

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



ANABELLA QUEZADA CALDRÓN

QUÍMICA BIÓLOGA
GUATEMALA, MARZO 2014

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



ANABELLA QUEZADA CALDRÓN

Para optar al título de
QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, MARZO 2014

Junta Directiva

Oscar Manuel C3bar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo Jos3 Vargases Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A la Sagrada Familia, por su amor infinito que me ha acompañado a lo largo de mi vida y día a día me guían en el camino que Dios a trazado para mí en la vida. **A mis Padres**, Víctor Manuel Quezada Torres y Lidia I. Calderón Gómez por la bendición de tenerlos en mi vida y ser la parte fundamental en mi crecimiento, desarrollo y formación como mujer, hija, esposa y madre, además de ayudarme incondicionalmente a realizar este sueño. **Así como a mi esposo** Alejandro Villeda, **mis hijas** Inés y Martina quiénes me han dado el amor, paciencia fuerzas necesarias para culminar este estudio y me han enseñado lo maravilloso que es tener mi propia familia. **A mi hermanas** por el apoyo a lo largo de toda nuestra vida. **Al resto de mi familia** por la ayuda apoyo y cariño que han brindado siempre. **A mis amigos** y compañeros por los momentos y vivencias que hemos compartido, ya que de cada uno de ustedes he aprendido que debemos respetarnos y aceptarnos tal como somos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia en especial a la Escuela de Química Biológica, por albergarme durante los años de mi vida estudiantil y otorgarme experiencias que me acompañarán a lo largo de vida.

Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), por el apoyo técnico y financiero para la realización de este trabajo. A todas las personas que participaron en este proyecto por su valiosa colaboración, en especial a las personas del Laboratorio de Bioquímica Nutricional, Licda. Paola Juárez, Licda. Mónica Guamuch, Doña Maria Luisa, Doña Maria, Dr. Omar Dary y en especial a Licda. Ana Carolina Martínez por su paciencia y ayuda en la realización de todo este trabajo.

Al personal administrativo de la Escuela de Química Biológica por su ayuda, apoyo y amistad que me brindaron en especial a Shen y Any.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	5
A. Generalidades	5
B. Yodo	6
1. Definición	6
2. Propiedades del yodo	6
3. Absorción, transporte y almacenamiento	6
4. Fuentes alimenticias	7
5. Requerimientos nutricionales y recomendaciones dietéticas	8
6. Función fisiológica	8
7. Deficiencia	9
8. Estrategias para combatir la deficiencia de yodo y prevención	9
C. Vitamina A	12
1. Definición	12
2. Propiedades de la vitamina A	12
3. Absorción, transporte y almacenamiento	12
4. Fuentes alimenticias	13
5. Requerimientos nutricionales y recomendaciones dietéticas	14
6. Función fisiológica	15
7. Deficiencia	15
8. Estrategias para combatir la deficiencia de vitamina A	16
D. Programa escuela centinela micronutrientes	17
E. Desarrollo, caracterización y validación de metodologías para propósitos analíticos	19
1. Desarrollo de métodos analíticos	19
a. Naturaleza del método	19
b. Revisión de literatura	19
c. Respuesta cuantitativa	19
d. Optimización de las condiciones de análisis	19
e. Puntos críticos del método	19

2. Validación y caracterización de métodos	19
a. Especificidad del análisis en la matriz de interés	20
i. Respuesta del blanco	20
ii. Interferentes constantes	20
iii. Límite de detección	20
iv. Sensibilidad y resolución	21
v. Precisión y variabilidad del método	21
vi. Exactitud	21
vii. Comparación contra un método de referencia	21
3. Evaluación del método	21
4. Herramientas del proceso de desarrollo, caracterización y validación	22
a. Blancos	22
b. Muestras, materiales a analizar	22
c. Materiales fortificados	22
d. Materiales con aditivos	22
e. Materiales previamente tratados	22
f. Materiales independientemente caracterizados	22
g. Estándares	23
h. Materiales de referencia	23
i. Materiales de referencia certificados	23
j. Estadísticas	23
F. Métodos para la determinación de yodo en sal y vitamina A en azúcar	23
1. Métodos Generales de análisis de yodo en material biológico	23
a. Análisis volumétrico de yodo en sal fortificada	23
b. Análisis de yodo en matrices biológicas o en alimentos	23
2. Métodos para la determinación de vitamina A en azúcar	25
IV. JUSTIFICACION	26
V. OBJETIVOS	28
VI. HIPOTESIS	28
VII. MATERIALES Y METODOS	29
A. Universales y muestra	29
1. Universales	29
2. Muestra	29
B. Recursos	29
1. Humanos	29

2. Físicos	29
3. Institucionales	30
C. Procedimientos	31
1) Determinación cualitativa de yodato de potasio en sal fortificada	31
2) Determinación cualitativa de palmitato de retinol en azúcar fortificada	35
3) Método espectrofotométrico de campo para la determinación de yodo en sal: UMS-Probador instantáneo	39
D. Diseño estadístico	41
VIII. RESULTADOS	43
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	56
X. CONCLUSIONES	61
XI. RECOMENDACIONES	63
XII. REFERENCIAS	65
XIII. ANEXOS	69

I. RESUMEN

Actualmente en muchos países del mundo se ha encontrado que la alimentación es insuficiente en muchos de los micronutrientes necesarios para el desarrollo del ser humano, un ejemplo de ello es el yodo, el cual al no encontrarse en una dieta normal puede causar padecimientos como retardo mental, bocio, idiotez, así mismo la vitamina A podría causar ceguera temporal y permanente, fallos en la respuesta inmunológica, hasta causar la muerte. Debido a ello los expertos en la salud alrededor del mundo han implementado diversos programas que aseguren que dichos micronutrientes sean ingeridos por las poblaciones que no tienen fácil acceso a los mismos, éstos son conocidos como programas de fortificación de alimentos.

En Guatemala estos programas están mandados por la Comisión Nacional para la Fortificación, Enriquecimiento y/o Equiparación de Alimentos (CONAFOR), creada por el Congreso de la República en 1992 (Decreto Ley # 44-92) cuyo propósito principal es coordinar y supervisar el buen desarrollo de los programas de fortificación de alimentos y en dicho decreto también se considera obligatoria la fortificación de alimentos con micronutrientes deficitarios en la población guatemalteca.

La CONAFOR está integrada por representantes del sector público (MSPAS, Economía, Gobernación, Finanzas y Agricultura), de las asociaciones o gremiales de los alimentos obligados a ser fortificados (a la fecha sal, azúcar y harina de trigo), la Asociación Liga del Consumidor (LIDECOM), y actúan como asesores la Universidad de San Carlos, UNICEF, y el INCAP/OPS. Actualmente en Guatemala existen tres programas de fortificación de alimentos, siendo estos: fortificación de sal con yodo, fortificación de azúcar con vitamina A y fortificación de harina de trigo con hierro, ácido fólico y vitaminas del complejo B.

Para dar a conocer la calidad y cobertura de los programas de fortificación de alimentos conjuntamente el Ministerio de Educación, UNICEF e INCAP han efectuado, desde 1995, la vigilancia de la calidad de la sal con yodo y azúcar con vitamina A en muestras colectadas en escuelas oficiales rurales mixtas del país; lo cual se realiza por medio de la recolección de muestras de sal y azúcar que los estudiantes traen de sus hogares, debido a ello el propósito principal de este estudio es desarrollar, caracterizar y validar métodos cualitativos de punto de corte fijo para la determinación de yodo en sal y vitamina A en azúcar en dos diversas concentraciones para cada uno de los micronutrientes, así como validar el método espectrofotométrico de campo para la determinación de yodo en sal: UMS probador instantáneo.

Dichos métodos permiten evaluar los programas de fortificación de alimentos minimizando el tiempo de trabajo y costos de los mismos, ya que actualmente se realiza el análisis de muestras de sal y azúcar de todo el país a través del programa de Escuela Centinela, el cual reúne aproximadamente 8,400 muestras, dicho análisis se realiza por el método cuantitativo de referencia en el cual todas las muestras que ingresan al laboratorio deben ser analizadas. Al tener metodologías cualitativas de punto de corte fijo dentro del laboratorio permitirá eliminar todas las muestras que no contengan la concentración mínima requerida que debe contener el alimento fortificado, ya que se realizará el análisis cualitativo previo a todas las muestras recolectadas.

Para el yodo se trabajaron dos concentraciones: 15 mg/Kg de yodo y a 20 mg/kg; la primera se refiere a la concentración mínima con importancia biológica, que debe contener la sal a nivel de hogares y la segunda es la concentración mínima vigente del reglamento de fortificación, donde regula la doble fortificación de la sal con yodo y flúor. En la parte del azúcar las concentraciones determinadas fueron 3.5 mg/Kg que es la concentración mínima

con importancia biológica en hogares y 5.0 mg/Kg el cual es mínimo de vitamina A que debe encontrarse en una muestra comercial. Se recolectaron 120 muestras de sal y azúcar previamente analizadas por el método cuantitativo dentro del laboratorio de bioquímica del INCAP, seleccionadas en diversos rangos de concentración y evaluadas tres veces al azar, utilizando para ello cada uno de los reactivos elaborados y a su respectiva concentración y tipo de muestra. De cada una de las determinaciones de las muestras analizadas al azar de cada analito y agrupadas posteriormente por rangos se obtuvo el porcentaje de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), así como el análisis de concordancia KAPA a través del estudio estadístico STATA versión 7.0 de cada una de las concentraciones a analizar.

En la concentración 15 mg/kg de yodo en sal, se estableció que el método de punto de corte fijo posee una sensibilidad del 92.42 %, especificidad del 86.12 %, VPP del 96.44 % y VPN 71.11 %. Al comparar los datos anteriores con el análisis de concordancia KAPA a través del estudio estadístico STATA versión 7.0, en el cual se determinó un KAPA medio de 0.70 con un rango de detección de 0.69 a 0.71, lo cual al analizarse indica que este valor se encuentra en un rango aceptable pero en el cual se debe verificar la metodología.

En la concentración de 20 mg/Kg se obtuvo una sensibilidad del 91.80 %, especificidad del 88.6 %, VPP 93.44 % y VPN 97.57%; al comparar con un KAPA medio de 0.81 con un rango de 0.75 a 0.88 refleja que existe una verdadera concordancia entre el método cualitativo y cuantitativo, por lo cual ambos métodos pueden ser utilizados indistintamente y detectarán la concentración de yodo en cuestión.

En la vitamina A se midió la concentración de 3.5 mg/Kg se obtuvo un porcentaje de sensibilidad del 89.36 %, especificidad del 96.39 %, VPP 95.15 % y VPN 91.55 %, al comparar con el análisis de concordancia KAPA se obtuvo un rango de 0.806 a 0.95 con un valor medio de 0.82, por lo cual indica que esta metodología puede ser utilizada libremente en la determinación de palmitato de retinol en cualquier muestra de azúcar; en la concentración del 5.0 mg/Kg la sensibilidad es de 98.87 %, especificidad del 94.69 %, VPP del 98.89 % y VPN del 94.44 %, en el análisis de la concordancia se obtuvo un KAPA medio de 0.925, dentro de un rango de 0.91 a 0.96 lo cual puede decirse que estos métodos son capaces de medir confiablemente las muestras, eliminando aquellas que no contengan dichas concentraciones, antes de realizar el análisis cuantitativo de cada una.

Puede decirse que al utilizar estas Metodologías Cualitativas de Punto de Corte Fijo, dentro del Laboratorio de Bioquímica Nutricional de Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), se podrán realizar muestras compuestas de todas aquellas muestras analizadas por estos métodos y de como resultado positivo ante dicha metodología, antes de ser analizadas por el método cuantitativo reduciéndose así costos y tiempo de elaboración del trabajo.

Para el método espectrofotométrico de campo UMS probador instantáneo se concluyó que este es un equipo capaz de detectar la presencia de yodo, pero no es un método confiable ya que posee una sensibilidad y exactitud muy pobre, ya que al analizado por el análisis de varianza, regresión lineal y coeficiente de concordancia este posee valores no significativos que permitan la utilización de este método, por lo que se recomienda evaluar el funcionamiento del equipo ya que este presenta fluctuaciones en el cambio de lectura.

II. INTRODUCCIÓN

Las deficiencias de micronutrientes, especialmente la de vitamina "A", yodo y hierro constituyen problemas de salud pública que afectan el bienestar y la salud de la población, disminuyen su productividad, aumentan significativamente el gasto en salud y representan un serio obstáculo para el desarrollo socio-económico en la mayoría de los países de América Latina y el Caribe (1).

