

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA  
CUANTIFICAR VITAMINA A - 414. AZÚCAR FORTIFICADO

Por: AS Teal-2..

Presentado por, ...

TÍTULO: W4. - MÉTODOS para la cuantificación de,

---

Para optar al Título de

C4/1111414 PARTE de la

Guatemala, septiembre de 1994.

JUNTA DIRECTIVA

Decano	Lic. Jorge Perez Folgar
Secretaria	Licda. Eleonora Gaitgn
Vocal 1ero.	Lic. Miguel Herrera
Vocal 2do.	Lic. Gerardo Arroyo
Vocal 3ero.	Lic. Miguel Garza
Vocal 4to.	Br. Jorge Luis Galindo
Vocal 5to.	Br. Edgar Garcia del Pozo

F-

Acto que dedico a

A DIOS: por haberme guiado en todo momento.

A la Comunidad: por ser el medio que el Senor utiliza para  
guiarme y darme fortaleza en todo momento.

A mis padres:

Miguel Angel Ramos de Leon  
Bertha Castellanos Torres

A mis compaafteros: Carolina, Sybil, Vilma, Edna, Claudia, Lilian  
Hector, Ivan y Francisco.

## AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Gerardo Pirir por haber sido un excelente asesor, por su apoyo y por haberme transmitido sus conocimientos.

Al Lic. Maynor Ordofiez y al Dr. Omar Dary por haberme abierto las puertas del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá para la realización de esta tesis.

Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá por haber permitido la realización de esta tesis en sus instalaciones, así como el financiamiento.

A las Licdas. Lorena Cerna, Gloria Navas y Clemencia Galvez de Avila por su formación y apoyo en todo momento.

A todas las personas que de una manera u otra colaboraron para la realización de esta tesis.

1. Resumen .....	1
2. Introduccion .....	3
3. Antecedentes .....	6
4. Justification .....	16
5. Objetivos .....	18
6. HipOtesis .....	19
7. Materiales y metodos .....	20
8. Resultados .....	29
9. Discusicin de resultados .....	31
10. Conclusiones .....	35
11. Recomendaciones .....	36
12. Referencias .....	37
13. Anexos .....	40

## 1. RESUME!.

Entre los problemas de Salud Pibblica que pongee Guatemala, se encuentra la hipovitaminosis A. Una de la formes que encontr6 el Instituto de Nutrici6n de Centroamftica y Panama (INCAP) para corregir tal deficiencias, fue la fortificaci6n de azimar con vitamina "A".

En 1974 se legaliz6 la fortificaci6n de azticar con vitamina "A" pasando a ser los ejecutores del programa de fortificaci6n los ingenios, y la Direcci6n General de Servicios de Salud a traves del Departamento de Registro y Control de alimentos, fue la responsable de garantizar al consumidor un producto con los niveles de vitamina A previstos en la legislaci6n y el INCAP se responsabiliz6 de asesorar a los ingenios para optimizer el proceso y la calidad de la fortificaci6n.

**En** el alio de 1986 la fortificaci6n se vio suspendida por los ingenios ya que estos indicaban que el costo del programa de fortificaci6n era elevado; en 1988 se inicio nuevamente la fortificaci6n; se hicieron evaluaciones' quo mostraron que el azdcar fortificada no contenia los niveles de vitamina A previamente establecidos, por lo que era evidente la necesidad de optimizer dicho proceso para obtener un mejor producto.

• .....

Para la cuantificación de vitamina A en azúcar fortificada, existen varios métodos, pero no hay un método común que sea empleado por el laboratorio de referencia, las autoridades oficiales y los productores. Por esta razón fue necesario realizar una comparación de los métodos montados por el INCAP, el método de extracción con hexano, colorimétrico y sep pack, utilizando como método de referencia el método Cromatografía líquida de Alta presión (HPLC), en los que se evaluó la precisión, exactitud, ventajas, desventajas y costo de cada uno de ellos, para así poder elegir el método más adecuado.

La comparación se realizó utilizando seis muestras de azúcar fortificada con vitamina A a diferentes concentraciones, cada muestra se analizó por triplicado.

La evaluación estadística de los resultados indicó, que los métodos hexano y colorimétrico son precisos y exactos aunque en menor grado que el método de referencia HPLC, en tanto el método Sep Pack no es preciso ni exacto. Por su alta precisión, exactitud, costo no elevado, se considera que el método hexano es el método más adecuado para la cuantificación de la vitamina A en azúcar fortificada.

Como segunda alternativa, se puede emplear el método colorimétrico, el método Sep pak, se descarta por su poca confiabilidad.

## 2. INTRODUCCION

En 1965 se new!) a cabo la Encuesta Nutricional Nacional la cual Indico que la hipovitaminosis "A" en Guatemala era un problema de salud PUblica, o sea que gran parte de la poblaciOn se vela afectada por las consecuencias de la baja ingesta de vitamina A. La deficiencia de vitamina **A** produce alteraciones del crecimiento en general, alteraciones en la integridad de los epitelios, ceguera permanente por perforaciones y cicatrizaciOn de la cornea.

Una de las soluciones para poder corregir y prevenir la hipovitaminosis "A" en Guatemala fue la que propuso INCAP, la fortificaciOn del azUcar con vitamina **A**, fundamentada por el amplio consumo de azUcar en la poblaciOn, lo que aseguraria en la misma, un suministro continuo y adecuado de dicho micronutriente.

En 1974 se 'ogre) que la fortificaciOn de azUcar tuviera un respaldo legal, en el que se indica que todo am:leer de use interno en nuestro pais debia ser fortificado con vitamina A. El Institute de NutriciOn de Centroamarica y Panama fue el responsable de prestar asesoria a los ingenios para una adecuada fortificacift; el Ministerio de Salud PUblica y Asistencia Social por medio de la DirecciOn General de Servicios de Salud a traves del Departamento de Registro y Control de Alimentos asumi6 la responsabili.dad de velar por que la fortificaciOn se llevara a calm en el marco legal ya establecido.

En 1975 a 1977 la fortificación se llevó a cabo; de 1978 a 1986 la fortificación se vio suspendida, debido a que los azucareros argumentaron que el costo del programa de fortificación era elevado. En 1988 se inició nuevamente el programa de fortificación; el departamento de Registro y Control de Alimentos (DRCA) realizó muestreos de los cuales se tienen resultados de los niveles de vitamina A en azúcar fortificada, los cuales mostraron que la mayoría de muestras sí poseen vitamina A, Pero que solo un porcentaje bajo de ellas poseen los niveles establecidos por la ley. Esto indica que la mayoría de azúcar que llega a la población no contiene los niveles adecuados de vitamina A y que por lo tanto el proceso de fortificación no se ha realizado adecuadamente.

Uno de los medios para mejorar tal situación es establecer estrategias de Control de calidad, ya que por medio de ellas se puede controlar constantemente la concentración de vitamina A en azúcar durante su producción y así lograr que todo el azúcar contenga los niveles de vitamina A establecidos por la ley.

---

~~Para realizar el control de calidad al azúcar fortificada,~~  
se cuenta con varios métodos de análisis, aunque no se ha establecido un método adecuado que tanto los productores como las autoridades oficiales puedan utilizar.

En el presente estudio se evaluaron tres métodos para el análisis de vitamina A en azúcar fortificada por comparación con el método de referencia (HPLC), ya que es el más confiable en precisión y exactitud.

Se evaluaron la precisión, exactitud, costo, ventajas y desventajas de cada método, con el fin de establecer el método más adecuado,

### 3. ANTECEDENTES

#### 1 importancia de la vitamina A:

La vitamina A o retinol es un alcohol primario isoprenoide con cinco dobles enlaces, lo cual la hace sensible a que sufra oxidación, especialmente en presencia de luz y calor. La estabilidad de la vitamina A se ve aumentada cuando se encuentra esterificada como palmitato y acetato en solución oleosa (1).

Entre las funciones fisiológicas de la vitamina A se encuentran las siguientes:

- Forma parte de un grupo proteico para los pigmentos fotosensibles de conos y bastones retinianos.
- Es esencial para el funcionamiento normal de las células del epitelio, osteoblastos y odontoblastos.
- Forma parte de antagonistas periféricos de los estrógenos.
- Es fundamental para el desarrollo fetal normal.

La deficiencia de vitamina A en el organismo da como consecuencia hiperqueratosis, otras dermatosis, hiperestrogenismo cequera permanente por perforaciones y cicatrización de la cornea (2).

## 2 Definición del problema:

En 1965 los resultados de la encuesta Nutricional Nacional mostraron que el 26.2% de los niños menores de cinco años presentaban niveles de retinol sérico inferiores a 20ug/dl, lo cual indicó que en Guatemala la hipovitaminosis A era un problema de Salud Pública (3,4) (Anexo 1).

## 3 Acciones emprendidas:

Ante tal problemática el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) en 1969 desarrolló un programa para corregir y prevenir la hipovitaminosis A, el cual consistía en fortificar un alimento con vitamina A (5).

Se consideró que un alimento apropiado para este fin, debería reunir las siguientes características:

- Que fuera consumido universalmente por la población.
- Que el consumo variara poco de día a día.
- Que la vitamina A no alterara las características organolépticas del alimento.
- Que el costo y naturaleza del alimento hicieran el proceso de suplementación económicamente factible a escala industrial.

