos se tiene que $W_{cal} > W_{tab}$, como se puede apreciar en la tabla 22, aceptando la hipótesis alterna que nos indica un comportamiento no normal para las concentraciones obtenidas con la curva, a pesar que el valor de significancia es mayor 0,05. Para comprobar la normalidad de la curva se realizó

Anova de un factor, encontrándose valores de significancia menores de 0.05, con lo cual se concluye que los datos para la curva se comportan de manera no paramétrica, como se muestra en el Anexo L.

5.4 Extracción líquido-líquido.

Se realizaron pruebas de extracción en el simulante graso con varios solventes a diferentes tiempos de agitación, se calculó el porcentaje de recuperación de cada uno y se obtuvieron las absorbancias para cada compuesto. Finalmente se escogió como solvente de extracción acetonitrilo y un tiempo de agitación de 10 minutos. Los resultados del % de recuperación y absorbancias se muestran a continuación en las tablas 23 y 24

Tabla 23. Porcentajes de recuperación con diferentes solventes

Solvente	Tiempo	% de Recuperación
Acetonitrilo	5	90,7
	10	92
	15	90,8
Metanol	5	84
	10	84
	15	82,7
Etanol	5	80
	10	82
	15	76,7

Tabla 24. Absorbancia a diferentes tiempos de extracción

Solvente	Tiempo, min	Absorbancia		Desviación	
		AM	PB	AM	PB
Etanol	5	0,167	0,108	0,070	0,048
	10	0,190	0,099	0,072	0,024
	15	0,147	0,083	0,081	0,059
Metanol	5	0,256	0,566	0,115	0,066
	10	0,227	0,544	0,088	0,070
	15	0,299	0,573	0,071	0,088
ACN	5	0,280	0,731	0,055	0,034
	10	0,344	0,776	0,065	0,068
	15	0,246	0,620	0,036	0,080

Finalizados los 10 días del proceso de migración, se realizó la extracción, dividiendo en 5 fracciones de 10mL cada muestra, de acuerdo a los parámetros anteriormente establecidos, los cuales se presentan en la Tabla 25.

Tabla 25. Parámetros para la extracción líquido- líquido

Solvente	Tiempo de Agitación (min)	Numero de extracciones
Acetonitrilo	10	5 de 10 mL

5.5 Preparación de la muestra

Los diferentes tratamientos obtenidos en el laboratorio de Reología de la Universidad de Cauca fueron cortadas y pesadas por triplicado (0.07 g aprox.) figura 20, éstas fueron sumergidas en cada simulante A, B, C y D, durante los 10 días a las dos temperaturas (25 y 40°C), posteriormente se cuantificó la migración del anhídrido maleico y peróxido de benzoilo.

Figura 20. Muestras, tratamiento 8 (bolsa y pellet)



5.6 Evaluación de la migración

5.6.1 Migración global

Para la determinación de la migración global se cuantifico con la ecuación 5, la cual se establece por diferencia de pesos antes y después del paso de inmersión, teniendo en cuenta que la cuantificación dada corresponde a cualquier sustancia de la fabricación del biopolímero, ya sea capsaicina, colorante, almidón, anhídrido maleico o peróxido de benzoilo.

Para las muestras en el simulante D (aceite) fue difícil determinar su peso inmediatamente, ya que se adhiere al biopolímero gran cantidad de aceite, motivo por el cual se le retiro una gran cantidad de este aceite y se seco por varios días a temperatura ambiente, para poder tomar su respectivo peso.

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

Los valores obtenidos en ppm para la migración global se presentan en la tabla 26.

De acuerdo con los datos obtenidos se observa que hay transferencia de masa de los componentes poliméricos del empaque hacia los simulantes, con un mayor porcentaje a 40°C en presentación de bolsa, posiblemente debido a la descomposición de los componentes mayoritarios; es de esperarse que la migración en la presentación pellet sea menor, ya que en esta presentación no se encuentra el componente mayoritario

del empaque. Podemos concluir entonces, que hay migración global en todos los tratamientos a las diferentes condiciones de evaluación y que sobrepasan el LMG establecido (60ppm).

Tabla 26. ppm obtenidos para la migración global

Tratamiento	Agua		A. Acético		Etanol		Graso	
	25°	40°	25°	40°	25°	40°	25°	40°
BT ₁	47,17	304,42	526,33	399,89	278,47	285,43	18,70	92,24
BT ₂	226,58	288,61	200,10	311,07	166,75	212,64	105,50	24,79
BT ₃	150,00	344,64	333,02	443,38	500,25	331,70	92,00	25,75
BT ₄	428,78	386,52	388,53	427,15	375,42	353,87	283,95	190,82
BT ₅	333,50	254,14	111,72	342,42	333,50	266,49	22,32	73,01
BT ₆	111,72	198,46	500,25	244,16	118,22	287,92	9,28	66,16
BT ₇	311,60	488,54	534,27	475,90	400,20	418,33	36,42	63,54
BT ₈	134,08	468,14	214,24	494,50	221,77	431,73	36,69	114,29
PT ₁	38,21	0,00	8,57	3,80	238,64	3,33	0,00	1,85
PT ₂	45,83	5,83	134,04	0,00	55,02	4,99	4,62	14,22
PT ₃	91,69	63,85	6,67	39,48	0,00	56,21	3,22	9,23
PT ₄	37,53	55,84	134,04	55,36	142,90	63,93	7,22	1,94
PT ₅	8,33	4,19	10,00	6,52	100,48	5,46	271,69	136,86
PT ₆	70,02	3,13	166,72	10,91	134,04	16,67	8,50	8,25
PT ₇	6,00	63,04	134,04	35,51	45,03	50,58	1,96	11,69
PT ₈	6,67	38,92	59,98	34,54	111,70	30,35	3,78	5,37

5.6.2. Migración específica

La determinación de los compuestos en los simulantes A, B y C se llevó a cabo en un Cromatógrafo líquido de alta eficiencia HP 1200 con columna C₁₈, utilizando como fase móvil una mezcla acetonitrilo:agua en proporción de 60:40, flujo de 1.1 mL/min y el tiempo de corrida fue 5 minutos.

Las muestras son analizadas según sus características de fabricación las cuales se dividieron en dos grupos:

Grupo 1: Bolsa 1-8: correspondientes al diseño experimental (BT)

Grupo 2: Pellet 1-8: correspondientes al diseño experimental (PT)

Las variables utilizadas en la preparación del polímero fueron obtenidas a partir del diseño de experimentos en la fabricación que incluye diferentes porcentajes de mezcla binaria (PLA y PLC), anhídrido maleico y peróxido de benzoílo.

El análisis del diseño involucra el estudio de las variables consideradas para la migración en cada simulante de acuerdo a las normas establecidas.

Para la cuantificación se utilizó la curva de calibración presentada en la gráfica 4 y se obtuvieron los datos que se presentan a continuación en la tabla 27.

Se observa en los todos los tratamientos a las dos temperaturas que no se presenta transferencia de PB, esto se puede atribuir a la solubilidad del compuesto en el simulante ya que es prácticamente nula.

Para el AM observamos que se presenta el fenómeno de migración y aumenta en la mitad de los tratamientos con la temperatura de 40°C, se esperaría que el aumento de temperatura afectara de igual manera a todos los tratamientos, por lo que se procede a realizar pruebas de normalidad para establecer la distribución de los datos y poder

aplicar test que den información acerca del efecto y la interacción que se puede presentar ente los factores y las variables dependientes.

Tabla 27. Cuantificación Simulante A

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (ppm) 25°		CONCENTRACION (ppm) 40°	
	AM	PB	AM	PB
BT ₁	---	---	---	---
BT ₂	2,534	---	1,943	---
BT ₃	---	---	---	---
BT ₄	15,852	---	122,882	---
BT ₅	0,622	---	---	---
BT ₆	7,249	---	1,639	---
BT ₇	18,804	---	1,919	---
BT ₈	19,394	---	---	---
PT ₁	---	---	---	---
PT ₂	---	---	---	---
PT ₃	62,597	---	68,809	---
PT ₄	52,229	---	22,544	---
PT ₅	0,176	---	---	---
PT ₆	---	---	---	---
PT ₇	25,448	---	98,667	---
PT ₈	9,450	---	52,064	---

--- Por debajo de LOD

La prueba de Shapiro-Wilk se usa para contrastar la normalidad de un conjunto de datos. Donde se plantea como hipótesis nula aquella población que se distribuye normalmente, sí el estadístico W es menor que el tabulado, entonces ésta se rechaza.

De acuerdo con la prueba se tiene que la significancia obtenida para cada factor es menor que 0,05 y el estadístico W es menor que el tabulado (tabla 28), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, la cual me indica que los datos no provienen de una distribución normal, es decir, son no paramétricos.

Tabla 28. Prueba de normalidad para simulante A, presentación bolsa

Factor		Shapiro- Wilk		
Anhídrido		Wcal*	Gl	Sig
Concentración AM	0,784	0.848	24	0.002
	3,136	0.635	23	0.000
Mezcla				
Concentración AM	25	0,561	24	0,000
	35	0,879	23	0,010
Temperatura				
Concentración AM	25	0,892	23	0,017
	40	0,490	24	0,000
Anhídrido				
Concentración AM	0,784	0,848	24	0,002
	3,136	0,635	23	0,000
Peróxido				
Concentración AM	0,100	0,797	24	0,000
	0,400	0,578	23	0,000

* Estadístico de Shapiro-Wilk para 23 y 24 gl Wtab= 0,988

Se realiza el análisis de multivalente de la varianza, siendo una extensión del análisis de la varianza para cubrir los casos donde hay más de una variable dependiente que no pueden ser combinadas de manera simple. Además de identificar si los cambios en las variables independientes tienen efectos significativos en las variables dependientes. Ésta técnica intenta identificar las interacciones entre las variables independientes y su grado de asociación con las dependientes.

Con el fin de determinar qué factores influyen en la concentración de AM se realiza la prueba multivariante, los resultados se presentan en la tabla 29 y nos indican como la mezcla y temperatura no afectan la concentración del AM, ya que presenta valores de significancia mayores a 0.05. Para el caso de AM y PB se puede ver como las concentraciones de éstos utilizadas en la fabricación del biopolímero son estadísticamente significativas, por lo que influyen en la concentración del AM.

