



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Maestría en Ingeniería en Calidad y Productividad

Efecto del PET en la vida útil del agua embotellada

Opción de titulación  
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestría en Ingeniería en Calidad y Productividad

**Presenta:**  
Humberto Comte Loera

Dirigido por:  
Guillermo Hiyane Nashiro

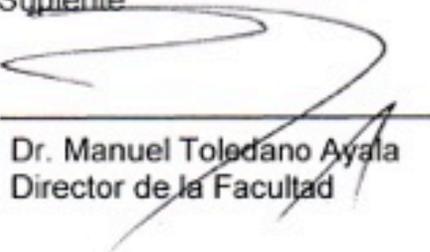
Mtro. Guillermo Hiyane Nashiro  
Presidente

Dra. Aurora Femat Diaz  
Secretario

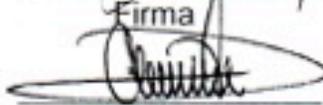
Dra. Marcela Gaytán Martínez  
Vocal

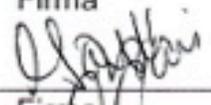
Mtro. Javier García Pérez  
Suplente

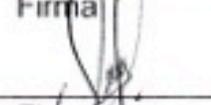
Mtro. Eric Leonardo Huerta Manzanilla  
Suplente

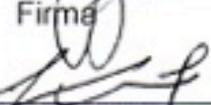
  
Dr. Manuel Toledano Ayala  
Director de la Facultad

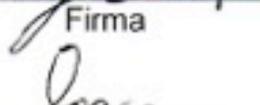
  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

## Resumen

México es el principal consumidor mundial de agua embotellada en envases de Tereftalato de Polietileno (PET), por lo que es importante que el envase garantice la salud del consumidor. El PET es el polímero más usado como envase para bebidas no alcohólicas. El PET libera una sustancia conocida como Bisfenol A (BPA). Se ha encontrado que esta sustancia afecta la actividad hormonal de los seres vivos, lo cual, aumenta el riesgo de obesidad, diabetes o paro cardíacos. En los últimos años, se han investigado los distintos factores que contribuyen a que la sustancia migre al agua durante su tiempo de almacenamiento. Sin embargo, se han presentado contradicciones en cuanto a los factores que contribuyen a la liberación de la molécula. En esta investigación se analizaron tres tipos de agua embotellada, de las cuales los factores a evaluar fueron: la marca, tiempo, temperatura de almacenado, volumen y peso de la botella. Los efectos de los factores fueron analizados con ANOVA. Solo la temperatura y el tiempo de almacenado contribuyen a que el BPA migre a el agua. Los dos factores, tuvieron una relación positiva con la concentración de BPA en el agua. Posteriormente se hizo una investigación en situación de la vida real donde dos tipos de envases fueron colocados en un auto durante una semana para comprobar el efecto de las variables significativas mencionadas, las mediciones se hicieron diariamente. La temperatura resulto no ser un factor importante ya que no llego a ser tan alta como en la investigación previa. Sin embargo, se detectó que el compuesto continúa migrando a través del tiempo. Los resultados sugieren que la investigación acerca del tema debe continuar para poder definir las condiciones de almacenamiento de los productos almacenados en PET o cualquier otro polímero para alargar su periodo de vida de útil.

**(Palabras Clave:** Agua, PET, BPA, temperatura, tiempo, migración.)

## Summary

Mexico is the main consumer of polyethylene terephthalate's bottled water, worldwide, therefore, containers shall warrant the client's health. PET is known to release Bisphenol A (BPA). BPA is reported to have effects on the hormonal activity of living beings, that increases the risks of obesity, diabetes and heart attack. Shelf life impact of BPA released in bottled water remains a research subject. Its importance has increased during the last years, where, some contradictions have been found in regards to factors of the molecule migration. In this research three brands of bottled water were analyzed, where the factors to evaluate were: brand, time & temperature of storage and volume & weight of the bottle. The effect of the factors was analyzed with ANOVA. The results showed that only the temperature and the time were significant factors for the BPA migration. Both have a positive relationship with the concentration of the molecule in the water, i. e., the higher is the temperature and time, the quantity of the molecule will be higher in the product. Later these two factors were analyzed on a real-life situation by storing two types of bottled water on a car during one week, the measurements were done daily. The temperature was not significant in this case because it was not high enough to influence the migration of the molecule, as the previous investigation. Nevertheless, the concentration of the BPA increased through the time. The results suggest to continue the investigation about the subject to define the best storage conditions for food products in PET or any other polymer in order to prolong as much as possible its useful life

**(Keywords:** Water, PET, BPA, temperature, time, migration.)

El presente proyecto está dedicado a Dios,  
mis papás Humberto y Gaby y a mis hermanos Luis Miguel y Gaby,

## **Agradecimientos**

Agradezco esta oportunidad a los maestros Eric Huerta y Guillermo Hiyane que me apoyaron durante todas las fases del proyecto y estudios con revisiones y acertados comentarios. A mis sínodos la Dra. Aurora Femat, Dra. Marcela Gaytán y Mtro. Javier García por sus consejos y asesorías desinteresadas para el desarrollo del presente documento.

Quisiera agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Dr. Manuel Toledano la Facultad de Posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro por su apoyo durante toda esta investigación.

Quisiera agradecer a la Facultad de Química de la U.A.Q por el apoyo proporcionado con equipo, materiales y espacio, especialmente a la Dra. Josefina Aldecoa, Dra. Dulce Rivera y a Fernando Díaz. Al Dr. Mario Enrique Rodríguez y al Mtro. Cristian Ramírez de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla por la asesoría y apoyo con equipo para las mediciones del experimento.

Finalmente le doy gracias a Dios, a mi familia y amigos de Aguascalientes por su apoyo y cariño incondicional en todo momento.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1.1. LA IMPORTANCIA DEL USO DEL PLÁSTICO COMO EMPAQUE EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA.....	1
1.2. EL AGUA EMBOTELLADA EN PET Y SU RELACIÓN CON EL BISFENOL A Y SU EFECTO EN LOS SERES VIVOS. ....	2
1.3. ANÁLISIS QUÍMICO PARA MEDIR CANTIDAD DE BPA.....	8
1.4. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA LIBERACIÓN DE BPA. ....	11
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. HIPOTESIS.....	14
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	14
2.3. OBJETIVO PARTICULAR.....	14
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
3.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	17
3.2. LÍNEA BASE. ....	18
3.3. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL. ....	19
3.3.1. TRATAMIENTOS. ....	19
3.3.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA. ....	21
3.3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL. ....	21
3.4. MUESTRAS. ....	22
3.4.1. MUESTRAS SELECCIONADAS PARA SU MEDICIÓN. ....	22
3.4.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. ....	23
3.5. EXPERIMENTACIÓN.....	23
3.5.1. LUGAR DEL EXPERIMENTO Y MATERIALES.....	23
3.6. CONDICIONES DEL EXPERIMENTO. ....	24
3.7. CONDICIONES DEL EQUIPO. ....	25
3.8. SISTEMA DE MEDICIÓN.....	26

3.8.1.	MEDICIÓN EN EL ESPECTROFOTÓMETRO UV/VIS.....	26
3.8.2.	DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE ABSORCIÓN DEL BPA EN EL ESPECTROFOTÓMETRO UV/VIS. ....	27
3.8.3.	CUANTIFICACIÓN EN ESPECTROFOTÓMETRO UV/VIS.....	28
3.8.4.	ANÁLISIS DEL SISTEMA DE MEDICIÓN. ....	29
3.8.5.	CURVA DE CALIBRACIÓN.....	29
3.8.6.	MEDICIÓN DE LAS MUESTRAS. ....	32
3.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	32
3.9.1.	CURVA DE CALIBRACIÓN.....	32
3.9.2.	EFECTOS DE LOS FACTORES. ....	34
3.9.3.	MIGRACIÓN DEL BPA EN CONDICIONES DE LA VIDA REAL .....	43
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>51</b>
<b>5.</b>	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>APENDICE .....</b>	<b>67</b>
6.1.	CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DEL EQUIPO.....	67
6.2.	CÓDIGO DE R. ....	68

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1-1 Estructura química de BPA ( <i>Michałowicz, 2014</i> ).....	3
Figura 3-1 Diagrama de bloques del experimento.....	17
Figura 3.3-1 Modelo general del proceso.....	19
Figura 3.7-1 Rango de absorción de los materiales para celdas para espectrofotómetros UV/VIS.....	25
Figura 3.8.1-1 Lugar donde se colocan la celda del blanco y la celda de la muestra que se desea medir.....	26
Figura 3.8.2-1 Curvas obtenidas de la dilución de una mezcla saturada de BPA 99%+ en Metanol 99%+ y Agua Destilada.....	28
Figura 3.8.2-2 Zona donde la transmitancia se reduce debido al BPA.....	28
Figura 3.8.5-1 Curva de Calibración.....	32
Figura 3.9.1-1 Residuales de la curva de calibración.....	34
Figura 3.9.2-1 Residuales del ANOVA del tercer modelo.....	40
Figura 3.9.3-1 Residuales del ANOVA final de los resultados de las muestras de vida real.....	48
Figura 4-1 Correlación entre el peso de la botella y el BPA migrado.....	52
Figura 4-2 BPA migrado en la primera fase del experimento según el color del envase.....	54
Figura 4-3 BPA migrado según el tipo de producto.....	55
Figura 4-4 BPA migrado en la primera fase del experimento según la temperatura de almacenamiento.....	56
Figura 4-5 BPA migrado en la primera fase del experimento según la semana de almacenamiento.....	57

Figura 4-6 BPA migrado en la segunda fase del experimento según el color del envase.....	59
Figura 4-7 Correlación entre el peso de la botella y el BPA migrado.....	60
Figura 4-8 BPA migrado en la segunda fase del experimento según el día de almacenamiento. ....	61

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.2-1 Estudios de BPA en varios Países (Arnold, 2013).....	7
Tabla 3-1 Marcas y temperaturas seleccionadas para analizar la liberación de BPA. .....	15
Tabla 3.3.1-1 Tabla experimental del planteamiento inicial. ....	20
Tabla 3.3.1-2 Tabla experimental fase 2 del experimento. ....	21
Tabla 3.8.5-1 Cantidad de BPA (ng/L) encontrada en las diversas bibliografías...	30
Tabla 3.8.5-2 Concentraciones para la preparación de los niveles de la curva de calibración. ....	31
Tabla 3.8.5-3 Transmitancia obtenida de concentraciones conocidas para obtener la curva de calibración. ....	31
Tabla 3.9.1-1 Resumen numérico de la curva de calibración. ....	33
Tabla 3.9.1-2 Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los residuales de la curva de calibración. ....	34
Tabla 3.9.2-1 Resultados de la primera fase de la investigación. ....	38
Tabla 3.9.2-2 ANOVA del primer modelo. ....	38
Tabla 3.9.2-3 ANOVA del segundo modelo. ....	39
Tabla 3.9.2-4 ANOVA del tercer modelo. ....	39
Tabla 3.9.2-5 Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk para modelo final del ANOVA. .....	40
Tabla 3.9.2-6 Valores del poder de la prueba de las variables significativas. ....	41
Tabla 3.9.2-7 Pruebas de homogeneidad de varianzas .....	42

Tabla 3.9.2-8 Prueba de Kruskal-Willis para las variables factoriales. ....	43
Tabla 3.9.2-9 Coeficiente de correlación de Pearson para el peso de las botellas. .....	43
Tabla 3.9.3-1 Resultados de la segunda fase de la investigación. ....	46
Tabla 3.9.3-2 ANOVA del primer modelo de la segunda fase del experimento. ....	47
Tabla 3.9.3-3 ANOVA del segundo modelo de la segunda fase del experimento. ....	47
Tabla 3.9.3-4 ANOVA del tercer modelo de la segunda fase del experimento. ....	47
Tabla 3.9.3-5 Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk para los residuales del modelo final del ANOVA de los datos de la vida real. ....	49
Tabla 3.9.3-6 Valores del poder de la prueba de las variables significativas de los datos de la vida real. ....	49
Tabla 3.9.3-7 Pruebas de homogeneidad de varianzas para el ANOVA final de los datos de la vida real. ....	49
Tabla 4-1 Prueba de Tukey para el color de la botella .....	53
Tabla 4-2 Prueba de Tukey para el tipo de producto. ....	55
Tabla 4-3 Prueba de Tukey para las temperaturas de almacenamiento. ....	56
Tabla 4-4 Prueba de Tukey para el tiempo de almacenamiento en la primera fase del experimento. ....	58
Tabla 4-5 Prueba de Tukey para el tiempo de almacenamiento en la segunda fase del experimento. ....	61

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. La importancia del uso del plástico como empaque en la industria alimenticia.**

En la industria alimenticia existen diversas actividades que buscan garantizar la calidad del producto que se elabora, de las cuales, al empaque no se le ha prestado la atención necesaria ya que se percibe una fuente de desperdicio y no genera ningún valor para el producto final. Sin embargo, el verdadero rol de este es el de contribuir a tener una mejor distribución del producto al mercado y evitar que se contamine, golpee y facilite el almacenaje del producto final (Coles, 2011). Por tal razón, es vital analizar bien el material que se va emplear, el diseño y características funcionales para poder así maximizar la vida de los alimentos y satisfacer al cliente final (Navia, 2014).

En la actualidad los principales polímeros usados para los empaques de alimentos son: polietileno (PE) de alta densidad (HDPE) y baja densidad (LDPE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), Tereftalato de polietileno (PET), en algunas ocasiones el etileno vinil alcohol (EVOH) y las poliamidas (PA) que normalmente se conocen como nylon. Estos materiales están formados principalmente de monómeros, oligómeros, aditivos y residuos de solventes (tintas y adhesivos) que por lo general son los que tienden a transferirse a los alimentos, siendo los dos primeros los encargados de hacer tóxico el producto. En la elaboración de dichos materiales suele haber aditivos como, plastificantes, antioxidantes, estabilizantes, colorantes, entre otros (Navia, 2014). Por otra parte, el uso de los plásticos también genero un problema de contaminación dentro de los alimentos ya que con las grandes partículas de los polímeros iban acompañadas de otros compuestos de menor tamaño los cuales eran capaces de transmitirse a través del material hacia el producto y finalmente incorporarse a él (Sarmiento, 2012). Los plastificantes usados en la industria han sido objeto de estudio ya que se caracterizan por tener baja toxicidad, pero contribuyen de gran manera a tener un efecto carcinogénico debido a las partículas que liberan (Navia, 2014).

El fenómeno mencionado en el párrafo anterior se conoce como *migración*, el cual se considera como una de las principales interacciones del empaque con el alimento, este consiste en que algunos componentes del empaque se transfieran al producto durante los procesos de almacenamiento y/o preparación. Este evento constituye un problema para la industria de alimentos, no solo organoléptico sino también toxicológico. El problema es inevitable ya que se presentan en todos los tipos de empaque incluyendo el vidrio, papel, cartón y metal, aunque en los plásticos es donde se detectó por primera vez por lo que originó la investigación del fenómeno (Navia, 2014). Los factores que contribuyen a la migración de partículas provenientes de los polímeros como son los siguientes:

- *Tamaño del migrante*: La velocidad de migración depende de del tamaño molecular de la sustancia migrante (Sarmiento, 2012).
- *Tipo de alimento*: Se da más rápido en los alimentos ricos en lípidos (Sarmiento, 2012).
- *Temperatura*: Entre mayor es la temperatura mayor es la transmisión de partículas (Sarmiento, 2012).
- *Tiempo*: Entre más tiempo transcurra mayor será la transmisión de elementos (Sarmiento, 2012).
- *Tipo de polímero*: La velocidad de intercambio de partículas varía de polímero a polímero, donde generalmente se presenta una disminución de la velocidad (Sarmiento, 2012).
- *Concentración de aditivo en el plástico*: Entre más se tenga de algún aditivo en la fusión del polímero más se presentara el intercambio de partículas (Sarmiento, 2012).

## **1.2. El agua embotellada en PET y su relación con el Bisfenol A y su efecto en los seres vivos.**

En México no se cuenta con un correcto manejo de los recursos hídricos y el servicio es ineficiente, según expertos de la materia, afirman que el suministro no es suficiente, regular y tiene baja calidad. El agua se surte de tres maneras en el país: red de servicio público, agua embotellada y pipas. En base a datos de la consultora Euromonitor International, México es el principal consumidor de agua embotellada donde cada habitante en promedio consumió 163.5 litros, sin contar bares y restaurantes. Estas cifras resultan un gran negocio para tres grandes las

cuales concentran el 82% del mercado del producto: Danone, Coca-Cola y PepsiCo (Paullier, 2015).

En la actualidad el material más usado para el envase del agua es el PET (C. Bach, 2013). Durante las últimas décadas, debido al bajo costo de la materia prima, fácil transportación, tamaño y fuerza (Petrelli, 2006). El consumo de agua embotellada en dicho material se ha incrementado sustancialmente a nivel mundial y ha remplazado efectivamente el agua de grifo en varios países desarrollados (IBWA, 2009). Debido al incremento en la popularidad del consumo de agua embotellada, varias preguntas han salido acerca de la posible migración de componentes químicos de las botellas hacia el agua contenida y en su caso si esto posee un riesgo para los consumidores (Zare Jeddi, 2015). Estudios recientes han demostrado que las botellas de PET pueden liberar sustancias dañinas tal como el Bisfenol A (BPA) en el agua (Santhi, 2012). Este compuesto se utiliza en la producción de plásticos como plastificante para que logren endurecer y evitar el desarrollo de bacterias (Visakh, 2015).

El Bisfenol A (BPA), 4,4'-(propano-2,2-diil) difenol, es un químico compuesto que pertenece al grupo de fenoles, el cual tiene un hidroxilo residuo ligado directamente a los anillos aromáticos. La presencia de los grupos hidroxilos en el BPA determina su reactividad. Similar a otros fenoles, el BPA se puede convertir a éteres, esterres sales (Flint, 2012). Su estructura química se muestra en la Figura 1.2-1. Tiene peso molecular de 228.29 g/mol, es de color blanco cristalino solido con punto de fusión a 156°C y su punto de ebullición a 220°C (a presión de 5 hPa). El coeficiente de octanol de agua del BPA expresado en forma logarítmica es 3.32, lo cual nos muestra que tiene buena solubilidad en grasas y baja en agua (cerca de 200 mg/dm<sup>3</sup> a 25°C).

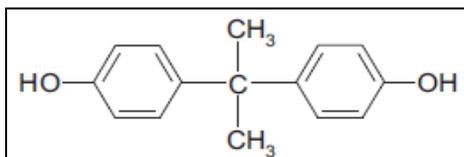


Figura 1.2-1 Estructura química de BPA (Michałowicz, 2014).

La historia del BPA empezó en 1891, cuando el químico ruso Aleksandr Dianin sintetizó bisfenol A por primera vez, pero no fue hasta 1905 que se mencionó oficialmente en un artículo científico escrito por Thomas Zincke. En la década de los 30s, el químico británico Charles Edward Dodds reconoció el BPA como un estrógeno artificial debido a que sus propiedades son similares. En 1953, se inventaron las resinas de policarbonato, las cuales para su producción tienen que utilizar el Bisfenol A lo que dio lugar a que los seres humanos se encuentren en contacto con la molécula. En 1960 el organismo americano encargado de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó el uso del BPA en productos para el consumidor, tal como: agua embotellada, biberones, contenedores de comida y revestimientos epóxicos para alimentos y bebidas contenidas en algún empaque metálico. En 1992 el Dr. David Feldman de la Universidad de Stanford descubrió que el Bisfenol A puede migrar de los tubos de prueba de policarbonato. La sustancia se encontraba en los especímenes contenidos por los tubos, por lo que podía imitar la actividad del estrógeno en las muestras y causar una respuesta celular imprevista en bajas dosis (Caliendo, 2012).