Aunque en las últimas décadas algunos países han adelantado acciones para la prevención y control de algunas deficiencias de micronutrientes, no fue hasta 1990 que en la "Cumbre Mundial sobre la Infancia" se consolidó un compromiso político por parte de los gobiernos para dar atención prioritaria de las deficiencias nutricionales, entre ellas las de micronutrientes (2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), UNICEF, INCAP y otros organismos internacionales, también han promovido y apoyado acciones para la prevención y control de las deficiencias de micronutrientes en la región, incluyendo programas nacionales exitosos para el control de los desórdenes por deficiencia de yodo. La Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) ha venido promoviendo esfuerzos, patrocinando investigaciones y programas de acción para combatir la deficiencia de vitamina "A" (2).

Se han planteado diversas estrategias en la prevención de las deficiencias de los micronutrientes, una de ellas es la administración directa del micronutriente a la población conocida como suplementación; otra de las estrategias es la fortificación de alimentos en la cual el micronutriente es administrado como un aditivo a diversos alimentos. Guatemala utiliza la fortificación de alimentos con micronutrientes, como la principal intervención para prevenir las consecuencias de sus deficiencias. Así la sal es fortificada con yodo, el azúcar con vitamina A, y la harina de trigo con hierro y vitaminas del complejo B.

Con el objetivo de determinar la calidad y cobertura de los programas de fortificación de alimentos, el Ministerio de Educación, UNICEF e INCAP/OPS han efectuado, desde 1995, la vigilancia de la calidad de la sal con yodo y azúcar con vitamina "A", en muestras provenientes de hogares guatemaltecos, tomadas en las Escuelas oficiales públicas rurales del país, seleccionadas aleatoriamente para tener representación nacional por región, reconocidas como escuelas centinela.

Para asegurar el éxito de estos programas es importante realizar actividades continuas y permanentes de inspección, monitoreo y vigilancia; tomando muestras de alimentos para evaluar el contenido del micronutriente. Muchas veces al realizar dichas actividades es necesario tomar una acción rápida para obtener resultados que indiquen el desarrollo y cumplimiento de los programas de

fortificación, por lo que es necesario contar con metodologías analíticas rápidas y confiables que permitan la verificación del contenido de los micronutrientes en los alimentos fortificados.

Por tal razón es necesario contar con métodos de punto de corte fijo, en donde se puedan determinar rápidamente y a un costo bajo, si el alimento fortificado tiene la concentración mínima del micronutriente de interés, ya que el análisis de muestras recolectadas a través de las escuelas centinela permite determinar el cumplimiento de la calidad en los programas de fortificación implementados a nivel nacional.

Para poder utilizar dichas técnicas cualitativas de punto de corte fijo y ser utilizadas en investigación fue necesario que éstas metodologías se desarrollaran, caracterizaran y validaran de tal manera que al presentar resultados, éstos sean confiables y seguros. Su uso permitirá establecer los parámetros necesarios para el seguimiento del análisis cuantitativo de las muestras que ingresan al laboratorio; reduciéndose así el tiempo de realización de las pruebas mejorando la entrega de resultados, ya que al dar inicio al análisis de muestras utilizando el método cualitativo de corte de punto fijo se reduce en gran número el volumen de muestras a ser analizadas posteriormente por el método cuantitativo, permitiendo una reducción en el costo de muestras analizadas cuantitativamente.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades:

La importancia de los macronutrientes, entre los cuales encontramos a las proteínas, carbohidratos y grasa, quienes proporcionan elementos estructurales para el crecimiento, mantenimiento y desarrollo del cuerpo humano, así como la energía necesaria para su adecuado funcionamiento; sin embargo estos requieren de catalizadores para ser utilizados adecuadamente. Dichos catalizadores son los micronutrientes de los cuales se necesitan cantidades pequeñas; sin embargo la deficiencia de algunos de ellos es muy común, ya que los alimentos que los contienen son consumidos en cantidades insuficientes (3,7).

La deficiencia de Micronutrientes es uno de los problemas nutricionales de mayor prevalencia alrededor del mundo, estos constituyen una forma de desnutrición que muchas veces pasa inadvertida. Descubrimientos han demostrado que las deficiencias subclínicas de micronutrientes pueden tener un efecto negativo en el funcionamiento del organismo, disminuyendo la capacidad de esfuerzo físico, las funciones cognitivas e inmunes. Los efectos adversos son permanentes en la salud, crecimiento, desarrollo normal del ser humano, repercutiendo en la capacidad productiva, calidad de vida y en la supervivencia del mismo (8,9).

La dieta de los guatemaltecos es deficiente en algunos micronutrientes esenciales tales como yodo, vitamina A, hierro, y posiblemente también ácido fólico, riboflavina, vitamina B-12 y cinc. La deficiencia de yodo provoca en los infantes retraso mental irreversible, sordomudez, cretinismo e idiotez; en los adultos, aletargamiento mental y físico además de bocio. La deficiencia de vitamina A causa no sólo patologías oculares que conducen a la ceguera temporal o permanente, sino que también daña el crecimiento físico y la respuesta inmunológica del organismo, haciendo que el individuo esté más propenso a enfermarse y por consiguiente, en el caso especialmente de los infantes y niños, aumenta los índices de mortalidad (1,3,43).

Existen muchas razones por las cuales el estado nutricional de micronutrientes esenciales como el yodo y la vitamina A es inadecuada, en las que se pueden incluir pobreza y bajo poder adquisitivo de la población, falta de educación nutricional que oriente el consumo de alimentos, baja producción local de alimentos fuente de micronutrientes, disminución de la energía total consumida, condiciones de salud y saneamiento ambiental deficientes (4,5,6).

Aunque en las últimas décadas algunos países han adelantado acciones para la prevención y control de algunas deficiencias de micronutrientes, no fue hasta 1990 que en la "Cumbre Mundial sobre la Infancia" se consolidó un compromiso político por parte de los gobiernos para dar atención prioritaria de las deficiencias nutricionales, entre ellas las de los micronutrientes. Posteriormente, este compromiso político se ratificó oficialmente en reuniones internacionales (10). Para fines de este estudio nos referiremos especialmente al yodo y vitamina "A".

B. YODO

1. Definición

El yodo es reconocido desde hace mucho tiempo como un nutriente esencial para el hombre y ha sido el elemento traza más intensamente estudiado (11). El elemento yodo (I), del grupo VII de los halógenos, ocupa el lugar 61 en orden de abundancia en la corteza terrestre, lo cual representa un 0.4% de la masa de la tierra, es uno de los elementos no metálicos más escasos y con la distribución más dispareja. Se le encuentra sólo ocasionalmente en su forma libre en vientos marinos o ciertos depósitos minerales (12).

El yodo (ioeions = color violeta) es así mismo un componente de las sales disueltas en el agua de mar; es considerablemente más reducida que la de cloruros y bromuros. En algunas algas marinas existe yodo acumulado; en las cenizas de estas algas se encuentra como yoduro potásico, el cual puede purificarse por cristalización. Ahora bien, los yacimientos principales de yodo son los de Chile, en los que el yodo se encuentra en forma de iodato sódico (NaIO_3) mezclado con el nitrato de sodio (NaNO_3) (13).

2. Propiedades del yodo:

La única función que desempeña el yodo en la economía del organismo es la de componente esencial de las hormonas tiroideas, que son indispensables para el desarrollo. El principal producto de secreción de la glándula tiroidea es la tiroxina, que contiene cuatro átomos de yodo. En la periferia, esta hormona se transforma en la principal sustancia metabólicamente activa, la triyodotironina, cuya única diferencia con la primera es la eliminación de un átomo de yodo (14).

El yodo está presente en el organismo en pequeñas cantidades. El papel nutricional del yodo proviene de la importancia de las hormonas tiroideas en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de un estado metabólico normal, tanto en humanos como en animales. La deficiencia de este elemento en la dieta provoca desórdenes causados por la alteración de la función de estas hormonas en el organismo (12,14, 55).

3. Absorción, transporte, almacenamiento:

El yoduro inorgánico se absorbe rápidamente y casi por completo en el estómago y parte superior del intestino delgado. Las formas orgánicas del yodo sufren una degradación variable en el intestino, con absorción del yodo así liberado, aunque algunas pueden absorberse intactas. El yodo absorbido penetra en un espacio de distribución aproximadamente igual al del volumen del líquido extracelular, aparece en la sangre en forma libre y dializable. No se une a las proteínas de la sangre pero es captado rápidamente por la tiroidea y el riñón. (15,56).

Su concentración plasmática depende del aporte y de la tasa de depuración. El riñón depura el yodo plasmático a razón de 30 ml por minuto. Mientras que la depuración por la tiroidea depende de la historia de captación del elemento. Las glándulas salivales excretan pequeñas cantidades de yodo y

proporciones aún menores aparecen en el plexo coroideo, las lágrimas y el sudor. La acción de la tiroides en cuanto a la extracción del yodo de la sangre, la síntesis y almacenamiento de hormonas tiroideas está controlada por la hormona tirotrópica, secretada por la hipófisis, a su vez controlada por el nivel de hormona tiroidea circulante. Casi el 80% de la Hormona tiroidea conocida como tiroxina que posee cuatro átomos de yodo, es absorbida sin cambios y el resto se pierde por las heces. De esta forma, el sistema tiroideo está orquestado por un grupo de complejas interrelaciones de retroalimentación entre el aporte de yodo, la síntesis y secreción de hormona, la secreción hipofisaria de tirotrópica y la secreción de la hormona liberadora de tirotrópica por el hipotálamo. El control no se ejerce sobre la absorción en el intestino sino sobre la excreción renal de yodo, del cual aproximadamente el 90% ingerido, es excretado en la orina (8,15,16).

A efectos prácticos, el único lugar de almacenamiento de yodo es la glándula tiroides, donde se encuentra casi por completo en las formas mono y diiodotirosina y tiroxina, con una pequeña fracción de triiodotironina. En la tiroides se almacenan grandes cantidades de yodo en forma de hormona o de precursores hormonales. Cuando el aporte de yodo ha sido abundante, pueden encontrarse de 10 a 20 mg de yodo, mientras que en casos de deficiencia crónica el contenido es mucho más variable. Por tanto, si la deficiencia se prolonga y no se corrige, el contenido de yodo en la tiroides puede reducirse a 200 µg o menos (16,17,53).

4. Fuentes alimenticias

Los océanos son la fuente primaria de yodo en el mundo. El yodo del mar es transportado a través de la lluvia, el cual precipita en el suelo, en algunos casos es lavado de éste y acarreado nuevamente al mar; lo que se conoce como ciclo del yodo; en otros casos es absorbido por alimentos que crecen en el suelo donde ha llegado este micronutriente a través de la lluvia. Nutrientes como el hierro, calcio, vitaminas y el yodo no se encuentran presentes en forma natural en los alimentos los cuales al ser analizados, éstos pueden estar o no presentes en algunos alimentos, ya que han sido absorbidos del suelo que los contiene (17,52).

La principal fuente de yodo es la comida proveniente del mar como de mariscos y aceites de pescado, también puede encontrarse en alimentos de origen animal en carnes, huevos y leche. El contenido del yodo en frutas y vegetales va a depender de la concentración de yodo del suelo de donde provienen dichos vegetales, se conoce que la espinaca posee el mayor contenido de yodo, aprox. 201 µg/kg en comparación con otros vegetales (18). El contenido de yodo en la mayoría de alimentos es muy bajo, así como en la sal común, esto puede deberse a que éste se pierde en forma de moléculas volátiles, durante el proceso de refinación de la sal, por lo que se ha recurrido a la fortificación y suplementación para poder consumir dicho nutriente (12,18).

5. Requerimientos nutricionales y recomendaciones dietéticas

El yodo es un elemento traza, es un micronutriente esencial que se necesita en pequeñas cantidades. El cuerpo de un adulto normal contiene de 15-20 mg de yodo. La mayor parte del yodo es almacenado en la glándula tiroides. La ingesta normal y requerimiento por día es 100-150 μg , el exceso de yodo es excretado por el riñón. La tiroides debe retener aproximadamente 60 μg de yodo al día para mantener un adecuado suplemento de tiroxina. Cuando el cuerpo recibe una suplementación insuficiente de yodo, la producción de hormonas tiroideas se ve afectada (14,18, 51).

Los requerimientos dietéticos diarios recomendados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) son:

Cuadro 1

Recomendaciones Dietéticas Diarias de Yodo

Cantidad Recomendada	Edad (años)
50 μg	Recién nacidos, primeros 12 meses de edad
90 μg	Niños entre 2-6 años de edad
120 μg	Niños entre 7-12 años de edad
150 μg	Para adolescentes y adultos, arriba de 12 años
200 μg	Para mujeres embarazadas y lactantes

Fuente: Hurrell, R. The Mineral Fortification of Foods. (1999) (19)

Los requerimientos de yodo se han re-evaluado y agrupado en varios grupos según la edad y sugieren que los requerimientos dietéticos diarios para recién nacidos o niños menos de 12 meses de edad debe incrementarse a 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ y la ingesta óptima para los adolescentes y adultos debe ser de 150 $\mu\text{g}/\text{día}$, así como en mujeres embarazadas debe ser de 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ (19,20, 21).