Entre los alimentos propuestos se encontraba la sal común, pero esta no reunía todas las características necesarias, ya que el consumo diario era bajo, por lo cual se descartó. Otro alimento propuesto era el azúcar, este reunía todas las características anteriores y además su producción es centralizada y esto facilitaría el agregado de la vitamina A, por lo que se optó por el azúcar para llevar a cabo el programa de fortificación (6).

se realizaron estudios que indicaban que el consumo diario de azúcar era de 20, 38, y 47g por día, para los niveles socioeconómicos bajo, medio y alto respectivamente. El valor de 20g/día se utilizó de base para establecer el nivel de fortificación, asumiendo que esta era la ingesta de los grupos de mayor riesgo y para satisfacer la recomendación dietética diaria de los niños de 300ug/día; de esta manera se recomienda un nivel de fortificación de 15ug/g equivalente a 50ui/g de retinol. (7).

#### 4 Legislación:

El 11 de junio de 1974 el Congreso de la República avala legalmente la fortificación de azúcar con vitamina A, con el decreto 56-74. Posteriormente el 27 de diciembre de 1985 se modifican algunos puntos del decreto 56-74, con el decreto 145-85 el cual indica que toda azúcar de consumo interno en Guatemala debe ser fortificada con vitamina A a un nivel de 13-17ug/g de **retinol**.

Así como también que el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social a través de la Dirección General de Servicio de Salud por medio del Departamento de Registro y control de Alimentos es responsable de realizar inspecciones en los ingenios, de tomar muestras en ingenios y expendios, de analizar las muestras en el Laboratorio Unificado de control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) y de imponer sanciones en caso de incumplimiento de la ley. En tanto INCAP debe prestar asesoría a los ingenios para la correcta fortificación del azúcar (8).

#### 5 Resultados de la fortificación:

En 1976-77 se realizó un estudio en el cual se verificó la efectividad y beneficio del programa de fortificación; este se llevó a cabo con doce comunidades rurales, en las que se estimó la ingesta de vitamina A, niveles en suero y leche humana y concentración de vitamina A en sangre de personas fallecidas accidentalmente (9).

#### 6 Cumplimiento del programa de fortificación:

De 1975 a 1977 el programa de fortificación funcionó adecuadamente. La fortificación se vio suspendida de 1978 a 1986 por los azucareros, ya que ellos puntualizaban que el costo del proceso era elevado (9).

En 1988 se evaluó que el nivel de prevalencia de hipovitaminosis A era similar al detectado a mediados de los años sesenta. Se estableció que el 21.8% de niños escolares provenientes de diversas regiones del país presentaban niveles de retinol sérico inferior a 20ug/dl (2).

Ese mismo año INCAP propuso nuevamente un programa de control de la hipovitaminosis A que consistía:

-Suplementación con dosis altas de vitamina A

(200,000DI) a niños de 1-7 años por sole una vez (ronda de la vitamina A) (10, 11).

-Reinicio del proceso de fortificación durante la zafra de 1987 -88 (12,13,14).

-Estímulo a la producción y consumo de vegetales ricos en pigmentos provitamina A (15).

El cambio de autoridades en el Departamento de Registro y Control de Alimentos (DRCA) del MSPAS fue un factor decisivo para el reinicio de la fortificación del azúcar, ya que se sostuvo la exigencia a los ingenios de cumplir con la ley; es así como se reinicia el proceso de fortificación con la zafra 1987/1988.

El DRCA en 1987 tomó 70 muestras de las cuales el 29% de muestras se detectó que contenían vitamina A establecido en la ley; en 1988 se analizaron 1048 muestras de las cuales el 85% contenían vitamina A y el 10% cumplía con la ley; en 1989 se analizaron 1199 Muestras, el 94% de ellas contenían vitamina A y el 12% se encontraban en el rango establecido; en 1990 se analizaron 550 muestras, el 99% contenían vitamina y solamente el 20% cumplían con la concentración esperada; en 1991 se analizaron

1203 muestras, el 94% de ellas contenian vitamina A y el 30% de las muestras contenia la concentracilin de vitamina A establecido en la ley (9) (Anexo 2).

Se puede notar con los resultados anteriores que el azUcar se estA fortificando, ya que la mayoria contiene vitamina A, sin embargo es mucho menor el Muller<sup>o</sup> de muestras que contienen vitamina A entre el rango establecido por la ley.

En 1991 se tomaron 150 muestras en tiendas y hogares de diferentes departamentos del pais, las cuales fueron analizadas unas muestras por LUCAM y otras por INCAP, los resultados mostreron que la mayoria de los casos el azUcar que llega al consumidor no tiene vitamina A o tiene niveles mucho mas bajos que los que se encuentra en los ingenios (9) (Anexo 3).

Linós de los medios que podrian contribuir con la mejora de la fortificacidn de azficar con vitamina A es el adecuado control de calidad, ya que con este se estaria verificando constantemente la concentracift de vitamina A en el azilcar al momento de la producci6n, y de este manera se estaria asegurando que el azlIcar que sale a la yenta contiene los niveles de vitamina A establecidos por la ley, y se estaria cumpliendo con el objetivo del programa de fortificaciOn.

## 7 Metodología para Control de Calidad:

Para el análisis cuantitativo de vitamina A en alimentos se encuentra el método oficial de la Asociación Oficial de Análisis Químico (AOAC), es un método general para analizar todos los alimentos que contengan vitamina A. Se han realizado estudios de otros métodos específicos para el azúcar, para hacer más eficiente la cuantificación de vitamina A y además con el fin de encontrar un método adecuado según sean las condiciones de trabajo que se tengan en el laboratorio en que se lleve a cabo la cuantificación de la vitamina A. A continuación se citan varios métodos que se han desarrollado para llevar a cabo el control de calidad de la vitamina A en azúcar fortificada (16,17,18).

### 7.1 Método Colorimétrico Cualitativo: (Arroyave y colab)

En 1975 el Dr. Arroyave y colaboradores en el INCAP desarrollaron el Método Cualitativo para la Determinación de Retinol en azúcar fortificada. El método se basa en la formación de anhidrovitamina A en ácido tricloroacético. El color azul producido en la reacción se compara con soluciones de sulfato de cobalto a diferentes concentraciones, que se han seleccionado para que repliquen el color que debe producir el azúcar adecuadamente fortificada (19,20).

Este método es bastante Util en el caso de los laboratories que no cuentan con instrumental necesario para cuantificar la vitamina A.

## 7.2 Método Rapid° para la Determinación de Palmitato de Vitamina A en Azúcar. (LUCAM Campos. M, Canahui E).

El Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) del MSPAS en 1988 elaboró el Método Rapid° para la Determinación de Palmitato de vitamina A en azúcar; el cual consiste en la extracción de palmitato con una mezcla de disolventes orgánicos compuesta de éter dietílico y de éter de petróleo en una relación de 1:1; luego este se cuantifica por su absorbancia a 325nm (21).

El Método que utiliza LUCAM es confiable, económico y rápido, aunque en el caso de utilizar este método en lugares de clima caliente como es el caso de la ubicación de la mayoría de ingenios, se dificultaría debido a que los disolventes que se utilizan son bastante volátiles.

## 7.3 Adaptation de Método LUCAM: (Dary o.)

Posteriormente INCAP en 1993 modificó el Método Rápido para 1) determinación de Palmitato de vitamina A en azúcar (LUCAM), disminuyendo cinco veces la cantidad de reactivos usados, aunque su precisión es un poco menor (22,23).

#### 7.4 Metodos desarrollados por INCAP:

En 1993 INCAP prosiguió desarrollando nuevos métodos que se indican a continuación:

##### 7.4.1 Método Extracción con Hexano:

Consiste en la extracción del palmitato de retinilo del azúcar con hexano, este se cuantifica por su absorbancia a 325nm y se hace la equivalencia para obtener la concentración de retinol (mg/kg) (22,24).

##### 7.4.2 Método Sep-pak:

Consiste en la separación del palmitato de retinilo del azúcar **fortificada, a partir de una solución** acuosa de la muestra, empleando una columna C18 (Sep-Pak). La afinidad del palmitato de retinilo por la resina de la columna, permite que este sea retenido dentro de **la** misma. La columna se lava varias veces con agua y con una mezcla de 2-propanol/agua al 50%. La polaridad de ambos solventes, permite eliminar interferentes más fuertes que impiden analizar el palmitato de retinilo directamente de soluciones acuosa de la muestra. Finalmente ~~utilizando 2-propanol absoluto, se eluye el palmitato y se~~ determina la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro a **475 nm (2:1)**.

#### 7.4.3 Método HPLC:

Se basa en la extracción del palmitato de retinilo a partir de una solución acuosa de la muestra analizada. El solvente utilizado (n-hexano), se evapora completamente y la muestra se reconstituye con metanol. El palmitato de retinilo se cuantifica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una fase estacionaria apolar (C18) y metanol como fase móvil. Se utiliza un detector ultravioleta a 325nm (22).

#### 7.4.4 Método Colorimétrico Cuantitativo:

Al mezclar la vitamina A con ácido tricloroacético se forma anhidrovitamina A, un compuesto de color azul que puede medirse colorimétricamente. Luego de efectuada la reacción se lee la absorbancia a 620nm exactamente a los 25 segundos después de agregado el reactivo cromógeno. La intensidad de color disminuye constantemente, por lo que el período de lectura debe ser fijo. La absorbancia se compara con una curva patrón para hallar la concentración de la muestra. (22)

#### 4. JUSTIFICACION

Para solucionar el problema de hipovitaminosis A en Guatemala se tomaron varias estrategias, una de ellas es la fortificación de vitamina A a un alimento de alto consumo, el azúcar.

En 1976-77 se realizó un estudio en doce comunidades rurales, el cual demostró la efectividad del programa de fortificación del azúcar con vitamina A.