Tabla 29. Prueba Multivariante

Variable dependiente	Factor	Sig.
Concentración AM	Modelo corregido	0,000
	Intercepto	0,000
	Peróxido	0,001
	Anhídrido	0,001
	Mezcla	0,100
	Temperatura	0,285

Se realiza la prueba de univariante la cual incluye todos los modelos factoriales de anova, la cual ofrece la posibilidad de trabajar tanto con factores de efectos fijos como con factores de efectos aleatorios. En éste análisis de varianza existe una hipótesis nula por cada factor y por cada posible combinación de factores. Donde la hipótesis nula es aquel factor que afirma que las medias de las poblaciones definidas por los niveles del factor son iguales y la hipótesis referida al efecto de una interacción afirma que tal efecto es nulo.

Para ver en qué grado las concentraciones de AM y PB afectan la variable dependiente se realiza la prueba Univariante (tabla 30), encontrándose que el peróxido y anhídrido son significativamente diferentes (Sig. $0.005 < 0,05$). En cuanto al efecto de la interacción de Peróxido*Anhídrido, el estadístico F correspondiente a este efecto lleva asociado un nivel crítico de 0,103 (gráfica 6), indicando que la interacción entre éstos posee un efecto significativo sobre la concentración AM, con esto podemos anticipar que las diferencias de las concentraciones AM que se dan en los tratamientos.

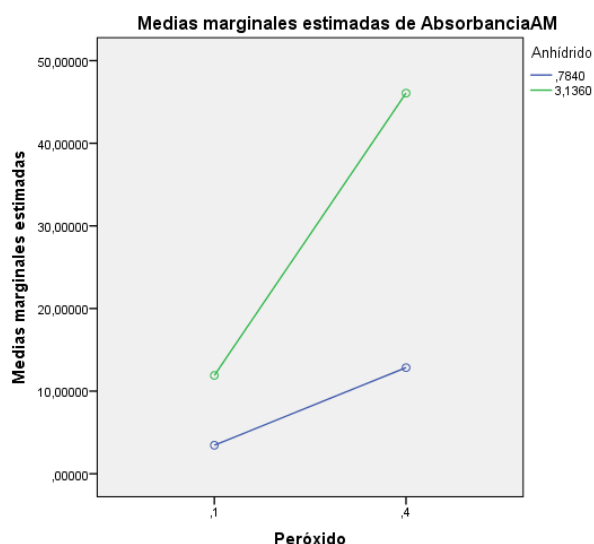
Tabla 30. Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen	gl	F	Sig.
Modelo corregido	3	6,167	0,001
Intersección	1	25,001	0,000
Peróxido	1	8,603	0,005
Anhídrido	1	7,872	0,008
Peróxido * Anhídrido	1	2,782	0,103

Variable dependiente: concentración AM

De acuerdo con las pruebas anteriores se concluye que los datos obtenidos no siguen un comportamiento normal, es decir, son no paramétricos. Se procede a realizar la prueba de Mann-Whitney, la cual se usa para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales. En la cual se rechaza H_0 si $p(\text{valor}) < \alpha$ la cual procede de una distribución normal y la hipótesis alterna puede ser unilateral o bilateral y únicamente supone que la tendencia central de la distribución difiere de la otra.

Gráfica 6. Interacción AM y PB Simulante A



Teniendo como factor el PB, con los datos presentados en la tabla 30 se observa que éste no es estadísticamente significativo para la concentración de PB ya que es mayor a 0,05 aceptando la hipótesis nula y rechazando la hipótesis alterna, pero si es significativo para la de AM, con una significancia de 0,001 rechazando la hipótesis nula. Igual ocurre con los demás factores (Anexo B), lo que nos indica que los datos no se ajustan a la normalidad.

Tabla 31. Estadístico de Contraste. Prueba de Mann-Whitney

Peróxido	ConcentraciónAM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	115,500	288,000
W de Wilcoxon	415,500	588,000
Z	-3,424	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	0,001	1,000

- **Simulante A pellet**

En la tabla 27 se puede observar que en los tratamientos del pellet a las dos temperaturas no se presenta transferencia de PB, posiblemente por la poca solubilidad del compuesto evaluado con el simulante A.

Para el AM en esta presentación observamos que hay una alta migración en los tratamientos y aumenta a 40°C, por lo cual se procede a realizar pruebas de normalidad para establecer el comportamiento de los datos y poder ejecutar diferentes

pruebas estadísticas que den la información necesaria para conocer el efecto y la interacción que se presenta con todos los factores en estudio.

Al realizar la prueba de Shapiro-Wilk tabla 32, se encontró que el comportamiento de los datos presenta una significancia menor a 0,05, rechazando la hipótesis nula ya que el W estadístico es menor que el W tabulado, por lo cual no se presenta una distribución normal para los resultados, siendo no paramétricos.

Tabla 32. Prueba de normalidad simulante A, presentación pellet.

Factor		Shapiro- Wilk		
Mezcla		Wcal*	Gl	Sig
Concentración AM	25	0,793	24	0,000
	35	0,787	24	0,010
Temperatura				
Concentración AM	25	0,835	24	0,001
	40	0,788	24	0,000
Anhídrido				
Concentración AM	0,784	0,595	24	0,000
	3,136	0,917	24	0,051
Peróxido				
Concentración AM	0,100	0,800	24	0,000
	0,400	0,795	24	0,000

* Estadístico de Shapiro-Wilk para 24 glWtab= 0,988

Al realizar la prueba multivariante se verifico el comportamiento de los datos y la interacción entre ellos, encontrándose que el peróxido y anhídrido afectan la variable dependiente con una significancia estadística < 0.05. Se comprobó este resultado con la prueba univariante para conocerla interacción presente entre ellos (Anexo C), encontrándose que el anhídrido y el peróxido afectan la migración de anhídrido significativamente (>0,05), razón por la cual se comprueba que la variación de la migración del anhídrido se ve afectada por el porcentaje de estos compuestos en el biopolímero.

Se concluye que los resultados se comportan de manera no paramétrica, se realizó la prueba de Mann-Whitney para comprobar la heterogeneidad de las muestras, teniendo el peróxido como factor, éste es no significativo para la concentración de PB y AM, ya que presenta una significancia mayor que 0,05 igual sucede con los demás factores. (Anexo C)

Podemos concluir que las dos presentaciones (bolsa y pellet) presentan un comportamiento no paramétrico dando como resultado posibles interacciones significativas entre AM y PB con las concentraciones de AM. De acuerdo a esto, se tiene que en la presentación de pellet hay mayor migración a la temperatura de evaluación más alta (40°C). En la tabla 33 podemos observar como en los tratamientos PT₃ y PT₇ hay una alta migración, ya que sobrepasa el límite permitido por las normas establecidas; en estos tratamientos solo se varía el porcentaje de mezcla, notándose que el cambio en la proporción PLA-PLC afecta la migración en estos tratamientos, podemos decir entonces que en este simulante el porcentaje de mezcla y la temperatura afectan significativamente la migración del anhídrido maleico.

Al variar el porcentaje de peróxido como en los tratamientos 4 y 8, se presenta menor migración. Al comparar otros tratamientos donde se varía el porcentaje de PB y los demás factores queden constantes, se puede observar como éste porcentaje influye en los datos. Igualmente sucede con el porcentaje de AM, encontrándose que a menor porcentaje de ellos (0,1 y 0,748) se presenta una menor migración.

Se observó que en la presentación bolsa solo hay migración de AM en el tratamiento 4 a mayor temperatura, comparando éste con el tratamiento 8 en el cual solo se varió el porcentaje de mezcla, se encuentra que el cambio influye en la migración del AM, ya que en este tratamiento (T_8) con esas condiciones no presento transferencia de AM. Para verificar esto se comparó con el tratamiento 3 (T_3) para determinar que otro factor puede interferir en la migración, en T_3 se varió el porcentaje de PB, encontrándose que a mayor concentración de PB (0.4%) se genera aumento en el proceso de migración. Este resultado coincide con los resultados obtenidos con las pruebas realizadas (SPSS), las cuales establecen que el porcentaje de peróxido de benzoilo utilizado en la fabricación del polímero afecta el proceso de migración.

Tabla 33. Concentración de AM encontrada con la variación de factores.

Tratamiento	% PB	% AM	% Mezcla	Concentración AM	
				25°	40°
PT ₃	0,100	3,136	25	62,597	68,809
PT ₇	0,100	3,136	35	25,448	98,667
PT ₈	0,400	3,136	35	9,500	52,064
PT ₄	0.400	3,136	25	52,229	22,544

De acuerdo con estos datos se observa que hay mayor migración en la presentación de pellet que en bolsa, esto puede atribuirse a que en la presentación de pellet se encuentra en menor proporción el porcentaje de almidón que en este caso sería el reactivo límite en la reacción de polimerización, lo cual hace que una porción de AM y PB queden sin reaccionar y por lo tanto tienden a presentar una mayor migración.

- Simulante B

En la tabla 34 se puede observar mayor migración de peróxido de benzoilo (presentación bolsa) y de anhídrido maleico (presentación pellet) a la temperatura de evaluación más alta (40°C).

Para el anhídrido maleico en presentación bolsa observamos que no hay migración en los tratamientos, esto es debido posiblemente a la solubilidad del compuesto en el simulante. Para el PB en esta presentación se observa que hay una alta migración, la cual sobrepasa el límite de esta sustancia establecido por la Mercosur (3mg/Kg) y que aumenta con el aumento en la temperatura de evaluación mayor (40°C), por lo cual se procede a realizar pruebas de normalidad para conocer el comportamiento de los datos y poder realizar diferentes pruebas estadísticas que nos brinden mayor información del efecto y la interacción que hay con los diferentes factores de interés.