6. Función Fisiológica

Dado que el yodo tiene su función fisiológica en el sistema tiroideo, se han establecido los requerimientos mínimos de yodo usando el sistema tiroideo como indicador del estado nutricional de yodo (12). La hormona tiroidea tiene múltiples funciones como reguladora de la actividad y el crecimiento celular. Influye en el crecimiento, emigración de las neuronas y en el desarrollo de sus prolongaciones dendríticas, también estimula el crecimiento y maduración de tejidos periféricos. No existen pruebas de que el yodo, por sí mismo, desempeñe papel alguno en el crecimiento, desarrollo o función fisiológica, salvo a través de la hormona tiroidea.

Esta hormona interviene también de manera importante, en el flujo de energía metabólica de la mayor parte de las células del organismo, el indicador más habitual de esta función es el índice de metabolismo basal (12,14,55).

7. Deficiencia

La deficiencia de yodo en animales y en el hombre tiene consecuencias importantes tanto para el desarrollo embrionario como para el postnatal, las cuales se han reunido bajo el término de "trastornos por deficiencia de yodo". Estos trastornos constituyen una de las enfermedades más importantes y prevalentes de la humanidad, la deficiencia de yodo es la causa más prevalente de retraso mental evitable en el mundo (20,22,55). La razón de esta prevalencia se debe a la escasez de yodo existente en los suelos de la mayor parte del mundo y en especial, en los que han sido lavados por glaciares e inundaciones repetidas (17).

El peso de la glándula tiroides de las personas que reciben un aporte suficiente de yodo oscila entre 15 y 20 gramos. Cuando hay escasez, se produce un incremento compensador de la depuración del elemento por la glándula, con aumento de la secreción de tirotrópina y del tamaño de la tiroides (22).

Una dieta deficiente en yodo afecta a todas las personas de cualquier edad, pero en particular a mujeres embarazadas, fetos en desarrollo y neonatos (23), los desórdenes por la deficiencia de yodo incluyen: cretinismo caracterizado comúnmente por deficiencia mental, sordomudez, aletargamiento y reducción de la capacidad mental, alteraciones en la fisiología general y muerte fetal y bocio. El bocio caracterizado por el aumento en tamaño de tiroides, puede darse a cualquier edad (3,17,24).

8. Estrategias para combatir la deficiencia de yodo y Prevención

La deficiencia de yodo es fácil de corregir, las poblaciones afectadas pueden recibir el yodo como un aditivo a la comida o el agua por medio de la fortificación o por administración directa conocida como suplementación. Los programas de fortificación son más prácticos a gran escala, particularmente si el vehículo alimentario es fácilmente controlable (24,50).

La experiencia a mostrado que la yodización de sal es el método más eficiente que provee este micronutriente a todos los seres humanos, ya que es utilizada todos los días en la preparación de alimentos. Además, las técnicas de yodización son sencillas y no muy costosas, no se afectan las propiedades organolépticas y la sal fortificada es bien aceptada por los consumidores (13,46).

Los compuestos de yodo más usados para fortificación de la sal son el yoduro de potasio (KI) y el yodato de potasio (KIO_3). Se recomienda utilizar el yodato de potasio cuando la sal a fortificar tiene cierto grado de impurezas, es almacenada y transportada en excesiva luz, calor, humedad o no es consumida de inmediato. Arroyave y colaboradores (1995) mostraron la estabilidad del yodato de potasio en la sal de uso común en Guatemala. Aunque el yoduro de potasio es más barato, es menos estable ya que se oxida rápido cuando se expone a altas temperaturas y humedad (25,26).

Otros vehículos alimenticios pueden ser utilizados tales como: pan, leche, agua y azúcar, los cuales son utilizados en situaciones altamente seleccionadas. En situaciones endémicas severas, es necesario utilizar la ingesta oral o inyectar intramuscularmente aceite yodado, ya que contiene una concentración de 480 mg de yodo unido covalentemente a 1 ml de aceite vegetal (8,17,24).

Guatemala junto con muchos otros países del mundo, se comprometió a la eliminación de la deficiencia de yodo para el año 2015, dichos compromisos han sido ratificados en los siguientes foros internacionales:

- Cumbre Mundial de la Infancia (Nueva York, 1990)
- La Conferencia sobre los Derechos Alimentarios del Hombre (Barcelona, 1992).
- Conferencia Internacional de la Nutrición (Roma, 1992)
- Acabando con el Hambre Oculta (Montreal, 1992)
- Cumbre Mundial de la Alimentación (Roma, 1996)
- Cumbre del milenio de las Naciones Unidas (Washington, 2000)
- Cumbre Mundial sobre Alimentación (México, 2002).

En estudios realizados se observó que en Guatemala existe una evidencia de deficiencia de yodo desde la época precolombina. En 1952 se reportó una prevalencia de bocio endémico del 38 % a nivel nacional. Como una medida de salud pública dos años después se inició un programa de fortificación de la sal. Posteriormente en la encuesta nacional de 1967 se encontró que la prevalencia había descendido en un 5%, por falta del adecuado control a este programa, los resultados posteriores a ese año han sido oscilantes, en el año de 1979 la deficiencia del yodo se incrementó a nivel nacional de 10.9% y en 1987 llegó a 20.4%. En la Encuesta Nacional de Micronutrientes del año 1995 se determinó la cantidad de yodo presente en muestras de sal y se observó que la región que no alcanzó el límite inferior de la norma nacional fue en el nororiente con un 77.3 % y en el departamento de Guatemala el 50.5 % contenía yodo en la sal. Además se evaluó por lugar de residencia, el mayor porcentaje de muestras de sal con más de 30 ppm correspondió al departamento de Guatemala con un 60 % de yodo en muestras de sal analizadas (9,57,58).

Guatemala cuenta con una organización legalmente establecida, La Comisión Nacional de Alimentos Fortificados (CONAFOR), creada por el Congreso de la República en 1992 bajo el Decreto Legislativo 44-92, Ley de Fortificación de Alimentos, con el propósito de coordinar y supervisar el buen desarrollo de los programas de fortificación de alimentos. La CONAFOR está integrada por representantes del sector público (MSPAS, Economía, Finanzas, Gobernación y Agricultura), de las asociaciones o gremiales de los alimentos obligados a ser fortificados (a la fecha sal, azúcar y harina de trigo), la Asociación Liga del Consumidor (LIDECON). Y actúan como asesores la Universidad de San Carlos, UNICEF y el INCAP/OPS. La CONAFOR se reúne sistemática y continuamente desde su creación, y ha contribuido a la defensa, divulgación y búsqueda de la calidad de los programas de fortificación de alimentos (3,27).

Tomando en cuenta que el consumo promedio de sal es igual a 10.8 g por persona por día, se ha establecido que la concentración mínima de yodo en la sal que es consumida en los hogares debe ser de 15 mg/Kg equivalente a 150 mcg de yodo por día. Anteriormente se estableció en la legislación según el acuerdo gubernativo No. 496-93 que la sal común a la venta debía de contener de 30-100

mg/kg. Actualmente se encuentra en vigencia el nuevo reglamento para la doble fortificación de la sal con yodo y flúor, en dicho reglamento se contempla que la sal debe ser fortificada con una concentración mínima de yodo 20 mg/kg y 60 mg/kg según el acuerdo gubernativo No. 123-2004 aprobado en enero del año 2004. (3,27).

C. VITAMINA A

1. Definición

Las vitaminas son necesarias en pequeñas cantidades para la regulación del metabolismo del cuerpo humano. Son sustancias orgánicas las cuales el cuerpo humano es incapaz de fabricar en cantidades suficientes por lo que debe de obtenerlas a través de alimentos que la contengan. La vitamina A, es una de las 13 vitaminas esenciales para la salud del ser humano, es un componente orgánico que se encuentra en los alimentos. Ésta es necesaria para la visión, crecimiento y desarrollo, funciones inmunes y otros procesos importantes de la vida humana (28,29).

La vitamina A es una sustancia lipo-soluble, la cual se encuentra en la naturaleza en dos formas principales: retinol y carotenoides. El retinol es la forma activa, y algunos compuestos carotenoides son los que dan a las frutas y vegetales su color amarillo, naranja o rojo, los cuales tienen actividad de precursores de vitamina A, cuando son convertidos a retinol dentro del cuerpo del ser humano. El carotenoide con el más alto valor de vitamina A es el beta-caroteno, sin embargo, la conversión de carotenos a vitamina A es más baja de lo que antiguamente se creía, ya que solo cerca de 50 de los 600 carotenoides que se encuentran en la naturaleza se convierten en vitamina A. Sin embargo se sabe que la conversión de beta-caroteno a retinol es menor a lo que se conocía, en una dieta mixta es aproximadamente 12:1 de carotenos y 24:1 de otros carotenoides pro vitamina A (28, 47).

2. Propiedades de la vitamina A

Desde su descubrimiento en los años 1920s, la vitamina A se ha encontrado asociada con la actividad anti-infecciosa en modelos animales. Es relativamente estable al calor y la luz, sin embargo se destruye por oxidación, el cocimiento aumenta la biodisponibilidad de carotenos, pero cuando es excesivo la disminuye notablemente. Es necesaria para el crecimiento y desarrollo del esqueleto, para el mantenimiento de las células de las mucosas, de los epitelios, de la piel, y para el funcionamiento de todos los tejidos, incluyendo el esmalte de los dientes. Tiene acción esencial en los procesos inmunológicos, previniendo infecciones respiratorias, además cumple función en la reproducción normal. Es uno de los principales antioxidantes que se encuentran en la naturaleza, es un elemento esencial en la lucha contra radicales libres. La deficiencia de la vitamina A se acompaña de queratinización de mucosas que recubren las vías respiratorias, digestivas, urinarias, de la piel y del epitelio de los ojos, fenómeno que reduce la función de barrera de estas membranas como protectoras del cuerpo contra infecciones (10).

3. Absorción, transporte y almacenamiento

Gracias a su sistema conjugado de enlaces dobles, la vitamina A absorbe muy bien la luz natural, en consecuencia sus longitudes de onda de máxima absorción en etanol es de 325 nm. Estas propiedades espectroscópicas se usan fundamentalmente para cuantificar la vitamina A y los

carotenoides en tejidos y en preparados farmacéuticos. En los alimentos, la mayor parte de la vitamina A preformada se encuentra en forma de éster retinil. Durante la digestión proteolítica que se produce en el estómago, el éster retinil y los carotenoides provitamina A contenidos en los alimentos se liberan y forman agregados junto con otros lípidos (29).

En el intestino delgado, la acción combinada de la esterase biliar y pancreática hidroliza los ésteres de retinol y los carotenoides (xantófilos). Junto con los carotenoides hidrocarbonados, el retinol y los carotenoles son transportados en forma de micelas a través del plasmalema de las células epiteliales absorbentes de la vellosidad intestinal (30).

La eficiencia de la absorción de la vitamina A de la dieta en las personas sanas que ingieren importantes cantidades de grasa (>10 g/día) es >80%. La eficacia de la absorción de los carotenoides de los alimentos oscila entre 1:12 y 1:24, lo que limita su utilidad como fuentes únicas de vitamina A (43). La absorción intestinal de estos compuestos depende mucho más de la presencia de sales biliares que de la de vitamina A.(30). En el interior de la célula epitelial intestinal, el retinol producido por la separación de los carotenoides se une a una proteína captadora de retinoides (CRP o PCR), la proteína captadora de retinoides (CRP) tipo II, a continuación así ligado se reduce a retinol unido, este junto con una pequeña proporción de retinol no esterificado, carotenoides hidrocarbonados y xantófilos, se incorpora a los quilomicrones con carotenoides y vitamina A asociados. Estos remanentes son captados fundamentalmente por las células parenquimatosas del hígado y hasta cierto punto, por las de otros tejidos (29,30).

Solo cuando existe una clara depleción de las reservas hepáticas de vitamina A se produce una disminución significativa de las concentraciones de retinol en el plasma. Los carotenoides hidrocarbonados se asocian sobre todo a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), mientras que los xantófilos se distribuyen de una manera más uniforme entre las LDL y las de alta densidad (HDL). El β -caroteno suele constituir de 15 % a 30% del total de carotenoides en el plasma (30,31).

En las personas y animales bien nutridos, más de 80% de la vitamina A se encuentra almacenado en unos glóbulos especiales de estas células. La vitamina A pasa de las células parenquimatosas a las estrelladas en forma de retinol, para ser re-esterificada y almacenada, cuando debe ser usado, el éster retinil es hidrolizado a retinol, que se une a la proteína captadora de retinoides (CRP) y se libera hacia el plasma. En estado de depleción de la vitamina A, las cantidades relativas de vitamina A contenidas en el riñón y en casi todos los tejidos restantes aumentan en comparación con las del hígado(29,30).