El Departamento de Registro y Control de Alimentos del MSPAS es el encargado de velar por que el azúcar consumida por la población contenga los niveles de vitamina A establecidos por la ley. Según los resultados que ellos han reportado de los años de 1988 a 1991, a la mayoría de muestras se les detectó vitamina A, pero solamente un bajo porcentaje de las muestras reportó niveles de vitamina A en los rangos establecidos por la ley. Lo que denota que la mayoría de azúcar al llegar al consumidor no posee vitamina A. o la posee en bajas cantidades, lo cual muestra que no se está alcanzando al máximo la efectividad del programa de fortificación.

Una de las formas para lograr que el azúcar contenga la concentración de vitamina A establecida por la ley y así asegurar la efectividad del programa de fortificación, es establecer estrategias de Control de Calidad, las cuales ayudarían a tener un control constante de la concentración de la vitamina A en el azúcar durante su producción y de esta manera se estaría logrando llevar al mercado azúcar fortificada con niveles adecuados de vitamina A.

En la actualidad existen varios métodos que se pueden utilizar en la cuantificación de la vitamina A en azúcar fortificada, pero hasta el momento no se ha establecido un método que pueda ser utilizado tanto por los laboratorios azucareros como por los laboratorios oficiales y de referencia, por lo cual es necesario realizar una comparación de los métodos en cuanto a su veracidad, ventajas y desventajas analíticas, costo y condiciones de trabajo, para establecer un método adecuado para la cuantificación de la vitamina A en azúcar fortificada.

## 5.OBJETIVOS

- 1    Evaluar la exactitud y precision de los siguientes métodos:
  - Método Extraction con Hexano.
  - Método Columna Sep-Pak
  - Método Colorimétrico Cuantitativo.para el análisis de vitamina A en azúcar fortificada.
  
- 2    Comparar los resultados de cada uno de los métodos anteriores con los resultados obtenidos con el método de referencia (HPLC).
  
- 3    Comparar los tres métodos anteriores entre sí, para evaluar las ventajas, desventajas y costo de cada uno de ellos.

## 6.HIPOTESIS

La precisiOn y exactitud obtenidos por el metodo de extraccien con Hexano, al cuantificar la vitamina A en azUcar fortificada, es mayor que los obtenidos por los metodos Sep-pak, y Calorimetric° cuantitativo.

## 7.MATERIALES Y Metodos

Univers() de trabajo:

Metodo ExtracciOn con hexano

Metodo Columna Sep-Pak

Metodo Colorimêtrico cuantitativo

Método HPLC.

Medios:

### 2.1 Recursos Humanos:

-Tanea R. Ramos Castellanos, Autora de la tesis.

-Lic. Gerardo Pirir Rodriguez, asesor del trabajo de tesis.

Recursos materiales:

-Equipo

Agitador vortex

Balk de aqua

Espectrofotometro (UV/VIS)

Balanza analitica Sartorius (presiciOn de 0.00010)

CromatOgrafo liquido constituido por:

CromatOgrafo Varian 5500 con detector UV

Autosampler Vista 9090

Interfase Varian IIM-A

Computadora US-650

impresora HP Tinjeckt

Columna Micropack MCH-5-cap de 150 x 4mm

Rotavapor

Sistema de filtration Millipore con Membrane 0.45um  
Refrigeradora

-Material

Aziicar fort ficada con palmitato de retinal  
(vitamina A) a las concentraciones siguientes:

6.54,9.81,14.08,22.21,28.9,37.5. pg/g

Cristaleria en general

Celdas para espectrofotometro (preferentemente de  
cuarzo)

Jeringa de 5mL y 10mL

Coiumna Sep-pak C" (Millipore)

Cronometro

Guates guirUrgicos

-fleactivos

Metanol p.a.

Etanol absoluto p.a.

2-propanol p.a.

n-hexano p.a,

Acido tricloroacetico

niclorometano

3 Procedimiento:

3.1 Metodo HPLC (Método de referencia)

3.1.t ExtracciOn, evaporaciOn y redisoluc 6 .

- 3.1.1.1 Homogenizer el azncar fortificada mezclAndola dentro de la bolsa varias veces.
- 3.1.1.2 Disolver 20.0g del azUcar en 50-60ml de agua destilada en un beaker de 150ml y transferir cuantitativamente a nn balón volumetrico de 100ml. Lavar varias veces el beaker con pequeflas porciones de ague y transferir los lavados al balón. Aforar a 100ml con agua destilada.
- 3.1.1.3 Incubar en ban° de agua a 60°C por 15 minutos. Dejar las soluciones cubiertas con tele negra, a temperature ambiente por 5 minutos o lo que sea necesario pare que se enfrien.
- 3.1.1.4 Medir 10ml de la soluclMn preparada anteriormente, y verter en un tubo de ensayo con tapOn esmerilado. De igual forma, medir 3m. de estanol absoluto y verter en el tubo que contiene la muestra. Cada muestra debe ser analizada por triplicado.
- 3.1.1.5 Con una pipeta volumetrica medir 5ml de n-hexano y luego agregar en cada uno de los tubos conteniendo la solucian de azUcar y etanol. Cerrar el tubo inmediatamente y mezclar en vortex por 30 segundos. Ahrir un poco los tubos pare disminuir la presign.

### 3.1.2 Cromatografía

#### Conditions de operaciOn

Fase mOvil	Metanol 100%
Flujo	1.7 ml/min
Detector	UV a 325 nm
Volumen de inyeccitin	10 pl
Inyecciones por vial	2
Atenuacian/detector	0.005 AU
AtenuaciOn/integrador	2
Tiempos:	
Corrida	10 min.
Acetato de R.	1.8 min.
Palmitato de R.	8.1 min.
velocidad de papel	1.00 cm/min

### 3.2 Metodo hexane:

3.2.1 Homogenizer la muestra mezclândola dentro de la bolsa varias veces.

Disolver 20.0g del azUcar en 50-60 ml de agua destilada caliente en un beaker de 150 ml y transferir cuantitativamente a un balan volumetric° de 100ml. Lavar varias veces el beaker con peguefias porciones de aorta y transferir los lavados al balOn. Aforar a 100 nil con agua destilada. Preparar un blanco de reactivos sin azilcar.

igual forma, medir la absorbancia de la muestra en el tubo que contiene la muestra. Cada muestra debe ser analizada por triplicado.

3.2.5 Con una pipeta volumétrica, medir cuidadosamente 5 ml de n-hexano y luego agregar en cada uno de los tubos conteniendo la solución de azúcar y etanol. Cerrar el tubo inmediatamente y mezclar en vortex por 30 segundos. Abrir un poco los tubos para aliviar la presión.

3.2.6 Agregar 10 gotas de etanol absoluto en cada uno de los tubos. Dejar reposar por dos minutos o el tiempo que sea necesario para que las fases se separen.

1.2./ A lo mayor brevedad posible, leer la absorbancia de la fase orgánica en un espectrofotómetro a 325nm en cubetas de cuarzo de 1 cm, empleando hexano como blanco. De igual forma, leer la absorbancia del blanco de reactivos.

Si se sospecha la presencia de sustancias distintas al plimitato de retinol, que absorben a la misma longitud de onda, repetir las etapas (4) a la (7), pero antes de leer la absorbancia de la muestra, irradiar la solución con luz ultravioleta por: 40 minutos. Reponer con n-hexano, cualquier pérdida de volumen que sufra la muestra durante la irradiación.

### 3.3 Método Sep-pak

3.3.1 Homogenizar la muestra mezclándola dentro de la bolsa varias veces.

Disolver 10.0g del azúcar en 50-60ml de agua destilada caliente (90°C), en un beaker de 150 ml y transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 100ml. Lavar varias veces el beaker con pequeñas porciones de agua y transferir los lavados al balón. Aforar a 100ml con agua destilada.

incubar en baño de agua a 60°C por 15 minutos. Dejar las soluciones cubiertas con tela negra, a temperatura ambiente por 5 minutos o lo que sea necesario para que se enfrien.

Activación del sep-pak:: Utilizar una jeringa de 10 ml para lavar la columna con 5 ml de metanol absoluto y luego con 10 ml de agua destilada.

- 3.3.5 Pasar 10 ml de la solución acuosa de la muestra a
- 3.7.7 Eluir el palmitato de retinol con 5 ml de 2-propanol absoluto, recolectar la solución eluida en un tubo de ~~ensayo de 20 ml. Leer la absorbancia de la solución en~~ un espectrofotómetro a 325 nm, utilizando celdas de cuarzo y empleando 2-propanol absoluto como Blanco. Lavar el sep-pak con 10 ml más de 2-propanol, y finalmente con 5 ml de metanol. El filtro puede ser utilizado varias veces.

#### 3.4 método Colorimétrico cuantitativo:

Mezclar bien la muestra de azúcar.

- 7.4.2 Pesar 10g de muestra de azúcar, dentro de un beaker de 50ml.

Agregar 10ml de agua destilada a 50-60°C y mezclar. Taponar el beaker con papel parafilm e incubar en baño de Marie a 56 °C durante 20 min.

Agitar la solución con una varilla de vidrio para bien toda el azúcar. Permitir su enfriamiento a temperatura ambiente y transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 100ml, aforar con agua.

- 3.4.5 Transferir 1 ml de la solución en un tubo de ensayo de 13 x 100mm.
- 3.4.6 Agregar 3 ml de Acido tricloroacético/diclorometano (180:80) (reactivo cromoforo) con la jeringa de vidrio mezclar inmediatamente.
- 3.4.7. Exactamente a los 25 segundos después de haber agregado el reactivo, leer la absorbancia de la solución a 620nm contra blanco de agua.