Para conocer el comportamiento de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilk la cual nos indica que los datos se comportan de manera no paramétrica para las dos presentaciones, ya que presentan una significancia menor a 0,05, rechazando la hipótesis nula debido a que el W estadístico es menor que el W tabulado. (Anexo D)

Tabla 34. Cuantificación Simulante B

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (ppm) 25°		CONCENTRACIÓN (ppm) 40°	
	AM	PB	AM	PB
BT ₁	---	---	---	179,297
BT ₂	---	41,956	---	62,625
BT ₃	---	45,073	---	26,822
BT ₄	---	46,917	---	60,152
BT ₅	---	47,658	---	229,948
BT ₆	---	42,031	---	46,886
BT ₇	---	47,139	---	43,117
BT ₈	0,380	37,642	---	21,851
PT ₁	---	47,253	---	175,085
PT ₂	---	27,789	---	119,238
PT ₃	20,612	53,376	68,768	74,286
PT ₄	10,065	39,076	85,211	124,019
PT ₅	---	56,497	12,874	124,169
PT ₆	---	38,647	15,796	99,463
PT ₇	19,502	44,449	62,053	114,916
PT ₈	34,920	53,378	84,740	127,952

--- Por debajo de LOD

La prueba de multivariante brinda información acerca de la interacción que hay entre los factores con sus variables dependientes para el simulante B en las dos presentaciones, encontrándose que las variables independientes no afectan las variables dependientes (concentración AM y PB), ya que su influencia no es estadísticamente significativa ($>0,05$) para la presentación bolsa. Para la presentación pellet se observa como todos los factores (AM, PB, % de Mezcla y temperatura) influyen en la concentración AM presentando una significancia menor que 0,05 y para la variable dependiente (concentración PB) se tiene que ninguno de los factores es significativo.(Anexo D)

Para verificar los datos se realiza la prueba univariante para encontrar la interacción de los factores con las variables dependientes, encontrándose que el peróxido y el anhídrido no difieren significativamente ($> 0,05$) en la presentación de bolsa, sucede lo contrario para el pellet ya que el anhídrido es significativamente diferente ($< 0,05$). En el efecto de la interacción de Peróxido*Anhídrido para las dos presentaciones, el estadístico F el cual es el encargado de este efecto lleva a asociado el nivel crítico mayor a 0,05, lo que indica que la interacción entre ellos posee un efecto significativo sobre la concentración de AM, como se muestra en la gráfica 7.

Por lo tanto se tiene que los datos se distribuyen de forma no paramétrica, por lo cual se realizó la prueba de Mann-Whitney para verificar la heterogeneidad de los tratamientos en las dos presentaciones, utilizando como factor peróxido de benzoílo, éste es estadísticamente significativo para la concentración AM y PB ya que es mayor a 0,05. (Anexo E).

Dado que se presenta comportamiento no paramétrico para las dos presentaciones dando como resultado posibles interacciones significativas entre anhídrido maleico y peróxido de benzoílo con las concentraciones halladas para éstos. De acuerdo a esto se tiene que en la presentación de pellet hay más migración a mayor temperatura.

Al comparar los tratamientos BT₂ y BT₅ (tabla 35) en los cuales se varía el porcentaje de mezcla y PB, se tiene que a mayor cantidad de PB y Mezcla se observa menor

migración de peróxido de benzoílo, de acuerdo con esto se tiene una transferencia de PB alta. Se tiene también que al variar un factor y dejando constante la mezcla y el porcentaje de PB como en el caso de los tratamientos 1 y 3 se presenta un valor bajo de migración, aunque se genera migración a las dos temperatura, esto nos indica que el porcentaje de AM también afecta la concentración de AM y PB. Al comparar y variar todos los tratamientos con sus respectivas variables, nos arrojan que a porcentajes de AM y PB altos se presenta más transferencia

Gráfica 7. Interacción entre AM y PB Simulante B

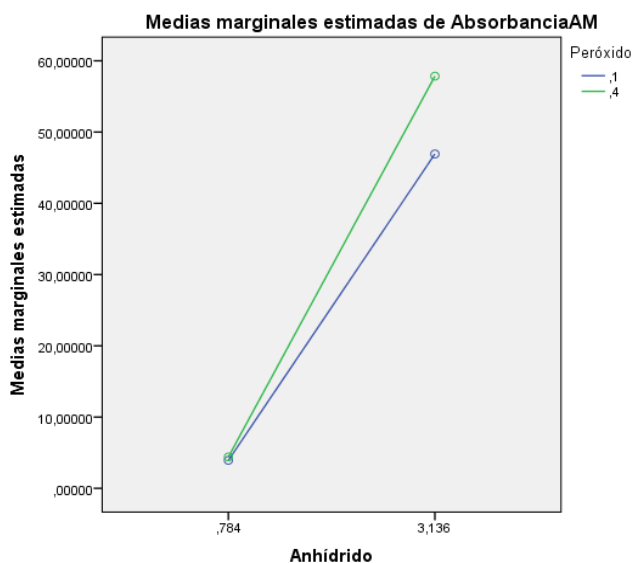


Tabla 35. Variación de los factores AM y PB

Tratamiento	% PB	% AM	% Mezcla	Concentración AM	
				25°	40°
BT ₂	0,400	0,784	25	---	62,625
BT ₅	0,100	0,784	35	47,657	229,947

En la presentación de pellet se encontró más migración a 40°C, al realizar comparaciones entre las variables de estudio, indicándonos que el porcentaje de anhídrido maleico y peróxido de benzoílo afectan la concentración de AM y PB como se muestra en la tabla 33, además se puede observar como en los tratamientos 3 y 7 presentan una mayor migración de anhídrido maleico y que en el tratamiento 7 hay más de peróxido de benzoílo. De acuerdo a esto confirmamos los datos arrojados por las pruebas estadísticas realizadas anteriormente.

De acuerdo con estos resultados podemos ver que hay mayor migración en la presentación pellet que en bolsa, como se pudo ver en el simulante A. Finalmente se tiene que los valores más bajos como los empleados en los tratamientos 1 y 3 son los más adecuados, ya que son los que presentan una menor migración.

- Simulante C

La cuantificación del simulante C se presenta en la tabla 36 encontrándose mayor migración de anhídrido maleico a menor temperatura, pero en la presentación de pellet se observa que la migración de los compuestos es mayor.

Tabla 36. Cuantificación simulante C

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (ppm) 25°		CONCENTRACION (ppm) 40°	
	AM	PB	AM	PB
BT ₁	---	---	---	---
BT ₂	3,742	---	4,459	---
BT ₃	9,405	---	---	---
BT ₄	9,684	---	4,447	---
BT ₅	9,346	---	16,503	---
BT ₆	5,643	---	1,986	2,030
BT ₇	28,253	---	10,996	---
BT ₈	38,795	---	9,479	---
PT ₁	---	---	32,845	---
PT ₂	---	---	---	---
PT ₃	41,986	---	---	---
PT ₄	30,936	---	1,305	---
PT ₅	---	---	106,816	---
PT ₆	---	---	3,545	---
PT ₇	28,110	---	---	---
PT ₈	33,659	---	19,795	---

--- Por debajo de LOD

Podemos observar que en las dos presentaciones no se presenta migración de peróxido de benzoílo y que el anhídrido maleico migrapero en menor cantidad en bolsa que en pellet, encontrándose que en esta presentación hay más migración a 25°C menor temperatura. Por lo cual se realizan pruebas estadísticas para conocer el comportamiento de los datos y encontrar sí las variables afectan los resultados obtenidos.

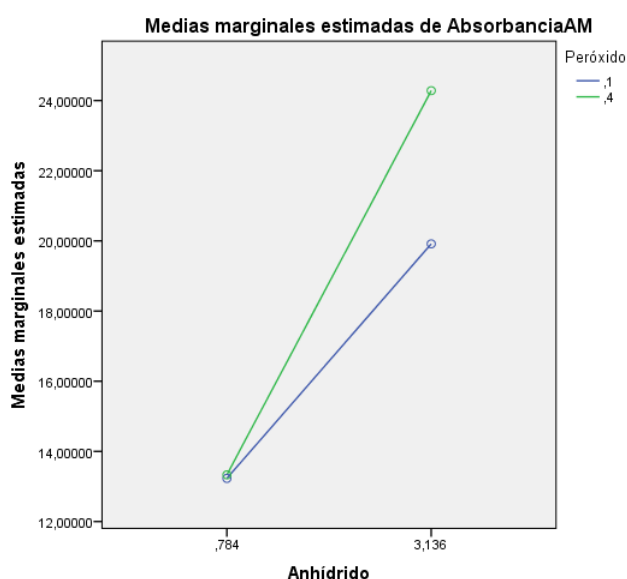
Para conocer la normalidad de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, encontrándose una significancia menor a 0,05 y un $W_{cal} < W_{tab}$ por lo cual se rechaza la hipótesis nula, indicando que los datos no presentan un comportamiento normal, siendo no paramétricos. (Anexo F)

Para conocer la interacción que hay entre los factores independientes y las variables dependientes, se realizó la prueba de multivariante, ya que esta nos permite conocer la significancia entre éstos, encontrándose que las variables independientes (mezcla, temperatura, AM y PB) afectan la variable dependiente (concentraciones AM y PB) ya que son significativas ($<0,05$), pero es no significativo para peróxido, por lo que la variación en el porcentaje de PB no afecta la concentraciones de AM encontradas, ya que se obtiene una significancia mayor a 0,05.

Para la presentación de pellet se observa que los factores independientes no afectan las concentraciones de AM y PB (Sig. $>0,05$), pero el factor mezcla es significativo por lo que afecta estas variables dependientes, y la temperatura es significativa para la concentraciones de PB pero es no significativa para las de AM. (Anexo G)

Se comparan los datos realizando la prueba univariante para confirmar la interacción de los factores dependientes, encontrándose que el peróxido no difiere significativamente ($> 0,05$) y las demás variables hay diferencia significativa en la concentración de AM para la presentación bolsa. En la presentación pellet el PB y la mezcla son significativamente diferentes y las otras variables no difieren significativamente. En el efecto de interacción de los factores dependientes con los independientes se encontró que en la presentación bolsa hay una interacción entre peróxido*anhídrido y peróxido*temperatura el cual posee un efecto significativo sobre la concentración de AM, en cuanto al pellet se encuentra una interacción entre peróxido*mezcla y anhídrido*mezcla generando un resultado significativo en la concentración de AM. (Anexo G)

Gráfica 8. Interacción entre AM y PB



Teniendo en cuenta que los resultados no siguen un comportamiento normal se continúa con la prueba de Mann-Whitney para comprobar la heterogeneidad de las muestras en las dos presentaciones, utilizando como factor el peróxido para esta prueba observándose que no es estadísticamente significativo ($>0,05$) para las concentraciones AM y PB. Para la presentación de pellet se obtiene que para la concentración de PB es significativa presentando un valor menor que 0,05; caso contrario para la concentración de AM ya que para este es no significativo. (Anexo H)

Se obtienen con los datos un comportamiento no paramétrico para ambas presentaciones las cuales nos brindan información necesaria entre la interacción de los factores independientes de los dependiente. Encontrándose que en el simulante C hay una mayor migración del anhídrido maleico a una menor temperatura, sucede igual que en los otros simulantes donde se encontró mayor migración en la presentación de pellet.