4. Fuentes alimenticias

La vitamina A se puede obtener de dos fuentes: animal y vegetal. Las fuentes alimentarias más comunes de vitamina A preformada de origen animal son el hígado, distintos productos lácteos como la leche, el queso, la mantequilla y los helados, a base de leche, clara de huevo, además de pescados como los arenques, las sardinas y el atún. Otras fuentes son el hígado de pescado como el tiburón,

peces marinos como el bacalao o el mero. Entre las fuentes habituales de origen vegetal de carotenoides (pro vitamina A), se encuentran las zanahorias, la calabaza amarilla, las verduras de hoja oscura como la lechuga y espinaca, maíz, brócoli, tomate, melón y papaya. (3,28,29).

A diferencia del yodo para la vitamina A hay más fuentes naturales de las cuales se puede obtener, sin embargo, no hay que olvidar que los alimentos con mayor cantidad y mejor biodisponibilidad de este micronutriente son de origen animal, productos de más alto costo y menor consumo dentro de la población de escasos recursos, por lo tanto, tampoco en el caso de la vitamina A la dieta se asegura un aporte constante y satisfactorio (33).

5. Requerimientos nutricionales y recomendaciones dietéticas

La cantidad diaria media de vitamina A que los individuos sanos deberían ingerir depende de su edad, masa corporal, actividad metabólica y circunstancias especiales, como el embarazo y la lactancia. También debe definirse el punto crítico operativo, es decir, si se trata solo de prevenir la deficiencia o si hay que proporcionar también una reserva corporal adecuada. Si se pretende recomendar una ingesta que cubra las necesidades de segmentos específicos de una población, hay que tomar en cuenta la heterogeneidad de la misma (32,48).

Los cantidades de vitamina A en alimentos y suplementos es comúnmente expresado en Unidades Internacionales (UI). La actividad de la vitamina A es también expresada como Equivalentes de Retinol (RE), esta es una unidad creada para estandarizar la medición de la variable actividad de las diversas fuentes de vitamina A, por definición un equivalente de retinol (RE) es igual a:

$$\begin{aligned} 1 \text{ RE} &= 1 \text{ mg de retinol} \\ &= 3.3 \text{ IU de la actividad vitamínica del retinol} \\ &= 10 \text{ IU de la actividad vitamínica de los beta-carotenos (28,29).} \end{aligned}$$

Además, pudiéndose encontrar otras dimensionales para la expresión de un equivalente de retinol RE = Equivalentes de Retinol

$$\begin{aligned} 1 \text{ RE} &= 1 \mu\text{g retinol} = 1 \text{ RE} \\ &= 1 \mu\text{g } \beta\text{caroteno} = 0.167 \mu\text{g RE} \\ &= 1 \mu\text{g de otra provitamina A} = 0.084 \mu\text{g RE (44,45).} \end{aligned}$$

Las recomendaciones expuestas, se denominan "Ingesta Segura Recomendada", y no Ingesta de Nutriente Recomendada o RNI. Este nivel de ingesta se ajusta para prevenir signos o deficiencias clínicas, permitir un crecimiento normal, pero no es adecuado para períodos prolongados de infección u otros tipos de estrés (45,46).

Cuadro 2

Recomendaciones Dietéticas Diarias de Vitamina A

EDAD	RDD (mcg ER/día) Nivel Seguro
Ambos sexos	
0-1	350
1-6	400
6-10	400
10-12	500
12-15	600
Mujeres	
15-18	500
Mayores de 18	500
Embarazadas	600
Lactantes	850
Hombres	
15-18	600
Mayores de 18	600

Fuente: FAO/OMS. Requirements of vitamin A, folate and B12. (1988). (45,46,47),

6. Función fisiológica

La función más conocida de la vitamina A es la visión, cuando la luz entra en el ojo, es activado y absorbida por el pigmento visual rodopsina (morado visual), en cual consiste en un complejo vitamínico con vitamina A (específicamente retinaldehído). La luz rompe este complejo, y un estímulo eléctrico es enviado al cerebro donde es interpretado como una imagen. También participa en la diferenciación celular, por medio de un programa interno dentro de las células permitiéndoles su desarrollo y acarreamiento para realizar funciones especializadas. El desarrollo embrionario y crecimiento son otras funciones en las que participa esta vitamina. Por otro lado la vitamina A interviene en muchos otros procesos fisiológicos, entre ellos la espermatogénesis, la respuesta inmunitaria, el gusto, la audición, el apetito. Casi todos ellos dependen directa o indirectamente, de la diferenciación celular (28,29,34).

7. Deficiencia

La deficiencia de vitamina A es un grave problema de salud pública en los países menos industrializados. Se calcula que cada año pierden la visión 500,000 niños en edad pre-escolar por deficiencia de esta vitamina (32).

Los signos habituales de la deficiencia de vitamina A son la ceguera nocturna y la xeroftalmía, en los niños pequeños los signos clínicos de mayor valor diagnóstico son las manchas de Bitot, que son acumulaciones blancas espumosas de detritos celulares que suelen aparecer en el cuadrante temporal de la conjuntiva (27).

El estado de insuficiencia de vitamina A suele asociarse a la mal-nutrición proteino-calórica, a las ingestas pobres en lípidos, a los síndromes de mala absorción de grasas y a las enfermedades febriles. En la población adulta, las madres lactantes son las que corren mayor riesgo (4,5,32).

Actualmente, se considera que la deficiencia de vitamina A incluyendo las formas clínicas y subclínicas moderadas o severas existen en 60 países alrededor del mundo. De acuerdo, con estimaciones de la OMS de 70-80 millones de mujeres y niños sufren de deficiencia de esta vitamina. Se estima que 190 millones de niños están en riesgo de sufrir deficiencia de vitamina A, 40 millones de ellos tiene una deficiencia medible bioquímicamente y 13 millones tiene síntomas oculares (33,49).

El estado del organismo en cuanto a la deficiencia de vitamina A puede clasificarse en cinco categorías: deficiente, marginal, satisfactorio, excesivo y tóxico. El deficiente se da cuando hay presencia de signos clínicos evidentes, el estado marginal es cuando la deficiencia de vitamina A (DVA) es sub-clínica. Satisfactoria implica la ausencia de signos clínicos, en esta se está en capacidad de llevar a cabo todas las funciones fisiológicas que dependen directa o indirectamente de la vitamina A, además hay una reserva corporal suficiente para cubrir necesidades en situaciones de estrés y disminución de la ingesta. Excesivo se encuentra en casos de ingesta levemente elevada a los requerimientos diarios. Tóxico, cuando la ingesta es excesivamente elevada y causa daños en el organismo (29).

8. Estrategias para combatir la deficiencia de vitamina A y Prevención

La dieta actual del ser humano en la mayoría de los países en desarrollo del mundo es deficitaria en proteínas y energía, también en micronutrientes, principalmente yodo, hierro y vitamina A. La solución de la deficiencia de micronutrientes es más fácil de obtener que la deficiencia de macronutrientes, razón por la cual la mayor parte de los gobernantes del mundo se comprometieron desde 1990 a erradicar, para el año 2015, la deficiencia de yodo y vitamina A. Durante los últimos años, la fortificación de alimentos ha recibido considerable atención ya que se percibe como una de las estrategias más sostenibles para alcanzar esta meta. Centro América buscó medios para prevenir y controlar la deficiencia de la vitamina A en su población y desarrollo en los años setenta la fortificación del azúcar con este nutriente. Actualmente esta práctica es aplicada como programas nacionales en Guatemala, Honduras, El Salvador, y Zambia (2,3,48).

El consumo de alimentos vegetales presuntamente fuente de carotenoides bioconvertibles a retinol, no es suficiente para llenar las necesidades diarias de vitamina A. En la actualidad no es muy bien conocida con exactitud la magnitud real de esta deficiencia a nivel de la población total del país, pero información derivada de áreas representativas de la misma indica que la condición nutricional general de la población se ha mantenido estable en los últimos años (34). Para lograr la erradicación de la deficiencia de vitamina A, el programa de Bioquímica Nutricional de la División de Nutrición y Salud, del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), planteó en el año de 1989, un enfoque a

desarrollarse secuencialmente en las siguientes etapas: 1. Tratamiento a la población de niños menores de 6 años con dosis altas de vitamina A (200.00 IU), para asegurar el establecimiento de una reserva hepática adecuada. 2. La fortificación de azúcar con vitamina A, para que su consumo asegure una suficiente ingesta diaria para el grupo de población a mayor riesgo, en base a cifras de adecuación de ingesta dietética diaria (2,45).

Una de las estrategias que proporcionó una mejor actividad en relación costo-beneficio fue la fortificación del azúcar con vitamina A. Guatemala fue el primer país del mundo en poner en práctica dicha estrategia, desarrollando así el programa más grande y de mayor cobertura en Centroamérica, obteniéndose con ello un impacto positivo en la disminución de dicha deficiencia. Algunos indicadores indirectos evaluados para determinar el impacto del programa como: evolución de la ceguera infantil en Guatemala antes y después del reinicio del programa; relación entre desnutrición crónica y deficiencia de vitamina A, y reducción de la tasa de mortalidad infantil han experimentado una franca mejoría a tal punto que la deficiencia de vitamina A (DVA), ha dejado de ser un problema de salud pública para el país (1,46).

La Encuesta Nacional de Micronutrientes realizada en 1965-67 reveló deficiencia de vitamina A en 26.5 %, mediante la identificación de niveles de retinol en plasma por debajo de 20 mcg/dl, en 1975, se obtuvo un resultado del 21.5 %, dos años después el programa descendió hasta un 9.2 %. Posteriormente en 1987 se obtuvo un 21.6 % de niveles de retinol en plasma inferiores a 20 mcg/dl (9,57,58). En 1995 se clasificó la deficiencia de vitamina A como moderada ya que la prevalencia de niveles de retinol en plasma se encontraba por debajo de 20 mcg/dl lo que representó un 15.8 %, por otro lado en las muestras de azúcar recolectadas en hogares de todo el país se obtuvo un 85,9% de presencia de retinol (9,57,58).

La Ley de Fortificación de Alimentos, en el Acuerdo Gubernativo No. 021-2000 legisla la fortificación del azúcar con vitamina A. Los niveles de fortificación establecidos con un contenido mínimo de vitamina A de 5 mg/kg durante su vida de comercialización, los niveles para realizar fortificación en los ingenios son de 15 mg/kg \pm 5 mg/kg. Este acuerdo permite el ingreso de azúcar sin fortificar al país, para ser vitaminada dentro del territorio (3,27). El promedio de ingesta de azúcar en el país es de 67.5 gramos por día por persona, los programas de fortificación deben ajustarse para aportar entre 400 a 500 mcg de vitamina A por día efectivamente consumidos, por lo que al analizar muestras provenientes de los hogares una vez obtenidas por el consumidor se busca que éstas contengan una concentración de 3.5 mg/kg como mínimo al ser analizados, ya que este es el mínimo requerido biológicamente útil al ser consumido por el ser humano (3,27,35).

D. Programa Escuela Centinela Micronutrientes

Desde 1995, con el objetivo de determinar la calidad y cobertura de los programas de fortificación de alimentos, en Guatemala el Ministerio de Educación, UNICEF e INCAP/OPS han efectuado la vigilancia de la calidad de la sal con yodo y azúcar con vitamina A, en muestras que los niños que asisten a escuelas oficiales rurales mixtas del país llevan de sus hogares. Esta estrategia ha

probado ser económicamente sostenible y relativamente fácil de repetir. Gracias a este sistema se tiene información sobre la situación de la fortificación del azúcar con vitamina A y sal con yodo desde 1995. En promedio durante estos años el contenido de vitamina A en azúcar ha sido de 7.0 mg/kg y cercano del 80% de las muestras cumplen con la ley. La situación ideal es que por lo menos el 80% de las muestras presenten niveles de vitamina A iguales o superiores a 5 mg/kg. Con base en los resultados presentados se puede decir que a nivel nacional, el programa de fortificación de azúcar está cerca de alcanzar la meta. Por lo tanto, este programa se constituye como uno de los programas más exitosos en la salud pública de Guatemala (1,29,35,36,37).

El Programa de Escuela Centinela Micronutrientes dio inicio desde 1995, en 420 Escuelas Oficiales Rurales Mixtas de nivel primario, seleccionadas aleatoriamente del Listado Oficial del Centro de Computo del Ministerio de Educación. Las escuelas se encuentran distribuidas en las ocho regiones y 22 departamentos de todo el país. Cubre una población aproximada de 100,000 escolares y 2,620 maestros y directores del sector oficial (1,36).