#### 4 Analisis Estadístico:

##### 4.1 Exactitud:

Se midió analizando por triplicado seis concentraciones patrones de azúcar fortificada con vitamina A, de concentración conocida, midiendo para cada método:

-Porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ recup} = \frac{\text{Conoc de vit. A encontrada} * 100}{\text{conoc patron}}$$

-desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

-Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

##### i.2 Precisión:

se midió específicamente la repetibilidad de cada método y se realizó un perfil de precisión, en que se graficó concentración vs CV y así se pudo ver que tan preciso era cada método.

### 4.3 Comparación de Métodos:

- Con los datos de exactitud se elaboró una regresión lineal y pruebas de colinealidad.
- Se compararon los tres métodos con el método de referencia (HPLC) en relación a la pendiente.
- En la regresión lineal se evaluó estadísticamente cada ecuación (ANDEVA y t de student para el coeficiente de correlación -r-)
- Se midió el coeficiente de correlación intraclass para indicar el grado de similitud entre el método de referencia (HPLC) con cada uno de los tres métodos a comparar.

## 8.RESULTADOS

Los resultados obtenidos para el análisis de las distintas muestras de edUcar por cada uno de los métodos evaluados, se muestra en la tabla 1 del anexo #4.

En la tabla 2, se pueden observar los porcentajes de recuperación obtenidos para cada uno de los métodos; este método fue empleado para evaluar la exactitud de cada método. El método hexano mostró ser el más exacto con un porcentaje de recuperación de 93%, mientras que el método sep-pak tan solo obtuvo un 65% de recuperación, con lo que refleja su escasa exactitud, y con el método colorimétrico se obtuvo 90% de recuperación.

La precisión de los métodos evaluados se midió a través de coeficientes de variación, tabla 3 y sus respectivos perfiles de precisión que se pueden observar en las gráficas 1, 2, 3 y 4, en las cuales reflejan la reproducibilidad de cada método; así como también se evaluó la repetitividad de cada método, lo cual se puede observar en la tabla 4. En la tabla 5 se observan los coeficientes de correlación intraclase obtenidos para cada uno, en los cuales se evaluó la reproducibilidad de cada uno de ellos estadísticamente.

En la tabla 6 muestra la prueba de paralelismo con lo cual se verificó la exactitud de los métodos,



## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

El porcentaje de recuperaci3n evalua la exactitud que posee cada metodo al cuantificar vitamina en azucar fortificada. El metodo HPLC posee un porcentaje de recuperaci3n de 94% lo cual se puede deber a que la capsula de CWS-250 (capsula que contiene palmitato de retinol) no se solubilice del todo en agua, lo cual tiene como consecuencia que no libere todo el palmitato de retinol, con lo que no se puede cuantificar en un 100%; lo que puede ser para que libere el palmitato de retinol es el tiempo de vida, es decir que al ir envejeciendo la capsula puede que la liberaci3n del palmitato se de en menor grado, en tanto el metodo ~~hexano tiene 93% de recuperaci3n, lo que se debe a que la~~ capacidad de extracci3n del hexano se ve disminuida al aumentar la concentraci3n de palmitato de retinol (vitamina A), lo cual podria solucionarse al emplear soluciones de azucar mAs diluidas. Con el metodo sep-pak se obtuvo el 65% de recuperaci3n, esto puede deberse a que la capsula CWS-250 forma una micela al encontrarse en agua y pueda ser que gran parte de ella permanezca en forma soluble en agua, con lo cual al lavar la columna Q, con agua para eliminar interferentes el palmitato que se encuentra en la micela soluble en agua se pierda en ese lavado, y como consecuencia se obtiene porcentaje de recuperaci3n bajo. Con el metodo colorim4trico se obtiene el 90% de recuperaci3n; el porcentaje de recuperaci3n en este metodo se ve afectado por la ~~reacci3n tan inestable que se da al formarse la anhidrovitamina~~ A, por medio de ella se cuantifica la vitamina A en la muestra; en el caso que la reacci3n no se haya llevado en un 100% afectara a la cuantificaci3n de la vitamina A en el azucar.

De los tres metodos comparados con el metodo de referencia HPLC, el colorimétrico y el hexano poseen exactitud tanto como el metodo de referencia y para fines prácticos se pueden utilizar factores de corrección apropiados.

La precisión de los métodos se evaluó de tres formas, una de ellas se realizó calculando los coeficientes de variación para cada concentración y así construir un perfil de precisión, el cual muestra la reproducibilidad de cada metodo. Otra forma de evaluar la precisión se llevo a cabo midiendo la repetibilidad, se escogió la muestra de la concentración de 13.08 µg/g de palmitato de retinol (vitamina A) en azúcar fortificada, se analizó seis veces por cada metodo y luego se evaluaron los coeficientes de variación obtenidos por cada metodo. Por último se evaluó la precisión por medio de correlación intraclass calculando el coeficiente de correlación intraclass ( $r_i$ ), cuanto más el valor se aproxime a 1 mayor reproducibilidad tendrá el metodo. En el metodo HPLC al construir el perfil de precisión muestra que los coeficientes de variación van disminuyendo cuanto las concentraciones van aumentando, al evaluar la repetibilidad de un coeficiente de variación de 0.49 y al realizar el análisis de correlación intraclass obtiene un  $r_i$  de 1, todo esto indica que el metodo de HPLC posee una alta precisión. En el metodo de hexano el perfil de precisión indica que aumenta la precisión al aumentar la concentración, en cuanto a su repetibilidad es alta pues obtuvo un coeficiente de variación de 0.75 y un  $r_i$  de 0.997 lo cual muestra que es reproducible. En cuanto al metodo sep-pah el perfil de precisión muestra que su coeficiente de variación cambia entre concentración y concentración, no tiene

buena repetibilidad pues su coeficiente de variación es de 2.72 y obtuvo un  $r_i$  de 0.998 lo cual indica que es reproducible, aunque este método posea reproducibilidad, es decir que varias personas pueden analizar una misma muestra y los resultados obtenidos poseen una baja variación entre sí, es decir que al realizar una misma persona el análisis de una muestra varias veces, los resultados obtenidos tendrán una variación considerable entre una y otra por lo cual su precisión es baja. En el método colorimétrico su perfil de precisión muestra que posee buena precisión, su reproducibilidad es aceptable y que tiene un coeficiente de variación de 0.55 y su  $r_i$  es de 0.999, todo esto muestra que es un método preciso. Los métodos hexano y colorimétrico son precisos en tanto el método Sep-Pak no es preciso.

La prueba de paralelismo muestra si los métodos son similares, los métodos hexano y colorimétricos son similares al método de referencia HPLC, por lo que se espera obtener resultados similares; el método Sep-pak no es similar al método HPLC por lo que los resultados obtenidos no serán similares. A los cuatro métodos se les aplicó el análisis de regresión lineal, el cual indica que los cuatro métodos son lineales significativamente ( $p=0.0001$ ).

En cuanto a los costos el más elevado es el método HPLC, luego Sep-pak, colorimétrico y hexano; esto es si se cuenta con el equipo y material necesario para cada método, pero si se van a montar por primera vez los métodos el más elevado es el HPLC, luego hexano, colorimétrico y Sep-pak.

Referentemente a las ventajas y desventajas del metodo HPLC es el mas confiable por su alta exactitud y precision, lamentablemente el costo del equipo es muy alto por lo que se recomienda solamente como metodo de referencia.

El metodo hexano aunque en menor grado que el metodo HPLC posee precision y exactitud, no es tan volatil a temperaturas elevadas, pero su capacidad de extraccion es un poco baja, aunque se puede solucionar utilizando factores de corrección, con respecto a su costo es relativamente favorable.

El metodo Sep Pack posee un costo bajo para su implementacion, aunque no es recomendable su montaje pues no posee precision y exactitud. El metodo colorimetrico aunque en menor grado que el HPLC y el hexano posee una aceptable precision y exactitud, su costo es relativamente bajo, pero posee la desventaja que los reactivos que se utilizan son bastante corrosivos y al estar en solucion su vida media es corta.

Al analizar las ventajas y desventajas de los tres metodos comparados, el metodo hexano es el metodo idoneo, pues posee exactitud, precision y sus costos no son elevados.

## 10. CONCLUSIONES

1 Los metodos Hexano y Calorimetric° son precisos y exactos, por to cual son metodos confiables para cuantificar vitamina A en azucar fortificada.

2 El metodo Sep Pack no es preciso ni exacto, por tanto no es eonfizble utilizarlo en la cuantificacion de vitamina A en azucar ferticada.

3 Los metodos Hexano, Colorimetrico y Sep Pack poseen linealidad al igual que el metodo de referencia HPLC.

4 Para la implementaciOn- de los metodos el costo mas elevado es el del metodo hexano Mega el colorimetrico y por Ultimo el metodo sep-pak.

5 El metodo hexano es el mds preciso, exacto, con un costo intarmedio, por to cual de los tres metodos comparados dste es el mejc`r para la cuantificacion de vitamina en azucar fortificada.

6 El metodo calorimetric° se podrfa utilizar en el caso que no se contara con todo el equipo y material necesario para implementar el metodo hexano.

3 En base a los resultados obtenidos, que tanto las autoridades como el laboratorio de referencia y los laboratorios de los ingenios, elijan como metodo oficial el metodo de extracciOn con hexano, ya que puede ser utilized° por los tres sectores para la cuantificaciin de vitamina A en aadcar fortificada.