En los resultados presentados en la tabla 37 se observa que en los tratamientos de bolsa se presenta migración de AM, especialmente en T₈ a 25°C en el cual el valor encontrado sobrepasa el límite permitido para esta sustancia (30mg/Kg), al comparar éste tratamiento con T₄ se puede observar que a menor porcentaje de mezcla, menor migración.

Tabla 37. Migración de AM con las diferentes condiciones de preparación del biopolímero.

Tratamiento	% PB	% AM	% Mezcla	Concentración AM	
				25°	40°
BT ₈	0,4	3,136	35	38,795	9,479
BT ₄	0,4	3,136	25	9,684	4,447
PT ₁	0,1	0,784	25	---	32,845
PT ₅	0,1	0,784	35	---	106,816

En la presentación pellet se presenta un incremento en el fenómeno de transferencia de masa notorio, y a las dos temperaturas se observa una alta migración en los tratamientos 1, 3, 4, 5 y 8 para AM. Comparando el tratamiento 1 y 5, en el cual solo se varía el porcentaje de mezcla, se puede observar como a mayor porcentaje de mezcla, mayor migración, como se muestra en la tabla anterior. En los tratamientos 3 y 7 se puede ver que el porcentaje de mezcla para estos tratamientos no afecta, ya que a mayor porcentaje no hay migración, lo que indica que el porcentaje de AM y PB también puede influir en la concentración de anhídrido maleico.

De acuerdo a esto, confirmamos que es mejor trabajar con las condiciones más bajas para las variables independientes y así disminuir la transferencia de masa que se presenta en este simulante, también se encontró que en este simulante la migración de los compuestos de estudio es más baja comparada con los simulante A y B.

- Simulante D

En la tabla 38 se encuentra los datos de cuantificación del simulante D, donde se encontró mayor migración de AM en las dos presentaciones y temperaturas, para el PB se presentó migración pero en menor proporción.

Tabla 38. Cuantificación simulante D

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (ppm) 25°		CONCENTRACION (ppm) 40°	
	AM	PB	AM	PB
BT ₁	103,646	34,678	92,900	27,977
BT ₂	87,423	24,259	93,891	27,717
BT ₃	103,959	30,484	82,207	23,048
BT ₄	83,511	24,302	80,694	24,431
BT ₅	86,119	25,210	92,535	30,311
BT ₆	120,809	127,198	84,554	24,302
BT ₇	95,717	27,501	94,152	25,772
BT ₈	71,93	190,363	96,552	28,193
PT ₁	88,884	51,755	84,867	25,123
PT ₂	77,773	25,037	168,969	40,082
PT ₃	83,146	23,091	103,751	28,409
PT ₄	89,979	24,648	96,187	26,593
PT ₅	80,850	24,864	89,510	25,383
PT ₆	92,744	26,636	103,542	30,095
PT ₇	78,712	21,708	112,827	27,977
PT ₈	66,661	22,010	91,388	26,680

De acuerdo a lo anterior, se observó migración de los compuestos, ocurriendo en menor proporción para PB que para AM. Se encontró que el factor temperatura afecta,

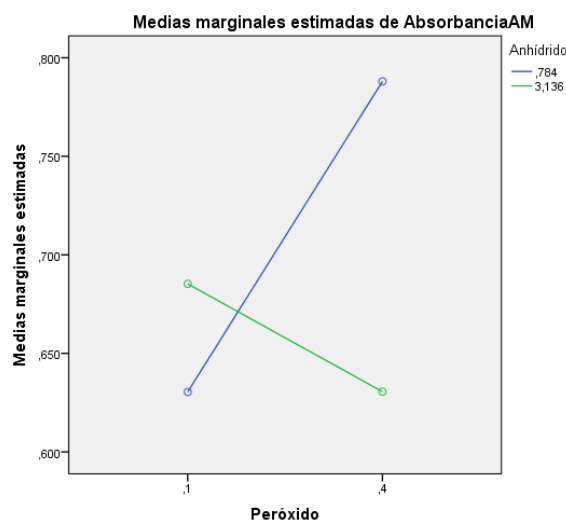
pero no presenta significancias muy altas. Por lo tanto se deben realizar pruebas estadísticas las cuales permiten conocer la distribución de los datos y encontrar el comportamiento de los factores independientes con las concentraciones de los compuestos de estudio y ver si afectan los resultados.

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk la cual nos permite conocer la normalidad de las muestras en las dos presentaciones (bolsa y pellet), encontrándose para los datos una significancia menor a 0,05 y un $W_{cal} < W_{tab}$ lo que nos indica que se rechaza la hipótesis nula, dando como resultado un comportamiento no paramétrico, para ambas presentaciones. (Anexo I)

Para conocer el efecto y las interacciones que se presentan entre los factores y las variables dependientes, se realizó la prueba multivariante, ya que estas nos proporcionan información acerca de la significancia entre ellos, encontrándose que las variables independientes (peróxido, mezcla y temperatura) afectan la variable dependiente ($< 0,05$), en este caso la concentración de PB; pero el factor anhídrido afecta la concentración de AM, también se encuentra que no se afecta la concentración del AM con las variables mezcla, temperatura y peróxido, y la concentración de PB no se ve afectada por la variable AM, ya que presenta una significancia mayor a 0,05. Para el pellet se observa que los factores que afectan la concentración de los compuestos son la mezcla, temperatura y anhídrido, ya que su significancia es menor que 0,05, encontrándose que el factor peróxido es no significativo y por lo tanto no afecta la concentración PB. (Anexo J)

Para verificar estos resultados se realizó la prueba univariante la que nos da el grado de interacción de los factores con las variables dependientes, y se encontró que el factor peróxido difiere significativamente ($< 0,05$), lo que no ocurre en la presentación pellet ya que presenta una significancia mayor que 0,05 por lo que la variable no difiere significativamente, sucede lo mismo para el anhídrido en las dos presentaciones. Para las interacciones anhídrido*peróxido para la bolsa se encontró que posee un efecto significativo sobre la concentración de AM presentando una alta interacción. Para la presentación de pellet se encuentra que no hay interacción ya que presenta una significancia menor que 0,05. (gráfica 9)

Grafico 9. Interacción AM * PB



A continuación se realiza la prueba Mann-Whitney para comprobar la heterogeneidad de las muestras en las dos presentaciones, utilizando como factor el peróxido para

esta prueba, se observa que éste no es estadísticamente significativo ($>0,05$) para las concentraciones AM y PB en las dos presentaciones. (Anexo K)

Se obtiene una distribución no paramétrica para ambas presentaciones conociendo las interacciones de los factores y las concentraciones de AM y PB.

Se encuentra que en este simulante hay más migración en comparación con los otros, observándose cómo el anhídrido maleico presenta una alta migración en todos los tratamientos a las dos temperaturas, el peróxido presenta migración pero en menor proporción.

En la presentación de pellet es donde menos migración hay para todos los tratamientos, pero para PB se observa que a mayor temperatura (40°C) menor es la migración de este compuesto. Comparando los tratamientos 1 y 5 presentación bolsa se encuentra que a mayor porcentaje de mezcla de copolímeros, menor grado de migración, igualmente sucede con estos tratamientos en la presentación de pellet.

En términos generales se puede decir que en el simulante graso se presenta con más frecuencia el fenómeno de migración, lo contrario ocurre en el simulante C donde los valores encontrados de migración son los más bajos para los dos compuestos.

Con las condiciones de trabajo óptimas establecidas se procedió a verificarla migración de los compuestos en cada simulante, observándose que la transferencia de los compuestos hacia el simulante depende en parte de la compatibilidad química que existe entre los analitos y las sustancias utilizadas como simulantes, se puede ver que en un mismo tratamiento, pero en diferente simulante como es el caso del agua donde no hay migración de peróxido, y en aceite donde la migración del compuesto es elevada depende en alto grado de la solubilidad del peróxido en las dos sustancias.

6. CONCLUSIONES

En el proceso de evaluación mediante las técnicas analíticas CLAE y UV-vis se determinó que en todos los simulantes hay mayor migración a 40°C, por lo cual el biopolímero no cumple con las normas establecidas, ya que todos los tratamientos sobrepasaron el límite permitido 30mg/Kg y 3mg/Kg para AM y PB respectivamente. Con los menores porcentajes de AM, PB y mezclabianaria se presenta nula o poca migración.

Al incrementar la temperatura a 40°C se encuentran los valores más altos de transferencia de masa (ppm), para AM se encontró en los tratamientos BT₈(19.39),BT₈(0.38), PT₃(41.99),y BT₆(120.81) en los simulantes A, B, C y D respectivamente; mientras que para el PB se observaron niveles altos en los tratamientos BT₄ (47.66), BT₈ (190.35) en los simulantes B y D respectivamente a 25°C; para 40°C se encuentran los valores más altos en BT₄ (122.88),PT₄ (85.21),PT₅ (106.82),PT₂ (168.70),en los simulantes A, B, C y D respectivamente para el AM, para el PB estos valores se encuentran en BT₅ (229.95), PT₂(40.08) en los simulantes B y D.

El proceso de evaluación de la migración se puede establecer utilizando el diseño experimental 2³ donde se involucraron las variables temperatura 25 y 40°C, porcentaje de mezcla 25 y 35 %, porcentaje AM 0.784 y 3.136 %, PB 0.1 y 0.4%, y los datos se analizaron con el paquete estadístico IBM SPSS 20.00, en el cual mediante pruebas estadísticas establece la normalidad y el grado de significancia de la interacción entre las variables independientes y las dependientes en las diferentes muestras y simulantes.

En el proceso de evaluación, utilizando las pruebas mencionadas, se confirma el grado de interacción que hay entre los factores comprendidos en del diseño de experimentos, donde se encontró que los que presentan un grado de interacción significativa son el porcentaje de anhídrido maleico y peróxido de benzoílo utilizados en la fabricación del biopolímero, afectando las concentraciones de migración de éstos hacia el simulante, por lo que se concluye que las mejores condiciones para la producción del empaque son minimizando la cantidad de los compuestos al momento de generar el biopolímero (0,1% de PB, 0.784 % AM y 25% de mezcla de copolímeros), ya que se genera menor transferencia de masa.