Se efectúa una vigilancia de calidad de alimentos fortificados, se lleva a cabo recolectando aproximadamente 20 gramos de muestras de sal y azúcar de los hogares, por medio de 20 niños seleccionados al azar. Las muestras son llevadas por el director y un maestro de la escuela, ante personal de UNICEF o del Ministerio de Educación, los cuales trasladan todas las muestras recolectadas al Laboratorio de Bioquímica Nutricional de INCAP/OPS para las determinaciones respectivas de yodo en sal y retinol en azúcar (1,36,37).

Por lo cual a partir de 1995, a través los datos obtenidos de dichos muestreos, revelaron que el programa de fortificación de sal cayó a niveles inaceptables, los cuales permiten evaluar las medidas que se deben tomar ante este programa de fortificación (cuadro 3) (33,36,37).

Cuadro 3

Evolución de la Cobertura y Calidad del Programa de Fortificación de Sal con Yodo en Guatemala (1995-2002)

AÑO	COBERTURA ¹ (%)	RANGO LEGAL ² (%)	CONTENIDO ³ (mg/Kg)
1,995	85	56	26.0
1,996	49	4	15.0
1,997	79	52	38.0
1,998	53	20	22.0
1,999	46	9	16.0
2,000	53	17	20.0
2,001	36	19	23
2,002	26	40	30

(1) Muestras con presencia de yodo a niveles biológicamente importantes (≥ 15 mg yodo /Kg de sal).

(2) Muestras que cumplen con la norma de fortificación establecida: 30-100 mg yodo /Kg de sal.

(3) Concentración promedio de yodo en las muestras obtenidas a través de las escuelas. (1,59).

Al igual que en el programa de fortificación de yodo, se han registrado datos que permiten obtener una idea más clara sobre el funcionamiento del programa de fortificación de azúcar con vitamina A (cuadro 4).

Cuadro 4

Evolución de la cobertura y Calidad del Programa de Fortificación de Azúcar con Vitamina A en Guatemala (1995-2002)

AÑO	COBERTURA ¹ (%)	RANGO LEGAL ² (%)	CONTENIDO ³ (mg vit. A/Kg)
1,995	82	51	6.6
1,996	97	79	7.0
1,997	96	75	6.9
1,998	98	76	6.9
1,999	98	80	7.9
2,000	99	79	7.5
2,001	90	82	9.3
2,002	88	42	7.4

(1) Muestras con presencia de Vitamina A (≥ 1.5 mg vit A/Kg de azúcar).

(2) Muestras que cumplen con la norma de fortificación establecida: 5-20 mg de vita A /Kg de azúcar.

(3) Concentración promedio de vitamina a en las muestras. (1,59)

E. Desarrollo, Caracterización y validación de metodologías para propósitos analíticos

1. Desarrollo de métodos analíticos

El desarrollo de un método nuevo siempre es individual, y los problemas que tendrán que resolverse serán diferentes en cada caso. Sin embargo, el seguimiento de un plan general y sistemático de desarrollo ahorra tiempo y evita el gasto innecesario de tiempo y de reactivos. Para ello se proponen las siguientes etapas:

- a. Naturaleza del método: establecer el tipo de método a utilizar ya sea cualitativo, de tamizaje o de referencia, así como el propósito vigilancia, monitoreo, control de calidad, o investigación, del método que se pretende desarrollar. Esto determinará la importancia relativa de los atributos que se caracterizarán.
- b. Revisión de literatura: consultar en la literatura y revisar la existencia de métodos aplicables al uso que se le quiere dar.
- c. Respuesta cuantitativa: debe probarse que existe una respuesta proporcional del método a la concentración del analito. La relación entre concentración del analito y la respuesta obtenida puede no ser lineal, pero debe ser una relación reproducible. La respuesta en esta etapa se mide con soluciones de diferentes concentraciones del analito, en el solvente que se piensa usar posteriormente.
- d. Optimización de las condiciones de análisis: se incluye en este punto cualquier procedimiento que mejore la función de respuesta. Debe variar un sólo parámetro a la vez.
- e. Puntos críticos del método: en esta etapa es necesario definir qué pasos del método son críticos para el funcionamiento adecuado del mismo. Es necesario establecer los reactivos y características del equipo que no son sustituibles. Debe establecerse también la estabilidad de los reactivos o estándares utilizados (24,38,39).

2. Validación y caracterización de métodos

Hay determinados requerimientos que un método debe cumplir para que pueda considerarse como un método válido y adecuado. Esto se aplica aún a métodos oficiales cuando se establecen por

primera vez en el laboratorio, la validación puede entenderse como los procedimientos que demuestran que el método mide el analito en la matriz de interés, con una precisión específica y uniforme en el rango de concentraciones en el que se usará. Confirmar que un método mide el analito de interés en una matriz dada no es suficiente, se requiere también caracterizarlo. La caracterización de un método se concibe como la descripción de las cualidades del método, una vez que se ha establecido que el método funciona. Por esta razón se considerarán, validación y caracterización en la misma sección.

- a. Especificidad del análisis en la matriz de interés: la complejidad en la composición de la matriz donde se quiere determinar el analito medible hace que se tenga que probar la especificidad del método en cada matriz de interés. Se entiende por especificidad la habilidad con que el método mide únicamente lo que está supuesto a medir, es decir el grado de selectividad con el que el método responde a la concentración del analito y no a otras sustancias identificadas como interferentes. Se considera interferencia el efecto de un componente en la exactitud de la medición del analito en interés. Como se desprende de la definición, el concepto de interferente va ligado al de la estimación de la magnitud de errores sistemáticos, y por tanto de la exactitud del método, es necesario realizar experimentos preliminares que determinen la ausencia de interferencia significativa. Si existiera interferencia, el método debe ser descartado, a menos que se encuentre algún procedimiento de separación de interferencias. Los tipos de error que deben considerarse son errores constantes y errores proporcionales, el error constante tiene la misma magnitud en todo el rango de concentración del analito; este puede deberse a la presencia de una sustancia interferente que da origen a una señal falsa, positiva o negativa. El error proporcional ocurre cuando la magnitud del error depende de la concentración del analito; un error proporcional se debe a alguna reacción lateral del interferente con el analito.
- i. Respuesta del blanco: un primer paso indispensable es la corrida de blancos de la muestra, con una matriz que no contempla el analito de interés. Salvo en casos particulares, la respuesta debe ser significativamente igual a cero, si se hace una corrida de 10 blancos, se obtiene una respuesta media y su desviación estándar.
 - ii. Interferentes constantes: para evaluar el efecto de interferentes que producen errores constantes, debe agregarse una cantidad de la sustancia sospechosa de interferencia a una porción de muestra. El volumen agregado no debe ser mayor al 10% del volumen de la muestra. Para compensar por la dilución de la muestra, se agrega a la muestra sin interferente un volumen igual del solvente puro en el que se encuentra el interferente; la muestra original y las muestras con el interferente se corren cada uno en triplicado. La diferencia entre los resultados de las dos muestras se atribuye al efecto del interferente.
 - iii. Límite de detección: se calcula en forma preliminar en base a la recta de regresión, el límite de detección teórico es la concentración estimada cuya respuesta es el valor de la respuesta del blanco más tres veces su desviación estándar (24,38,40).

- iv. Sensibilidad y resolución: se entiende por sensibilidad del método, la mínima concentración discriminable en el rango de trabajo; por ejemplo un método A es más sensible que un método B, si el método A permite diferenciar dos muestras con 10.5 y 11 unidades de concentración, mientras que el otro solo puede dar una estimación de entre 10 y 11 unidades de concentración. Para estimar la sensibilidad o resolución se usan los límites de confianza al 95% de tres patrones cuya concentración es cercana a los valores de los cuartiles del rango de trabajo.
- v. Precisión y variabilidad del método: la precisión es la medida de reproducibilidad del método bajo condiciones de operación normales. La precisión indica que tan bien se comporta el método bajo condiciones diferentes de uso repetido. Tiene dos componentes: la variación aleatoria entre réplicas en un mismo ensayo o corrida, llamada la variación intraensayo; y la variación que ocurre entre ensayos independientes, llamada variación entre ensayos. Para evaluar la precisión, se necesita usar muestras control. Un control es una muestra con una concentración dada del analito. Se asume que la muestra se puede preservar de modo tal que la concentración dada del analito no varía considerablemente en un período de tiempo razonable (40).
- vi. Exactitud: con este término se pretende agrupar las pruebas necesarias para demostrar que el método cuantifica la concentración real del analito en una muestra. Se incluyen dos pruebas, consideradas alternativas, siendo recomendable usar más de una para establecer la exactitud del método.
- vii. Comparación contra un método de referencia: el método en su versión final se compra contra un método aceptado que sirve de referencia para el análisis. Se analizan un mínimo de 20 muestras diferentes por ambos métodos y se comparan los resultados graficando los resultados por el método de referencia y el método que se está probando. La correlación entre ambos resultados debe ser buena, y la pendiente debe ser significativamente igual a 1 (prueba de hipótesis sobre la pendiente, que equivale a hacer intervalos de confianza al 95 % con dos colas, y verificar que el valor de 1 está incluido en el intervalo). El intercepto debe ser significativamente igual a 0 (24,39,40).

3. Evaluación del método:

La evaluación del método se hace como una comparación con otros métodos publicados, bajo los siguientes aspectos: precisión, exactitud, velocidad, capacidad de procesamiento, grado de complejidad del método, instrumentación requerida, aspectos de seguridad y finalmente costo del análisis

La validación establece las características, limitaciones e influencias en un método analítico; es decir que luego del análisis estadístico de los datos obtenidos de este proceso, se pueden conocer los analitos, matrices, interferentes y niveles que puede determinar el método que ha sido evaluado, con una precisión y exactitud conocida. La implementación de un método puede involucrar la adaptación de un método haciendo pocos cambios o puede requerir de la adaptación de ideas de algún experto en el

campo para que el método pueda ser aplicable. La necesidad de la validación o evaluación de un método puede radicar en la:

- a) Importancia de las medidas analíticas que soportan decisiones a nivel de instituciones, empresas, regiones, países o gobiernos.
- b) Responsabilidad profesional, ya que si los resultados de una prueba no son confiables, el cliente o persona que los ha solicitado, los considerará de poco valor. En la mayoría de los casos la muestra es tomada por el cliente, lo cual puede influir en los análisis y el analista debe de conocer la magnitud de estas influencias y ser capaz de resolver con base en evidencia científica cualquier problema relacionado, por lo que deberá conocer el método que esté empleando.
- c) Verificar si los parámetros desarrollados en el método son adecuados para el uso de un problema analítico en particular, por ejemplo cuando un método es desarrollado con un problema en particular, presenta nuevos problemas, el control de calidad indica que el método establecido cambia con el tiempo, el método es usado en diferentes laboratorios, analistas o instrumentación y cuando se desea establecer equivalencia entre dos métodos (41,42).

4. Herramientas del proceso de desarrollo, caracterización y validación

- a. Blancos: el uso de varios tipos de blancos puede indicar cuánto de la señal medida puede ser atribuida al analito y cuánto a otras causas, los tipos de blanco pueden ser:
 - i. Blanco de reactivos: los reactivos usados durante el proceso analítico son analizados con el propósito de determinar su contribución de señal y de esta forma corregir la señal del analito por la señal del blanco.
 - ii. Blanco de muestra: son matrices sin analito, y aunque son difíciles de obtener, permiten estimar los interferentes que pueden encontrarse en la matriz.
- b. Muestras, materiales a analizar: los materiales a analizar de muestras reales son usados debido a la información que pueden proveer y que pueden ser encontradas en el trabajo diario. Si el verdadero contenido del analito en el material a analizar es conocido puede ser empleado para determinar la exactitud del método, aunque puede haber diferencias según los métodos utilizados.
- c. Materiales fortificados: estos materiales o soluciones a las que se le adiciona el analito, pero pueden contener el analito de interés, por lo que debe observarse que los niveles de fortificación no queden fuera del rango en el que se va a aplicar el método.
- d. Materiales con aditivos: son similares a los materiales fortificados ya que se adicionan sustancias aunque diferentes al analito, que pueden ser interferentes y otros que deben ser plenamente identificados.
- e. Materiales previamente tratados: estos son materiales fortificados en los que el analito de interés puede ser encontrado con menor frecuencia, pero que son introducidos para su evaluación.
- f. Materiales independientemente caracterizados: son muestras que han sido analizadas por un método en particular y que puede ser empleada para determinar la desviación de otros métodos.

- g. Estándares: éste término es usado para referirse a sustancias caracterizadas empleadas con propósitos de calibración o identificación, es conveniente emplearlo como estándares de medida o calibradores.
- h. Materiales de referencia: puede ser cualquier material que se emplea como referencia y pueden ser reactivos con pureza conocida, químicos industriales u otros artefactos, aunque el grado de caracterización no es alto.
- i. Materiales de referencia certificados: son materiales caracterizados por diferentes métodos, tantos como sea posible y éstos análisis son realizados por una institución reconocida.
- j. Estadísticas: es empleada para analizar la variabilidad inherente en las medidas analíticas (38, 40, 42).