## 12. REFERENCIAS

- Litter H. Farmacologia Experimental y Clinica. Eta. edition  
Argentina: El Ateneo, 1980. 1089-1091p.
- Bevan J. Fundamentos de Famacologia. 2da. ed. Mdxico: Harla  
1982. 718-726p.
- 3 Institut<sup>o</sup> the NutriciOn de Centro America y Panama , y Comite  
Interdepartamental de NutriciOn para la Defensa Nacional.  
Nutritional Evaluation of the Population of Central America and  
Panama. Regional Summay. DREW Publication No. USM 72- 8120.  
Secretaria de salud y Bienestar de los E.U.A., Washington,  
0,C.,1972.
- 4 Vit A Field Support Project (VITAL). Evaluation de Intervenciones  
para el Control de la Hipovitaminosis A en Guatemala.  
Guatemala. 1991.
- Arroyave G. Fortificaton of Sugar with Vitamin A: Bases,  
Implementation and Evaluation. Capltulo 22 en: Nutrition in the  
Community. London. 1983. 25-40p.
- Bulux 3., Moran O. Infante de Guatemala en Taller Regional sobre  
Estrategias para mejorar el estado nutricional de Vitamina A en  
America Latina y El Caribe. Arlington. 1990. 57-62p.
- 7 Arroyave G., et al. PublicaciOn No. 384 de la organizaciOn  
PaMaMmricaaa de la salud (OPS), Washington, D.C., 1979. 84p.  
Gobierno de Guatemala. Decretos No. 56-74 y 145-85,  
Pegl.Jmento SP-G-105-74.

Organization Panamericana de la Salud/Guatemala.

Fortificación de Azúcar Blanca con Vitamina A -fl '7ket-, -

Intern°. Zafra 1991-92. Guatemala 1991.

- 13 Dary O., Cifuentes D. Situación del Programa de Fortificación de Azúcar con Vitamina A en Guatemala en 1991. Guatemala 1991. INCAP. 3-10p.
- 14 Gary O. Control de la Hipovitaminosis A en Centro America por medio de la Fortificación de Azúcar. Guatemala 1991. INCAP. 3-11p.
- 15 Pineda a. Erradicación de la Deficiencia de Vitamina A en Guatemala. En: Memorias del XII Congreso de Nutrición de Centro America y Panama. Guatemala, 1990. 67-71p.  
Pineda O., Camacho E. Método para la Determinación Cuantitativa de Vitamina A en Azúcar Fortificada con Vitamina A y en premezcla. Guatemala, INCAP. 1988.  
Arroyave G., Aguilar J. y Portela E. Manual de Operaciones del Programa de Fortificación de Azúcar con Vitamina A. Guatemala. 1975. 5-4ep.

- 18 Aguilar J., Arroyave G. Gallardo C. Manual de Supervision y Control del Programa de Fortificación de Azdcar con Vitamins A. II/GAP. Guatemala. 1976.
- 10 Arrsyave G. Funes C. Enriquecimiento de Azdcar con Vitamina A , método para la Determinación Cualitativa de Retinol en Azdcar Blanca de mesa. Arch. Latiam. Nutr. 24. 147-1538.
- 20 Bayfield R.F., Cole E.R. Calorimetric Determination of Vitamina A with Trichloroacetic Acid. Methods in Enzymology. New York. 1980. 189-195p.
- 21 Campos M., Canahui E. Metodo Rapid° para la Determinación de Palmitato de vitamina A en Azdcar . Guatemala. 1988. LUCAM, MSPAS.
- 22 Pirir G., Lary O. Manual de Metodologias Analiticas para el Control de Calidad del Azdcar Fortificada con Vitamina A. Guatemala INCAP. 1993.
- 23 Haifa L.A., Pineda O. Substitución del Aceite de Man/ usado para la Fortificación de Azlizar con Vitamina A por otros Aceites Vecjetales Disponibles en Centro America. Guatemala INCAP. 1980. 3-6p.
- 21 Ostia Bernard. Estadistica Aplicada. 10ma. ed. Mexico: Limusa. 1985. 57-59, 265p.
- Roche. Entabilidad de la Vitamina A en Azdcar. Periodo de julio '9 n jyllo '20. Cumtomala. 1091.

## 13. ANEXOS

## ANEXO 1

### PREVALENCIA DE HIPOVITAMINOSIS A. NIVELES SERICOS < DE 20 pg/dl EN NINOS MENORES DE 15 ANOS

Prevalencia (%)

Pais	0-4atios	5-9ianos	10-14afts	=
Guatemala	26.2	15.2	11.2	=
El Salvador	43.5	43.5	22.4	
Honduras	39.5	29.0	21.9	
Nicaragua	19.8	10.5	6.4	
Costa Rica	32.5	25.6	11.7	
Panama	18.4	12.1	9.7	

K-Campos M., CanalAli E. MOtodo Rapido par la Determinacion de Paimitato de Vitamina A en AzUcar . Guatemala. 1988. LUCAM, MSPAS.

## ANEXO 2

**MUESTRAS TOMADAS EN INGENIOS**  
**POR EL DEPARTAMENTO DE REGISTRO Y CONTROL DE ALIMENTOS**  
**ANALIZADAS POR EL LABORATORIO UNIFICADO DE CONTROL DE**  
**ALIMENTOS Y MEDICAMENTOS (LUCAM) \*\***

- - = Aft	1987	1988	1989	1990	1991
<b>Nftero de Muestras</b> =====	70	1048	1199	515	1203
% con Vitamina A	29	85	94	99	94
% con Vit.A no detectado	71	15	6	1	6
% con < 80% nivel legal	15	68	76	69	50
% con 80-120% del nivel*	13	10	12	20	30
% con >120% nivel legal	1	7	6	10	14

- - - - =

\* Tomando en cuenta el error analítico, el rango de 12 -18pg/g (80-120% de 15'g/g) se considera como aceptable y en cumplimiento de la ley.

\* \*Campos M., Canahui E. Metodo Rapid() par la Determinacion de Palmitato de Vitamina A en Azilcar . Guatemala. 1988. LUCAM, MSPAS.

ANEW 3

14UESTRAS TOHADAS EN EXPENDIO Y EN HOGARES  
PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DE VITAHINA 21 <sup>1.\*</sup>

JUN/0 1991

Huestras analizadas por: DRCA (LUCAM)

m=s=====m

Department°	n	nd*	% del nivel legal		
			<80%	80-120%	>120%
Zacapa	8	12	88	0	0
Chiquimula	9	0	67	22	11
Quetzaltenango	11	27	64	0	9
TotonicapAn	4	50	25	0	25
Antigua	5	20	80	0	0
Jutiapa	5	0	100	0	0

=\_...-----=

Huestras analizadas por INCAP:

=====

Departamento	n	nd*	SIORDOSO		
			<80%	80-120%	>120%
Guatemala Ciudad	30	32	64	3	1
San Marcos y Quetzaltenango	30	52	48	0	0
Costa Sur	30	52	48	0	0

\*nd \* no detectado, < 1µg/g.

\*\*nary 0., Cifuentes D. Situacifin del Programa de Fortificaci6n (10 A\*ncar con Vitamina A en Guatemala en 1991. Guatemala 1991 INCAP. 3-1ep.

16	37.50	33.40	20.86	34.70	34.25
17	37.50	33.40	20.53	34.50	34.29
18	37.50	34.85	20.69	34.60	34.23

C.O = ConcentraciOn Conocida  
 C.HHX=: ConcentraciOn hexano  
 C.SP.= Concentracián sep-pack  
 C.COL.= Concentracien ColorimetrIco

C.H.= concentration  
 HPLC

**TABLA # 2**  
**PORCENTAJES DE RECUPERACION OBTENIDOS**

NETODO	it	S	CV	IC 95
Hexano	93.05	5.26	5.65	95.67 - 90.43
Sep Pack	65.21	7.75	11.88	69.06 - 61.36
Calorimetric°	90.77	5.18	5.71	93.35 - 88.19
HPLC	94.34	3.46	3.67	96.06 - 92.62

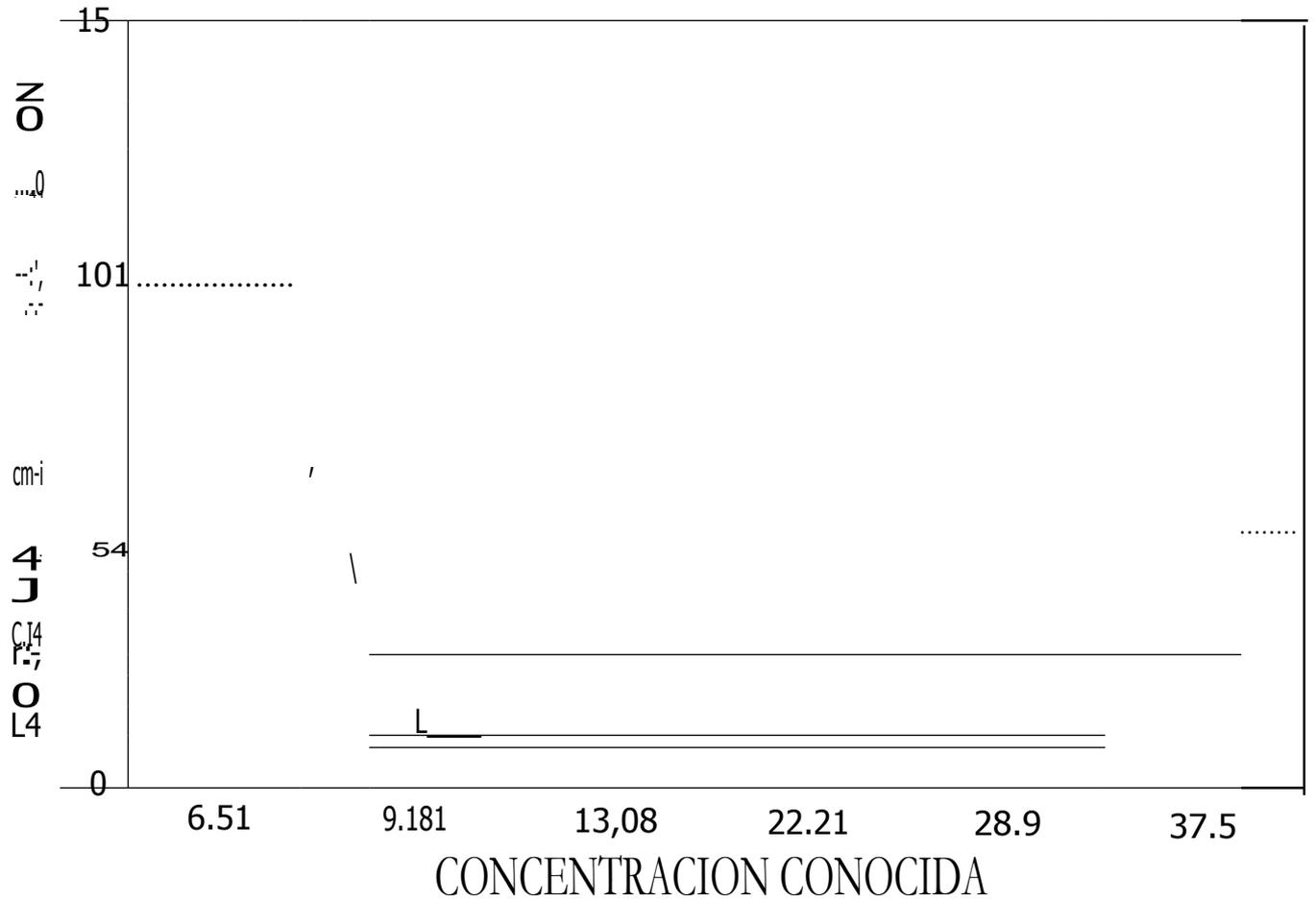
31 = Medida  
 s = Desviacion estandar  
 cv = Coeficiente de Variacion  
 IC 95% = Intervalo de confianza (indica el porcentaje de recuperacion).