La implementación de un método analítico estableciendo los parámetros adecuados mediante CLAE y Uv-Vis, es confiable para la determinación y cuantificación de los compuestos de interés, determinándose los parámetros de calidad para cada técnica, límites de cuantificación (1,869 AM y 1,107 PB) y detección (6,230 AM y 3,690 PB)

El método por UV demostró ser repetible, preciso y lineal en un rango de concentraciones de 1 a 6 ppm; mientras que para CLAE la linealidad y repetibilidad se encontró en un rango de 40 a 608 ppm.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Carrasquero, L. F. Fundamentos de Polímeros. En: VI Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química. Universidad de los Andes. Diciembre, 2004. Online: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16700/1/polimeros.pdf>.
- [2] Sun, X., Zhang, J. F. Mechanical properties of poly(lactide) acid/starch composites compatibilized by maleic anhydride. En: Biomacromolecules. No.5. pp. 1446-1451. 2004.
- [3] Moad, G., Solomon, D. H., Stanley, R. J., Willing, R. Structure of benzoyl peroxide initiated polystyrene: Determination of the initiator-derived functionality by ¹³C NMR. En: Macromolecules. No. 15. pp. 1188–1191. 1982.
- [4] Pérez, P. Caracterización de la liberación de Carvacrol y eugenol contenidos en Films de wpi. En: UPNA, Universidad Pública de Navarra. Febrero, 2012. Online:<http://academicae.unavarra.es/bitstream/handle/2454/4724/577700.pdf?sequence=1>.
- [5] NTC 5022. Norma técnica Colombiana. Materiales y artículos plásticos destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas. Determinación de migración global. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC. 2003
- [6] NTC 4606. Norma Técnica Colombiana. Plásticos, Determinación De La Migración De Plastificantes. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC 1999.
- [7] Galotto, M., Garde, J. Procesos de migración del envase al alimento. Interacción envase-producto. En: ITENE, Instituto Tecnológico del Envase, Embalaje y Transporte, Valencia. 1994
- [8] Villada, C. H., Velasco, M. R. PRODUCCION Y CARACTERIZACIÓN DE PELICULAS FLEXIBLES POR EXTRUSION DE TORNILLO SIMPLE, A PARTIR DE ALMIDON DE YUCA, PLASTIFICANTE Y PLA Nombre del proyecto: USO DE PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS DE YUCA (MANIHOT ESCULENTA CRANTZ) EN EL DESARROLLO DE EMPAQUES BIODEGRADABLES. Disponibilidad: Restringido. En: Colombia, 2010, p.1510. Fin del proyecto, Diciembre, 2011.
- [9] DIRECTIVA 2002/72/CE DE LA COMISIÓN; Relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Agosto, 2002. Online: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:220:0018:0018:ES:PDF>
- [10] Pardave, W. L. Envases y medio ambiente. Bucaramanga. Marzo, 2003. Online:<http://www.siceditorial.com/ArchivosObras/obrapdf/TA10062332005.pdf>
- [11] Cran, J. The Mathematics of Diffusion, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford. pp. 1–2; 44–45; 69–70. 1975
- [12] Pelaez, A. Café metilxantin. Online: http://cafemetilxantin.blogspot.com/2012_09_01_archive.html.
- [13] La importancia del empaque de cosméticos y medicamentos. Quiminet.com. <http://www.quiminet.com/articulos/la-importancia-del-empaque-de-cosmeticos-y-medicamentos-2641511.htm>.

- [14] T.O.L.C.A. Embalaje. Agosto, 2010. Online:
<http://frezhitasss.blogspot.com/2010/08/embalaje-el-embalaje-es-un-recipiente-o.html>.
- [15] El diseño de empaque como estrategia de posicionamiento y sus tendencias. Diciembre, 2012. Online:<http://bantoodiseno.com/blog/disenio-de-empaque-posicionamiento/>.
- [16] Bolsas biodegradables: ¿Qué beneficios representan?. Agosto, 2009. Online:
<http://www.rpp.com.pe/detalle.php?nid=205060&op=7>.
- [17] Pascual. E. Bolsas biodegradables y medio ambiente. En: El blog verde. Agosto, 2009. Online:
<http://elblogverde.com/bolsas-biodegradables-y-medio-ambiente/>.
- [18] Empaque y embalaje: Empaques biodegradables, características y tipos. Marzo, 2011. Online:
<http://www.empaque-embalaje.com.mx/?p=36>.
- [19] Meneses, J., Corrales, C., Valencia, M. Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. En: Revista EIA, ISSN 1794-1237. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín. No. 8. pp. 57-67. Diciembre, 2007.
- [20] Fritz, H.G., Seidenstucker, T., Bolz, U., Juza, M. Study on production of thermoplastics and fibers based mainly on biological materials. En: Stuttgart. European Commission. pp. 392. 1994.
- [21] Poliésteres. En: NaturPlas, Centro Virtual de Desarrollo de Compósitos Biodegradables. Online:
<http://cvnaturplas.dnsalias.com/materiais-naturais/polimeros-biodegradaveis-de-origem-natural/principais-aplicacoes-de-polimeros-biodegradaveis/polimeros-biodegradaveis-de-origem-natural-1/poliesteres>.
- [22] Los empaques biodegradables aliados de los productos orgánicos. En: Medio ambiente. Agosto, 2007. Online:
<http://www.envapack.com/los-empaques-biodegradables-aliados-de-los-productos-organicos/>.
- [23] Conn, R.E., Kolstad, J.J., Borzelleca, J. F., Dixler, D.S., Filer, L. J., LaDu, B. N., Pariza M. W. Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer. En: FoodChemistryToxic, 33, No. 4. pp. 273-283. 1995.
- [24] Poliésteres. En: NaturPlas, Centro Virtual de Desarrollo de Compósitos Biodegradables. Online:
<http://cvnaturplas.dnsalias.com/materiais-naturais/polimeros-biodegradaveis-de-origem-natural/principais-aplicacoes-de-polimeros-biodegradaveis/polimeros-biodegradaveis-de-origem-natural-1/poliesteres>
- [26] Sinha, V.R., Bansal, K., Kumria, R., Kaushik, R., Trehan, A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. En: International Journal of Pharmaceutics. No. 278. pp. 1–23. Enero, 2004.
- [25] Sinha, V.R., Bansal, K., Kumria, R., Kaushik, R., Trehan, A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. En: International Journal of Pharmaceutics. No. 278. pp. 1–23. Enero, 2004.
- [26] Dubois P., Jacobs C., Jerome R., Teyssie P. Macromolecular Engineering of Polylactones and Polylactides. 4. Mechanism and Kinetics of Lactide Homopolymerization by Aluminum Isopropoxide. En: Macromolecules. No. 24. pp. 2266-2270. Abril 1991.
- [27] Kesel C., Wauven C., David C. Biodegradation of polycaprolactone and its blends with poly(vinylalcohol) by micro-organisms from a compost of house-hold refuse. En: Polymer Degradation and Stability. No. 55. pp. 107-113. 1995

[28] BASTIOLI, C., BELLOTTI, V., DEL TREDICI, G., MONTINO, A. Film-forming, starchy, polymeric composition and shaped articles, particularly films and sheets, which can be produced from the composition and have a good barrier effect, and a method of producing the articles. Patente N° 5462980.U.S. PTO.1995

[29] Anhídrido maleico. Online: http://www.huntsman.com/performance_products/a/Products/Maleic%20anhydride?P_LANGSWITCH=1

[30] Moad, G., Solomon, D. H., Stanley, R. J., Willing, R. Structure of benzoyl peroxide initiated polystyrene: Determination of the initiator-derived functionality by ¹³C NMR. En: *Macromolecules*. No. 15. pp. 1188–1191. Julio, 1982.

[31] Moad, G., Solomon, D. H., Willing, R. Thermal stability of benzoyl peroxide-initiated polystyrene. En: *Macromolecules*. No. 21. pp. 855-857. Marzo, 1988.

[32] Gottret, M. V., Escobar, Z., Pérez, S. El sector yuquero en Colombia: desarrollo y competitividad. En: OSPINA, Bernardo y CEBALLOS, Hernán. *La yuca en el tercer milenio*. pp. 340-377. Cali: CIAT, 570.2002

[33] López, S., Patricia Interacciones especiales envase-alimento : alta temperatura y envase activo antimicrobiano.– 1ª ed. – Zaragoza : Consejo Económico y Social de Aragón , 2008.– 232 p. , 24 cm. ISBN 978-84-691-8607-7 Alimentos - envases 664.8.036.52. online: http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/02/docs/Areas/Convocatorias/PremiosTesis/2007/TESIS_INTERACCIONES_ESPECIALES_2007.pdf,

[34] Catalá, R. Migración en envases de materiales poliméricos. II Congreso internacional de envases de alimentos, RISEA. Hermosillo, Sonora, México. pp. 14-16. Marzo, 1999.

[35] Catalá, R. Migración en envases de materiales poliméricos. II Congreso internacional de envases de alimentos, RISEA. Hermosillo, Sonora, México. pp. 14-16. Marzo, 2000.

[36] Ariosti, A. Aptitud sanitaria de envases en contacto con alimentos situación legislativa en el MERCOSUR. Seminario Iberoamericano de Interacciones Envases Plásticos-Alimentos. Santiago, Chile. pp. 20-21. Abril, 1999.

[37] VomBruck, C., Bieber, W., Figge, K. Interaction between food and packaging materials and its consequence on migration. En: *Food Packaging and Preservation. Theory and Practice*. De. M. Mathlouthi. pp. 39-65. 1991.

[38] Galotto, M., Guarda, A. Comparison between thermal and microwave treatment on the overall migration of plastic materials intended to be in contact with foods. En: *Packaging Technology and Science*. No.12. pp. 227-281. 1999.

[39] Galotto, M., Garde, J. Procesos de migración del envase al alimento. Interacción envase-producto. En: ITENE, Instituto Tecnológico del Envase, Embalaje y Transporte, Valencia. 1994.

[40] Garde, J. Análisis de migración. En: *Jornada técnica sobre migración en envases*. Valencia, España. Febrero, 1996.