F. Métodos para la determinación de yodo en sal y vitamina A en azúcar

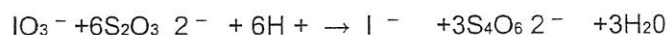
1. Métodos Generales de análisis de yodo en material biológico

a. Análisis volumétrico de yodo en sal fortificada

En análisis químico, los compuestos usualmente determinados son el yodo, I_2 , el ión yodato IO_3^- , y el ión yoduro I^- . El yodo es poco soluble en agua, pero su solubilidad aumenta en presencia de yoduros, por formación del triyoduro (I_3^-). Esta especie se reduce fácilmente a I^- , pero por el potencial normal de la reacción



hace que la oxidación de yoduro a triyoduro también sea posible, usando oxidantes fuertes. Por ésta razón el yodo es ampliamente usado en volumetría. Los métodos directos usan yodo para cuantificar el agente reductor, mientras que en los métodos indirectos, los oxidantes se analizan haciéndolos reaccionar con exceso de yoduro, y el yodo liberado se cuantifica con un reductor patrón (tiosulfato o arsenito de sodio) (13,16,24,50). Este es el principio de la determinación de yodato en la sal fortificada con yodato de potasio, la ecuación global es la siguiente:



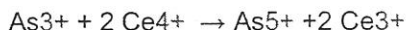
El método permite detectar hasta 5 $\mu\text{g/g}$ de sal (ppm), pero la cantidad neta detectable de yodo es alrededor de 250 μg , pues se requieren 50 g de sal para el análisis. Esto impide el uso de este método a muestras biológicas, donde la concentración de yodo es de unos 10 $\mu\text{g/dl}$ (0.1 $\mu\text{g/ml}$). El método es rápido y sencillo para analizar sal, pues no requiere más equipo que una bureta y un agitador magnético (13,24).

b. Análisis de yodo en matrices biológicas o en alimentos

En muestra biológicas o en alimentos compuestos, el yodo se encuentra a niveles traza, en el orden de nanogramos. Por otro lado antes del análisis se hace necesaria la destrucción de materia orgánica compleja, que puede dificultar el análisis, por lo que se hace necesario una digestión previa de la muestra. Hay métodos muy preciso y exactos para medir yodo, una técnica muy sensible es el

método de activación de neutrones. El método se basa en la irradiación de la muestra y la separación radioquímica del I128. Este método requiere de un reactor para irradiar la muestra con un flujo termal de neutrones, lo cual hace imposible su utilización como método de rutina(13,25,48). Otra metodología es el análisis de yodo por cromatografía de gases, por conversión del yodo a yodobutanona y cuantificación con detector de captura electrónica. El método desarrollado por Bakker se aplica a yodo inorgánico en leche y elimina la digestión previa de la muestra. La recuperación es de 94-96%, con un límite de detección de 0.8 µg/dl.

Para el análisis de yodo urinario y últimamente para el análisis de alimentos, se ha utilizado el método espectrofotométrico, debido a que éste sólo necesita equipo sencillo de laboratorio y porque se presta fácilmente a la automatización. Se ha usado la reacción de Feigl, que consiste en la formación temporal de un color azul por reacción del yodo con tetrabase y cloramina T, la reacción más ampliamente usada para cuantificar yodo en muestras biológicas es la reacción caracterizada por Sandell y Kolthoff (1937), que lleva su nombre. Se base en el yoduro actúa como catalizador de la reducción del ión cérico Ce⁴⁺ a ión ceroso Ce³⁺ acoplado a la oxidación del arsenito As³⁺, a As⁵⁺. La reacción neta es:



El Ce⁴⁺ es amarillo, mientras que el Ce³⁺ es incoloro. Esto permite, manteniendo las demás condiciones constantes, cuantificar el yodo mediante la desaparición de color amarillo. La reacción catalítica tiene efecto amplificador y es sensible a muy pequeños cambios en la concentración del catalizador.

El método original para análisis de yodato o yoduro en sal es por titulación redox. Se requieren por lo menos 100 gramos de sal para realizar el análisis en duplicado. Para determinar yoduro por este método se hace una retrovaloración y se emplea agua de bromo. Este reactivo es tóxico y de difícil manejo. Además el número de muestras que se pueden procesar diariamente es reducido. En el laboratorio de INCAP se modificó el método para análisis de yodo urinario para el análisis de sal. Con este método se puede usar una menor cantidad de muestra, mínimo 1 gramo, y 10 g para asegurar una muestra homogénea (ver anexo 1), (60).

2. Métodos para la determinación de vitamina A en azúcar

La determinación espectrofotométrica de vitamina A o retinol en azúcar fortificada de acuerdo al método INCAP es una adaptación simplificada del método usado por el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) del Ministerio de Salud de Guatemala, que se basa en el propuesto por Arroyave y Funes (1974). El procedimiento como está descrito utiliza 5-10 veces menos cantidad de reactivos que el original, tiene una exactitud y recuperación semejantes, y su precisión, aunque un poco menor, es muy satisfactoria (<3 %). Consiste en la extracción del palmitato de retinol en hexano. La concentración de retinol es determinada por su absorbancia a 325 nm. El método usualmente no requiere la destrucción del retinol por irradiación con luz ultravioleta, porque la absorbancia a 325 nm del extracto orgánico es debida esencialmente al retinol presente en el azúcar (61).

En la determinación de vitamina A en premezclas secas por método espectrofotométrico consiste en la desintegración de la cubierta de las microcápsulas de vitamina A con ácido clorhídrico tibio y diluido. La muestra se diluye con etanol y el éster de vitamina A se extrae con n-hexano. Realizando la lectura en un espectrofotómetro a 325 nm (62).

Para efectos de este estudio se utilizará como fundamento la determinación colorimétrica semi-cuantitativa de palmitato de retinol en azúcar fortificada, el cual es una modificación del propuesto por Arroyave, Pineda y Funes (1974). Este método se basa en la formación de anhidroretinol al mezclarse el retinol con un reactivo cromógeno que contiene ácido tricloroacético y diclorometano. Se genera un compuesto de color azul cuya intensidad puede medirse por comparación visual contra una escala de soluciones de sulfato de cobre. El color azul es transitorio por lo que comparación debe hacerse dentro 10 segundos después de haber agregado el reactivo (ver anexo 2) (63).

IV. JUSTIFICACIÓN

La dieta de la mayor parte de los países en desarrollo es usualmente carente de alimentos de origen animal. Esta condición ha provocado que gran parte de la población sufra deficiencia de algunos micronutrientes. A nivel mundial se ha tratado de solucionar la deficiencia de micronutrientes, empleando para ello estrategias nutricionales como la diversificación de la dieta, fortificación de alimentos y suplementación. Con ayuda de la industria alimentaria en Latinoamérica se ha dado un desarrollo aceptable, lo que ha permitido agregar estos nutrientes esenciales en procesos de fortificación a alimentos de consumo masivo.

Se ha observado en Guatemala que una de las estrategias nutricionales mejor utilizada es la fortificación de alimentos, ya que ha demostrado ser la principal intervención en la prevención de las consecuencias causadas por la deficiencias de yodo y vitamina A. Además, la relación costo-efectividad que estos programas presentan, generan mayores y mejores resultados, interviniéndose así en la prevención de trastornos irreversibles que afectan a la población guatemalteca ya que la deficiencia de yodo puede provocar retraso mental, sordomudez, cretinismo e idiotez, bocio, entre otros. La deficiencia de vitamina A causa no sólo patologías oculares que conducen a la ceguera temporal o permanente, sino también daña el crecimiento físico, la respuesta inmunológica del organismo y aumenta los índices de mortalidad.

En el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) se han desarrollado y promovido sistemas de garantía de calidad para los programas de fortificación, se prestan servicios como soporte técnico y asesoría, con lo cual se genera la ayuda necesaria para los diversos grupos inter-institucionales que han implementado los programas de fortificación de alimentos como parte del soporte a la lucha de deficiencias de micronutrientes en nuestro país.

En Guatemala UNICEF, INCAP/OPS y MINEDECO, ha realizado la evaluación en hogares guatemaltecos de los programas de fortificación de la sal con yodo y vitamina A en azúcar a través del Programa de Escuela Centinela Micronutrientes, para llevar a cabo este monitoreo se colectan muestras de sal y azúcar en 420 escuelas a lo largo de todo el país; de cada escuela se solicita aproximadamente 20 gramos de muestra de sal y de azúcar respectivamente, por medio de 20 estudiantes seleccionados al azar, obteniéndose 8,400 muestras de sal y azúcar para ser analizadas, las cuales deben recolectadas en bolsa plástica oscura de ser posible sellarla, identificarla correctamente y guardadas en oscuridad para ser transportadas al Laboratorio de Bioquímica Nutricional del INCAP para su análisis.

Debido al gran número de muestras de sal y azúcar recolectadas a través del programa de Escuela Centinela, a ser analizadas por la metodología cuantitativa ya establecida en la determinación de yodo en sal y vitamina A en azúcar dentro del laboratorio, hace que el volumen, tiempo de trabajo sea mayor, aumentando el costo del análisis, ya que al ser analizadas todas las muestras por el método de referencia es necesario utilizar una mayor cantidad de reactivos, materiales y recursos provocando retraso en la obtención de resultados; por lo cual se ha generado el desarrollo de nuevas metodologías cualitativas de punto de corte fijo que buscan reducir el número de muestras, el tiempo, volumen y costos de los análisis por muestra, ya que al analizar cada una por dicha metodología todas las muestras que presenten un resultado positivo pasarán a formar una muestra compuesta, y serán descartadas las muestras que presenten un resultado negativo ante la concentración del analito a analizar, esto es en base a lo estipulado en la Legislación Guatemalteca de Alimentos Fortificados, éstas metodologías deben ser capaces de determinar concentraciones específicas de los analitos en cuestión, las cuales posteriormente las muestras compuestas obtenidas serán analizadas por el método de referencia.

V. OBJETIVOS

A. General

- a) Desarrollar, caracterizar y validar métodos cualitativos de punto de corte fijo para la determinación de yodo en sal y vitamina "A" en azúcar.
- b) Validar el método espectrofotométrico de campo para la determinación de yodo en sal.

B. Específicos

- a) Desarrollar y validar el método cualitativo de punto de corte fijo en concentración de 15 y 20 mg/Kg para la determinación de yodo en sal.
- b) Desarrollar y validar el método cualitativo de punto de corte fijo en la concentración de 3.5 y 5 mg/Kg de vitamina "A" en azúcar.
- c) Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo que presenta cada método.
- d) Determinar condiciones necesarias para elaboración, preparación y almacenamiento de reactivos.

VI. HIPÓTESIS

Por el tipo de estudio no se requiere de Hipótesis.

**Método espectrofotométrico de campo para la determinación de yodo en sal: UMS-
Probador instantáneo**

- a. Yodato de potasio solución estándar KIO_3 , 99.7% Merck Art. 05051 PM 214.00
- b. Solución estándar (10 ug/ml – 20%NaCl (99.5%, Merck Art. 06404 PM 58.44)).
- c. Solución de almidón de KI 99.5%, Merck Art. 05043 PM166.01
- d. Acido sulfúrico 1 mol/L H_2SO_4 95-98%, EM Science SX1244-5 PM98.08

ii. Equipo

- a) Balanza analítica ± 0.0001 g
- b) Campana de extracción
- c) Desecadora
- d) Probador instantáneo de yodo "UMS"
- e) Celdas plásticas para realizar lecturas en el espectrofotometro UMS

iii. Materiales

- a) Tubos de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.30 cm)
- b) Pipeta pasteur de polietileno (de 0.5 a 3 ml)
- c) Guantes descartables
- d) Lentes de protección
- e) Agua destilada
- f) Agua desionizada previamente hervida.
- g) Papel bond blanco, para utilizarlo como fondo
- h) Beakers de 50, 100, 250, 600 mL
- i) Erlenmeyers 50, 100, 250 mL
- j) Balones volumétricos 100, 200 mL
- k) Recipientes de vidrio ámbar
- l) Espátula
- m) Estufa

3) Institucionales

Laboratorio de Bioquímica Nutricional, del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP).