**TABLA #4.3**  
**DATOS PARA FORMAR EL PERFIL DE PRECISION**

coeficiente	de	Variacion	(CV)	
concentracion conocida	Hexano	Sep-pak	Colorimetrico	HPLC
6.54	10.40	1.49	7.84	0.86
9.81	1.04	1.33	2.31	0.72
13.08	0.65	3.56	0.72	0.57
22.21	1.19	4.06	0.29	0.31
28.90	2.88	0.61	0.32	0.14
37.58	2.48	0.77	0.28	0.09

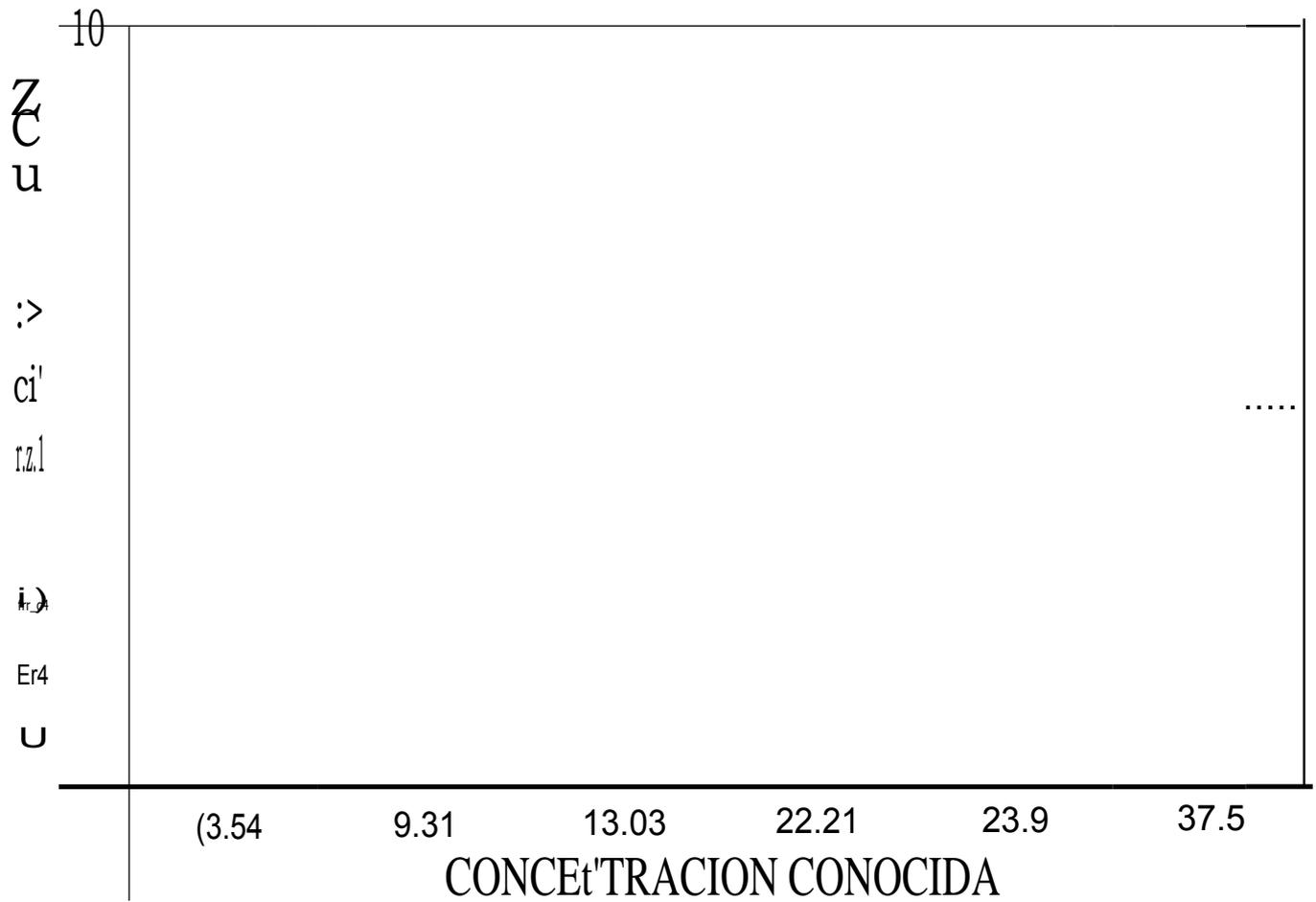
# GRAFICA 1

## PERM, DE PRECISION DEL METODO HEXANO



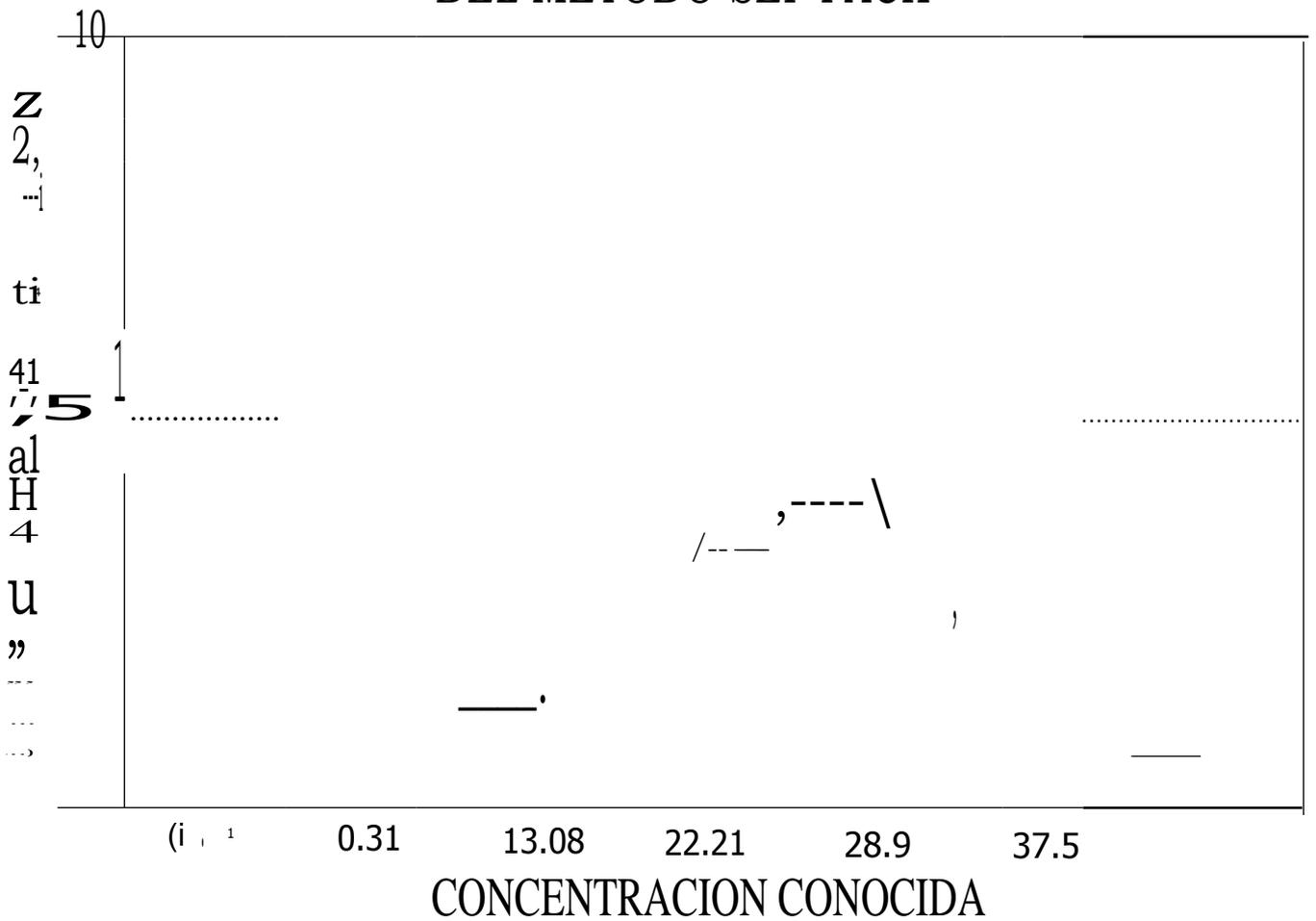
# GRAF I CA 2

## PERFIL DE PRECISION DEL METODO COLORIMETRICO



# GRAF I CA 3

## PERFIL DE PRECISION DEL METODO SEP PACK



# GRAFICA 4

## PERIL DE PRECISION DEL METODO HPLC

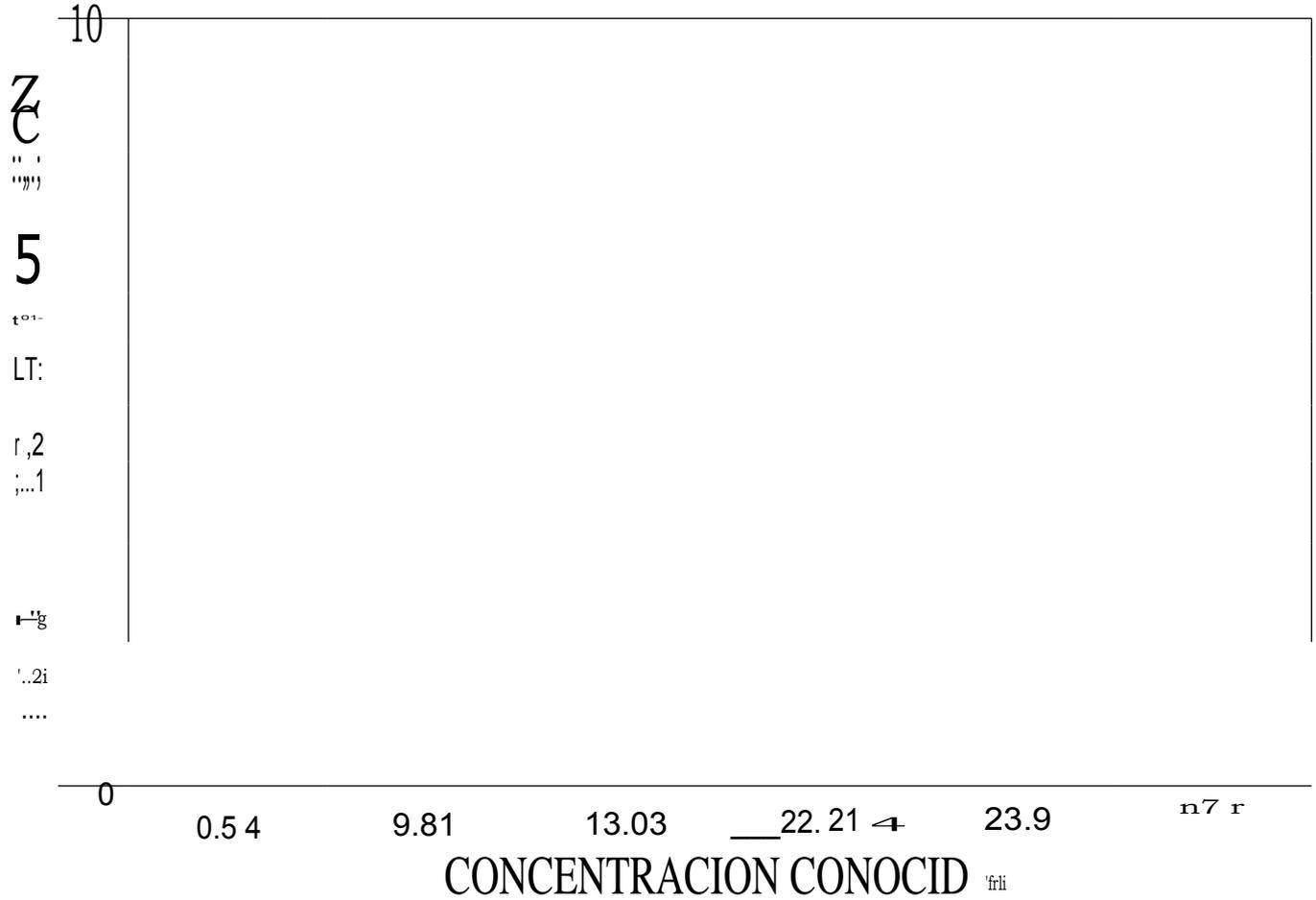


TABLA # 4

C, C	METODO			
13,08	Hexano	12.95	0.0097	0.75
13.08	Sep Pack	9.56	0.25	2.62
13.08	Colorieetrico	12.02	0.066	0.55
13.08	HPLC	12.17	0.060	0.49

$f_{tt}$  Media  