[41] Empaque y embalaje: Normativa. Online: <http://es.scribd.com/doc/59940150/Normas-Empaque-y-Embalaje>

[42] BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO. Núm. 164 Lunes 11 de julio de 2011 Sec. I. Pág. 76316. MINISTERIO DE SANIDAD, POLÍTICA SOCIAL E IGUALDAD. Online: <http://www.boe.es/boe/dias/2011/07/11/pdfs/BOE-A-2011-11828.pdf>

[43] Situación actual y perspectivas del uso de PET reciclado para envases en contacto con alimentos Disponible en http://www.ecoembes.com/es/documentos-e-informacion/estudios-idi/Documents/PI%C3%A1sticos/INFORME_FASE1.pdf. AIMPLAS instituto tecnológico del plástico

[44] Pérez, P. Caracterización de la liberación de Carvacrol y eugenol contenidos en Films de wpi. En: UP^{NA}, Universidad Pública de Navarra. Febrero, 2012. Online: <http://academicae.unavarra.es/bitstream/handle/2454/4724/577700.pdf?sequence=1>.

[45] García, S.R. Estudio De La Migración De Distintos Componentes De Los Materiales Plásticos A Los Alimentos. En: Universidad De Santiago De Compostela. Febrero, 2005. Online: http://igc.xunta.es/pls/portal/docs/page/igc/012_centrodedocumentacion_menu/004_estudos_menu/estudomigracion.pdf.

[46] EMBALAJES Y EQUIPOS PLASTICOS EN CONTACTO CON ALIMENTOS: CLASIFICACION DE ALIMENTOS Y SIMULADORES MERCOSUR/GMC/RES N° 30/92.

[47] NTC 5022. Norma técnica Colombiana. Materiales y artículos plásticos destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas. Determinación demigración global. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC. 2003

[48] NTC 4606. Norma Técnica Colombiana. Plásticos, Determinación De La Migración De Plastificantes. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC 1999.

[49]]BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO. Núm. 164 Lunes 11 de julio de 2011 Sec. I. Pág. 76316. MINISTERIO DE SANIDAD, POLÍTICA SOCIAL E IGUALDAD. Online: <http://www.boe.es/boe/dias/2011/07/11/pdfs/BOE-A-2011-11828.pdf>.

[50] Ferré, J., Rius, X. Introducción Al Diseño Estadístico De Experimentos. En: Universitat Rovira i Virgili. Online: <http://ocw.univalle.edu.co/ocw/ingenieria-electronica-telecomunicaciones-y-afines/investigacion-i/bibliografia-1/disenostadisticoexperimentos.pdf>

[51] Diseño estadístico de experimentos. Online. http://www.ugr.es/~bioestad/_private/cpfund3.pdf

[52] Introducción al diseño de experimentos. Online: <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/Disenno/IntroDE.pdf>

[53] Busto. J. Diseño de experimentos. Online: http://www.aesan.mpsi.es/AESANdocsdocsnotas_prensa6_Juana_Bustos_Garcia_de_Castro.pdf

[54] Vasquez, M. Interacciones en el sistema producto-envase-entorno. Online: [http://www.lhica.org/archivos/docs/Interacciones%20Envase-Alimento_Lugo_2012_para%20pdf\[1\].pdf](http://www.lhica.org/archivos/docs/Interacciones%20Envase-Alimento_Lugo_2012_para%20pdf[1].pdf)

[55] Experimentos factoriales. Online: <http://www.uru.edu/fondoeditorial/libros/pdf/manualdestatistix/cap5.pdf>

[56] Modelo de diseños factoriales y diseños 2k. online: <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/Disenno/tema3DE.pdf>

[57] Las pruebas estadísticas. Online: <http://scientific-european-federation-osteopaths.org/es/prueba-estadisticas>

[58] Pruebas no paramétricas. Universidad de Barcelona. Online:
http://www.ub.edu/aplica_infor/spss/cap6-2.htm

[59] Análisis de correlación lineal, capítulo 24. online:
http://pendientedemigracion.ucm.es/info/socivmyt/paginas/D_departamento/materiales/analisis_datosyMultivariable/17corlin_SPSS.pdf

[60] Gutiérrez, I, Martínez, J., Santiago, M., García, D., Análisis de la relación entre la intensidad del tráfico de datos y el número de alumnos en universidades españolas. Online:
<http://www.maths.ed.ac.uk/~jmartinezgarcia/papers/jitel07.pdf>

[61] Pruebas estadísticas, capítulo 8. Online:
http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Abril_2011/IF_VIVANCO_FIPA/I_Capitulo%208_Pruebas%20estad%EDsticas.pdf

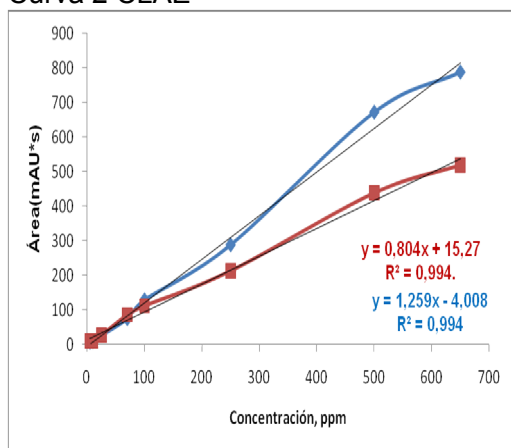
[62] J.C. Sena. La medición de la repetibilidad y el error de medida.online:
http://www.bcn.cat/museuciencies_fitxers/imatges/FitxerContingut1983.pdf

ANEXOS

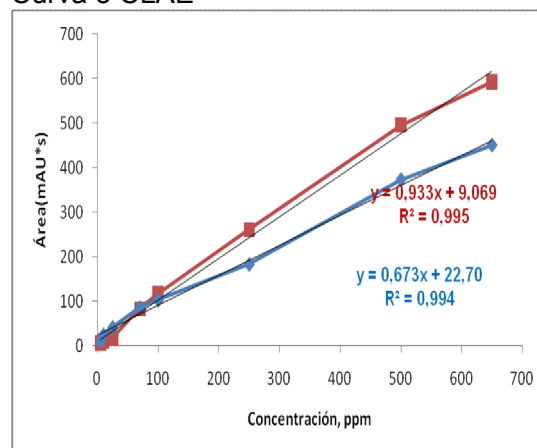
ANEXO A

Curvas de Calibración CLAE

Curva 2 CLAE

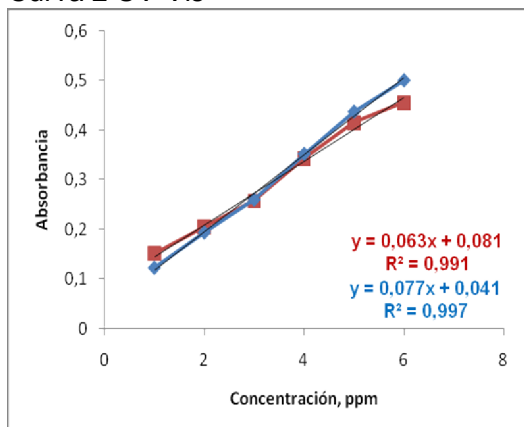


Curva 3 CLAE

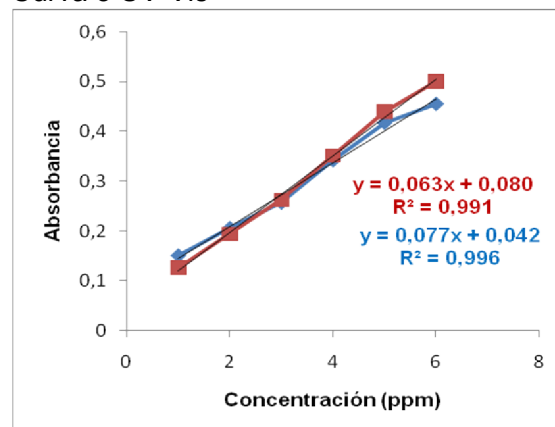


Curvas de Calibración UV-Vis

Curva 2 UV-Vis



Curva 3 UV-Vis



ANEXO B

Pruebas no paramétricas para los factores, simulante A

Anhídrido	Concentración AM, ppm	Concentración PB, ppm
U de Mann-Whitney	168,500	288,000
W de Wilcoxon	468,500	588,000
Z	-2,293	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	0,022	1,000

Mezcla	Concentración AM, ppm	Concentración PB, ppm
U de Mann-Whitney	243,500	288,000
W de Wilcoxon	543,500	588,000
Z	-,693	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	0,488	1,000

Temperatura	Concentración AM, ppm	Concentración PB, ppm
U de Mann-Whitney	193,500	288,000
W de Wilcoxon	493,500	588,000
Z	-1,760	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	0,078	1,000

ANEXO C

Pruebas simulante A, presentación pellet.

- Multivariante

Factor	Variable dependiente	Sig.
Modelo corregido	Concentración AM	0,000
Intercepto	Concentración PB	0,000
Peróxido	Concentración AM	0,004
Anhídrido	Concentración PB	0,000
Mezcla	Concentración AM	0,955
Temperatura	Concentración PB	0,069

- Efectos inter-sujetos

Origen	gl	Sig.
Modelo corregido	3	0,000
Intersección	1	0,000
Peróxido	1	0,007
Anhídrido	1	0,000
Peróxido * Anhídrido	1	0,010

Variable dependiente: concentración A

- Estadístico de Contraste-Prueba de Mann-Whitney

Peróxido	Concentración AM, ppm	Concentración PB, ppm
U de Mann-Whitney	241,500	288,000
W de Wilcoxon	541,500	588,000
Z	-,985	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	0,325	1,000

Anhídrido	Concentración AM, ppm	Concentración PB, ppm
U de Mann-Whitney	0,000	288,000
W de Wilcoxon	300,000	588,000
Z	-6,101	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	0,000	1,000

Mezcla	Concentración AM, ppm	Concentración PB, ppm
U de Mann-Whitney	261,000	288,000
W de Wilcoxon	561,000	588,000
Z	-0,572	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	0,567	1,000

Temperatura	Concentración AM, ppm	Concentración PB, ppm
U de Mann-Whitney	288,000	288,000
W de Wilcoxon	588,000	588,000
Z	0,000	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	1,000	1,000