El Dr. Feldman en sus investigaciones hechas cinco años después en la Universidad de Misuri Columbia, encontró que la exposición a bajos niveles de BPA puede dañar la próstata. Dado que los consumidores y los científicos tuvieron un fuerte interés en el tema, durante la siguiente década se hicieron más de 100 publicaciones acerca de los problemas causados a la salud por dicha sustancia (Caliendo, History of BPA, 2012). Dichos estudios demostraron que el consumo de BPA es capaz de unirse a varios tipos de receptores, incluyendo receptores de estrógeno y andrógeno, así como receptor de aril hidrocarburos y receptor de peroxisoma proliferado-activado que está asociado con las hormonas del sistema endocrino y otros sistemas del cuerpo (Ziv-Gal, 2013). También se demostró que el BPA interrumpe la función de varias hormonas incluyen las sexuales, leptina, insulina y tiroxina, además de tener efecto hepatotóxico, inmunotóxico, mutagénico y carcinogénico (Zeinab, 2012). Información reciente sugiere que la exposición humana al BPA eleva el riesgo de obesidad, diabetes y paro cardíaco (Teng, 2013).

La exposición a largo tiempo a niveles bajos (0.05 mg/kg bw/Day) de BPA tiene consecuencias fisiológicas negativas (Erler, 2010).

Las primeras medidas hechas por varios países fue prohibir el uso del BPA en productos alimenticios, principalmente buscando defender a la parte de la población mayormente afectada: los niños. En 2008, la Unión Europea y Turquía fueron los primeros en prohibir el uso del BPA en la producción de biberones, así como la importación, venta y publicidad de los biberones de policarbonato que contienen la sustancia (Caliendo, History of BPA, 2012). Esta misma contramedida fue implementada en Canadá en el mismo año, donde también se publicaron los resultados sobre el daño que genera el BPA, por lo que fue declarado como “tóxico” debido a su daño en el ámbito reproductivo, desarrollo humano y daño ambiental (Erler, 2010). Dinamarca y China, de manera más radical, optaron por prohibir el BPA en todos los productos alimenticios para bebés, mientras que Japón, lo hicieron por cambiar las resinas epóxicas de las latas con revestimientos libre de BPA. En Estados Unidos en tan solo 13 estados, el distrito de Columbia y unas pocas jurisdicciones locales, se aprobó la prohibición para contenedores de fórmula de alimento para bebés. La FDA apoyó la implementación de acciones en la industria para remover el BPA de los biberones, copas de alimentación, latas con formula u otras comidas enlatadas, sin embargo, no se presentó evidencia de que se hayan implementado (EWG, 2015). En Francia en el año 2014 se optó por prohibir el BPA de todos los empaques de alimentos (Caliendo, 2012).

Al día de hoy, se han creado límites para la cantidad de BPA que puede tener la comida empaquetada. Ejemplo de esto son los estados Maryland, Connecticut, Minnesota, Nevada y Vermont de Estados Unidos de América que limitaron la venta y distribución de desechables para comida, latas y alimento para bebé a 0.5 partes por billón (ppb). A pesar de estas medidas, la FDA o alguna agencia regulatoria del país americano han restringido la sustancia en el país. Japón tiene un caso similar, siendo la comida empaquetada limitada a 2,500 ppb. La Unión Europea tiene una restricción similar a pesar de haber prohibido el BPA en los biberones, estableciendo un límite de la sustancia de 600 ppb por kilogramo. Ambos valores son muy altos

en comparación de los niveles detectados en comida empaquetada y muy elevados como para proteger la salud o cambiar radicalmente los procesos de producción alimenticia (EWG, 2015).

La exposición al BPA también ha sido limitada, siendo Francia el único que cuenta con esta restricción donde se está limitado el consumo de 0.0025 ppb por día. Aun así, no se es seguro ya que a pesar de las investigaciones que se han hecho, es difícil determinar el nivel de BPA que no posee riesgo para niños, mujeres embarazadas u otro tipo de población o inclusive el medio ambiente (EWG, 2015). Lo único que está claro es que el BPA causa riesgos potenciales y varios países ya han regulado sobre este tema. La mayoría de los reglamentos propuestos se refieren a la exposición humana a través de materiales y envases que entran en contacto con alimentos, pero varias naciones han evaluado los riesgos de exposición ambiental al BPA, tal como se mencionó anteriormente (T. Özdal, 2014).

En el caso de México, aun no se tienen normas que regulen la cantidad de BPA en los productos alimenticios, debido a que la investigación es escasa en el país y en los países desarrollados tiene muy poco tiempo. en la Tabla 1.2-1 se muestra la cantidad de investigaciones hechas en tres continentes (Arnold, 2013). En la primera columna se indica los países de los cuales se sintetiza las publicaciones hechas, mientras que de la segunda a la cuarta columna que tipo de agua se analizó. Los números fuera de los paréntesis muestran la cantidad de estudios publicados y en paréntesis el total de muestras analizadas en estos.

País	Numero de estudios (número de muestras) *		
	Agua potable	Fuente de agua superficial	Fuente de agua bajo tierra
Norte América			
Canadá	3 (130+)	4(130+)	1(5)
México	0	0	1(2)
E.U.A.	10(288+)	14(612+)	10(451)
Total	13(418+)	18(742+)	12(458)
Europa			1(164) **
Francia	1(2)	1(2)	0
Alemania	1(10)	0(0)	0
Italia	1(6)	1(8)	1(2)
Noruega	0	1(12)	0
España	1(7)	7(46+)	1(3)
Suecia	1(34) ***	0	0
Reino Unido	1(4)	2(70+)	0
Total	6(63)	12(138+)	3(169)
Asia			
China	9(25)	4(80)	0
Irán	1(1)	0(0)	0
Singapur	1(1)	0(0)	0
Corea del Sur	0(0)	2(486)	0
Taiwán	0(0)	1(120)	0
Total	11(27)	7(686)	0
<b>Total General</b>	<b>30(508+)</b>	<b>37(1566+)</b>	<b>15(627)</b>
*Los valores mostrados es el total de estudios seguido por el número de muestras entre paréntesis. El número actual de muestras es más grande que el reportado dado que algunos estudios no especifican la cantidad.			
** 23 países son representados			
***La información no final, no se concluyó ciertos estudios.			

Tabla 1.2-1 Estudios de BPA en varios Países (Arnold, 2013)

### **1.3. Análisis químico para medir cantidad de BPA**

La molécula de Bisfenol A es encontrada en concentraciones muy bajas ya que su concentración está en unidades de nanogramos por litro, tal como se puede inferir en base a las investigaciones mencionadas en el apartado anterior, por lo que su cuantificación no puede ser llevado a como técnicas comunes y se debe recurrir a la química analítica. Esta es una ciencia de medición basada en un conjunto de ideas y métodos que son útiles en los campos de la ciencia y la medicina. Los resultados de un análisis cuantitativo típico se calculan a partir de dos medidas: el volumen y la cantidad proporcional a la del analito en la muestra (masa, volumen, intensidad luminosa o carga eléctrica). Los métodos analíticos se clasifican en base a la segunda medida. Los métodos gravimétricos determinan la masa del objeto a analizar o de algún compuesto que esté relacionado químicamente con él. Los métodos volumétricos cuantifican el volumen de la solución que tiene un reactivo, con el cual, se obtiene una reacción. Los métodos electro analíticos comprenden la medición de las propiedades eléctricas tales como la diferencia de la potencia, la corriente, la resistencia y la cantidad de carga eléctrica. Los métodos espectroscópicos se basan en la medida de la interacción de la radiación electromagnética con los átomos del analito o en determinar la producción de tal radiación por el analito mismo. En una última instancia, hay un grupo de varios métodos que miden la proporción de masa sobre carga de las moléculas en la espectrometría de masas, porcentaje de descomposición radiactiva, calor que generan las reacciones, porcentaje de reacciones, conductividad térmica de las muestras, actividad óptica o índice refractivo (Skoog D. A., 2015).

La cuantificación de Bisfenol A en particular se ha hecho con la aplicación de distintas técnicas mencionadas anteriormente, de las cuales destacan aquellas de separación cromatográficas analíticas. La más destacada es la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC). Esta técnica consiste en que un líquido (fase móvil) circula en contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria), al introducir la mezcla de sustancias en el corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Se tiene el supuesto que al terminar el recorrido

por la columna cada una de las sustancias introducidas en el sistema eludirán en tiempo diferente, por ende, separadas (Skoog D. A., 2015). En un artículo publicado por los laboratorios Agilent (2011) se explica cómo cuantificaron la molécula contenida en el agua que estuvo en biberones de policarbonato, estos fueron calentados con agua hirviendo durante 30 minutos. Durante el análisis se utilizó el equipo Agilent 1260 Infinita LC junto con una columna Agilent ZORBAX Eclipse plus C18; de igual manera, se empleó la Cromatografía de Líquidos de Ultra Alto rendimiento (UHPLC) con el fin de comparar ambos métodos, en este caso se utilizó un sistema Agilent 1290 Infinita LC. En el estudio se encontró que el límite de cuantificación detectado en las soluciones contenía 1.06 ng/ml de BPA, con este método se consiguió recuperar el 80% de la sustancia en los estudios de recuperación de muestra. En el UHPLC se encontraron picos más altos y delgados, tiene mejor resolución y evita más ruido en las mediciones por lo que hace más fácil la interpretación de gráficos.

La Cromatografía de Gases/Masas (GC-MS) es otra técnica de separación cromatográfica que se usa para cuantificación del Bisfenol A. Esta consiste en que las moléculas de la muestra entran a la fuente de ionización por el sistema de entrada, estas se convierten en iones y a menudo se fragmentan en la fuente. Los iones pasan después del analizador, donde se separan según su relación masa/carga. Por último, los iones separados llegan al detector de iones, donde producen una señal eléctrica que se registra y se representa gráficamente en el sistema de datos. (Skoog D. A., 2015). Una aplicación de GC-MS es un estudio hecho a aguas en tres ríos en la India. Se buscó analizar tres componentes dentro de los cuales se encontraba el BPA. Los límites de detección fueron desde 2.8 hasta 136 ng/L en el 100% de las muestras (Kumar Selvaraj, 2014).

En otros estudios, se ha analizado la cantidad de BPA a través de espectrometrías de absorción molecular dado que las cromatografías son de alto costo. Las técnicas se basan en radiaciones de rayos ultravioleta, visible e infrarrojo para identificar distintas especies inorgánicas, orgánicas o bioquímicas. Estas técnicas utilizan instrumentos llamados espectrofotómetro que conformados por un

monocromador o un policromador en combinación de un transductor para convertir las intensidades de radiación en señales eléctricas, permitiendo así, medir la relación entre la radiación de dos rayos para poder medir así la absorbancia (Skoog D. A., 2015).

La espectroscopia infrarroja, en particular, es una poderosa herramienta para determinar la estructura de compuestos orgánicos e inorgánicos, además, desempeña una función importante en el análisis cuantitativo (Skoog D. A., 2015). Es particularmente la técnica adecuada para investigar la interacción entre moléculas debido a que permite cuantificar las conexiones de hidrógeno (Bin Fei, 2003). La técnica consiste que la radiación primero golpea a un divisor escinde el haz de la luz en dos partes iguales. Estos dos haces son reflejados sobre otros dos espejos: Uno dispuesto frente a la trayectoria del haz original y el otro perpendicular. En esta trayectoria se dispone la muestra y a continuación el detector IR. La absorción completa se muestra descrita para cada longitud de onda por la correspondiente disminución de intensidad luminosa. (FEUM, 2016). Una aplicación de lo que recién se acaba de mencionar es un estudio donde se buscó cuantificar el BPA en mezcla con PHBV. Se utilizó la Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) para verificar la presencia intermolecular de ambas moléculas en base a los enlaces de hidrógeno. El espectro de absorción de C=O se encontró que tiene tres tipos de enlace: amorfa, cristalina y enlace de H (Bin Fei, 2003). Un segundo ejemplo, es el espectro y los picos de absorción del BPA se pueden observar en la gráfica FTIR; en esta los picos muestran una reconciliación razonable con factor de escala de 0.9679, a excepción de las vibraciones de estiramiento de C-H y O-H (Ramzan Ullah, 2016).

En el caso de las espectrometrías ultravioletas y visibles, es probable que esta sean las técnicas más utilizadas para hacer análisis cuantitativos de los laboratorios químicos y clínicos de todo el mundo ya que son casi tan precisas como un HPLC y tienen bajo costo (Yafeng Zhuang, 2014). Esta técnica consiste en elegir una longitud de onda (nm) en base a la molécula a investigar por lo que se debe investigar previamente que variables intervienen en la absorbancia. En seguida con

la ayuda de un estándar o patrón, se consigue la calibración para el análisis fotométrico (Skoog D. A., 2015). Un ejemplo de la aplicación de esta técnica, es la tesis de Benecyo de la Universidad Bautista de Ouachita en la cual utilizó un espectrofotómetro UV/VIS para medir BPA. Se analizaron distintos empaques utilizados en los productos cotidianos, estos fueron llenado con agua y metanol en proporción 1:1. Los rangos utilizados de absorbancia para medir la curva de calibración fueron 255.1 y 272.3 nm, las cuales resultaron con una correlación de 0.9923 y 0.9988, respectivamente, midiendo con una precisión de 0.48-120 µg/ml. En este caso se comparó con un HPLC, con el cual, se obtuvieron resultados similares lo cual indica que es un método razonable para la medición de BPA con el hecho de que este es muy rápido, con costo accesible y fácil de manipular a comparación del HPLC (Benecyo, 2016).

#### **1.4. Factores que contribuyen a la liberación de BPA.**

El análisis y resultados de las fuentes del Bisfenol A que se han estudiado en la actualidad han sido muy distintos. Una de estas es la teoría de que la molécula proviene del agua antes de ser embotellada, como, por ejemplo, en el estudio hecho por V.A. Santhi (2012) investigó la cantidad de BPA contenida en el agua potable, el agua para tomar y el plasma humano en el río Langat de Malasia. En el 93% de las muestras de agua potable se presentó BPA variando entre los límites de cuantificación 1.3 a 215 ng/L, en el caso de las aguas cerca de zonas industriales y comerciales los niveles fueron mayores 6 veces; este estudio es similar a uno hecho por S.Y. Wu (2010) con los sedimentos el río Amarillo en China donde se encontró en promedio una concentración de 46.7 ng/L de BPA. En el caso para el agua de tomar hecho por Santhi se detectó que el BPA estaba entre las cantidades de 3.5 y 59.5 ng/L, siendo las muestras obtenidas de dispositivos conectados a tubos de PVC y filtros de agua las que presentaron los niveles más altos. Con respecto al tercer análisis, solo el 17% de las muestras de plasma tuvieron niveles detectables de BPA entre el rango de 0.81 y 3.65 ng/L (Santhi, 2012).

La temperatura es un factor de control que también se ha analizado para saber si esta influye en la liberación de BPA. En un estudio hecho por Casajuana (2003) donde se cuantificó la cantidad de 5 esteres Ftalatos contenida en el agua embotellada, así como también durante su distribución, dentro de las se incluyó el Bisfenol A. El proceso consistió en colocar botellas de agua mineral y agua en PET y PE a 30°C durante 10 semanas, las mediciones se hicieron al inicio y al final del experimento. Se concluyó que no todos los esteres estudiados se liberan gracias a la temperatura, el BPA entre ellos. Caso similar se encontró en un estudio hecho por T. Toyo'oka (2000) donde al agua mineral embotellada en PET se midió la cantidad de la molécula antes y después de ser calentada durante 8 horas a 50°C; las mediciones se mantuvieron entre 3 y 10 ng/l.

Resultados contrarios se han presentado en otros estudios a los del párrafo anterior, como por ejemplo, en un estudio donde S. H. Nam (2010) estudió la cantidad de BPA liberada de biberones de policarbonato (PC) reutilizados más de 100 veces con agua entre temperaturas de 40 y 100 °C. La cantidad de la sustancia encontrada fueron 0.03 ppb y 0.13 ppb a 40°C y 95°C, respectivamente. Sin embargo, la cantidad encontrada después de 6 meses fue 0.18 ppb y 18.47 ppb a 40°C y 95°C, respectivamente. Los niveles de BPA incrementaron rápidamente cuando se utilizó temperatura por encima de los 80°C.

Otros estudios obtuvieron resultados similares, como el caso de V.A. Santhi (2012) quien analizó agua mineral embotellada de PET expuesta a 25°C y 50 °C. Después de 3 días las muestras almacenadas a temperatura ambiente mostraron niveles más bajos ( $3.3 \pm 2.6$  ng/L) en comparación de aquellas almacenadas a temperatura más alta ( $11.3 \pm 5.3$  ng/L) con una diferencia significativa entre las medias de ambos niveles. Un tercer y último ejemplo, es un estudio que hizo Y. Fan (2014) en China en el cual se analizaron 16 marcas de agua embotellada en PET. Los niveles de BPA detectados después de 1 semana de almacenado fueron 0.26-18.7, 0.62-22.6 y 2.89-38.9 ng/L a 4, 25 y 70°C respectivamente. La liberación de Bisfenol A incremento considerablemente hasta haber tenido 4 semanas de

almacenaje, después la tasa liberación fue decreciendo por lo que se entendió que esta se vuelve estable con el tiempo.

Existen otros factores en lo que se ha encontrado que también contribuyen a la liberación de BPA, uno de estos es el caso del estudio hecho por S.H. Nam donde analizó si afecta el reutilizar la botella. Después de reutilizar 60 veces el envase, cerca ser usado durante 3 meses, la liberación de la sustancia incrementa con una tasa de  $4.6 \times 10^{-2}$  ppb/vez (Nam, 2010). Y. Fan (2014) también investigó si el gramaje o espesor de las botellas afectan en la liberación de BPA tal como se encontró en un estudio se encontró que la correlación entre estas variables es significativa (valor  $p < 0.02$ ) en las primer y segunda semana de almacenamiento, pero así para para una cuarta. El color de la botella también ha sido evaluado para la detección de sustancias cancerígenas, en un estudio P. Westerhoff (2008) encontró que las botellas de color claro liberan cuatro veces más que aquellas de color azul, sin embargo C. Reimann (2012) encontró que las botellas azules y verdes liberan más que las claras.

En base a lo que se ha investigado hasta el día de hoy, es importante tomar en cuenta el tipo de envase en el que se produce agua embotellada con la finalidad de garantizar el producto a los consumidores, principalmente en México como principal consumidor de dicho producto (Paullier, 2015). Cabe destacar que la mayor parte de este tipo de agua se distribuye en garrafones de PC, el cual es un material conocido por liberar BPA en grandes cantidades (Guart A. W., 2013). Un ejemplo de esto, es el estudio Nam (2010) mencionado anteriormente, en el cual, se concluye que la tasa aumenta con la reutilización de los envases. Las condiciones de almacenamiento son un factor clave para la interacción entre el envase y el producto contenido, por lo que también deben ser analizadas para asegurar la calidad del producto. Dentro de los factores, la temperatura tiende a jugar el papel más importante ya que en la mayoría de los alimentos es un factor clave para la preservación de estos. Las características de las botellas también son importantes ya que pueden reducir la tasa liberación de BPA debido a que estas son las encargadas de lidiar con el medio donde se encuentra almacenado el producto.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. HIPOTESIS**

En la producción y comercialización de agua embotellada en México se usa como material del envase el PET, el cual por ser un polímero, se sabe que en su elaboración se utiliza el Bisfenol A. Este compuesto durante el almacenamiento del producto migra al contenido, generando un efecto contraproducente a la salud del consumidor ya que afecta la actividad hormonal y aumenta el riesgo de tener obesidad, diabetes o tener un paro cardíaco. Con el fin de controlar la ingesta de este material al cliente, es necesario analizar los factores que interactúan con el producto (temperatura, espesor del envase, color) durante su almacenamiento.

### **2.2. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los factores de almacenamiento que contribuyen a la migración de Bisfenol A en el agua embotellada en PET en condiciones controladas y analizar el efecto que tienen en condiciones de la vida real aquellas fuentes significativas.

### **2.3. OBJETIVO PARTICULAR**

- Determinar y comparar los factores que contribuyen a la migración de BPA en el agua embotellada en PET.
- Medir la migración de BPA hacia el agua a través del tiempo.
- Observar y analizar los efectos de los factores significativos en condiciones de la vida real.
- Publicar un artículo acerca del tema para fomentar la investigación acerca del tema.