C. Procedimientos

1) Determinación cualitativa de yodato de potasio en sal fortificada

i. Punto de Corte Fijo 15 mg I / Kg:

1. Preparación de los controles y la muestra:

- a. Se homogenizó el control y/o la muestra de sal, mezclándola varias veces dentro de una bolsa plástica. Un mal homogenizado de la muestra pudo dar un resultado falso.
- b. Se añadió a cada tubo de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.3cm), aproximadamente 1 gramo o un cuarto de cucharadita del control o de la muestra de sal a analizar.
- c. Se agregó, utilizando una pipeta pasteur de polietileno, alrededor de 2 mL de agua desionizada, a tubos de ensayo con la sal. Es importante que todos los tubos tuvieran la misma cantidad de agua desionizada y sal. Se disolvió la sal completamente agitando el tubo suavemente. Se realizó este procedimiento con precaución para evitar derrames o salpicaduras.
- d. A un tubo se añadió únicamente 2.0 mL de agua desionizada, sin muestra de sal. Este tubo fue el control del reactivo. Este control se debió correr cada día junto con las muestras.
- e. Utilizando otra pipeta pasteur de polietileno, se vertió rápidamente 0.6 mL de reactivo cromógeno dentro los tubos. (Utilizando guantes y lentes de protección.) Mezclando perfectamente la solución. Si el control y/o las muestras de sal estaban fortificados con yodato de potasio se observó la aparición de un color amarillo, indicando que el resultado fue positivo. El tubo utilizado como control de reactivo debió quedar con la solución incolora indicando un resultado negativo, si en la solución se formó un color amarillento, se debió preparar reactivo nuevo o se verificó la calidad del agua desionizada.
- f. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de yodato que contenga el control y/o muestra analizada, únicamente se indicó si se tornó amarilla. Si la concentración de yodato es baja la aparición del color amarillo es casi imperceptible, se tomaron estas muestras como negativo. Las muestras que dieron una reacción débil son difíciles de interpretar, para tales muestras se utilizó un fondo blanco para realizar las lecturas, se utilizó una hoja de papel. El fondo blanco permitió apreciar mejor el color amarillo, el cual debió ser claramente identificable para ser considerado como positivo, de lo contrario el resultado fue negativo.
- g. Se anotó el resultado únicamente como positivo o negativo. Una vez realizadas todas las determinaciones se descartó el contenido de cada tubo en el lavadero y se dejó correr agua por 5 minutos.

2. Preparación de reactivos:

a. Reactivo Cromógeno Yoduro de potasio

i. Composición punto de corte 15 mg/Kg

Yoduro de potasio 0.0115 %.....0.02875 g
 H₂SO₄ 0.75 M.....10.0 mL

ii. Preparación punto de corte de 15 mg/kg

Se disolvieron 0.02875 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua desionizada, previamente hervida, se transfirió a un balón de 250 mL, se añadieron 10 mL de H₂SO₄ 0.75 N y se aforó con agua desionizada.

iii. Almacenamiento

Se almacenó en frasco oscuro etiquetado correctamente.

iv. Expiración

Cuando la solución se torna amarillenta se descarta y se prepara nuevamente.

b. Ácido sulfúrico H₂SO₄ 0.75 M

i. Composición

H₂SO₄.....0.75 mol/L

ii. Preparación

En un beaker graduado de 600 mL se agregó 300 ml de agua destilada y 20.82 mL de ácido concentrado. Se enfrió a temperatura ambiente, se llegó a la marca de 500 mL con agua destilada.

iii. Almacenamiento

Se guardo en frasco de vidrio bien tapado, alejado de bases.

iv. Expiración y Precaución

La solución es estable indefinidamente. El ácido es corrosivo, deshidratante e irritante para todos los tejidos. Su inhalación puede provocar daño hepático y el contacto con la piel necrosis. El reactivo concentrado y sus soluciones deben manipularse bajo campana. (anexo 3, formato INCAP) .

ii) Punto de Corte Fijo 20 mg I / Kg:

1. Preparación de los controles y la muestra:

- a. Se homogenizó el control y/o la muestra de sal, mezclándola varias veces dentro de una bolsa plástica. Un mal homogenizado de la muestra pudo dar un resultado falso.
- b. Se añadió a cada tubo de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.3cm), aproximadamente 1 gramo o un cuarto de cucharadita del control o de la muestra de sal a analizar.
- c. Se agregó, utilizando una pipeta pasteur de polietileno, alrededor de 2 mL de agua desionizada, a tubos de ensayo con la sal. Es importante que todos los tubos tuvieran la misma cantidad de agua desionizada y sal. Se disolvió la sal completamente agitando el tubo suavemente. Se realizó este procedimiento con precaución para evitar derrames o salpicaduras.
- d. A un tubo únicamente se añadió 2.0 mL de agua desionizada, sin muestra de sal. Este tubo fue el control del reactivo. Este control se debió correr cada día junto con las muestras.
- e. Se utilizó otra pipeta pasteur de polietileno, se vertió rápidamente 0.6 mL de reactivo cromógeno dentro los tubos. (Utilizando guantes y lentes de protección.) Se mezcló perfectamente la solución. Si el control y/o las muestras de sal estaban fortificados con yodato de potasio se observó la aparición de un color amarillo, indicando que el resultado fue positivo. El tubo utilizado como control de reactivo debió quedar con la solución incolora indicando un resultado negativo, si en la solución se formó un color amarillento, se debió preparar reactivo nuevo o se verificó la calidad del agua desionizada.
- f. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de yodato que contenga el control y/o muestra analizada, únicamente se indicó si se tornó amarilla. Si la concentración de yodato es baja la aparición del color amarillo es casi imperceptible, se tomaron estas muestras como negativo. Las muestras que dieron una reacción débil son difíciles de interpretar, para tales muestras se utilizó un fondo blanco para realizar las lecturas, se pudo utilizar una hoja de papel. El fondo blanco permitió apreciar mejor el color amarillo, el cual debió ser claramente identificable para ser considerado como positivo, de lo contrario el resultado fue negativo.
- g. Se anotó el resultado únicamente como positivo o negativo. Una vez realizadas todas las determinaciones se descartó el contenido de cada tubo en el lavadero y se dejó correr agua por 5 minutos.

2. Preparación de reactivos:

a. Reactivo Cromógeno Yoduro de potasio

i. Composición punto de corte 20 mg/Kg

Yoduro de potasio 0.0075 %.....0.01875 g
 H₂SO₄ 0.50 M.....10.0 mL

ii. Preparación punto de corte de 20 mg/kg

Se disolvieron 0.01875 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua desionizada, previamente hervida, se transfirió a un balón de 250 mL, se añadió 10 mL de H₂SO₄ 0.75 N y se aforó con agua desionizada.

iii. Almacenamiento

Se almacenó en frasco oscuro etiquetado correctamente.

iv. Expiración

Cuando la solución se torne amarillenta descartar y preparar nuevamente.

b. Ácido sulfúrico H₂SO₄ 0.50 M

i. Composición

H₂SO₄.....0.50 mol/L

ii. Preparación

En un beaker graduado de 600 mL se agregó 300 ml de agua destilada y 13.88 mL de ácido concentrado. Se enfrió a temperatura ambiente, se llegó a la marca de 500 mL con agua destilada.

iii. Almacenamiento

Se guardar en frasco de vidrio bien tapado, alejado de bases.

iv. Expiración y Precaución

La solución es estable indefinidamente. El ácido es corrosivo, deshidratante e irritante para todos los tejidos. Su inhalación puede provocar daño hepático y el contacto con la piel necrosis. El reactivo concentrado y sus soluciones deben manipularse bajo campana (anexo 4, formato INCAP).

2) Determinación cualitativa de palmitato de retinol en azúcar fortificada

i. Punto de Corte Fijo 3.5 mg vit. A / Kg

1. Preparación de los controles y la muestra

- a. Se homogenizó el control y/o la muestra de azúcar, mezclándola varias veces dentro de una bolsa plástica. Un mal homogenizado de la muestra pudo dar como resultado un falso negativo.
- b. Se añadió a cada tubo de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.3cm), aproximadamente 1 gramo o un cuarto de cucharadita del control o de la muestra de azúcar a analizar.
- c. Se agregó alrededor de 2 mL de agua destilada a tubos de ensayo. Para agregar el agua, se utilizó una pipeta pasteur de polietileno. Es importante que todos los tubos tuvieran la misma cantidad de agua destilada. Se mezcló bien.
- d. Utilizando otra pipeta pasteur de polietileno, se vertió rápidamente 0.6 mL de reactivo cromógeno dentro de los tubos. (Utilizando guantes y lentes de protección).
- e. Si el control y/o las muestras de azúcar estaban fortificadas con palmitato de retinol se observó la aparición de un color azul o celeste, indicando que el resultado fue positivo. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de palmitato de retinol que contenga el control y/o las muestras analizadas, únicamente se indicó si se tornó celeste. Si la concentración de palmitato fue baja, se observó que algunos cristales se tornaron celestes depositándose en el fondo del tubo y se acumularon lentamente, esta muestra fue positiva. Si el color celeste fue muy tenue, casi imperceptible o no hubo aparición de color, la muestra se tomó como negativa.
- f. Una vez realizadas todas las determinaciones se depositó el contenido de cada tubo dentro de una solución de bicarbonato de sodio al 10 % para neutralizar el ácido.

2. Preparación de reactivos:

a. Reactivo Cromógeno

i. Precaución

El ácido tricloroacético es altamente corrosivo. Al momento de preparar y utilizar el reactivo, se debió utilizar bata de manga larga, anteojos de seguridad, guantes y mascarilla para gases. Se disolvió en campana de gases. El reactivo debió almacenarse en un lugar fresco para evitar su descomposición por contacto con la humedad.

ii. Composición punto de corte de 3.5 mg/Kg

Acido tricloroacético.....	60 g
Diclorometano.....	61 mL
Anhídrido acético.....	2 mL

iii. Preparación punto de corte de 3.5mg/Kg

Se disolvió 60 g de ácido tricloroacético en 80.0 g de diclorometano (60.6 mL). Para disolverlo por completo, se entibió la mezcla (con el recipiente tapado) en baño de agua a 60°C, agitando constantemente.

iv. Almacenamiento

Se agregó 2 mL de anhídrido acético y se guardó en frasco ámbar con tapón de rosca preferiblemente en refrigeración. La solución fue estable por lo menos 18 días guardado a temperatura ambiente y en refrigeración.

b. Bicarbonato de sodio 10 %

i. Composición

Bicarbonato de sodio.....10 g

ii. Preparación

Se disolvieron 10.0 g de bicarbonato de sodio en 100 ml de agua destilada.

iii. Almacenamiento

Se almacenó en frasco oscuro a temperatura ambiente (anexo 5, formato INCAP).

ii) Punto de Corte Fijo 5.0 mg vit. A / Kg

1. Preparación de los controles y la muestra

- a. Se homogenizó el control y/o la muestra de azúcar, mezclándola varias veces dentro de una bolsa plástica. Un mal homogenizado de la muestra pudo dar como resultado un falso negativo.
- b. Se añadió a cada tubo de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.3cm), aproximadamente 1 gramo o un cuarto de cucharadita del control o de la muestra de azúcar a analizar.
- c. Se agregó alrededor de 2 mL de agua destilada a tubos de ensayo. Para agregar el agua, se utilizó una pipeta pasteur de polietileno. Es importante que todos los tubos tuvieran la misma cantidad de agua destilada. Se mezcló bien.
- d. Se utilizó otra pipeta pasteur de polietileno, se vertió rápidamente 0.6 mL de reactivo cromógeno dentro de los tubos. (Utilizando guantes y lentes de protección).
- e. Si el control y/o las muestras de azúcar estaban fortificadas con palmitato de retinol se observó la aparición de un color azul o celeste, indicando que el resultado fue positivo. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de palmitato de retinol que contenga el control y/o las muestras analizadas, únicamente se indicó si se tornó celeste. Si la concentración de palmitato fue baja, se observó que algunos cristales se tornaron celestes depositándose en el fondo del tubo y se acumularon lentamente, esta muestra fue positiva. Si el color celeste fue muy tenue, casi imperceptible o no hubo aparición de color, la muestra se tomó como negativa.
- f. Una vez realizadas todas las determinaciones se depositó el contenido de cada tubo dentro de una solución de bicarbonato de sodio al 10 % para neutralizar el ácido.

2. Preparación de reactivos:

a. Reactivo Cromógeno

i. Precaución

El ácido tricloroacético es altamente corrosivo. Al momento de preparar y utilizar el reactivo, se debió utilizar bata de manga larga, anteojos de seguridad, guantes y mascarilla para gases. Se disolvió en campana de gases. El reactivo debió almacenarse en un lugar fresco para evitar su descomposición por contacto con la humedad.

ii. Composición punto de corte de 5.0 mg/Kg

Acido tricloroacético.....	30 g
Diclorometano.....	61 mL
Anhídrido acético.....	2 mL

iii. Preparación

Se disolvieron 30 g de ácido tricloroacético en 80.0 g de diclorometano (60.6 mL). Para disolverlo por completo, se entibió la mezcla (con el recipiente tapado) en baño de agua a 60°C, agitando constantemente.

iv. Almacenamiento

Se agregó 2 mL de anhídrido acético y se guardó en frasco ámbar con tapón de rosca preferiblemente en refrigeración. La solución es estable por lo menos 18 días guardado a temperatura ambiente y en refrigeración.

b. Bicarbonato de sodio 10 %

i. Composición

Bicarbonato de sodio.....10 g

ii. Preparación

Se disolvió 10.0 g de bicarbonato de sodio en 100 ml de agua destilada.

iii. Almacenamiento

Se almacenó en frasco oscuro a temperatura ambiente (anexo 6, formato INCAP).