ANEXO D

Prueba de normalidad Simulante B, presentación Bolsa

Factor		Shapiro- Wilk		
Mezcla		Wcal*	gl	Sig
Concentración AM	25	0,719	24	0,000
	35	0,690	24	0,000
Concentración PB	25	0,313	24	0,000
	35	0,512	24	0,000
Temperatura				
Concentración AM	25	0,908	24	0,031
	40			
Concentración PB	25	0,730	24	0,000
	40	0,298	24	0,000
Anhídrido				
Concentración AM	0,784	0,638	24	0,002
	3,136	0,796	24	0,000
Concentración PB	0,784	0,325	24	0,000
	3,136	0,925	24	0,075
Peróxido				
Concentración AM	0,1	0,705	24	0,000
	0,4	0,745	24	0,000
Concentración PB	0,1	0,320	24	0,000
	0,4	0,215	24	0,000

* Estadístico de Shapiro-Wilk para 24 glWtab= 0,988

Prueba de normalidad simulante B, presentación pellet

Factor		Shapiro- Wilk		
Mezcla		Wcal*	gl	Sig
Concentración AM	25	0,756	24	0,000
	35	0,867	24	0,005
Concentración PB	25	0,872	24	0,006
	35	0,217	24	0,000
Temperatura				
Concentración AM	25	0,849	24	0,002
	40	0,802	24	0,000
Concentración PB	25	0,942	24	0,000
	40	0,215	24	0,000
Anhídrido				
Concentración AM	0,784	0,653	24	0,000
	3,136	0,872	24	0,006
Concentración PB	0,784	0,890	24	0,013
	3,136	0,217	24	0,000
Peróxido				
Concentración AM	0,1	0,826	24	0,001
	0,4	0,772	24	0,000
Concentración PB	0,1	0,845	24	0,002
	0,4	0,218	24	0,000

* Estadístico de Shapiro-Wilk para 24 glWtab= 0,988

Pruebas realizadas al simulante B

- Multivariante (bolsa)

Factor	Variable dependiente	Sig.
Modelo corregido	Concentración AM	0,419
	Concentración PB	0,480
Intercepto	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,075
Peróxido	Concentración AM	0,594
	Concentración PB	0,585
Anhídrido	Concentración AM	0,117
	Concentración PB	0,173
Mezcla	Concentración AM	0,387
	Concentración PB	0,214
Temperatura	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,264

- Multivariante (Pellet)

Factor	Variable dependiente	Sig.
Modelo corregido	Concentración AM	0,00
	Concentración PB	0,442
Intercepto	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,182
Peróxido	Concentración AM	0,06
	Concentración PB	0,329
Anhídrido	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,329
Mezcla	Concentración AM	0,007
	Concentración PB	0,324
Temperatura	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,273

- Efectos inter-sujetos bolsa

Origen	gl	Sig.
Modelo corregido	9	0,397
Intersección	1	0,072
Peróxido	1	0,581
Anhídrido	1	0,169
Mezcla	1	0,215
Temperatura	1	0,259
Peróxido * Anhídrido	1	0,583
Peróxido * Mezcla	1	0,475
Peróxido * Temperatura	1	0,444
Anhídrido * Mezcla	1	0,223
Mezcla * Temperatura	1	0,212

Variable dependiente: Concentración PB

- Efectos inter-sujetos bolsa

Origen	gl	Sig.
Modelo corregido	9	0,000
Intersección	1	0,000
Peróxido	1	0,346
Anhídrido	1	0,007
Mezcla	1	0,129
Temperatura	1	0,000
Peróxido * Anhídrido	1	0,741
Peróxido * Mezcla	1	0,014
Peróxido * Temperatura	1	0,346
Anhídrido * Mezcla	1	0,053
Mezcla * Temperatura	1	0,129

Variable dependiente: concentración AM

- Prueba univariante para bolsa

Origen	gl	Sig.
Modelo corregido	3	0,419
Intersección	1	0,000
Peróxido	1	0,594
Anhídrido	1	0,117
Peróxido * Anhídrido	1	0,852

Variable dependiente: Concentración AM

- Prueba univariante pellet

Origen	gl	Sig.
Modelo corregido	3	0,000
Intersección	1	0,000
Peróxido	1	0,294
Anhídrido	1	0,000
Peróxido * Anhídrido	1	0,336

Variable dependiente: Concentración AM

ANEXO E

Pruebas no paramétricas simulante B

- Estadístico de Contraste-Prueba de Mann-Whitney para pellet

Peróxido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	269,000	248,000
W de Wilcoxon	569,000	548,000
Z	-,399	-,825
Sig. asintót. (bilateral)	0,690	0,409

Anhídrido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	3,000	288,000
W de Wilcoxon	303,000	588,000
Z	-5,988	0,000
Sig. asintót. (bilateral)	0,000	1,000

Mezcla	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	244,500	260,000
W de Wilcoxon	544,500	560,000
Z	-0,914	-0,577
Sig. asintót. (bilateral)	0,361	0,564

Temperatura	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	183,000	,000
W de Wilcoxon	483,000	300,000
Z	-2,206	-5,939
Sig. asintót. (bilateral)	0,027	0,000

Anexo F

Pruebas de normalidad simulante C

- Prueba de normalidad simulante C (bolsa)

Factor		Shapiro- Wilk		
Mezcla		Wcal*	gl	Sig
Concentración AM	25	0,910	24	0,035
	35	0,863	24	0,004
Concentración PB	25	0,209	24	0,000
	35	0,544	24	0,000
Temperatura				
Concentración AM	25	0,829	24	0,001
	40	0,926	24	0,081
Concentración PB	25	0,209	24	0,000
	40	0,544	24	0,000
Anhídrido				
Concentración AM	0,784	0,914	24	0,043
	3,136	0,863	24	0,004
Concentración PB	0,784	0,564	24	0,000
Peróxido				
Concentración AM	0,1	0,949	24	0,260
	0,4	0,611	24	0,000
Concentración PB	0,1	0,450	24	0,002
	0,4	0,383	24	0,000

* Estadístico de Shapiro-Wilk para 24 glWtab= 0,988

- Prueba de normalidad simulante C (pellet)

Factor		Shapiro- Wilk		
Mezcla		Wcal*	gl	Sig
Concentración AM	25	0,804	24	0,000
	35	0,728	24	0,000
Concentración PB	25			
	35	0,424	24	0,000
Temperatura				
Concentración AM	25	0,827	24	0,001
	40	0,682	24	0,000
Concentración PB	25	0,209	24	0,000
	40	0,393	24	0,000
Anhídrido				
Concentración AM	0,784	0,619	24	0,000
	3,136	0,889	24	0,013
Concentración PB	0,784			
	3,136	0,424		0,000
Peróxido				
Concentración AM	0,1	0,777	24	0,000
	0,4	0,814	24	0,001
Concentración PB	0,1	----	24	
	0,4	0,424	24	0,000

* Estadístico de Shapiro-Wilk para 24 glWtab= 0,988

Anexo G

Pruebas multivariante simulante C

- Multivariante Simulante Bolsa

Factor	Variable dependiente	Sig.
Modelo corregido	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,000
Intercepto	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,150
Peróxido	Concentración AM	0,065
	Concentración PB	0,000
Anhídrido	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,000
Mezcla	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,000
Temperatura	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,000

- Prueba Multivariante Pellet

Factor	Variable dependiente	Sig.
Modelo corregido	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,000
Intercepto	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,060
Peróxido	Concentración AM	0,090
	Concentración PB	0,060
Anhídrido	Concentración AM	0,494
	Concentración PB	0,06
Mezcla	Concentración AM	0,011
	Concentración PB	0,006
Temperatura	Concentración AM	0,343
	Concentración PB	0,013

- Prueba Univariante bolsa

Origen	gl	F	Sig.
Modelo corregido	9	12,008	0,000
Intersección	1	392,522	0,000
Peróxido	1	1,565	0,219
Anhídrido	1	24,380	0,000
Mezcla	1	47,410	0,000
Temperatura	1	21,857	0,000
Peróxido * Anhídrido	1	1,426	0,240
Peróxido * Mezcla	1	6,010	0,019
Peróxido * Temperatura	1	0,029	0,866
Anhídrido * Mezcla	1	4,490	0,041
Mezcla * Temperatura	1	0,900	0,349

Variable dependiente: Concentración PB

Origen	gl	F	Sig.
Modelo corregido	9	12,008	0,000
Intersección	1	392,522	0,000
Peróxido	1	1,565	0,219
Anhídrido	1	24,380	0,000
Mezcla	1	47,410	0,000
Temperatura	1	21,857	0,000
Peróxido * Anhídrido	1	1,426	0,240
Peróxido * Mezcla	1	6,010	0,019
Peróxido * Temperatura	1	,029	0,866
Anhídrido * Mezcla	1	4,490	0,041
Mezcla * Temperatura	1	,900	0,349

Variable dependiente: Concentración AM

- Prueba univariante pellet

Origen	gl	F	Sig.
Modelo corregido	9	11,078	0,000
Intersección	1	120,627	0,000
Peróxido	1	7,542	0,009
Anhídrido	1	,477	0,494
Mezcla	1	7,246	0,011
Temperatura	1	,923	0,343
Peróxido * Anhídrido	1	18,715	0,000
Peróxido * Mezcla	1	1,292	0,263
Peróxido * Temperatura	1	8,450	0,006
Anhídrido * Mezcla	1	3,769	0,060
Mezcla * Temperatura	1	8,077	0,007

Variable dependiente: Concentración AM

Anexo H

Pruebas no paramétricas simulante C

- Estadístico de Contraste-Prueba de Mann-Whitney bolsa

Peróxido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	285,000	282,000
W de Wilcoxon	585,000	582,000
Z	-,062	-,202
Sig. asintót. (bilateral)	0,951	0,840

Anhídrido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	148,000	204,000
W de Wilcoxon	448,000	504,000
Z	-2,887	-2,821
Sig. asintót. (bilateral)	0,004	0,005

Mezcla	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	93,000	225,000
W de Wilcoxon	393,000	525,000
Z	-4,021	-2,116
Sig. asintót. (bilateral)	0,000	0,034

Temperatura	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	189,000	225,000
W de Wilcoxon	489,000	525,000
Z	-2,042	-2,116
Sig. asintót. (bilateral)	0,041	0,034