### 3. METODOLOGIA

La investigación de las variables que afectan a la contaminación del agua embotellada por Bisfenol A, inició por seleccionar 3 tipos de botella de PET y ser colocadas en a diferentes temperaturas de almacenado. Las diferencias entre las distintas botellas de PET y las temperaturas permitieron definir los niveles para cada nivel de las variables de control del experimento, tal como se establece en la Tabla 3-1. En la primera columna se muestra cada una, mientras que la segunda su respectivo nivel. El diseño de experimentos (DoE) seleccionado fue un 3<sup>3</sup> ya que se tomaron en cuenta tres tipos de botellas y tres temperaturas de almacenado, teniendo así un tamaño de muestra igual a 27. Las mediciones a las muestras seleccionadas se hicieron semanalmente para poder medir la migración de BPA generada durante un mes.

Botella	<ul style="list-style-type: none"><li>• A</li><li>• B</li><li>• C</li></ul>
Contenido	<ul style="list-style-type: none"><li>• 250 ml</li><li>• 500 ml</li></ul>
Color	<ul style="list-style-type: none"><li>• Azul</li><li>• Transparente</li></ul>
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"><li>• 4 °C</li><li>• 25 °C</li><li>• 60 °C</li></ul>
Masa	Gramos

Tabla 3-1 Marcas y temperaturas seleccionadas para analizar la liberación de BPA.

La cuantificación de la molécula se hizo a través de un espectrofotómetro UV/VIS con celdas de SUPRASIL. Las muestras fueron almacenadas en viales de vidrio esterilizadas con la finalidad de evitar la contaminación de las mismas. Para la curva de calibración fue necesario con el estándar de BPA provisto por Sigma-Aldrich y metanol de 99+% de pureza, tal como lo hizo Jean Eudes Benecyo (Benecyo, 2016). Con estos materiales se preparan soluciones con concentración conocida de la molécula en intervalos de 50 ng/L en el rango de 0 a 250 ng/L de BPA. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 269 nm.

Los datos obtenidos fueron analizados a través de la técnica de ANOVA con su respectiva comprobación de supuestos: normalidad, homogeneidad de las varianzas, balanceo en tamaño de muestra, independencia y prueba de poder. Todos los supuestos se cumplieron a excepción de la homogeneidad de las varianzas, por lo que se procedió a analizar cada variable de control por separado con la aplicación de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, en el caso de la variable numérica (masa) se hizo a través del coeficiente de correlación de Pearson. El resultado fue que solo el tiempo y temperatura de almacenamiento son factores significantes para la migración de BPA de la botella al agua contenida por el envase.

La experimentación continuó analizando a través de un DoE general donde se analizó la cantidad de BPA migrada en situaciones extremas de la vida diaria. En este caso se utilizaron cinco botellas de color azul y cinco de color transparente con el mismo contenido (ml), estas fueron colocadas en el auto del investigador en vez de una incubadora de ambiente controlado. Las mediciones se hicieron diariamente durante cinco días. Esto se repitió dos veces para comprobar el efecto de la temperatura, para la cual, en este caso se tomó en cuenta el promedio del día. Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA, el cual cumplió con todos los supuestos. La conclusión fue que solo el tiempo de almacenado es un factor significativo para la migración de BPA.

El diagrama de proceso del experimento se muestra en la Figura 3-1, en él se puede apreciar de manera sintetizada cada uno de los puntos redactados anteriormente. En el diagrama de la izquierda se observa el proceso que corresponde a la fase 1, en la cual las botellas fueron almacenadas a temperaturas controladas. El diagrama de la derecha muestra las etapas de la fase 2, siendo expuestas las botellas a temperatura de la vida real dentro de un automóvil.

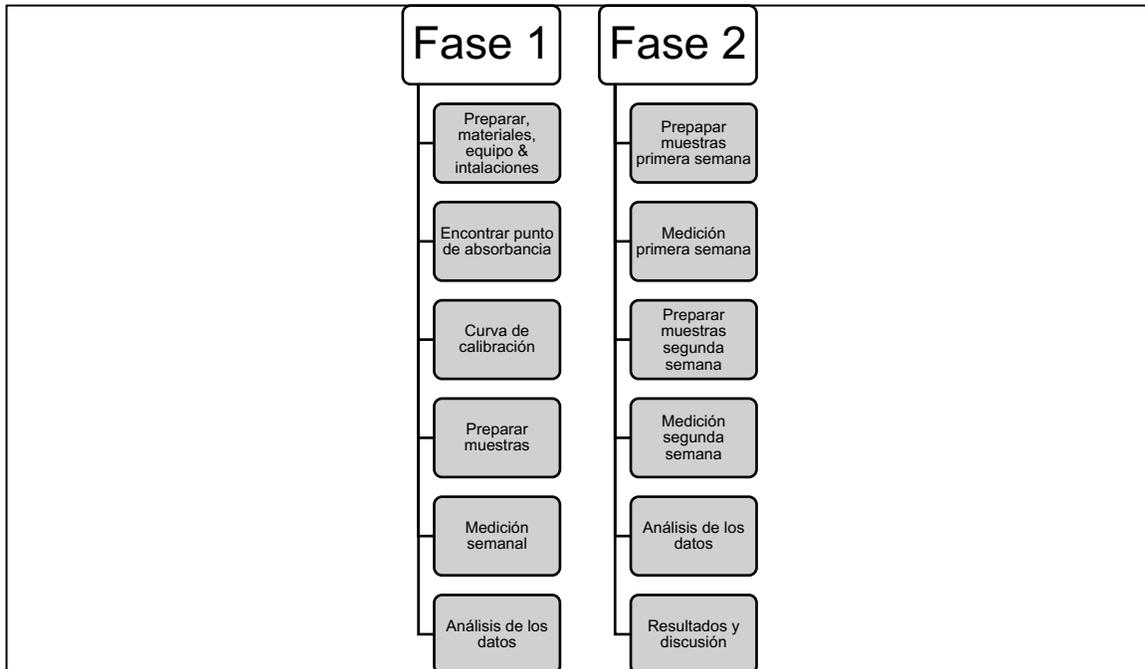


Figura 3-1 Diagrama de bloques del experimento.

### 3.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.

El consumo de agua embotellada en México es una actividad la cual se lleva a cabo día a día, siendo el país el principal consumidor mundial de este producto (Barragán, 2016). La mayor parte del agua comercial purificada se almacena en envases plásticos, principalmente en presentaciones menores a 20 litros suele utilizarse el PET. Sin embargo, los plásticos al ser sustancias químicas sintéticas, llevan diversas sustancias para su síntesis de las cuales durante los últimos años se ha descubierto son dañinas para el consumo de los seres vivos. Una de las sustancias más estudiadas en los últimos años es el Bisfenol A, ya que se ha demostrado que contribuye a que las personas tengan un paro cardíaco, generen obesidad o diabetes y afecta la actividad hormonal de todos los seres vivos, alarmante en los de temprana edad ya esta es intensa en ese periodo.

Las características de la botella que almacena el producto es una causa raíz que levanta sospechas. Se ha planteado que el BPA se encuentra ya en el agua antes de ser envasada, lo cual lleva a los productores a verificar sus prácticas de

producción; si esta aseveración fuera la única verdadera, los niveles del Bisfenol A en el producto embotellado no deben aumentar a través del tiempo. Hay otros estudios que demuestran que la molécula es liberada gracias a la temperatura en la que se encuentra almacenada la botella, pero otro lado, también existen evidencias para afirmar lo contrario lo cual propone a continuar estudiando acerca de este tema. El color del envase se encuentra en una situación semejante. Por otra parte, el espesor y la masa de la botella cuentan con un escaso análisis, demostrando que estas características significativas durante las primeras 2 semanas después de haberse envasado el producto. Por último, también se ha estudiado que el reutilizar los envases plásticos aumenta la liberación de BPA después de cierta frecuencia, pero esta variable no debería preocupar a los productores de agua embotellada ya que el producto se comercializa para usarse una única vez.

Los hallazgos mencionados en el párrafo anterior, deben alertar a los productores de agua embotellada en PET ya que el producto está expuesto a la contaminación por diversas sustancias, dentro de las que destaca el BPA. Sin embargo, los estudios deben continuar para tener mayor evidencia y determinar qué características de las botellas contribuyen a este fenómeno.

### **3.2. LÍNEA BASE.**

Esta investigación se fundamenta en las publicaciones previamente revisadas, en las cuales denotan la importancia del consumo del Bisfenol A en la salud los seres humanos y de la relación que tienen las características de los envases de PET y sus condiciones almacenamiento. Los factores de control que se escogieron en la investigación fueron aquellos que se considera que el producto se encuentra en mayor interacción. Estos son: la temperatura y el tiempo de almacenado, el color y la masa del envase y el tipo de botella.

### 3.3. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los tratamientos y el diseño experimental fueron definidos en base a la revisión de la literatura. El modelo experimental presentado en la Figura 3.3-1 resume las variables que se encuentran relacionadas entre las botellas de PET y la liberación de BPA. Como variables de entrada se tiene el agua (marca) y la botella en la que está esta almacenada. Las variables controladas en el experimento son la temperatura de almacenamiento, la masa y color de la botella y el tiempo que llevan almacenadas. Los rayos UV se clasifica como variable de ruido ya que en la literatura se tiene como factor, pero por condiciones de disposición de equipo no se podrá agregar al experimento. La variable respuesta a medir será la cantidad de BPA en nanogramos sobre litro (ng/L).

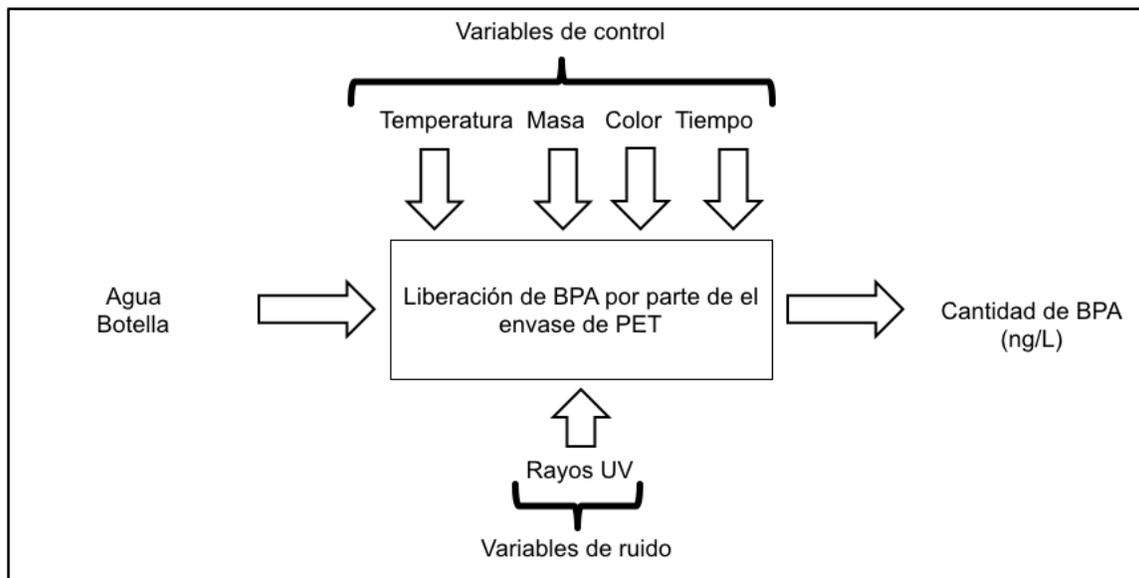


Figura 3.3-1 Modelo general del proceso.

#### 3.3.1. Tratamientos.

En este experimento se consideró 9 tratamientos obtenidos de un diseño factorial  $3^3$ , en el cual las variables de control son: tiempo, temperatura, color y masa del envase y tipo de botella. En la Tabla 3.3.1-1 se muestra la tabla experimental en la cual se detalla cada tratamiento; en la primera columna se especifica el número de tratamiento correspondiente, a continuación, se indica el tipo de botella que

almacena el agua a analizar, seguido de la cantidad contenida en dicho envase. A partir de la cuarta columna se detalla los tres niveles de temperatura. Como variable cuantitativa se tiene el espesor, expresada en milímetros. Con respecto al último tratamiento, se indica el color de manera cualitativa. En cada tratamiento se analizaron tres réplicas.

Tratamiento	Botella	Contenido (ml)	Temperatura (°C)	Peso (g)	Color	Replicas
1	A	500	4	P <sub>1</sub> .	Azul	3
2	A	500	25	P <sub>2</sub> .	Azul	3
3	A	500	65	P <sub>3</sub> .	Azul	3
4	B	250	4	P <sub>4</sub> .	Transparente	3
5	B	250	25	P <sub>5</sub> .	Transparente	3
6	B	250	65	P <sub>6</sub> .	Transparente	3
7	C	250	4	P <sub>7</sub> .	Transparente	3
8	C	250	25	P <sub>8</sub> .	Transparente	3
9	C	250	65	P <sub>9</sub> .	Transparente	3

Tabla 3.3.1-1 Tabla experimental del planteamiento inicial.

El experimento requirió una segunda fase para comprobar la migración de BPA en una situación extrema de la vida diaria. Esta situación se definió por dejar las botellas dentro del coche del investigador y medir la migración de la molécula durante cinco días continuos, llevado a cabo en dos semanas distintas. En el nuevo planteamiento eligieron tres factores de control: Tiempo de almacenado, Temperatura promedio del día y color de la botella; la temperatura promedio del día se tomó como una variable numérica. Se seleccionaron botellas de color azul y transparente que contuvieran 250 ml, tomando como muestra cinco de cada una para cada semana. En la Tabla 3.3.1-2 se muestra la tabla experimental empleada en este caso. En la primera columna está representado el número de muestra, seguida del día de la semana, la siguiente columna muestra la temperatura promedio del día y en la última el color de la botella.

n	Día de la semana	Temperatura Promedio (°C)	Color
1, 2, 3, 4, 5	L, M, Mi, J, V	T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> , T <sub>5</sub>	Azul
6, 7, 8, 9, 10	L, M, Mi, J, V	T <sub>6</sub> , T <sub>7</sub> , T <sub>8</sub> , T <sub>9</sub> , T <sub>10</sub>	Azul
11, 12, 13, 14, 15	L, M, Mi, J, V	T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> , T <sub>5</sub>	Transparente
16, 17, 18, 19, 20	L, M, Mi, J, V	T <sub>6</sub> , T <sub>7</sub> , T <sub>8</sub> , T <sub>9</sub> , T <sub>10</sub>	Transparente

Tabla 3.3.1-2 Tabla experimental fase 2 del experimento.

### 3.3.2. Tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra quedo delimitado por la capacidad de las incubadoras de temperatura controladas empleadas en el experimento y los viales disponibles. Las incubadoras tuvieron espacio para un número máximo de nueve botellas mientras que los viales disponibles fueron 27 de 5 ml. Dadas estas condiciones se decidió tener un tamaño de muestra igual a tres por cada tratamiento. En el caso de estudio de situación de la vida real, se definió como cinco ya que en el análisis de los datos de la primera semana se obtuvo un poder de la prueba con valor igual a 1.

### 3.3.3. Diseño Experimental.

El experimento se desarrolló de la siguiente manera:

1. Un día antes del inicio del experimento, se configuraron las tres incubadoras disponibles a las tres temperaturas especificadas por cada nivel del tratamiento: 4, 25 y 65 °C.
2. El día del inicio de la experimentación, se compraron las aguas embotelladas que serían objeto de estudio y se colocaron en las incubadoras con un tamaño de muestra igual a tres.
3. Una semana después de haber colocados se tomó las botellas en la incubadora, se tomó 3 ml de cada envase con la ayuda de una micropipeta y se colocó en los viales de vidrio. Las botellas volvieron a ser colocadas en las incubadoras una vez que el experimentador haya obtenido la muestra.
4. Los viales fueron analizados con el espectrofotómetro UV/VIS en las instalaciones de la U.N.A.M Campus Juriquilla del Centro de Ciencia de Física y Tecnología aplicada.
5. Los resultados fueron almacenados digitalmente en Excel.

6. Las actividades del punto tres al cinco fueron repetidas hasta obtener las mediciones de la cuarta semana después de haber iniciado el experimento.
7. Los resultados fueron almacenados en Excel para su análisis en R.

Al analizar los resultados, se deseó observa la cantidad de migración de BPA en situaciones extremas de la vida diaria. La investigación continuo q través de colocar botellas de los dos colores seleccionados con la misma cantidad de líquido en el auto del investigador durante dos semanas. Por lo que el experimento siguió de la siguiente manera:

8. Se compraron las botellas de 10 botellas de color azul y 10 botellas de color transparente. Se seleccionaron 5 de cada una y fueron llevadas al en el mismo espectrofotómetro utilizado anteriormente.
9. Las botellas azules contenían 500 ml por lo que con la ayuda de un matraz aforado de 250 ml se les retiro dicho volumen. De esta manera las muestras color azul contenían el mismo volumen que aquellas de color transparentes. El resto de las botellas quedaron almacenadas en sombra en el área de becarios de la Maestría en Ingeniería en Calidad y Productividad de la U.A. Q.
10. El agua fue analizada durante 5 días laborales consecutivos (lunes a viernes). Cada día se tomó 3 ml para la medición por triplicado.
11. Los pasos 8 y 9 fueron repetidos con el resto de las botellas que quedaron pendientes de monitoreo.
12. Las mediciones fueron almacenadas en Excel para su análisis en R. Los datos acerca de la temperatura promedio diaria fue obtenida en el sitio de meteored.mx (Meteored, 2017).

### **3.4. MUESTRAS.**

#### **3.4.1. Muestras seleccionadas para su medición.**

Las botellas seleccionadas se tomaron botellas en presentación de 250 y 500 ml producidas en la Universidad Autónoma de Querétaro. En el caso de la marca comercial, se compraron las muestras en presentaciones de 250 ml un día antes de ser introducidas en el ambiente controlado. Para la segunda fase del experimento, se compraron diez botellas de la marca comercial analizada anteriormente y diez botellas de la UAQ azules llanadas únicamente con 250 ml.

### **3.4.2. Preparación de las muestras.**

Las muestras utilizadas en este proyecto fueron agua embotellada en distintos envases con finalidad de comparar distintas características del envase de PET que contribuyen a la liberación de BPA en el agua. Cada tipo de envase se colocó en ambientes controlados a 4, 25 y 65 °C por triplicado para dar una mayor fiabilidad a los resultados. Las incubadoras fueron estabilizadas un día antes de su medición siendo monitoreadas cada dos horas con el fin de asegurar su estabilidad. Al obtener muestras de cada envase el contenido fue modificado para tener una proporción 1:1 metanol:agua con la finalidad de disolver el BPA y facilitar su lectura en el espectrofotómetro UV (Benecyo, 2016). El uso de metanol es necesario ya que es el soluto de la molécula a estudiar.

En el caso del estudio de vida real, los envases fueron colocados en una caja de cartón atrás del asiento del piloto. Las muestras de agua se tomaron directamente sin tener que usar los viales como anteriormente se había hecho.

## **3.5. EXPERIMENTACIÓN.**

### **3.5.1. Lugar del experimento y materiales.**

Lugar

Las muestras fueron almacenadas en las incubadoras ubicadas en la Facultad de Química con dirección Cerro de Las Campanas, s/n, Las Campanas, Centro Universitario, C. P. 76010 Santiago de Querétaro, Qro. Se encuentra en la latitud Norte 20° 35' 29.467" y la longitud Oeste 100° 24' 39.368" a una altura del nivel del mar de 1828 m. Las mediciones fueron hechas en las instalaciones de la U.N.A. M. Campus Juriquilla en las instalaciones del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (C.F. A. T. A.). La dirección de las instalaciones es Blvd. Juriquilla 3001, Juriquilla La Mesa, C. P. 76230 Juriquilla, encontrándose en la latitud Norte 20° 42' 4.961" y la longitud Oeste 100° 26' 48.366" a una altura del nivel del mar de 1930 m.

## Materiales

- 9 botellas de 250 ml de la U.A.Q.
- 19 botellas Bonafont de 250 ml.
- 19 botellas de 500 ml de la U.A.Q.
- Bisfenol A de grado HPLC (99%+) CAS No.: 80-05-7
- Metanol de grado HPLC (99%+).
- Agua destilada.