 $B t$  desviación estandar  
 C.V. = Coeficiente de variación.

TABLA # 5  
CORRHLACION INTRACLASE

	METODO	ri
	Hexano	0.997
	Sep Pack	0.998
	Colorimet.	0.999
	HPLC	1.00D

ri = coeficiente de correlación intraclase

**TABLA # 6**  
**PRUEBA DS PARALELISMO**

Ho.:  $b(\text{HPLC}) = b(\text{mátodo } x)$  (metodos iguales)  
 Ha.;  $b(\text{HPLC}) + b(\text{metodo } x)$  (m6tcdos diferentes)

Hdtodo	ComparaciOn Dependientes (b)
Hexano	$b(\text{HPLC}) = b(\text{bexano})$
Sep Pack	$b(\text{HPLC}) + b(\text{sep pack})$
Colerimittrico	$b(\text{HPLC}) = b(\text{colorimetric0})$

**TABLA # 7**  
**REGRESION LINEAL**

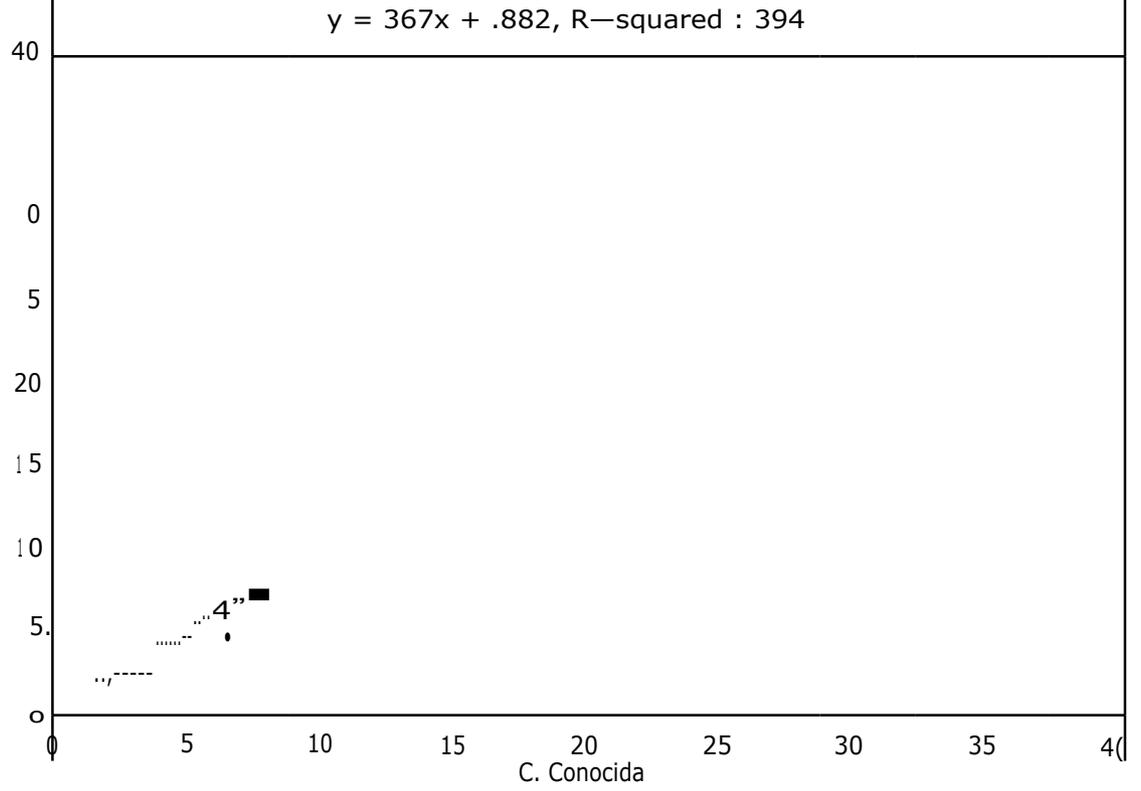
METODO	ECUACION	R	P
Hexano	$0.882 + 0.867x$	0.997	0.0001
Sep Pack	$1.956 + 0.519x$	0.989	0.0001
Colorimdtrico	$-0.233 + 0.928x$	0.999	0.0001
HPLC	$0.661 + 0.895x$	1.000	0.0001