- Estadístico de Contraste-Prueba de Mann-Whitney pellet

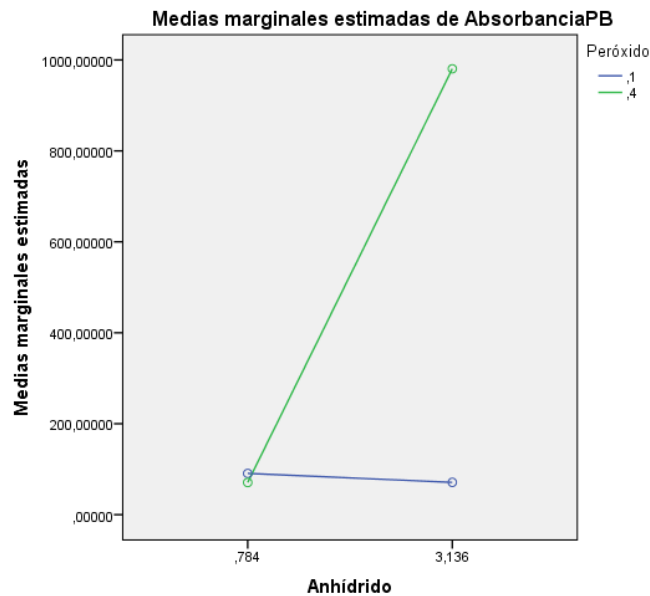
Peróxido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	280,000	240,000
W de Wilcoxon	580,000	540,000
Z	-,165	-2,065
Sig. asintót. (bilateral)	0,869	0,039

Mezcla	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	214,000	240,000
W de Wilcoxon	514,000	540,000
Z	-1,526	-2,065
Sig. asintót. (bilateral)	0,127	0,039

Temperatura	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	288,000	262,500
W de Wilcoxon	588,000	562,500
Z	0,000	-1,097
Sig. asintót. (bilateral)	1,000	0,273

Anhídrido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	198,000	240,000
W de Wilcoxon	498,000	540,000
Z	-1,856	-2,065
Sig. asintót. (bilateral)	0,063	0,039

- Interacción AM * PB



Anexo I

Pruebas de normalidad simulante D

- Prueba de normalidad simulante D, presentación bolsa

Factor		Shapiro- Wilk		
Mezcla		Wcal*	gl	Sig
Concentración AM	25	0,804	24	0,000
	35	0,728	24	0,000
Concentración PB	25			
	35	0,424	24	0,000
Temperatura				
Concentración AM	25	0,827	24	0,001
	40	0,682	24	0,000
Concentración PB	25	0,209	24	0,000
	40	0,393	24	0,000
Anhídrido				
Concentración AM	0,784	0,791	24	0,000
	3,136	0,918	24	0,052
Concentración PB	0,784	0,477	24	0,000
	3,136	0,431	24	0,000
Peróxido				
Concentración AM	0,1	0,910	24	0,035
	0,4	0,855	24	0,003
Concentración PB	0,1	0,931	24	0,105
	0,4	0,597	24	0,000

- Prueba de normalidad simulante D, presentación pellet

Factor		Shapiro- Wilk		
Mezcla		Wcal*	gl	Sig
Concentración AM	25	,643	24	,000
	35	,944	24	,196
Concentración PB	25	,706	24	,000
	35	,938	24	,149
Temperatura				
Concentración AM	25	,911	24	,037
	40	,701	24	,000
Concentración PB	25	,548	24	,000
	40	,699	24	,000
Anhídrido				
Concentración AM	0,784	,632	24	,000
	3,136	,955	24	,342
Concentración PB	0,784	,687	24	,000
	3,136	,887	24	,012
Peróxido				
Concentración AM	0,1	,832	24	,001
	0,4	,732	24	,000
Concentración PB	0,1	,610	24	,000
	0,4	,762	24	,000

Anexo J

Prueba multivariante simulante D

- Multivariante bolsa

Factor	Variable dependiente	Sig.
Modelo corregido	Concentración AM	0,032
	Concentración PB	0,000
Intercepto	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,000
Peróxido	Concentración AM	0,172
	Concentración PB	0,000
Anhídrido	Concentración AM	0,026
	Concentración PB	0,308
Mezcla	Concentración AM	0,541
	Concentración PB	0,000
Temperatura	Concentración AM	0,128
	Concentración PB	0,000

- Multivariante pellet

Factor	Variable dependiente	Sig.
Modelo corregido	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,000
Intercepto	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,000
Peróxido	Concentración AM	0,064
	Concentración PB	0,611
Anhídrido	Concentración AM	0,065
	Concentración PB	0,001
Mezcla	Concentración AM	0,028
	Concentración PB	0,004
Temperatura	Concentración AM	0,000
	Concentración PB	0,410

- Univariante bolsa

Origen	gl	F	Sig.
Modelo corregido	3	2,236	0,097
Intersección	1	59,840	0,000
Peróxido	1	5,888	0,019
Anhídrido	1	0,268	0,607
Peróxido * Anhídrido	1	0,551	0,462

Variable dependiente: Concentración PB

- Univariante Pellet

Origen	gl	F	Sig.
Modelo corregido	3	3,835	0,016
Intersección	1	1299,962	0,000
Peróxido	1	1,842	0,182
Anhídrido	1	1,830	0,183
Peróxido * Anhídrido	1	7,833	0,008

Variable dependiente: Concentración AM

Anexo K

Pruebas no paramétricas simulante D

- Prueba de Mann-Whitney pellet

Peróxido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	229,000	258,500
W de Wilcoxon	529,000	558,500
Z	-1,217	-,609
Sig. asintót. (bilateral)	,224	,543

Anhídrido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	285,000	169,000
W de Wilcoxon	585,000	469,000
Z	-0,062	-2,456
Sig. asintót. (bilateral)	0,951	0,014

Mezcla	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	52,500	105,000
W de Wilcoxon	352,500	405,000
Z	-4,857	-3,777
Sig. asintót. (bilateral)	0,000	0,000

Temperatura	ConcentraciónAM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	261,000	233,500
W de Wilcoxon	561,000	533,500
Z	-0,557	-1,125
Sig. asintót. (bilateral)	0,578	0,261

- Prueba de Mann-Whitney Bolsa

Peróxido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	200,500	259,500
W de Wilcoxon	500,500	559,500
Z	-1,805	-0,589
Sig. asintót. (bilateral)	0,071	0,556

Anhídrido	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	217,500	250,500
W de Wilcoxon	517,500	550,500
Z	-1,454	-0,774
Sig. asintót. (bilateral)	0,146	0,439

Mezcla	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	224,500	197,500
W de Wilcoxon	524,500	497,500
Z	-1,310	-1,869
Sig. asintót. (bilateral)	0,190	0,062

Temperatura	Concentración AM	Concentración PB
U de Mann-Whitney	254,500	192,000
W de Wilcoxon	554,500	492,000
Z	-0,691	-1,983
Sig. asintót. (bilateral)	0,490	0,047

Anexo L

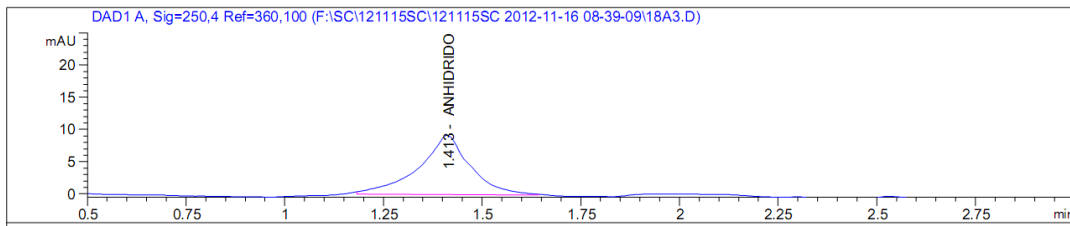
Prueba Anova de un factor curva de calibración UV-Vis

Inter-grupos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
AM	0,216	5	0,043	33863,270	0,000
PB	0,313	5	0,063	70408,600	0,000

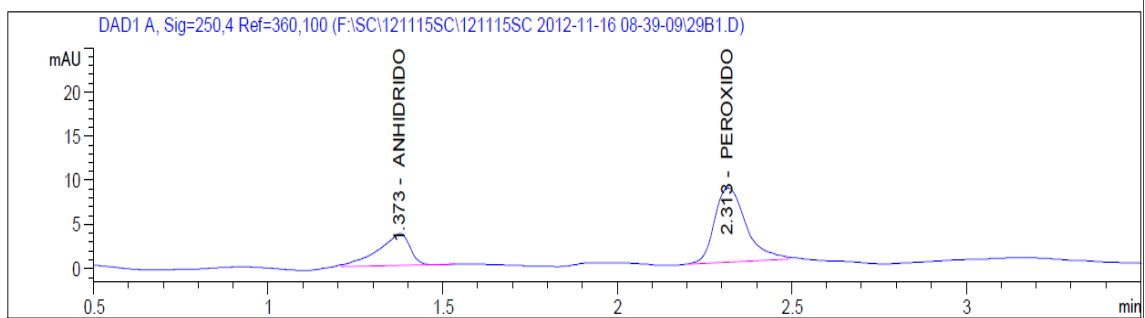
Anexo M

CROMATOGRAMAS

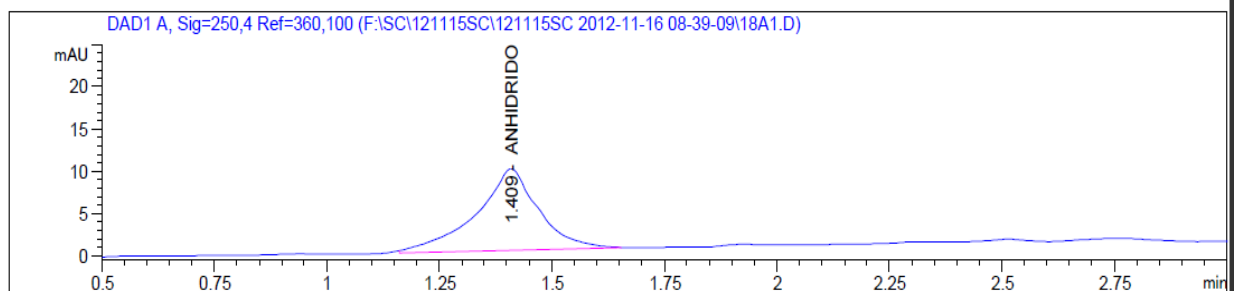
Simulante A, 25°C, muestra 18 (pellet)



Pellet simulante B



Pellet T8 simulante A



Simulante c, bolsa 25