## Equipo

- Espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 35.
- 2 celdas de SUPRASIL de 10 mm.
- 3 Incubadoras de temperatura controlada.
- Bascula (precisión de 0.001 gr).
- Probetas graduadas.
- Matraz aforado de 500 ml.
- Matraces aforados de 100 ml.
- Micropipeta (precisión de 100 a 1000  $\mu$ l).
- Viales de viales de muestreo (5 ml).
- Cápsula de porcelana
- Gotero.
- Guantes.
- Cubreboca.
- Plumas
- Marcador permanente.
- Computadora.
- Software: Lambda 35, R, Microsoft Office.

### **3.6. Condiciones del experimento.**

Los reactivos utilizados fueron almacenados a temperatura ambiente en el laboratorio sin corriente de aire. Todos los objetos de cristal fueron calentados en un horno a 120°C durante 2 horas para asegurar que estos estén secos. Las muestras seleccionadas fueron por triplicado en el refrigerador a 4°C, en la primera incubadora a 25 ° C y en la segunda a 65°C, tal como se indicó en la tabla experimental.

Las botellas en la segunda fase del experimento fueron colocadas detrás del asiento del piloto del investigador para simular un comportamiento en la vida real. Las semanas seleccionadas para hacer el análisis fueron: la primera, del 18 al 22 de Septiembre de 2017, y la segunda, del 25 al 29 de Septiembre de 2017.

### 3.7. Condiciones del equipo.

La cantidad de BPA se determinó con el Espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 35 y empleando el software Lambda 35, el cual fue provisto por el mismo proveedor del equipo utilizado. El espectrofotómetro tiene una resolución en el rango de longitud de onda de 225 a 800 nm. En el caso del experimento solo se utilizó los valores de absorbancia entre 240-300 nm dado que esta es el área donde se presenta la absorción del Bisfenol A.

Las celdas utilizadas fueron de SUPRASIL del mismo proveedor del equipo utilizado, no se pudo utilizar otro material dado que absorbe el rayo UV tal como se muestra en la Figura 3.7-1. Esta grafica fue compartida por el proveedor, en la cual se observa que los únicos materiales que no absorben el UV en el rango a utilizar son el SUPRASIL y el SUPRASIL 300.

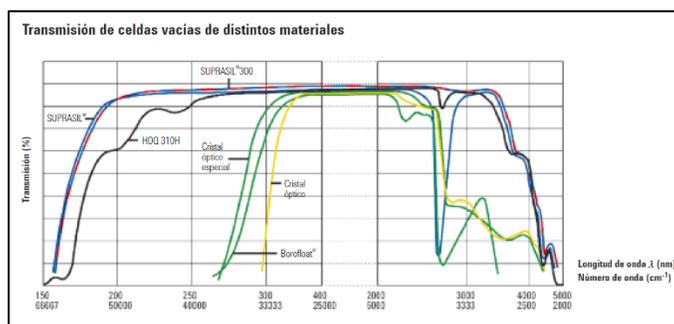


Figura 3.7-1 Rango de absorción de los materiales para celdas para espectrofotómetros UV/VIS.

### 3.8. SISTEMA DE MEDICIÓN.

#### 3.8.1. Medición en el espectrofotómetro UV/VIS.

La cuantificación del Bisfenol A se hizo a través de utilizar un espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 35 y celdas de SUPRASIL de 10 mm, las cuales pueden contener 3 ml de muestra. Al inicio del día en el cual se midieron las muestras, se prepararon dos celdas de metanol:agua destilada en proporción 1:1; esto se hizo con la finalidad de poder definir la línea base. Se analizó que la variación de porcentaje de transmitancia se encontrará en el rango de 99.5% y 100.5%.

Una vez establecida la línea base, el siguiente paso fue retirar la celda que contenía la muestra preparada, dejando una de las que se había preparado anteriormente como blanco en el espacio señalado en la Figura 3.8.1-1. La extracción del líquido contenido anteriormente se hizo a través de utilizar un gotero. Esto tuvo la finalidad de evitar de que el líquido se derrame en las paredes de la celda lo cual causa que el investigador tenga que limpiar de nuevo la celda pudiendo causar un poco de ruido. Enseguida, se tomó con la micropipeta 1 ml de la muestra de agua que se deseó medir y se colocó en el espacio designado para la lectura de la muestra señalado en la Figura 3.8.1-1; de igual manera con el metanol para obtener así una proporción 1:1. Este proceso se repitió en cada medición.

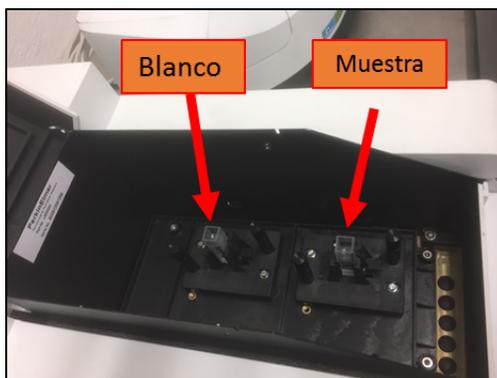


Figura 3.8.1-1 Lugar donde se colocan la celda del blanco y la celda de la muestra que se desea medir.

### **3.8.2. Determinación del punto de absorción del BPA en el espectrofotómetro UV/VIS.**

La forma de cuantificar al emplear el Espectrofotómetro UV/VIS es a través de comprobar el punto donde la molécula absorbe el rayo de luz que pasa a través de celda. Dicho punto se obtuvo al preparar muestra saturada (sin cantidad conocida) de BPA (99%+) en metanol (99%+). Se tomó 1 ml de la solución preparada y se colocó en la celda para su medición. Se hizo una lectura de transmitancia en el rango de 220 a 400 nm, después se extrajo con la ayuda de la micro pipeta 1 ml de la celda que contenía la mezcla saturada y se le agregó 500  $\mu$ l de agua destilada y 500  $\mu$ l de metanol 99%+; esto se repitió durante 10 veces hasta llegar a la proporción 1:512 de la medición inicial. Las curvas obtenidas de las distintas diluciones se muestran en la Figura 3.8.2-1, las cuales están denotadas con un color diferente especificado en el cuadro de acotaciones. En el eje x se colocó la longitud de onda emitida por el espectrofotómetro UV/VIS y en el eje y el porcentaje de transmitancia que pasa a través del vial que contiene la muestra. En la mezcla saturada inicial (1:1), el rango de longitud de onda (nm) donde se observó que la transmitancia fue muy amplia, pero al irse diluyendo la concentración este fue reducido. En la Figura 3.8.2-2, se muestran las curvas de las últimas tres diluciones hechas, en esta se observó que el BPA tiende a tener su punto de absorción en la longitud de 269 nm (denotado con la línea vertical de color azul).

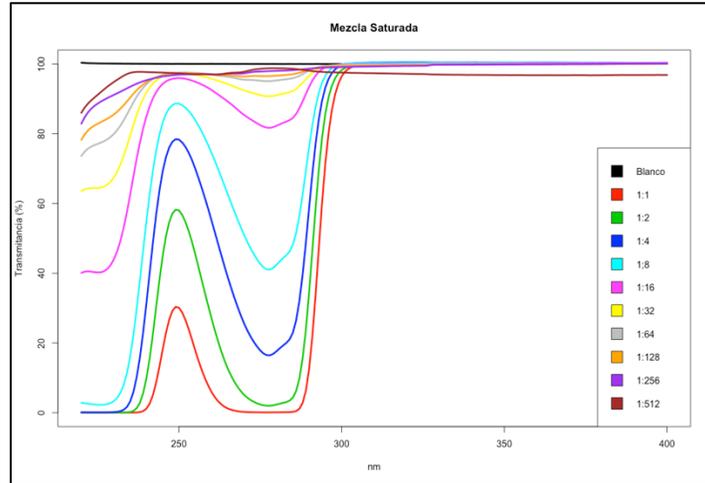


Figura 3.8.2-1 Curvas obtenidas de la dilución de una mezcla saturada de BPA 99%+ en Metanol 99%+ y Agua Destilada.

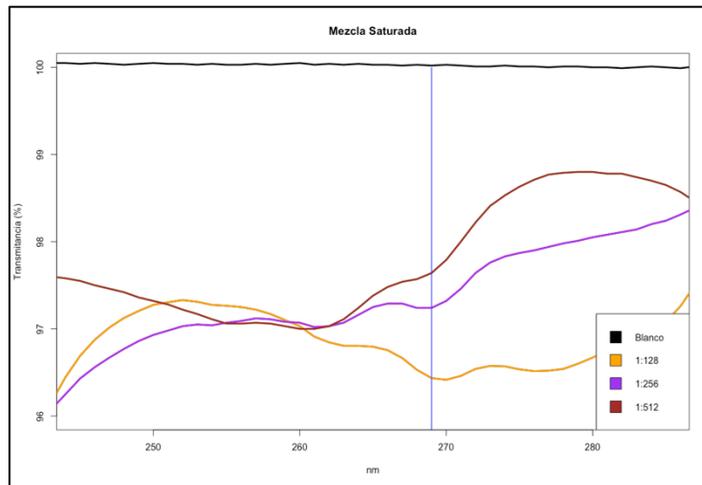


Figura 3.8.2-2 Zona donde la transmitancia se reduce debido al BPA.

### 3.8.3. Cuantificación en espectrofotómetro UV/VIS.

Todas las mediciones que se hicieron fueron por triplicado con el fin de mejorar la precisión. La celda utilizada para el espectrofotómetro fue llenada a dos terceras partes de su capacidad, aproximadamente 2 ml de contenido. Utilizando del software Lambda 35 se llevó a cabo la lectura de porcentaje de transmitancia en el rango de longitud de onda de 240-300 nm.

#### **3.8.4. Análisis del sistema de medición.**

La validación del sistema de medición se llevó a cabo por el proveedor del espectrofotómetro UV-VIS dado que debido a la precisión del instrumento es necesario llevarlo por un laboratorio especializado y no validarlo por técnicas como el R&R cruzado. En el apartado 6.1 se muestra el certificado de calibración emitido, en el cual se demuestra que el equipo cuenta con la sensibilidad necesaria. Por otra parte, la practica en este tipo de mediciones se sugiere hacer por triplicado debido a que al basar los resultados en una sola medición existe un error relativo que va del 1 al 5%, haciéndolo de esa manera ese porcentaje se reduce a solo unas décimas (Skoog D. A., 2015).

#### **3.8.5. Curva de calibración.**

Las concentraciones para la curva de calibración se prepararon en el laboratorio. El primer paso fue tomar una capsula de porcelana y colocarla en la báscula para tararla. Una vez tarada se tomó el estándar de BPA 99%+, se selección una partícula y se colocó en la capsula, pesando 1.5 mg. La partícula fue colocada en el matraz aforado de 500 ml junto con metanol 99%+ y agua destilada en proporción 1:1 para preparar la solución madre cuya concentración fue de 300,000 ng/L.

Los niveles de la curva de calibración fueron definidos en base las cantidades encontradas en la revisión de la literatura efectuada en los Antecedentes. Estas se encuentran resumidas en la Tabla 3.8.5-1. La primera columna hace referencia la fuente bibliográfica, la segunda y tercera columna la cantidad mínima y máxima de BPA encontrada en cada estudio, respectivamente. En el experimento de Santhi se encontró la cantidad máxima de BPA, de la cual fue 215 ng/L (Santhi, 2012) mientras que en el experimento de Nam se encontra la menor cantidad, 0.03 ng/L (Nam, 2010). Por lo tanto, los niveles seleccionados para obtener la curva de calibración fueron los siguientes: 250, 200, 150, 100 y 50 ng/L.

Bibliografía	Cantidad de BPA (ng/L)	
	Mín.	Máx.
Toyo'oka, 2000	3	10
Wu, 2010	N/A	46.7
Nam, 2010	0.03	0.18
Nam, 2010	0.13	18.47
Santhi, 2012	0.7	5.9
Santhi, 2012	6	16.6
Santhi, 2012	1.3	215
Santhi, 2012	3.5	59.5
Santhi, 2012	0.81	3.65
Fan, 2014	0.26	18.7
Fan, 2014	0.62	22.6
Fan, 2014	2.89	38.9
Kumar Selvaraj, 2014	2.8	136

Tabla 3.8.5-1 Cantidad de BPA (ng/L) encontrada en las diversas bibliografías.

Los niveles fueron preparados en matraces aforados de distinta capacidad ya que la cantidad de la solución madre a diluir en el Metanol 99%+ tenía que estar entre 0.1 a 1 ml debido a la capacidad de la micropipeta utilizada. Con la aplicación de la ecuación de dilución [1] se estimó las cantidades para cada nivel, donde:  $V_2$  corresponde a la capacidad del matraz,  $C_1$  la concentración de la solución madre y  $C_2$  la concentración a preparar para la curva de calibración.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad [1]$$

En la Tabla 3.8.5-2 se muestran las condiciones para preparar cada nivel de la curva. Estos están señalados en la primera columna, mientras que en la segunda de indica la cantidad de solución madre tomada para preparar cada nivel de la curva. En la tercera columna se muestra la capacidad del matraz aforado utilizado. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente forma: El investigador usó la micropipeta para tomar el volumen de la solución madre acorde a la concentración y lo vació en el su respectivo matraz, después este fue llenado con metanol 99%+ y agua destilada en proporción 1:1 hasta tener completar el volumen correspondiente.

Concentración (ng/L)	Cantidad de solución madre (ml)	Capacidad del Matraz (ml)
250	0.21	250
200	0.17	250
150	0.13	250
100	0.17	500
50	0.17	1000

Tabla 3.8.5-2 Concentraciones para la preparación de los niveles de la curva de calibración.

Las concentraciones fueron medidas por triplicado para disminuir la incertidumbre de las mediciones. Una vez que se obtuvieron todas las curvas de transmitancia, se tomaron los valores obtenidos en 269 nm los cuales están indicados en la Tabla 3.8.5-3. En la Figura 3.8.5-1 se muestra el diagrama de dispersión de los datos obtenidos, en el cual, el eje de la abscisa representó la concentración de BPA (ng/L) y en el eje de la ordenada el porcentaje de absorción. El siguiente paso fue trazar una recta de regresión con los datos obtenidos, de la cual su ecuación es esta es:  $y = 99.9446 - 0.0065x + \varepsilon$ . Las comprobaciones de los supuestos de regresión se encuentran más adelante.

Concentración (ng/L)	Transmitancia (%)		
	1	2	3
0	99.99	99.94	99.97
50	99.65	99.59	99.66
100	99.28	99.28	99.23
150	98.92	98.89	98.95
200	98.71	98.64	98.67
250	98.34	98.32	98.35

Tabla 3.8.5-3 Transmitancia obtenida de concentraciones conocidas para obtener la curva de calibración.

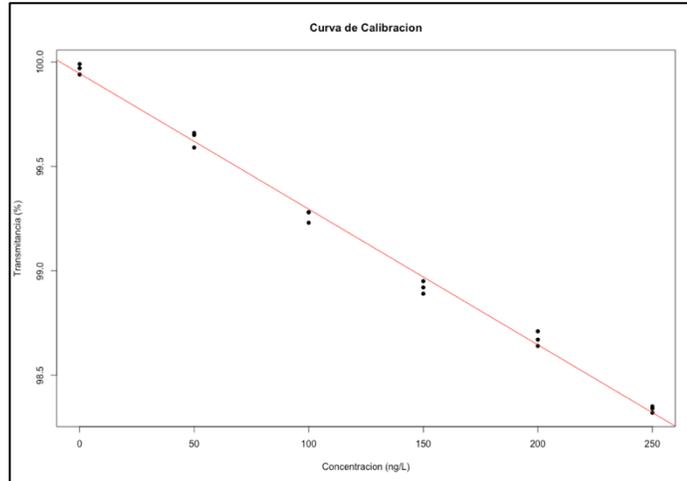


Figura 3.8.5-1 Curva de Calibración.

### 3.8.6. Medición de las muestras.

La cantidad de BPA fue determinada por el porcentaje de transmitancia detectado en el espectrofotómetro, estas hechas por triplicado y en base al punto seleccionado para fijar la curva de calibración. Con la micro pipeta se tomó 1 ml de la muestra a medir y se colocó en la celda del espectrofotómetro, después se tomó 1 ml de metanol 99+% y se vertió en la misma celda. El siguiente paso fue colocar la celda para la medición asegurando que esta esté libre de suciedad y burbujas. Una vez hecha la medición, se retiró el contenido con la ayuda de un gotero para evitar que el contenido se derrame en las paredes y permita continuar con la siguiente medición. Al obtener los tres valores de transmitancia se estimó un promedio y con la curva de calibración se determinó la cantidad de BPA (ng/L).

## 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

### 3.9.1. Curva de Calibración.

La curva de calibración obtenida en el apartado 3.8.5, es una recta que se ajusta a las nubes de puntos obtenidos con la finalidad de minimizar el error medio al hacer los pronósticos. La cantidad de BPA se estimó en base al porcentaje de transmitancia. Por lo tanto, es necesario comprobar los supuestos que debe cumplir

cualquier recta de regresión. En la Tabla 3.9.1-1 se muestra el resumen numérico de la curva obtenida. La recta cuenta con coeficiente de  $R^2$  igual a 0.9953 y  $R^2$ -ajustada a 0.9950, lo cual, nos dice que la recta es predictiva y muy precisa lo que permite pronosticar la cantidad de BPA (ng/L) en base al porcentaje de transmitancia obtenido por el espectrofotómetro UV/VIS. En referencia a la significancia del modelo, se hizo una prueba F múltiple a los factores de la ecuación, en la cual las hipótesis son:

$$H_0: \beta_0 = \beta_1$$

$$H_a: \beta_0 \neq \beta_1$$

La hipótesis alternativa  $H_0$  se rechaza con un 95% de confianza ya que se tiene una probabilidad menor a  $2.2 \times 10^{-16}$  de que los coeficientes no pronostiquen la cantidad de BPA cuando esta es cierta.

Coeficientes:				
Estimados	Est.	Error	t	Valor-p
(Intercepto)	99.9446032	0.0169165	5908.1	<2e-16
concentración	-0.006499	0.0001117	-58.16	<2e-16

Error estándar de residuales: 0.04048 con 16 grados de libertad  
 $R^2$  múltiple: 0.9953,  $R^2$  ajustada: 0.995

Tabla 3.9.1-1 Resumen numérico de la curva de calibración.

Los residuales se muestran graficados en la Figura 3.9.1-1. La independencia de estos se puede observar en las gráficas donde se encuentran los valores ajustados (ambas representadas en el lado izquierdo). Por otra parte, la normalidad no se aprecia muy bien de manera gráfica dado que los puntos que se ubican cerca del cuantil teórico 0 están alejados de la curva de normalidad. Dado esta situación, la normalidad se comprobó con la prueba no paramétrica de normalidad Shapiro-Wilk, en la cual las hipótesis son:

$$H_0: \text{Los residuales se distribuyen de manera normal}$$

$$H_a: \text{Los residuales no se distribuyen de manera normal}$$

El resultado de la prueba se muestra en la Tabla 3.9.1-2, con el cual, se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar con 95% de confianza la hipótesis nula ya que el valor-p es de 0.7215. Esto demuestra que los datos se distribuyen de manera normal. Con esta prueba queda demostrado que la normalidad se cumple en los residuos del modelo de regresión.

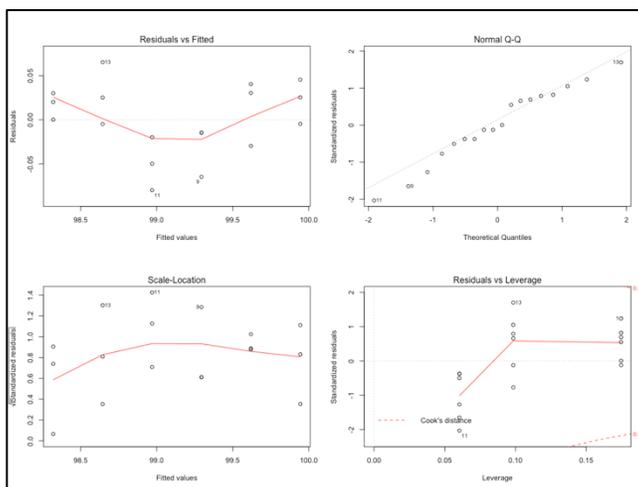


Figura 3.9.1-1 Residuales de la curva de calibración.

Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk	
W	0.96608
Valor-p	0.7215

Tabla 3.9.1-2 Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los residuos de la curva de calibración.

### 3.9.2. Efectos de los Factores.

Los resultados obtenidos al medir la cantidad de BPA en las botellas almacenadas se presentan en la Tabla 3.9.1-2. En la primera columna se indica el número del sujeto experimental, seguido del contenido que tienen el envase, la temperatura de almacenado, el tipo de botella y el color de la botella. La botella A corresponde a el agua producida por la U.A.Q. en presentación de 500 ml, la botella

B es la presentación de 250 ml y la botella C hace referencia a la marca comercial Bonafont en presentación de 250 ml. Cada botella fue pesada con la ayuda de una báscula con precisión de centésimas de gramo, estos valores se indican en la sexta columna. La columna con en el encabezado “Sem” se indica la semana en que se hizo la medición, en la cuales, cada semana corresponde a 7 días después de haberse almacenado. Las columnas con mediciones, estas son las mediciones hechas por triplicado como se especificó anteriormente. Por último, al final se muestra el promedio de las tres mediciones hechas.

n	Cont (ml)	Temp (°C)	Bot	Color	Peso (g)	Sem	Mediciones			$\bar{x}$
1	500	4	A	Azul	20.04	1	69.38	64.69	63.12	65.73
2	500	4	A	Azul	19.95	1	61.56	63.12	67.81	64.16
3	500	4	A	Azul	20.2	1	27.19	31.87	30.31	29.79
4	250	4	B	Trans	17.96	1	31.87	24.06	17.81	24.58
5	250	4	B	Trans	18.17	1	0	3.75	0	1.25
6	250	4	B	Trans	18.22	1	19.37	17.81	6.87	14.68
7	250	4	C	Trans	16.95	1	8.44	2.19	0	3.54
8	250	4	C	Trans	16.91	1	3.75	13.13	11.56	9.48
9	250	4	C	Trans	16.75	1	0	10	6.87	5.62
10	500	25	A	Azul	20.2	1	33.44	39.69	35	36.04
11	500	25	A	Azul	20.12	1	42.81	41.25	45.94	43.33
12	500	25	A	Azul	20.02	1	74.06	75.62	64.69	71.46
13	250	25	B	Trans	17.99	1	27.19	25.63	38.13	30.32
14	250	25	B	Trans	17.97	1	25.63	22.5	24.06	24.06
15	250	25	B	Trans	18.03	1	24.06	25.63	27.19	25.63
16	250	25	C	Trans	16.94	1	35	33.44	31.87	33.44
17	250	25	C	Trans	16.81	1	20.94	20.94	16.25	19.38
18	250	25	C	Trans	16.79	1	8.44	5.31	0	4.58
19	500	60	A	Azul	19.4	1	20.94	24.06	33.44	26.15
20	500	60	A	Azul	19.72	1	55.31	55.31	67.81	59.48
21	500	60	A	Azul	20.19	1	30.31	31.87	30.31	30.83
22	250	60	B	Trans	18.13	1	81.88	78.75	86.56	82.4
23	250	60	B	Trans	18.26	1	81.88	88.12	74.06	81.35
24	250	60	B	Trans	18.25	1	80.31	89.69	94.37	88.12
25	250	60	C	Trans	16.94	1	66.25	77.19	70.94	71.46
26	250	60	C	Trans	16.38	1	125.63	124.06	122.5	124.06

27	250	60	C	Trans	16.98	1	99.06	100.62	105.31	101.66
1	500	4	A	Azul	20.04	2	80.31	81.88	86.56	82.92
2	500	4	A	Azul	19.95	2	74.06	77.19	81.88	77.71
3	500	4	A	Azul	20.2	2	30.31	31.87	35	32.39
4	250	4	B	Trans	17.96	2	38.13	35	31.87	35
5	250	4	B	Trans	18.17	2	25.63	33.44	28.75	29.27
6	250	4	B	Trans	18.22	2	28.75	38.13	33.44	33.44
7	250	4	C	Trans	16.95	2	0	8.44	5.31	4.58
8	250	4	C	Trans	16.91	2	17.81	20.94	13.13	17.29
9	250	4	C	Trans	16.75	2	14.69	8.44	6.87	10
10	500	25	A	Azul	20.2	2	45.94	39.69	41.25	42.29
11	500	25	A	Azul	20.12	2	81.88	89.69	89.69	87.09
12	500	25	A	Azul	20.02	2	74.06	72.5	74.06	73.54
13	250	25	B	Trans	17.99	2	35	41.25	42.81	39.69
14	250	25	B	Trans	17.97	2	41.25	49.06	44.37	44.89
15	250	25	B	Trans	18.03	2	44.37	49.06	47.5	46.98
16	250	25	C	Trans	16.94	2	36.56	38.13	49.06	41.25
17	250	25	C	Trans	16.81	2	55.31	56.88	64.69	58.96
18	250	25	C	Trans	16.79	2	31.87	36.56	30.31	32.91
19	500	60	A	Azul	19.4	2	86.56	85	89.69	87.08
20	500	60	A	Azul	19.72	2	85	85	77.19	82.4
21	500	60	A	Azul	20.19	2	105.31	97.5	97.5	100.1
22	250	60	B	Trans	18.13	2	86.56	83.44	92.81	87.6
23	250	60	B	Trans	18.26	2	91.25	94.37	92.81	92.81
24	250	60	B	Trans	18.25	2	94.37	89.69	91.25	91.77
25	250	60	C	Trans	16.94	2	136.56	127.19	128.75	130.83
26	250	60	C	Trans	16.38	2	125.63	127.19	124.06	125.63
27	250	60	C	Trans	16.98	2	156.87	156.87	167.81	160.52
1	500	4	A	Azul	20.04	3	91.25	86.56	91.25	89.69
2	500	4	A	Azul	19.95	3	92.81	99.06	89.69	93.85
3	500	4	A	Azul	20.2	3	42.81	45.94	41.25	43.33
4	250	4	B	Trans	17.96	3	135	135	127.19	132.4
5	250	4	B	Trans	18.17	3	70.94	56.88	61.56	63.13
6	250	4	B	Trans	18.22	3	91.25	100.62	99.06	96.98
7	250	4	C	Trans	16.95	3	3.75	8.44	2.19	4.79
8	250	4	C	Trans	16.91	3	22.5	10	25.63	19.38
9	250	4	C	Trans	16.75	3	22.5	13.13	20.94	18.86
10	500	25	A	Azul	20.2	3	117.81	110	114.69	114.17
11	500	25	A	Azul	20.12	3	102.19	105.31	102.19	103.23

12	500	25	A	Azul	20.02	3	135	138.13	130.31	134.48
13	250	25	B	Trans	17.99	3	114.69	114.69	116.25	115.21
14	250	25	B	Trans	17.97	3	114.69	113.13	117.81	115.21
15	250	25	B	Trans	18.03	3	86.56	86.56	89.69	87.6
16	250	25	C	Trans	16.94	3	70.94	75.62	77.19	74.58
17	250	25	C	Trans	16.81	3	78.75	70.94	75.62	75.1
18	250	25	C	Trans	16.79	3	52.19	58.44	60	56.88
19	500	60	A	Azul	19.4	3	147.5	149.06	145.94	147.5
20	500	60	A	Azul	19.72	3	163.13	163.13	155.31	160.52
21	500	60	A	Azul	20.19	3	164.69	172.5	167.81	168.33
22	250	60	B	Trans	18.13	3	145.94	144.37	147.5	145.94
23	250	60	B	Trans	18.26	3	160	147.5	145.94	151.15
24	250	60	B	Trans	18.25	3	117.81	130.31	113.13	120.42
25	250	60	C	Trans	16.94	3	180.31	188.12	189.69	186.04
26	250	60	C	Trans	16.38	3	177.19	180.31	186.56	181.35
27	250	60	C	Trans	16.98	3	181.88	189.69	181.88	184.48
1	500	4	A	Azul	20.04	4	92.81	92.81	95.94	93.85
2	500	4	A	Azul	19.95	4	111.56	102.19	102.19	105.31
3	500	4	A	Azul	20.2	4	53.75	58.44	58.44	56.88
4	250	4	B	Trans	17.96	4	147.5	136.56	145.94	143.33
5	250	4	B	Trans	18.17	4	106.88	119.37	114.69	113.65
6	250	4	B	Trans	18.22	4	135	130.31	133.44	132.92
7	250	4	C	Trans	16.95	4	44.37	39.69	45.94	43.33
8	250	4	C	Trans	16.91	4	31.87	39.69	17.81	29.79
9	250	4	C	Trans	16.75	4	38.13	36.56	28.75	34.48
10	500	25	A	Azul	20.2	4	175.62	170.94	169.38	171.98
11	500	25	A	Azul	20.12	4	178.75	178.75	178.75	178.75
12	500	25	A	Azul	20.02	4	153.75	139.69	149.06	147.5
13	250	25	B	Trans	17.99	4	122.5	120.94	130.31	124.58
14	250	25	B	Trans	17.97	4	131.87	130.31	131.87	131.35
15	250	25	B	Trans	18.03	4	120.94	122.5	130.31	124.58
16	250	25	C	Trans	16.94	4	92.81	102.19	95.94	96.98
17	250	25	C	Trans	16.81	4	103.75	110	100.62	104.79
18	250	25	C	Trans	16.79	4	100.62	95.94	92.81	96.46
19	500	60	A	Azul	19.4	4	239.69	247.5	238.13	241.77
20	500	60	A	Azul	19.72	4	235	236.56	236.56	236.04
21	500	60	A	Azul	20.19	4	225.63	227.19	219.37	224.06
22	250	60	B	Trans	18.13	4	210	217.81	214.69	214.17
23	250	60	B	Trans	18.26	4	217.81	203.75	208.44	210

24	250	60	B	Trans	18.25	4	163.13	163.13	163.13	163.13
25	250	60	C	Trans	16.94	4	217.81	213.13	220.94	217.29
26	250	60	C	Trans	16.38	4	228.75	242.81	227.19	232.92
27	250	60	C	Trans	16.98	4	203.75	208.44	211.56	207.92

Tabla 3.9.2-1 Resultados de la primera fase de la investigación.

Los datos obtenidos fueron analizados a través de un Análisis de Varianza (ANOVA). Las variables independientes seleccionadas para medir la cantidad de BPA fueron: la temperatura, el tiempo, la botella, peso y el color; cabe destacar que el contenido y el color son covariantes ya que sus variables respuesta es la misma. En el análisis se utilizó una confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ) en el que las hipótesis son las siguientes:

$H_0$ : El factor de control es significativo

$H_a$ : El factor de control no es significativo

El primer ANOVA se muestra en la Tabla 3.9.2-2. En este las interacciones no fueron analizadas ya que los factores no están relacionados entre sí.

F.V	G.L	SC	CM	F	Valor-p
Color	1	5883	5883	6.5	0.0123
Temp	2	145985	72992	80.648	<2e-16
Botella	1	2676	2676	2.957	0.0886
Peso	1	123	123	0.136	0.7128
Tiempo	3	161016	53672	59.301	<2e-16
Residuales	99	89602	905		
Total	107	405285	136251		

Tabla 3.9.2-2 ANOVA del primer modelo.

El ANOVA muestra que el peso de la botella no tiene influencia significativa en la migración de BPA en el agua embotellada, esta afirmación tiene 71.28% (representado por el valor-p) de que sea verdad. Esta situación requirió hacer un segundo análisis en el cual no se encuentre dicha variable. El ANOVA del segundo modelo se muestra a continuación en la Tabla 3.9.2-3.

F.V	G.L	SC	CM	F	Valor-p
Color	1	5883	5883	6.557	0.0119
Temp	2	145985	72992	81.351	<2e-16
Botella	1	2676	2676	2.983	0.0872
Tiempo	3	161016	53672	59.818	<2e-16
Residuales	100	89726	897		
Total	107	405286	136120		

Tabla 3.9.2-3 ANOVA del segundo modelo.

El nuevo análisis muestra que la botella no es significancia en la liberación de BPA dado que su valor-p es 0.0872, lo cual, es mayor al  $\alpha$  utilizado en la investigación. Esto conllevó a volver a hacer el ANOVA, el siguiente paso se hizo sin tomar en cuenta la botella; en la Tabla 3.9.2-4 se presenta el nuevo análisis.

F.V	G.L	SC	CM	F	Valor-p
Color	1	5883	5883	6.43	0.0128
Temp	2	145985	72992	79.78	<2e-16
Tiempo	3	161016	53672	58.67	<2e-16
Residuales	101	92402	915		
Total	107	405286	133462		

Tabla 3.9.2-4 ANOVA del tercer modelo.

En la tabla anterior se presenta el efecto cada variable, en este se demuestra que el color de la botella, la temperatura y el tiempo de almacenaje son significativos en la migración de BPA en el agua embotellada. Para validar esta afirmación es necesario comprobar los supuestos que debe cumplir un ANOVA: normalidad en los residuos, independencia, balanceo en los niveles de cada tratamiento, poder de la prueba (error tipo II) y homocedasticidad (Box, 2008).

En la Figura 3.9.2-1 se muestran graficados los residuales del ANOVA obtenido, en las dos gráficas situadas a la izquierda están representados los valores ajustados con respecto a su respectivo residual (gráfica superior) y raíz cuadrada del residual estandarizado (gráfica inferior). En ambos casos se observa que no se presenta algún patrón en el comportamiento de los puntos, por lo que de manera gráfica se observa evidentemente la independencia en el modelo obtenido. En la gráfica inferior derecha se representa la distancia de Cook para los residuales

estandarizados, en la cual se aprecia que no existen datos atípicos ya que ningún punto pasa los límites calculados por el software, lo cual no hace necesario volver a hacer el análisis eliminando dichos puntos.

La normalidad parece cumplirse de manera gráfica, ya que en la curva de normalidad representada en la gráfica superior derecha de la Figura 3.9.2-1, los residuales se ajustan a la recta a excepción de los puntos marginales. El supuesto en cuestión también fue validado con la Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk aplicada a los residuales, los resultados se muestran en la Tabla 3.9.2-5. Las hipótesis y nivel de confianza son los mismos de la prueba hecha en la página 32, por lo tanto, con un 95% de confianza no se rechaza la hipótesis nula ya que el valor-p es mayor a 0.05. De esta manera se demuestra estadísticamente que los residuales se distribuyen de manera normal.

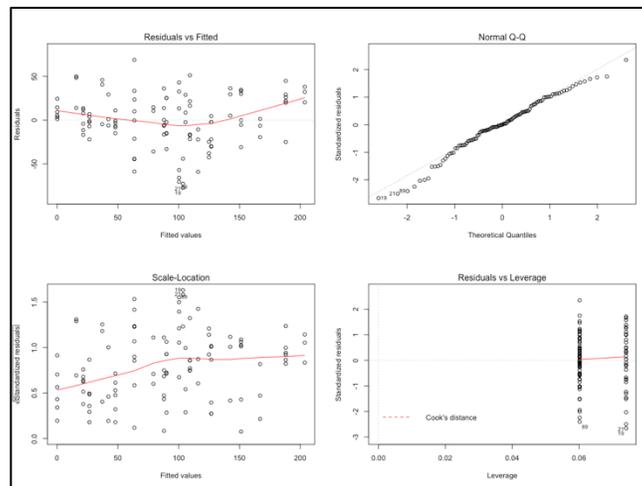


Figura 3.9.2-1 Residuales del ANOVA del tercer modelo.

Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk	
W	0.98158
Valor-p	0.1406

Tabla 3.9.2-5 Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk para modelo final del ANOVA.

Los tratamientos significativos no están balanceados en su totalidad, solo cumplen con esta condición las variables de Tiempo y de Temperatura con 27 y 36

datos por cada nivel, respectivamente. La variable de Color fue analizada con 36 muestras de color Azul y 72 de color Transparente, lo cual, puede obtener diferentes probabilidades de cometer el error tipo II ( $\beta$ ) en las inferencias. En la Tabla 3.9.2-6 se muestran los datos necesarios para hacer la prueba de poder para cada variable. En ella se puede observar que todas las variables tienen una probabilidad igual a 0 de no rechazar la hipótesis nula cuando esta es falsa. Por lo tanto, no existe problema por el desbalanceo de datos y el análisis tiene el suficiente poder para no cometer el error tipo II.

Variable	No. de grupos	n	Varianza	Varianza del error	Poder	$\beta$
Tiempo	4	27	53672	2349	1	0
Temperatura	3	36	72992	2470	1	0
Color	2	36* 72**	5882.9	3768	1* 1**	0* 0**
*Valor para el nivel "Azul" de la variable						
**Valor para el nivel "Transparente" de la variable						

Tabla 3.9.2-6 Valores del poder de la prueba de las variables significativas.

El último supuesto a evaluar para que el análisis sea válido es la homocedasticidad. La comprobación de este supuesto se llevó a cabo con tres pruebas para no tener algún riesgo en hacer una afirmación falsa, dichas pruebas fueron: Bartlett, Levene y Fligner; de las cuales las hipótesis son las siguientes:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2 ; \text{ donde } k \text{ es el número de niveles de la variable}$$

$$H_a: \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2 \text{ para al menos un par } (i,j)$$

En la Tabla 3.9.2-7 se indica el resultado de las tres pruebas de homocedasticidad para cada variable. En la primera columna se muestra cada variable a analizar, en la segunda se muestra el estadístico de prueba y el valor-p de la prueba de Bartlett, en la siguiente ambos índices de la prueba de Levene y de igual manera en la última con la prueba de Fligner. La confianza para inferir acerca de la *hipótesis nula* fue del 95%. La variable Color fue la única que no rechazó  $H_0$  en las tres pruebas, cumpliendo así el supuesto de homocedasticidad. Los datos de la Temperatura solo cumplen con el supuesto en la prueba de Bartlett, en el caso hipotético de inferir con un 99% de confianza la condición se cumpliría en los tres

casos. Por último, los niveles de la variable tiempo definitivamente no cumplen con el supuesto ya que en ninguna prueba presentan un valor-p mayor a 0.05.

Variable	Bartlett		Levene		Fligner	
	K <sup>2</sup>	Valor-p	F	Valor-p	χ <sup>2</sup>	Valor-p
Temperatura	5.5061	0.0637	3.9129	0.0230	6.8996	0.0318
Color	0.1393	0.7090	1.1267	0.2909	0.8758	0.3494
Tiempo	13.408	0.0038	4.5304	0.0050	11.794	0.0081

Tabla 3.9.2-7 Pruebas de homogeneidad de varianzas

El ANOVA obtenido no es válido ya que no se cumple con el supuesto de homocedasticidad, por lo tanto, el efecto de las variables se debe llevar a cabo de distinta manera. La técnica seleccionada para el nuevo análisis fue la prueba de Kruskal-Walis ya que a diferencia del ANOVA, esta toma en cuenta la media y no la varianza suponiendo que los datos provienen de una distribución parecida (Corder, 2014). El análisis realizado fue efectuado por separado para cada variable inicial con excepción al peso ya que esta es numérica, su análisis se explica más adelante. La hipótesis para esta prueba son las siguientes:

H<sub>0</sub>: La  $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ ; donde  $k$  es el número de niveles de la variable

H<sub>a</sub>:  $\mu_i \neq \mu_j$  para al menos un par (i,j)

El efecto de las variables factoriales analizadas por la prueba de Kruskal-Walis mencionadas en el párrafo anterior, se muestran en la Tabla 3.9.2-8. En ella se indica en la primera columna la variable, en la siguiente el coeficiente de chi-cuadrada de la prueba, seguido por los grados de libertad correspondiente a cada una y por último el valor-p. El tipo de Botella y Color resultaron no tener suficiente evidencia estadística para ser significantes ya que su valor-p es mayor a 0.05, lo cual, se puede inferir con un 95% para no rechazar H<sub>0</sub>. Por otra parte, la Temperatura y el Tiempo de almacenado resultaron ser significativos con un valor-p muy cerca de 0, lo cual quiere decir que sin temer a equivocarse están variables definitivamente contribuyen con la migración de BPA a el agua embotellada.