TAMA 8  
COSTOS

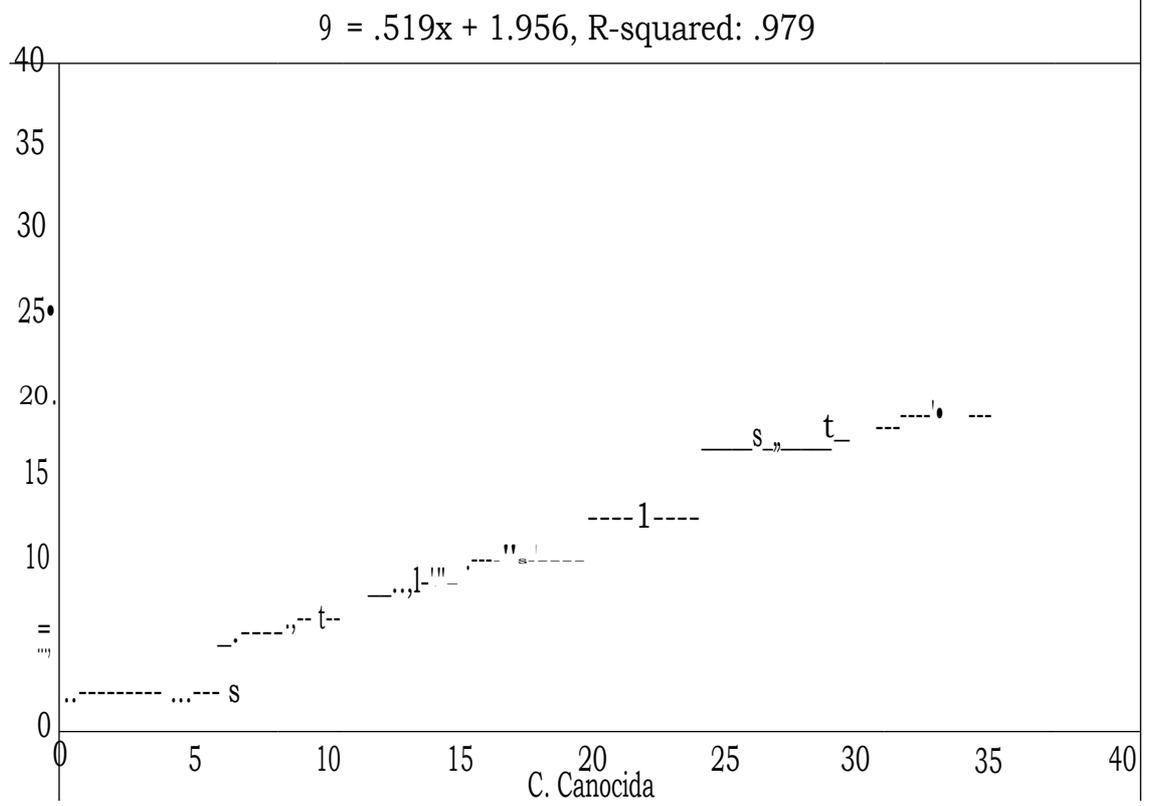
Metodo	Cos to en QUe zales	
Hexano	Q.148.00	
Sep Pack	Q.154.00	
Colorimétraco	Q.152.00	
HPLC	Q.296.00	

Note: Los costos solamente se calcularon tomando en cuenta los reactivos y el material.

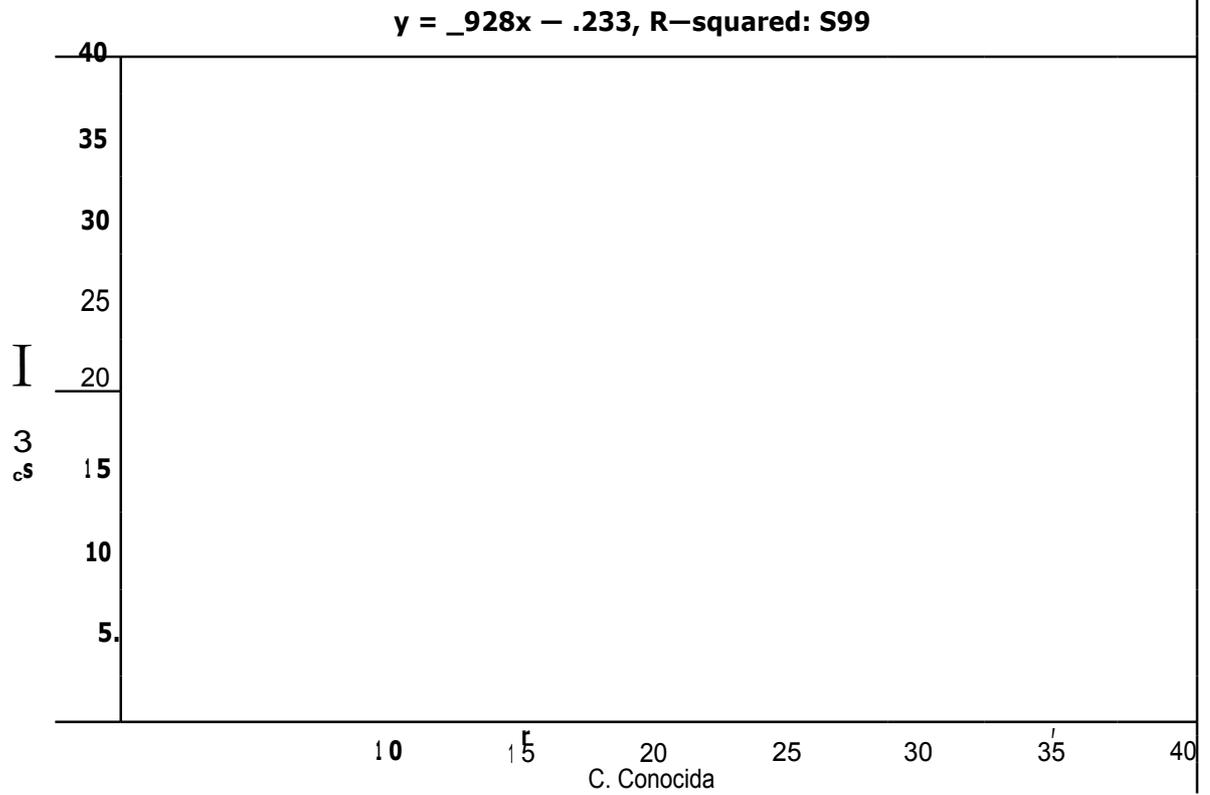
GRAFICA 5  
REGRESION LINEAL



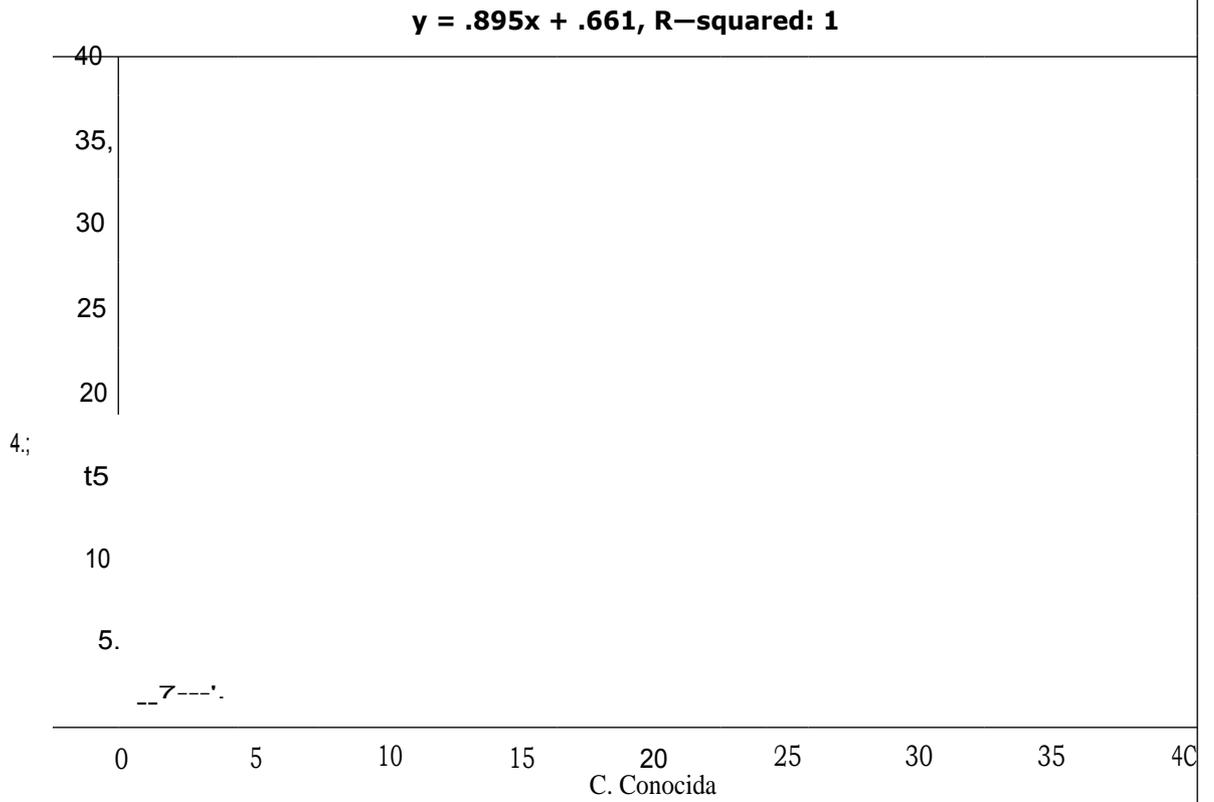
GRAFICA 6  
REGRESION LINEAL



**GRAFICA 7**  
**REGRESION LINEAL**



**GRAPICA 8**  
**REGRESION LINEAL**





AIL 1111

MI Palos

1 1

Pirir R.

4 s...

licda Lillian ing Antillen  
Directora de la Escuela  
Quimica Farmaceutica



lic. Jorge Pe z Folgar  
Decant

[111111161 N IA IIIMASMAA IN MA PALOS 01 WIWI  
SibliotsAa Coatral