Variable	Kruskal-Walis $\chi^2$	Grados de libertad	Valor-p
Botella	3.7402	2	0.1541
Color	1.9001	1	0.1681
Temperatura	35.231	2	0.0000
Tiempo	42.852	3	0.0000

Tabla 3.9.2-8 Prueba de Kruskal-Willis para las variables factoriales.

El efecto del peso, como ya se mencionó, no fue verificado con el método anterior debido a que la variable es numérica y no factorial como el resto. Para esta situación el efecto fue verificado con una prueba de correlación con un 95% de confianza usando el coeficiente de Pearson, las hipótesis para esta prueba son:

$H_0$ : La correlación es igual a 0

$H_a$ : La correlación no es igual a 0

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 3.9.2-9. En ella se presenta el estadístico de prueba en la primera columna, seguido por los grados de libertad, después por el valor-p y para finalizar el porcentaje de correlación entre el peso y la cantidad de BPA migrada. El análisis da evidencia estadística para no rechazar  $H_0$ , lo cual quiere decir que no existe correlación positiva o negativa entre el peso y la concentración de BPA contenido en el agua embotellada. Por lo tanto, de esta manera queda demostrado que el peso no es factor significativo para la liberación de BPA.

Coeficiente de correlación de Pearson			
Estadístico de prueba t	Grados de libertad	Valor-p	Correlación (%)
1.2435	106	0.2164	11.99

Tabla 3.9.2-9 Coeficiente de correlación de Pearson para el peso de las botellas.

### 3.9.3. Migración del BPA en condiciones de la vida real

Los resultados de la segunda fase de la experimentación donde se comprobó la migración de BPA en condiciones de la vida diaria, se muestran en la Tabla

3.9.3-1. Las 20 botellas seleccionadas están indicadas en la primera columna. En la segunda columna se indica el día de la semana, donde 1 representa el día Lunes, el 2 el Martes, el 3 el Miércoles, 4 el Jueves y 5 el día Viernes. La tercera columna indica el día de la medición, las semanas seleccionadas para su medición fueron del 18/Sep – 22/Sep y del 25/Sep – 29/Sep. En la siguiente columna se indica la temperatura promedio del día (Meteored, 2017), seguida del color de la botella. Las mediciones por triplicado se encuentran señaladas en las siguientes tres columnas mientras que en la última el promedio de estas.

n	Día de la semana	Fecha	°C	Botella	BPA1	BPA2	BPA3	$\overline{BPA}$
1	1	18/09/17	18.5	Azul	0.71	2.25	2.25	1.73
1	2	19/09/17	19.3	Azul	6.86	8.4	0.71	5.32
1	3	20/09/17	21.4	Azul	19.17	13.02	14.56	15.58
1	4	21/09/17	20.2	Azul	20.71	25.33	28.4	24.81
1	5	22/09/17	20.2	Azul	39.18	40.71	39.18	39.69
2	1	18/09/17	18.5	Azul	3.79	0.71	2.25	2.25
2	2	19/09/17	19.3	Azul	19.17	22.25	14.56	18.66
2	3	20/09/17	21.4	Azul	17.63	28.4	14.56	20.2
2	4	21/09/17	20.2	Azul	22.25	22.25	19.17	21.22
2	5	22/09/17	20.2	Azul	33.02	29.94	29.94	30.97
3	1	18/09/17	18.5	Azul	11.48	9.94	17.63	13.02
3	2	19/09/17	19.3	Azul	19.17	8.4	19.17	15.58
3	3	20/09/17	21.4	Azul	20.71	19.17	16.1	18.66
3	4	21/09/17	20.2	Azul	16.1	19.17	22.25	19.17
3	5	22/09/17	20.2	Azul	23.79	17.63	20.71	20.71
3	1	18/09/17	18.5	Azul	13.02	2.25	0.71	5.32
4	2	19/09/17	19.3	Azul	8.4	3.79	8.4	6.86
4	3	20/09/17	21.4	Azul	16.1	9.94	9.94	11.99
4	4	21/09/17	20.2	Azul	11.48	20.71	11.48	14.56
4	5	22/09/17	20.2	Azul	20.71	23.79	22.25	22.25
5	1	18/09/17	18.5	Azul	3.79	9.94	3.79	5.84
5	2	19/09/17	19.3	Azul	19.17	9.94	19.17	16.1
5	3	20/09/17	21.4	Azul	17.63	20.71	14.56	17.63
5	4	21/09/17	20.2	Azul	34.56	17.63	28.4	26.87
5	5	22/09/17	20.2	Azul	23.79	36.1	23.79	27.89
6	1	25/09/17	18.6	Azul	11.48	16.1	13.02	13.53
6	2	26/09/17	19	Azul	14.56	14.56	13.02	14.04

6	3	27/09/17	18.3	Azul	14.56	17.63	9.94	14.04
6	4	28/09/17	18.9	Azul	20.71	16.1	14.56	17.12
6	5	29/09/17	17.1	Azul	25.33	20.71	29.94	25.33
7	1	25/09/17	18.6	Azul	11.48	2.25	0.71	4.81
7	2	26/09/17	19	Azul	5.32	5.32	3.79	4.81
7	3	27/09/17	18.3	Azul	8.4	8.4	6.86	7.89
7	4	28/09/17	18.9	Azul	9.94	13.02	16.1	13.02
7	5	29/09/17	17.1	Azul	19.17	14.56	14.56	16.1
8	1	25/09/17	18.6	Azul	0.71	0.71	3.79	1.73
8	2	26/09/17	19	Azul	20.71	16.1	11.48	16.1
8	3	27/09/17	18.3	Azul	25.33	34.56	20.71	26.87
8	4	28/09/17	18.9	Azul	20.71	26.87	40.71	29.43
8	5	29/09/17	17.1	Azul	25.33	33.02	29.94	29.43
9	1	25/09/17	18.6	Azul	3.79	9.94	5.32	6.35
9	2	26/09/17	19	Azul	3.79	6.86	17.63	9.43
9	3	27/09/17	18.3	Azul	13.02	17.63	13.02	14.56
9	4	28/09/17	18.9	Azul	11.48	19.17	22.25	17.63
9	5	29/09/17	17.1	Azul	23.79	26.87	23.79	24.81
9	1	25/09/17	18.6	Azul	14.56	11.48	6.86	10.97
10	2	26/09/17	19	Azul	9.94	16.1	9.94	11.99
10	3	27/09/17	18.3	Azul	13.02	14.56	22.25	16.61
10	4	28/09/17	18.9	Azul	20.71	13.02	22.25	18.66
10	5	29/09/17	17.1	Azul	19.17	17.63	20.71	19.17
11	1	18/09/17	18.5	Transparente	2.25	5.32	2.25	3.27
11	2	19/09/17	19.3	Transparente	3.79	3.79	3.79	3.79
11	3	20/09/17	21.4	Transparente	2.25	9.94	3.79	5.32
11	4	21/09/17	20.2	Transparente	13.02	13.02	11.48	12.5
11	5	22/09/17	20.2	Transparente	14.56	20.71	6.86	14.04
11	1	18/09/17	18.5	Transparente	3.79	8.4	8.4	6.86
11	2	19/09/17	19.3	Transparente	11.48	3.79	9.94	8.4
12	3	20/09/17	21.4	Transparente	9.94	5.32	11.48	8.91
12	4	21/09/17	20.2	Transparente	14.56	13.02	5.32	10.97
12	5	22/09/17	20.2	Transparente	9.94	16.1	16.1	14.04
13	1	18/09/17	18.5	Transparente	0.71	3.79	8.4	4.3
13	2	19/09/17	19.3	Transparente	3.79	0.71	9.94	4.81
13	3	20/09/17	21.4	Transparente	3.79	11.48	11.48	8.91
13	4	21/09/17	20.2	Transparente	8.4	13.02	8.4	9.94
13	5	22/09/17	20.2	Transparente	11.48	17.63	11.48	13.53
14	1	18/09/17	18.5	Transparente	8.4	9.94	14.56	10.97

14	2	19/09/17	19.3	Transparente	14.56	8.4	11.48	11.48
14	3	20/09/17	21.4	Transparente	11.48	11.48	11.48	11.48
14	4	21/09/17	20.2	Transparente	11.48	17.63	17.63	15.58
14	5	22/09/17	20.2	Transparente	16.1	25.33	14.56	18.66
15	1	18/09/17	18.5	Transparente	3.79	2.25	0.71	2.25
15	2	19/09/17	19.3	Transparente	0.71	8.4	9.94	6.35
15	3	20/09/17	21.4	Transparente	6.86	16.1	11.48	11.48
15	4	21/09/17	20.2	Transparente	11.48	16.1	9.94	12.5
15	5	22/09/17	20.2	Transparente	22.25	26.87	20.71	23.28
16	1	25/09/17	18.6	Transparente	13.02	11.48	14.56	13.02
16	2	26/09/17	19	Transparente	13.02	23.79	17.63	18.15
16	3	27/09/17	18.3	Transparente	14.56	20.71	22.25	19.17
16	4	28/09/17	18.9	Transparente	22.25	17.63	26.87	22.25
16	5	29/09/17	17.1	Transparente	25.33	23.79	17.63	22.25
17	1	25/09/17	18.6	Transparente	22.25	8.4	11.48	14.04
17	2	26/09/17	19	Transparente	19.17	9.94	13.02	14.04
17	3	27/09/17	18.3	Transparente	14.56	19.17	26.87	20.2
17	4	28/09/17	18.9	Transparente	23.79	31.48	16.1	23.79
17	5	29/09/17	17.1	Transparente	31.48	39.18	31.48	34.05
18	1	25/09/17	18.6	Transparente	20.71	13.02	8.4	14.04
18	2	26/09/17	19	Transparente	14.56	19.17	19.17	17.63
18	3	27/09/17	18.3	Transparente	17.63	17.63	19.17	18.15
18	4	28/09/17	18.9	Transparente	25.33	22.25	16.1	21.22
18	5	29/09/17	17.1	Transparente	23.79	22.25	25.33	23.79
19	1	25/09/17	18.6	Transparente	17.63	8.4	11.48	12.5
19	2	26/09/17	19	Transparente	13.02	8.4	16.1	12.5
19	3	27/09/17	18.3	Transparente	14.56	14.56	17.63	15.58
19	4	28/09/17	18.9	Transparente	14.56	16.1	16.1	15.58
19	5	29/09/17	17.1	Transparente	16.1	19.17	14.56	16.61
19	1	25/09/17	18.6	Transparente	9.94	19.17	17.63	15.58
20	2	26/09/17	19	Transparente	14.56	11.48	23.79	16.61
20	3	27/09/17	18.3	Transparente	22.25	23.79	8.4	18.15
20	4	28/09/17	18.9	Transparente	17.63	17.63	22.25	19.17
20	5	29/09/17	17.1	Transparente	20.71	29.94	17.63	22.76

Tabla 3.9.3-1 Resultados de la segunda fase de la investigación.

El primer análisis hecho a los datos fue un ANOVA donde la variable dependiente fue la cantidad de BPA liberada (ng/L), y las variables independientes fueron el día de la semana, el color de la botella y la temperatura promedio del día;

esta última se estudió como variable numérica. En la Tabla 3.9.3-2 se muestra el análisis mencionado. El nivel de confianza utilizada y las hipótesis son las mismas que el apartado 3.9.2.

F.V	G.L	SC	CM	F	Valor-p
Día	4	2656.6	664.2	22.587	4.69E-13
Temperatura	1	96.1	96.1	3.267	0.0739
Color	1	86.2	86.2	2.932	0.0901
Residuales	93	2734.7	29.4		
Total	99	5573.6	875.9		

Tabla 3.9.3-2 ANOVA del primer modelo de la segunda fase del experimento.

En el primer modelo de los datos de vida real, se aprecia que el día es una variable significativa dado que su valor-p es muy cercano a 0. Por otra parte, las variables de Temperatura y Color no lo son ya que su valor-p es mayor a 0.05, por lo que es necesario hacer un modelo nuevo quitando la variable con mayor valor-p. En este caso es la variable de color. En la Tabla 3.9.3-3 se muestra el nuevo ANOVA.

F.V	G.L	SC	CM	F	Valor-p
Día	4	2656.6	664.2	22.132	6.78E-13
Temperatura	1	96.1	96.1	3.201	0.0768
Residuales	94	2820.9	30		
Total					

Tabla 3.9.3-3 ANOVA del segundo modelo de la segunda fase del experimento.

En el nuevo análisis se puede observar que el día sigue siendo significativa, mientras que la temperatura sigue sin serlo. Esto conlleva a que sea analizado un tercer modelo donde solo se estime la cantidad de BPA liberado en base al día transcurrido después de su envasado y expuesto a temperaturas irregulares. Enseguida se muestra la Tabla 3.9.3-4 que muestra dicho ANOVA.

F.V	G.L	SC	CM	F	Valor-p
Día	4	2657	664.2	21.63	1.04E-12
Residuales	95	2917	30.7		
Total	99	5574	694,9		

Tabla 3.9.3-4 ANOVA del tercer modelo de la segunda fase del experimento.

El efecto del día sigue siendo significativo, inclusive su valor disminuyó lo cual confirma que la concentración de BPA inevitablemente sigue siendo mayor a través del tiempo. Esta conclusión es la misma que la obtenida en el apartado anterior. Sin embargo, es necesario validar los supuestos de un ANOVA para que el análisis pueda tomarse en cuenta.

La independencia puede apreciarse en la Figura 3.9.3-1. En las gráficas de la izquierda, en ellas se representa el en el eje de las x el valor ajustado y en el eje y los valores de los residuales y residuales ajustados en la gráfica superior e inferior, respectivamente. Se puede apreciar que los datos no siguen un patrón, tiene una distribución similar y ninguno de ellos está más allá de los límites de Cook, mostrados en la gráfica inferior derecha, por lo tanto, se infiere que la independencia se cumple.

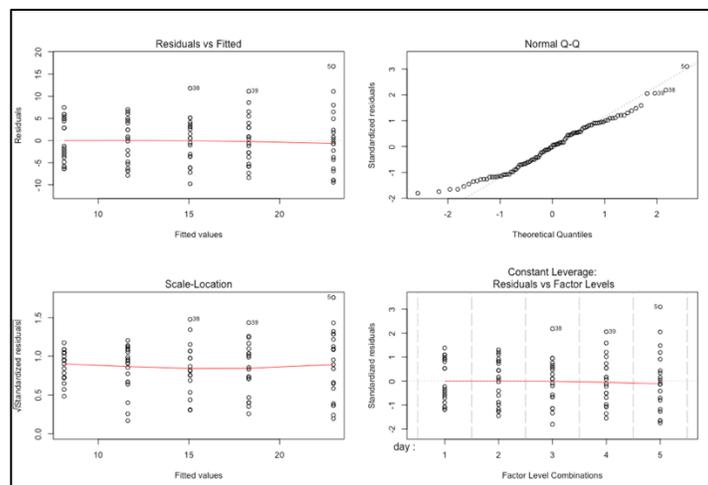


Figura 3.9.3-1 Residuales del ANOVA final de los resultados de las muestras de vida real.

Los residuales representados en la Figura 3.9.3-1 en la parte superior derecha corresponden a una gráfica de normalidad de los residuales. En ella se puede apreciar que los datos que los datos ubicados al centro de la recta se apegan a esta, por otro lado, lo datos en las orillas están distantes lo cual pone en duda que se cumpla la normalidad. En la Tabla 3.9.3-5 se muestra los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para poder determinar si los datos se distribuyen de manera normal. La prueba obtuvo un valor-p de 0.0603, lo cual, da evidencia para

inferir con un 95% de confianza de que los residuales del modelo obtenido se distribuyen de manera normal.

Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk	
W	0.97595
Valor-p	0.0603

Tabla 3.9.3-5 Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk para los residuales del modelo final del ANOVA de los datos de la vida real.

Los cinco niveles de la variable de control “Día” fueron medidos de manera balanceada, teniendo un tamaño de muestra igual a 20 en cada nivel. En la Tabla 3.9.3-6 se presentan los datos para analizar el poder de la prueba para evitar que se tenga el *error tipo II* mencionado anteriormente. Se puede observar que los datos recolectados son los suficientes para evitar esa situación, por lo que no es necesario prolongar la toma de datos.

Variable	No. de grupos	n	Varianza	Varianza del error	Poder	$\beta$
Día	5	20	664.2	30.7	1	0

Tabla 3.9.3-6 Valores del poder de la prueba de las variables significativas de los datos de la vida real.

El último de los supuesto a evaluar es el de la homogeneidad de varianzas en las muestras. La evaluación se llevó a cabo de la misma manera que el apartado anterior, donde este supuesto se comprobó a través de tres pruebas. En la Tabla 3.9.3-7 se encuentra resumido los resultados, en los tres casos se puede inferir con un 95% de confianza que las varianzas en los cinco niveles del día son homogéneas ya que el valor-p es mayor a 0.05.

Variable	Bartlett		Levene		Fligner	
	$K^2$	Valor-p	F	Valor-p	$\chi^2$	Valor-p
Día	3.2682	0.514	0.394	0.8125	1.8379	0.7655

Tabla 3.9.3-7 Pruebas de homogeneidad de varianzas para el ANOVA final de los datos de la vida real.

Los análisis hechos demuestran que se cumplen los supuestos para que un ANOVA sea la técnica adecuada para demostrar el efecto de los niveles de las distintas variables de control. Por lo tanto, las inferencias sobre los resultados de la migración de BPA con respecto a las variables de control del experimento son válidas.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

En la investigación se presentan varios análisis para los factores que contribuyen a la migración de BPA en el agua embotellada en PET durante su almacenaje antes de que llegue al consumidor. En base a la revisión de la literatura hecha, las variables tomadas en cuenta fueron: el tipo de botella, peso y color de la botella y tiempo y temperatura de la botella. En el caso de la primera variable se control se decidió estudiar con el fin de ver si existe diferencia entre cada una, en cuanto respecta al color y temperatura se debe a que existen estudios en los cuales los resultados son contradictorios entre sí. El peso de la botella fue seleccionado ya que en el estado del arte se encontró que existe una correlación positiva entre la masa de la botella y la migración de BPA. Por último, la variable tiempo fue seleccionado con la finalidad de ver si existe la migración de la molécula durante el periodo de almacenamiento del producto.

El efecto de cada uno fue analizado a través de la técnica estadística de análisis de varianza (ANOVA), en el caso de que no cumplir los supuestos se procedió a utilizar la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis de una vía. Esta metodología se siguió con las dos fases del experimento, donde en la primera se deseó comprobar en un ambiente controlado el efecto de las variables mencionadas en el párrafo anterior, mientras que, en la segunda se demostró la importancia de aquellas variables significativas resultantes de la fase anterior en una situación real. Las condiciones de la última prueba mencionada fue colocar las botellas dentro de un vehículo durante cinco días.

En la Metodología se presenta el análisis estadístico hecho en las dos fases de la investigación, en este se demuestra que, de las variables seleccionadas en la primera parte del experimento, el peso es la menos significativa para la migración de BPA en el agua embotellada. En la Figura 4-1 se muestra una gráfica de correlación entre el peso de cada botella con la migración de BPA detectada durante las 4 semanas de medición. En ella se aprecia que no existe alguna correlación importante entre ambas variables, lo cual ya se tenía indicios por el porcentaje obtenido en el análisis estadístico hecho anteriormente cuyo valor fue de 11.99%.

Este resultado es contradictorio a los hallazgos hechos por Y. Fan (2014), en el cual encontró que existe correlación positiva entre ambas variables. Una característica que se observa en la figura mencionada es que se aprecia los grupos de producto en base a su peso, donde con un 95% de confianza las muestras del producto A pesaron  $19.98 \pm 0.08$  gr, aquellas del producto B  $18.11 \pm 0.04$  gr y las del producto C  $16.83 \pm 0.06$  gr. Este último fue el que presentó el envase más ligero mientras que el A fue el más pesado; esto ya se esperaba dado que el envase contenía el doble de agua a comparación de los otros dos modelos. Esto ayuda a comprobar que el peso no es factor significativo ya que en los tres grupos los datos se distribuyen de manera similar a pesar de la diferencia de pesos. Por esta razón, este factor de control no se tomó en cuenta en la segunda fase del experimento.

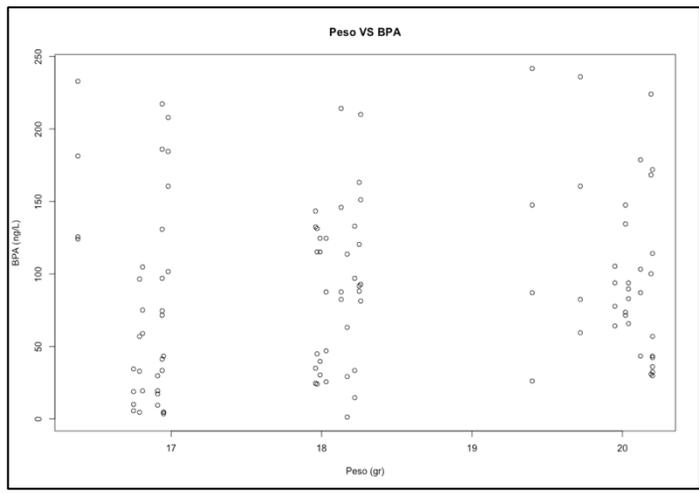


Figura 4-1 Correlación entre el peso de la botella y el BPA migrado.

La variable que tampoco resultó ser significativa fue el Color de la botella, la distribución de los datos se muestra en la Figura 4-2. En ella se aprecia con un valor  $\alpha$  de 0.05 que el agua de los envases de color Azul contenían  $100.10 \pm 20.10$  ng/L de Bisfenol A, mientras que las muestras de color Transparente presentaron  $84.45 \pm 14.68$  ng/L. De manera gráfica se aprecia que no existe diferencia significativa entre ambos niveles, esto queda sustentado con una prueba de Tukey cuyas hipótesis son las siguientes:

$$H_0: \mu_i = \mu_k$$

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j$$

Donde i y j son distintos niveles de tratamientos

Comparación (color)		Diferencia	Intervalo		Valor-p
			Inferior	Superior	
Trans	Azul	-15.66	-44.50	9.19	0.21

Tabla 4-1 Prueba de Tukey para el color de la botella

Los resultados de la prueba de Tukey se muestran en la Tabla 4-1, donde en las primeras dos columnas se muestran los tipos de producto comparados, seguido de la diferencia entre cada uno y la estimación un intervalo para esta a través de la distribución t. En la última columna se muestra el valor-p de cada comparación en las cuales en ningún caso se rechaza  $H_0$ . La prueba estima una diferencia entre -40.50 y 9.19 ng/L entre los envases azules con respecto a los transparentes, lo cual da un valor-p de 0.21. Por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula lo cual quiere confirmar que no existe evidencia estadística para demostrar diferencia que el color del envase es factor clave para la migración del Bisfenol A. Sin embargo, se aprecia que las botellas transparentes presentaron menor concentración de la molécula sin tener una diferencia significativa. Esto apoya la investigación hecha por C. Reimann (2012) el cual estableció que las botellas claras liberan menor cantidad compuesto. Por otra parte, estos resultados contradicen los hallazgos hechos por P. Westerhoff (2008) quien estableció una diferencia de casi cuatro veces entre ambas características, pero en sentido contrario, es decir, el agua en envases transparentes contenía mayor concentración de BPA que aquellos de color azul o verde. Con la finalidad de comprobar una vez más este factor, el color del envase se consideró para la investigación llevada a cabo con condiciones de la vida real.

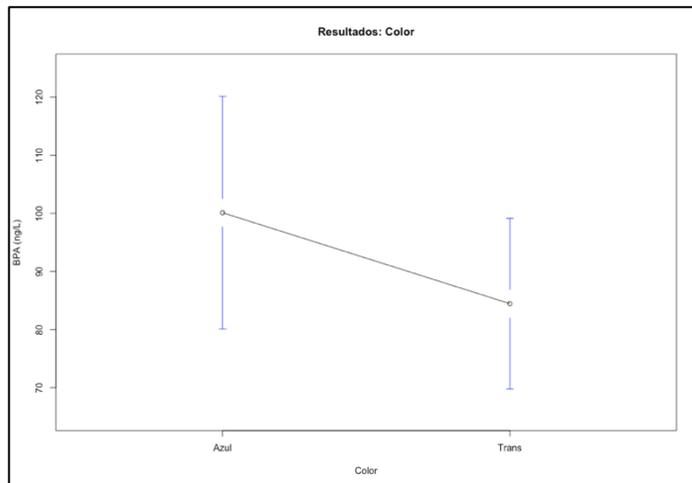


Figura 4-2 BPA migrado en la primera fase del experimento según el color del envase.

La tercer y última variable no significativa en la primera fase de la experimentación, fue el tipo del producto. Las muestras del tipo A presentaron concentración de BPA en el intervalo ( $\alpha=0.05$ ) de  $100.10 \pm 20.10$  ng/L, mismo valor que presentado en los envases de color Azul ya que este fue el único con esas características, lo cual, dio más bases para tener muestras balanceadas en la segunda fase del experimento. Los productos B y C presentaron concentración de  $96.54 \pm 18.32$  y  $78.35 \pm 23.71$  ng/L, respectivamente. En la Figura 4-3 están representados los intervalos mencionados, en ella se aprecia de manera gráfica que no existe diferencia significativa entre los tipos de producto. Esta afirmación se demuestra con los resultados de la prueba de Tukey mostrados en la Tabla 4-2. Estos resultados dieron evidencia para no tomar en cuenta esta variable en el experimento de condiciones de la vida real, por lo que se descartó el factor de control. También estos hallazgos dan indicios de que todos los estudios hechos acerca del BPA pueden aplicarse a cualquier tipo de agua embotellada sin importar su marca.

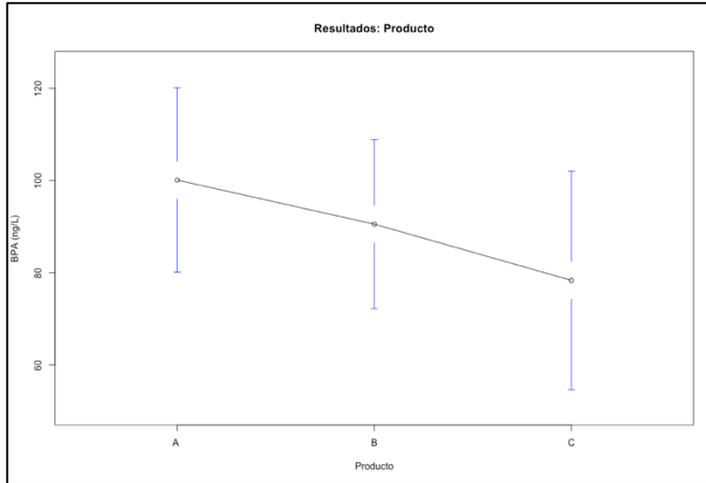


Figura 4-3 BPA migrado según el tipo de producto.

Comparación (productos)		Diferencia	Intervalo		Valor-p
			Inferior	Superior	
A	B	-9.56	-44.00	24.88	0.79
A	C	-21.75	-56.20	12.69	0.29
B	C	-12.19	-46.64	22.25	0.68

Tabla 4-2 Prueba de Tukey para el tipo de producto.

Un factor frecuentemente mencionado en los estudios fue la temperatura, este factor resulto ser significativo en la primera investigación donde fue constante y controlado. En la Figura 4-4 se muestran cada nivel de temperatura seleccionado con su respectiva estimación de la cantidad de BPA migrado en el agua. Se puede observar que entre mayor es la temperatura, mayor es la concentración del compuesto. A primera instancia se observa que hay una clara diferencia entre cada nivel, sin embargo, en los resultados de la prueba de Tukey mostrados en la Tabla 4-3 demuestran que con un 95% de confianza una diferencia no es significativa entre las muestras almacenadas a 4°C con respecto aquellas que se encontraban a 25 °C. Por otra parte, con los datos obtenidos se puede demostrar que claramente los envases almacenados a 60°C, migraron mayor cantidad de BPA al agua contenida, en comparación a los otros dos niveles.

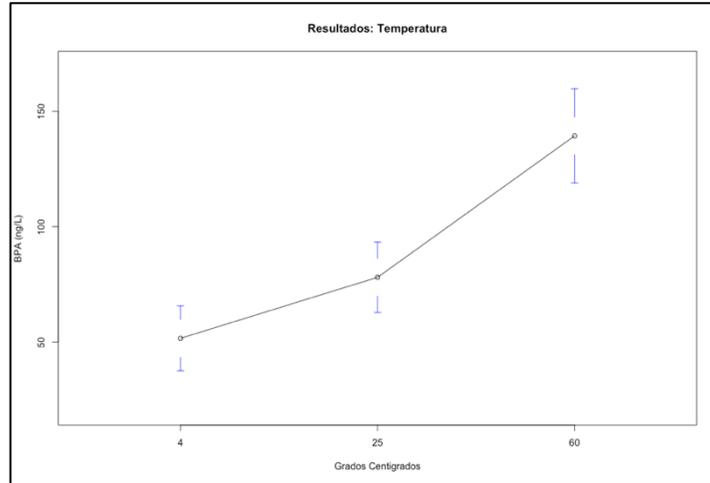


Figura 4-4 BPA migrado en la primera fase del experimento según la temperatura de almacenamiento.

Comparación (temperaturas)	Diferencia	Intervalo		Valor-p
		Inferior	Superior	
4	25	26.44	-1.41 54.29	0.07
4	60	87.78	59.93 115.62	0.00
25	60	61.33	33.49 89.18	0.00

Tabla 4-3 Prueba de Tukey para las temperaturas de almacenamiento.

El efecto de la temperatura de 4 y 25 °C fue similar al obtenido por Casajuana (2003) ya que ella colocó los envases a 30 °C y no encontró diferencia en la migración de la molécula. Sin embargo, los hallazgos obtenidos también contradicen a los de T. Toyo'oka (2000) ya que en su experimento no se detectó alguna diferencia significativa en la concentración del BPA cuando los envases se calentaron a 100°C durante 8 h, a pesar de que el tiempo de exposición es mucho menor a del experimento hecho y solo detecto de 3 a 10 ng/L. Por otra parte, conclusiones parecidas se obtuvieron en el estudio hecho por S. H. Nam (2010) demostró que si existe un diferencia significativa en la migración de BPA al colocarse a temperatura de 40 y 95 °C, al igual que V.A. Santhi (2012) quien encontró de igual manera un diferencia significativa al comparar los resultados de botellas expuestas a 25 y 50 °C. Por esta comparación se tomó como factor de control la temperatura en el experimento de la vida real, con la finalidad de establecer de las temperaturas del día al día son factor importante para estimar la

liberación del compuesto. El estudio hecho por Y. Fan (2014) fue muy parecido al realizado, ya que en su caso colocaron las botellas a 4, 25 y 70°C durante cuatro semanas, aunque encuentra también diferencia significativa entre el nivel más alto de temperatura con respecto a los otros dos, en sus conclusiones menciona que la tasa de liberación de BPA decrece después de ese lapso.

En el análisis estadístico se encontró el Tiempo como variable significativa, los resultados se muestran en la Figura 4-5, dónde se aprecia que la concentración de la molécula en el agua fue detectada en cantidades de  $43.43 \pm 13.09$ ,  $64.78 \pm 15.30$ ,  $106.84 \pm 20.33$  y  $143.62 \pm 25.52$  ng/L para cada semana en el orden mencionado. Se puede apreciar que existe un incremento en la concentración del compuesto, dado que entre más pasa el tiempo mayor es la cantidad que liberaron los envases. También se aprecia que la varianza se va incrementando lo cual fue factor para no poder analizar el efecto con la técnica de ANOVA. En Tabla 4-4 se muestran los resultados obtenidos para esta variable, en los cuales se aprecia que no existe diferencia significativa entre la primera y segunda semana. Por otro lado, las diferencias al comparar todos los otros pares de semanas son significativos tomando como alfa a 0.05. Este factor también se consideró importante de monitorear en la próxima parte del experimento, pero fue analizado diariamente en vez de semanalmente.

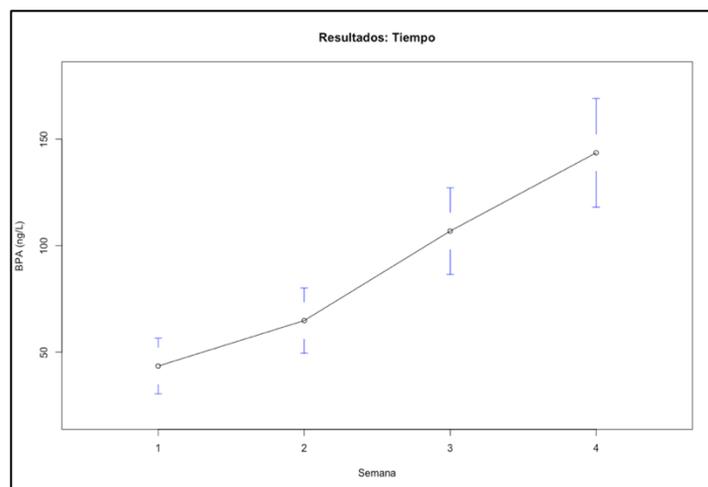


Figura 4-5 BPA migrado en la primera fase del experimento según la semana de almacenamiento.

Comparación (semanas)		Diferencia	Intervalo		Valor-p
			Inferior	Superior	
1	2	21.35	-13.09	55.79	0.37
1	3	63.41	28.97	97.85	0.00
1	4	100.19	65.75	134.63	0.00
2	3	42.06	7.62	76.50	0.01
2	4	78.85	44.41	113.29	0.00
3	4	36.79	2.35	71.23	0.03

Tabla 4-4 Prueba de Tukey para el tiempo de almacenamiento en la primera fase del experimento.

La segunda fase del experimento que fue llevada a cabo en condiciones de la vida real, como se mencionó anteriormente, se tomaron como variables de control el color del envase, la temperatura del día y el tiempo de almacenamiento. El análisis de cada una de estas se pudo llevar a cabo a través del ANOVA ya que este cumplió todos los supuestos para esta técnica. La temperatura en este caso fue analizada como variable numérica ya que no puede ser controlada con en la fase anterior. El experimento se llevó a cabo durante dos semanas, la primera fue a partir del 18 al 22 de Septiembre y la segunda del 25 al 29 de Septiembre, ambas del año 2017. En cada semana se colocaron en un automóvil cinco botellas transparentes y cinco de color azul conteniendo 250 ml cada una.

Los resultados obtenidos confirmaron que el color no es una variable significativa para la migración del BPA. Sin embargo, en la Figura 4-6 se observa que los resultados son muy parecidos a los del experimento anterior. Se puede observar que el agua de las botellas de color transparente tenía menor concentración de Bisfenol A con respecto a aquellas de color azul. Se espera que las primeras muestras mencionadas tengan una concentración de Bisfenol A al final de cinco días de estar en un auto de 12.47 a 16.11 ng/L, mientras que las otras se espera que este en el rango de 13.75 a 18.54 ng/L. De esta manera, queda confirmado el hallazgo de C. Reimann (2012) quien afirma que las botellas de color azul liberan mayor cantidad de BPA que aquellas que son transparentes.

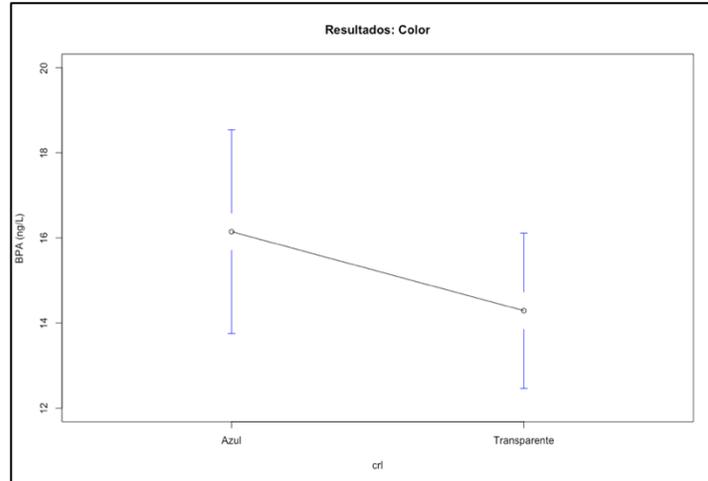


Figura 4-6 BPA migrado en la segunda fase del experimento según el color del envase.

Una de las variables significantes de la fase anterior, lo cual no se cumplió en esta parte de la investigación fue la temperatura. En la Figura 4-7 se muestra la concentración de BPA con respecto a la temperatura. Se observa que no existe alguna correlación entre ambas variables, el cálculo esta que el valor de esta es de -8.23% cuyo valor es decreciente, contrario a la relación que se menciona en la literatura y se encontró en la fase anterior al experimento. Un factor que se deba a la inexistencia del efecto en base a los hallazgos de Casajuana (2003), Y. Fan (2014) y la fase uno de la investigación, la temperatura no es factor para la migración de la molécula cuando está por debajo de 25 °C; en ningún día se sobre paso ese valor.

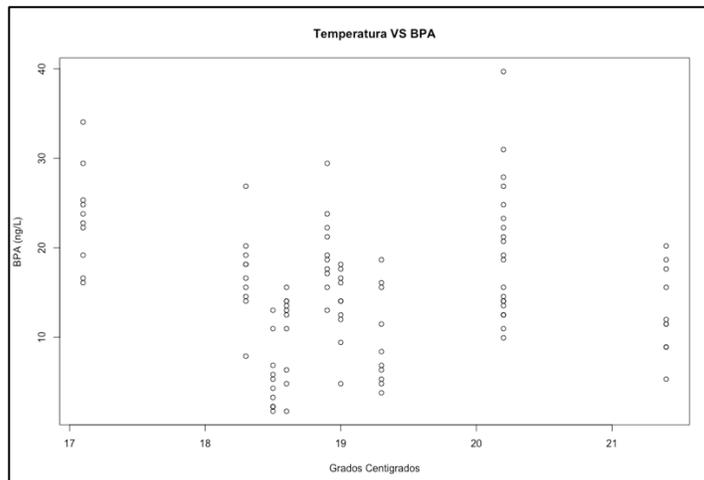


Figura 4-7 Correlación entre el peso de la botella y el BPA migrado.

La última variable en ser analizada fueron los resultados con respecto al día de medición, esta variable fue la única significativa en base al ANOVA. El intervalo con un 95% para la concentración del compuesto detectada para cada día en orden creciente fue:  $8.12 \pm 2.29$ ,  $11.62 \pm 2.36$ ,  $15.07 \pm 2.42$ ,  $18.30 \pm 2.53$  y  $22.97 \pm 3.25$  ng/L, cada uno se encuentra representado en la Figura 4-8. Al igual que en el experimento pasado, se observa que entre más pasa el tiempo mayor es la cantidad de BPA detectada en el agua. También se observa que la variación de va aumentando con el transcurso del almacenamiento ya que los intervalos van siendo cada vez más grandes. Al igual que en el análisis del efecto del tiempo de almacenamiento anterior, se elaboró una prueba de Tukey la cual se muestra en la Tabla 4-5. En ella se observa que la diferencia es no significativa con un 95% de confianza con respecto de un día con el siguiente de haberse almacenado la botella, es decir, al comprar el día 1 con el 2, el 2 con el 3, el 3 con el 4 y el 4 con el 5 no se puede rechazar la hipótesis nula; para el resto de las comparaciones no existe duda de que la diferencia es significativa. Este hallazgo puede confirmar al consumidor que, si alguna vez dejo su botella en el coche, la concentración del Bisfenol A no es muy distinta a la del día anterior.

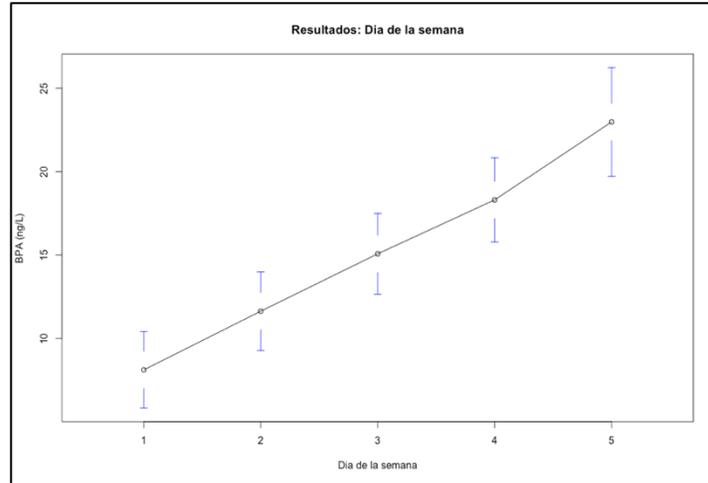


Figura 4-8 BPA migrado en la segunda fase del experimento según el día de almacenamiento.

Comparación (día)	Diferencia	Intervalo		Valor-p
		Inferior	Superior	
1	2	3.51	-1.36 8.39	0.27
1	3	6.95	2.08 11.82	0.00
1	4	10.18	5.31 15.05	0.00
1	5	14.85	9.98 19.72	0.00
2	3	3.44	-1.44 8.31	0.29
2	4	6.67	1.79 11.54	0.00
2	5	11.34	6.46 16.21	0.00
3	4	3.23	-1.64 8.10	0.36
3	5	7.90	3.03 12.77	0.00
4	5	4.67	-0.20 9.54	0.07

Tabla 4-5 Prueba de Tukey para el tiempo de almacenamiento en la segunda fase del experimento.

Los resultados obtenidos en ambas fases del estudio sugieren que la investigación acerca del tema debe seguir creciendo como en los últimos años, ya que se debe empezar a concientizar a la población acerca de la cantidad ingerida de BPA dado que el consumo en dosis excesivas conlleva a daños a la salud, derivado de la afectación a la actividad hormonal. Un camino que puede tomar es acerca de los garrafones de policarbonato comercializados en México, ya que esta es la manera en la que principalmente se vende el agua purificada y el material es

conocido por contener altas cantidades de Bisfenol A (Paullier, 2015) (Guart A. W., 2013).

El trabajo hecho concluyó que el tiempo y la temperatura extrema tienen un rol muy importante en la migración del compuesto en agua embotellada en PET, esto debe tenerlo en cuenta el productor y el organismo encargado de regular los productos del mercado para asegurar la salud del consumidor. Por otra parte, el color de los envases seleccionado para la distribución del producto también tiene un rol importante, pero sin ser tan significativo como los otros dos mencionados anteriormente.

El agua embotellada en PET debe tener una limitación en su exposición al calor por parte del encargado de su distribución, como por ejemplo las tiendas de autoservicio, para que el consumidor no llegue a tener una afectación a su salud. Esto debe ser regulado por el organismo gubernamental encargado de controlar los requisitos para la producción de cualquier producto alimenticio. Esto obligaría a que el productor tenga que asegurar a través de alguno estudio como el presentado que su producto no será contraproducente para el consumidor, ya que si bien este no se echa a perder si es contaminado por las moléculas migradas del envase.

## 5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- C. Bach, X. D. (2013). Effect of temperature on the release of intentionally and non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and potential toxicity. *Food Chemistry*, 672-680.
- Caliendo, H. (28 de Junio de 2012). *Packaging Digest-Food Safety*. Obtenido de <http://www.packagingdigest.com/food-safety/history-bpa>
- Casajuana, N. L. (2003). Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia* 57, 649-655.
- Lateef, S. S. (01 de Diciembre de 2011). Agilent Application Solution. *Analysis of bisphenol A leaching from baby feeding bottles*. E.U.A. Obtenido de <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-9398EN.pdf>
- Li, X. Y. (2010). Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environmental Investing* 36, 557-562.
- Coles, R. (2011). *Food and Beverage Packaging Technology*. Sussex, UK: Blackwell Publishing.
- COFEPRIS. (16 de 02 de 2011). Criterios para la evaluación de métodos fisicoquímicos. México.
- Corder, G. D. (2014). *Nonparametric Statistics: A step-by-step approach* (Segunda ed.). New Jersey: WILEY.
- AOAC. (2013). Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.
- Arnold, S. M. (2013). Relevance of drinking water as a source of human exposure to bisphenol A. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 137 -- 144.
- Aungst, J. (17 de Junio de 2014). 2014 Updated safety assessment of Bisphenol A (BPA) for use in food contact applications. Estados Unidos: FDA.
- Bach, C. D. (2012). Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: a source of controversy reviewed. *Water Resource* 46, 571-583.
- Barragán, A. (01 de 02 de 2016). *Economía Hoy*. Obtenido de <http://www.economiahoy.mx/nacional-eAm-mx/noticias/7318458/02/16/Mexico-el-pais-que-mas-agua-embotellada-consume-1341-pesos-al-ano-en-garrafon.html>
- Benecyo, J. E. (2016). Simultaneous Determination of BPA and BPS Using UV/Vis Spectrophotometry and HPLC. Tesis.
- Bin Fei, C. C. (2003). Quantitative FTIR study of PHBV/Bisphenol A blends. *European Polymer Journal* 39, 1939-1946 .
- Box, G. E. (2008). *Estadística para investigadores: Diseño, innovación y descubrimiento* (Segunda edición ed.). Barcelona: Editorial Reverté.

- Dewalque, L. C. (2014). Estimated daily intake and cumulative risk assessment of phthalate diesters in a Belgian general population. *Toxicology Letters* 231(2), 161-168.
- EFSA. (14 de 10 de 2016). *European Food Safety Authority*. Obtenido de <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>
- Erlor, C. N. (2010). Bisphenol A exposure: human risk and health policy. *Pediatric Nutrition*, 400-407.
- EWG. (3 de June de 2015). *Environment Working Group*. Obtenido de <http://www.ewg.org/research/bpa-canned-food/regulation-bpa>
- Flint, S. M. (2012). Bisphenol A exposure effects and policy; a wildlife perspective. *Journal of Environmental Management* 104, 19-34.
- Fan, Y. Z. (2014). Effects of storage temperature and duration on release of antimony and bisphenol A from polyethylene terephthalate drinking water bottles of China. *Environmental Pollution* 192, 113-120.
- FEUM, F. d. (2016). MGA 0351 Espectrometría Infrarroja. Ciudad de México.
- Franz, R. W. (2002). Recycled poly(ethylene terephthalate) for direct food contact applications: challenge test of an inline recycling process. *Food Additives & Contaminants*, 502-511.
- Guart, A. B.-B. (2011). Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assessment*, 676-685.
- Guart, A. W. (2013). Migration of plasticisers from Tritan™ and polycarbonate bottles and toxicological evaluation. *Food chemistry*, 141(1), 373-380.
- IBWA. (2009). *Bottled water vs Tap water*. International bottled water association.
- Kim, H. G. (1990). Determination of potential migrants from commercial Amber PET bottle. *Pharmacy Research* 7, 176-179.
- Kumar Selvaraj, K. G. (2014). GC-MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 99, 13-20.
- Manning, R. E. (2009). Temperature in Cars Survey. *Royal Automobile Club of Queensland Limited (RACQ) Vehicle Testing Authority Brisbane*.
- Meteored. (4 de 10 de 2017). *Meteored*. Obtenido de [meteored.mx: https://www.meteored.mx/clima\\_Queretaro-America+Norte-Mexico-Queretaro--sactual-22380.html](https://www.meteored.mx/clima_Queretaro-America+Norte-Mexico-Queretaro--sactual-22380.html)
- Michałowicz, J. (2014). Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 738-758.
- Nam, S. S. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere* 79, 949-952.

- Navia, D. P. (2014). Interacciones empaque-alimento: Migración. *Ingenierías Universidad de Medellín*, 99-113.
- Paullier, J. (28 de Julio de 2015). Por qué México es el país que más agua embotellada consume en el mundo. *BBC*.
- Petrelli, F. (2006). Voluzione normativa Della disciplina delle acque. *Annali di Igiene*, 923-931.
- Ramzan Ullah, I. A. (2016). Fourier Transform Infrared Spectroscopy of "Bisphenol A". *Journal of Spectroscopy*.
- Reimann, C. B. (2012). Temperature-dependent leaching of chemical elements from mineral water bottle materials. *Applied Geochemistry* 27, 1492-1498.
- Santhi, V. N. (2012). Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Sci. Total Environ* 427-428, 332-338.
- Sarmiento, L. G. (2012). Migración en empaques y envases para alimentos. *Alimentos hoy*, 23-27.
- Skoog, D. A. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. México D. F.: Thomson.
- Skoog, D. A. (2015). *Fundamentos de Química Analítica* (9na ed.). México D. F.: Cengage Learning Editores.
- T. Özdal, N. Ş. (2014). Toxicity of Bisphenol-A: Effects on Health and Regulations . *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* 8(6) , 553-557.
- Teng, C. G. (2013). Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, 556-564.
- Toyo'oka, T. O. (2000). Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with coulometric detection. *Analytical Sciences* 16, 1071-1076.
- Vega, G. (14 de 02 de 2014). Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos. COFEPRIS.
- Visakh, P. L. (2015). *Poly(Ethylene Terephthalate) Based Blends, Composites and Nanocomposites*. Waltham, Resultados de búsqueda Massachusetts: Elsevier.
- Wang, L. Y.-G.-J.-L.-J.-F. (2012). Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution*, 241-249.
- Westerhoff, P. P. (2008). Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. *Water Research* 42, 551-556.
- Wu, S. X. (2010). Determination of bisphenol A in plastic bottled drinking water by high performance liquid chromatography with solid-membrane extraction based on electrospun nylon 6 nanofibrous membrane. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 38, 503-507.

- Yafeng Zhuang, M. Z. (2014). Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 122, 153-157.
- Yen Sun, M. W.-D. (2000). High-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride as a label. *Journal of Chromatography*, 49-56.
- Zare Jeddi, M. (2015). Concentrations of phthalates in bottled water under common storage conditions: Do they pose a health risk to children? *Food Research International*, 256-265.
- Zeinab, K. H. (6 de Junio de 2012). *Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model*. Obtenido de Oxidative medicine and cellular longevity: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/194829>
- Ziv-Gal, A. Z. (2013). Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Reprod. Toxicol*, 58-67.

## 6. APENDICE

### 6.1. Certificado de calibración del equipo.

	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 28 Ayer Rajah Crescent, #04-01/08, Singapore 139959, Singapore		
<b>Lambda 35 UV-Vis Spectrometer Product Configuration and Test Certificate</b>			
<b><u>General Information</u></b>			
Product Line:	UV	Date:	Monday, September 02, 2013
Product:	Lambda 35	Instrument Part Number:	L600000C
Serial Number:	502S13081306	Final Test Version:	L602 8005 Rev A
Software Revision:	6.0.0.0718	Firmware Revision:	Lambda 35 1.27
Electrical Safety Test	Pass		
<b><u>Configuration</u></b>			
Main PCB Serial Number:	1324145057		
Power Supply Serial Number:	131221230		
<b><u>Performance Verification</u></b>			
	<b>Test</b>	<b>Specification</b>	<b>Result</b>
Resolution	Toluene in Hexane (Visual)	< 0.5 nm	Passed
Photometric Accuracy	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Solution	± 0.01 A	Passed
Photometric Accuracy	NIST 930D Filter 1A	± 0.001 A	Passed
Photometric Repeatability	NIST 930D Filter at 546.1nm 1A	≤ 0.001 A	Passed
Stray Light	KCl at 200nm	≤ 1.0 %T	Passed
	NaI at 220nm	≤ 0.01 %T	Passed
	NaNO <sub>2</sub> at 340nm	≤ 0.01 %T	Passed
	NaNO <sub>2</sub> at 370nm	≤ 0.01 %T	Passed
	Deuterium Line at 656.1nm	± 0.1 nm	Passed
Wavelength Accuracy	Deuterium Line at 656.1nm	± 0.1 nm	Passed
Wavelength Repeatability	Deuterium Line at 656.1nm	± 0.05 nm	Passed
Photometric Noise RMS	500nm 0A	≤ 0.00005 A	Passed
Baseline Flatness	100%T 190-1100nm	± 0.001 A	Passed
Photometric Stability (Drift)	500nm 1A	≤ 0.00015 A/h	Passed
<b>This instrument has been produced, aligned and tested in the UV production cell.</b>			
Signed:			
Test Engineer: Simon Yeo			
Date: Monday, September 02, 2013			
<i>Issue Date:</i> October 2007			
Copyright 2007 PerkinElmer, Inc. PerkinElmer is a registered trademark of PerkinElmer, Inc.			

## 6.2. Código de R.

```
library(car); library (effects); library (gplots); library (Rmisc)

#Mezcla saturada

mezsat=read.table(file.choose(),sep=" ",header=T)

plot(x = mezsat[,1], y= mezsat[,2],ylim = c(0,100), main="Mezcla
Saturada",xlab="nm",
      ylab="Transmitancia (%)",type = "l",lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,3],col=2,lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,4],col=3,lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,5],col=4,lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,6],col=5,lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,7],col=6,lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,8],col=7,lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,9],col=8,lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,10],col="orange",lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,11],col="purple",lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,12],col="brown",lwd=3)
legend("bottomright",

c("Blanco","1:1","1:2","1:4","1:8","1:16","1:32","1:64","1:128","1:256","1:512"),
  fill=c(1:8,"orange","purple","brown"))

plot(x = mezsat[,1], y= mezsat[,2],ylim = c(96,100),xlim=c(245,285),
main="Mezcla Saturada",xlab="nm",
      ylab="Transmitancia (%)",type = "l",lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,10],col="orange",lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,11],col="purple",lwd=3)
lines(x= mezsat[,1],y= mezsat[,12],col="brown",lwd=3)
lines(x= c(rep(269,100)),y= c(1:100),col="blue",type=)
legend("bottomright",
      c("Blanco","1:128","1:256","1:512"),
fill=c(1,"orange","purple","brown"))

#Curva de calibracion

cc=read.table(file.choose(),sep=" ",header=T)

conc<-cc[,1]
t<-cc[,2]

cclr<-lm(t~conc); cclr
summary(cclr)
par(mfrow=c(2,2))
```

```

plot(cclr)

par(mfrow=c(1,1))
plot(conc, t, main="Curva de Calibracion",xlab="Concentracion (ng/L)",
      ylab="Transmitancia (%)",pch=16)
abline(cclr,col="red")

shapiro.test(cclr$residuals)

#Analisis de datos

datos<-read.table(file.choose(),sep="," ,header=T)

y<-datos[,11]
Color<-as.factor(datos[,5])
Temp<-as.factor(datos[,3])
Botella<-as.factor(datos[,4])
Tiempo<-as.factor(datos[,7])
Peso<-as.numeric(datos[,6])

# 1st model
m1 <- lm (y~Color+Temp+Botella+Peso+Tiempo)
summary (aov(m1))

# 2nd model
m2 <- lm (y~Color+Temp+Botella+Tiempo)
summary (aov(m2))

# 3rd model - FINAL
m3 <- lm (y~Color+Temp+Tiempo)
summary (aov(m3))

summary (m3)
ef1 <- allEffects(m3)
plot (ef1)

#COMPROBACION DE SUPUESTOS

#Independencia y Normalidad
par(mfrow=c(2,2))
plot(m3)
shapiro.test(m3$residuals)

#Poder y balanceo
#temperatura
atemp<-lm(y~Temp)
anova(atemp)

```

```

power.anova.test(groups=3, n=36, between.var = 72992, within.var =
2470,power = NULL)

#color
acol<-lm(y~Color)
anova(acol)
power.anova.test(groups=2, n=c(36,72), between.var = 5882.9 , within.var =
3768.0 ,power = NULL)

#tiempo
atiempo<-lm(y~Tiempo)
anova(atiempo)
power.anova.test(groups=4, n=27, between.var = 53672, within.var = 2349
,power = NULL)

#Homogeneidad de varianzas
#Temperatura
bartlett.test(y~Temp)
leveneTest(y~Temp)
fligner.test(y~Temp)

#Color
bartlett.test(y~Color)
leveneTest(y~Color)
fligner.test(y~Color)

#Tiempo
bartlett.test(y~Tiempo)
leveneTest(y~Tiempo)
fligner.test(y~Tiempo)

# Kruskal-Wallis

cor.test(y,Peso)
cor.test(y[1:27],Peso[1:27])
cor.test(y[28:54],Peso[1:27])
cor.test(y[55:81],Peso[1:27])
cor.test(y[82:108],Peso[1:27])

par(mfrow=c(2,2))
plot(x = Peso[1:27], y = y[1:27], main = "Semana 1: Peso VS BPA",xlab = "Peso
(gr)", ylab = "BPA (ng/L)")
plot(x = Peso[1:27], y = y[28:54], main = "Semana 2: Peso VS BPA",xlab =
"Peso (gr)", ylab = "BPA (ng/L)")
plot(x = Peso[1:27], y = y[55:81], main = "Semana 3: Peso VS BPA",xlab =
"Peso (gr)", ylab = "BPA (ng/L)")

```

```

plot(x = Peso[1:27], y = y[82:108], main = "Semana 4: Peso VS BPA",xlab =
"Peso (gr)", ylab = "BPA (ng/L)")

kruskal.test(y~Botella)
kruskal.test(y~Color)
kruskal.test(y~Temp)
kruskal.test(y~Tiempo)

#2do Analisis, vida real

drl<-read.table(file.choose(),sep="," ,header=T)

yrl<-drl[,9]
day<-as.factor(drl[,2])
trl<-as.numeric(drl[,4])
crl<-as.factor(drl[,5])

# Interaction Model- Only interaction sig.
mrl1 <- lm (yrl~crl)
summary (aov(mrl1))

mrl2 <- lm (yrl~day+trl)
summary (aov(mrl2))

mrl3 <- lm (yrl~day)
summary (aov(mrl3))
summary (mrl3)

# Supuestos

#Independencia y Normalidad
par(mfrow=c(2,2))
plot(mrl3)
shapiro.test(mrl3$residuals)

#Poder la prueba
power.anova.test(groups=5, n=20, between.var = 664.2, within.var =
30.7,power = NULL)

#balanceo
par(mfrow=c(1,1))
plotmeans(yrl~day,main="Resultados por dia",xlab = "Dia de la semana",ylab
= "BPA (ng/L)")

#homogeneidad
bartlett.test(yrl~day)
leveneTest(yrl~day)

```

```

fligner.test(yrl~day)

# Resultados y discusion

plot(x = Peso, y = y, main = "Peso VS BPA",xlab = "Peso (gr)", ylab = "BPA
(ng/L)")
plotmeans(y~Color,n.label = F,ci.label = F, digits = 2, main="Resultados:
Color",ylim=c(65,125),mean.labels = F,ylab = "BPA (ng/L)")
plotmeans(y~Botella,n.label = F,ci.label = F, digits = 2, main="Resultados:
Producto",ylim=c(50,125),mean.labels = F,ylab = "BPA (ng/L)",xlab =
"Producto")
plotmeans(y~Temp,n.label = F,ci.label = T, digits = 2, main="Resultados:
Temperatura",ylim=c(20,170),mean.labels = T,ylab = "BPA (ng/L)", xlab =
"Grados Centigrados")
plotmeans(y~Tiempo,n.label = F,ci.label = F, digits = 2, main="Resultados:
Tiempo",ylim=c(20,180),mean.labels = F,ylab = "BPA (ng/L)",xlab="Semana")

TukeyHSD(aov(y~Color))
TukeyHSD(aov(y~Botella))
TukeyHSD(aov(y~Temp))
TukeyHSD(aov(y~Tiempo))

# Datos vida real
TukeyHSD(aov(mrl3))
par(mfrow=c(1,1))
plotmeans(yrl~crl,n.label = F,ci.label = F, digits = 2, main="Resultados:
Color",ylim=c(12,20),mean.labels = F,ylab = "BPA (ng/L)")
plot(x = trl, y = yrl, main = "Temperatura VS BPA",xlab = "Grados Centigrados",
ylab = "BPA (ng/L)")
cor(trl,yrl)
plotmeans(yrl~day,n.label = F,ci.label = F, digits = 2, main="Resultados: Dia
de la semana",mean.labels = F,ylab = "BPA (ng/L)", xlab = "Dia de la semana")

TukeyHSD(aov(yrl~day))

```