3) Método espectrofotométrico de campo para la determinación de yodo en sal: UMS- Probador instantáneo

1. Preparación química para su uso en el probador instantáneo de yodo "UMS"
 - 1.1 Solución estándar KIO_3 (yodato de potasio 1000 μg /1 ml)

Se pesó 0.8432 g de KIO_3 que se seca a 100-110°C por tres horas y se disuelve en 500 mL de agua destilada.
 - 1.2 Solución estándar (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 20% NaCl)

Se tomaron 5 mL de solución estándar KIO_3 y se agregó 100 g de NaCl y 0.5 g de Na_2CO_3 , se agregó agua destilada hasta la marca de 500 mL y se agitó bien la solución. Esta puede utilizarse durante seis meses. La concentración de 5 mL de solución KIO_3 es igual a 50 Mg/Kg en la muestra de sal yodada.
 - 1.3 Solución de almidón de KI

Se pesó 2.0 g de almidón soluble, se agregó agua destilada y se agitó bien, se vertió esta solución en 200 mL de agua hirviendo y se dejó hervir durante dos minutos, luego se enfrió. Se agregó 1.0 g de KI y 40 g de $\text{H}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Esta solución puede guardarse en una botella durante tres meses.
 - 1.4 H_2SO_4 1 mol/L

Se colocó en un beaker graduado de 600 mL, 300 mL de agua destilada. Se adicionó 27.5 mL de H_2SO_4 . Se deja enfriar y se termina de agregar agua destilada hasta la marca de 500 mL, se mezcló bien. Se guarda en frasco de vidrio oscuro, alejado de bases.
 - 1.5 Solución estándar para calibrar el probador de yodo

Se preparó solución estándar para calibrar el probador de yodo o se utilizó el vidrio de color.

Se transfirieron 5.0 mL de la solución estándar de yodo (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a un tubo de 50 mL, se agregó 2 ml KI-solución de almidón y 2 mL de H_2SO_4 (1 mol/L). Se mezcló bien la solución y se agregó agua destilada hasta completar 50 ml. Se Agitó bien. Esta solución es equivalente a la concentración de 50 mg I /Kg de sal.
 - 1.6 Solución de la muestra

Se pesó 1.0 g de sal yodada bien mezclada en un tubo de 50 ml, se agregó 10 mL de agua destilada, 2 mL de KI-solución de almidón y 2 mL de H_2SO_4 (1mol/L). Se sigue el mismo procedimiento de la solución estándar.
2. Direcciones para el uso del probador instantáneo de yodo "UMS"
 - 2.1 Se enciende el equipo UMS y se deja calentar durante 10 minutos. Si este no se usa durante un periodo largo de tiempo, necesita más tiempo de calentamiento.

- 2.2 Antes de usar el probador, la calibración de ajuste cero y la calibración de ajuste estándar deben estar alineados con las marcas mencionadas en la superficie de la llave de calibración cero y estándar del equipo UMS.
- 2.3 Se colocó agua destilada dentro de la celda, se puso la celda en la cámara y cierre la tapa. La superficie transparente de la celda debe estar alineada con el rayo óptico de la izquierda a la derecha (mirar dentro de la cámara). Mantenga la superficie clara del vidrio cerca de la cabeza de la flecha de la cámara que contiene la celda.
- 2.4 Se giró la llave de calibración azul del ajuste cero (la izquierda) hasta que apareció en la lectura digital. Se giró la llave de calibración azul (la izquierda) para ajustar los números enteros hasta cero y la otra llave de calibración blanca (la derecha) para ajustar los decimales a cero. Cuando se lea cero en la lectura digital LCD, mantenga constante la calibración cero. NOTA: No se toca más la calibración cero.
- 2.5 Se insertó la solución estándar o el vidrio de color en la cámara de la celda y se giró hasta llegar a 50 en la lectura del LCD ajustando la calibración azul (la izquierda) para ajustar los números enteros hasta el cero y la calibración blanca (la derecha) para ajustar los decimales hasta cero en la lectura del LCD. Tan pronto como se lea cero en el LCD, mantenga la calibración estándar constante. NOTA: No se toca más la calibración estándar.
- 2.6 Sacar la solución estándar o el vidrio de color, inserte la solución desconocida de sal yodada en la cámara de la celda y cierre la cubierta. La concentración mg/Kg de yodo se lee claramente en el UMS. Se anotó el contenido de yodo en la muestra de sal. Se siguió leyendo el contenido de yodo en diferentes muestras de manera simultánea una después de la otra. NOTA: No es necesario cambiar entre calibración cero y calibración estándar, pero al apagar la calibración cero y la estándar deben estar alineadas con las marcas sobre la superficie de la calibración cero y la calibración estándar antes de usar el UMS (véase No.2.2).
- 2.7 Se siguió el mismo procedimiento para que el UMS lea un contenido de yodo en sal desconocido (anexo 7, documento INCAP).

D. Diseño estadístico

1. Tipo de estudio:

Experimental

2. Muestreo:

Por conveniencia

3. Número de muestras:

Para cada método cualitativo en la determinación de yodo en sal y de palmitato de retinol en azúcar se utilizaron 120 muestras escogidas al azar, de concentración conocida, las cuales posteriormente se ordenaron por rangos una vez terminados los análisis, dichas muestras se encuentran dentro del Laboratorio de Bioquímica Nutricional del INCAP.

Para el método espectrofotométrico UMS, se realizaron diversas diluciones para la realización de la curva de calibración, además fueron seleccionadas de 5 a 8 muestras de sal de concentración conocida, comprendidas en diferentes rangos, las cuales se agruparon por bloques una vez terminados los análisis.

4. Análisis Experimental

- a. Para evaluar los métodos cualitativos utilizados en la determinación de yodo en sal y de palmitato de retinol en azúcar se aplicó un análisis bivariado utilizando la tabla de contingencia de 2 x 2. Se evaluó la significancia estadística de la asociación entre resultados positivos y negativos, calculando valores de: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo para cada prueba. Además se utilizaron como estándares de comparación los resultados cuantitativos obtenidos anteriormente de las muestras utilizadas.

Cuadro 5
ANÁLISIS BIVARIADO

RESULTADO	CUALITATIVO		
CUANTITATIVO	Negativo	Positivo	Casos
Negativo	1	2	1+2
Positivo	3	4	3+4
Casos	1+3	2+4	n

Sensibilidad: Capacidad del método cualitativo para identificar muestras con niveles de micronutrientes por debajo del punto del corte fijo establecido.

$$\text{Sensibilidad} = 1 / 1 + 2$$

Especificidad: Capacidad del método cualitativo para identificar muestras con niveles de micronutrientes por arriba del punto de corte fijo establecido.

$$\text{Especificidad} = 4 / 3 + 4$$

Valor Predictivo Positivo: Probabilidad del método cualitativo de obtener un resultado positivo verdadero cuando la muestra tenga un contenido del micronutriente por arriba del punto de corte fijo establecido.

$$\text{Valor predictivo Positivo} = 4 / 2 + 4$$

Valor Predictivo Negativo: Probabilidad del método cuallitativo de obtener un resultado negativo verdadero cuando la muestra tenga un contenido del micronutriente por debajo del punto de corte fijo establecido.

$$\text{Valor predictivo Negativo} = 1 / 1 + 3$$

- b. Además, para evaluar los métodos cualitativos utilizados en la determinación de yodo en sal y de palmitato de retinol en azúcar, se aplicó el análisis de concordancia KAPA entre los métodos cualitativos y cuantitativos a través del análisis estadístico STATA versión 7.0, donde al utilizar el índice de Fleiss se han caracterizado diferentes rangos de valores para KAPA, con respecto al grado de aceptabilidad sugerido por Landis y Koch (1977); para valores mayores de 0.75 o más representan una excelente aceptabilidad o confiabilidad entre cada lectura. Valores bajo 0.40 o menos representan una pobre aceptabilidad o confiabilidad entre cada lectura. Y valores entre 0.40 - 0.75 presentan una buena o aceptable confiabilidad entre cada lectura (64).
- c. El Método espectrofotométrico de campo UMS se midió por medio del análisis de los resultados obtenidos utilizando el coeficiente de correlación de concordancia, regresión lineal, y Análisis de varianza (ANOVA).

VIII. RESULTADOS

A. Método Cualitativo de Punto de Corte Fijo para la determinación de yodo en sal y vitamina A en azúcar:

La fase experimental de este estudio se realizó en el laboratorio de Bioquímica Nutricional del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá INCAP, donde se inició el desarrollo y caracterización de esta metodología a partir de metodologías cualitativas antes utilizadas por el laboratorio las cuales sirvieron de referencia para obtener la concentración deseada para cada uno de los componentes que conforman los reactivos de los métodos cualitativos a dos distintas concentraciones. Se utilizaron 120 muestras de sal y azúcar analizadas anteriormente en dicho laboratorio por el método de referencia (anexo 1 y 2), seleccionadas en rangos y al azar para la validación de los métodos cualitativos de punto de corte fijo; se evaluó la composición de los reactivos para las concentraciones 15 mg/Kg y 20 mg/Kg de yodo por kilogramo de sal y las concentraciones 3.5 mg/kg y 5.0 mg/Kg para el palmitato de retinol por kilogramo de azúcar; posteriormente para la validación se analizaron dichas muestras al azar en tres corridas cada una, y se procedió a la comparación de los datos obtenidos con el método cuantitativo, el cual se utilizó como método de referencia para:

- Yodo en sal: método cinético en microplaca
- Vitamina A en azúcar: método espectrofotométrico

Yodo en muestras de sal

1. Análisis de desarrollo y caracterización de reactivo cromógeno

Se partió de una concentración inicial de Yoduro de potasio (KI) y Acido sulfúrico (H_2SO_4), para desarrollar y modificar las concentraciones de cada uno de los componentes que contiene el reactivo cromógeno del método cualitativo para la determinación de yodo en sal, obteniéndose las cantidades necesarias para cada metodología ver anexo 3 y 4, formato INCAP:

Tabla No. 1 Preparación del reactivo cromógeno: Modificaciones obtenidas para la determinación de yoduro de potasio 15 mg/kg y 20 mg/kg, respectivamente a partir de la concentración original.

	KI (gramos)	KI (%)	H ₂ SO ₄ [Molar]
Concentración inicial	1.25	0.5	2
Concentración final para 15 mg/kg	0.02875	0.0115	0.75
concentración final para 20 mg/kg	0.01875	0.0075	0.50

Se analizó el tiempo de estabilidad del reactivo cromógeno preparándolo en diferentes condiciones: por medio de la utilización de agua desionizada hervida y no hervida en la preparación; cuando el mismo se preparó utilizando agua previamente hervida este fue estable de 5 a 6 días, y 2 a 3 días con las preparaciones utilizando agua sin hervir. En ambos casos el reactivo se almacenó protegido de la luz, en frascos color ámbar, debidamente identificados.

2. Análisis de Contingencia de muestras de yodo en sal:

Se realizaron tres corridas a las muestras de sal escogidas al azar, las cuales fueron agrupadas en diversos rangos de concentración de yodo, por ser un modelo cualitativo se les asignó el valor 1 para las muestras negativas y 2 para las muestras positivas, cada muestra fue valorada tres veces, haciéndose posteriormente un promedio entre cada corrida.

Según el análisis estadístico bivariado de contingencia de 2 X 2 se puede observar en la tabla No. 2, que se obtuvo 4 formas de clasificar los resultados obtenidos al comparar los análisis de la muestra medidos por el método cuantitativo o de referencia con el método cualitativo de punto de corte fijo.

Tabla No. 2 Comparación del método cualitativo de punto de corte fijo 15 mg/Kg para la determinación de yodo en sal con el método de referencia:

Resultado cuantitativo/ No. de corrida	Cualitativo Negativo		Cualitativo Positivo		Total de muestras
	< 15 mg/Kg	> 15 mg/Kg	< 15 mg/Kg	> 15 mg/Kg	
Corrida No.1	33	4	12	71	120
Corrida No. 2	32	2	13	73	120
Corrida No. 3	31	2	14	73	120
PROMEDIO	32	3	13	72	120

Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), y valor predictivo negativo (VPN) obtenidos en la determinación de yodo en sal a la concentración de 15 mg/Kg, y su respectivo porcentaje se muestran en la tabla No. 3

Tabla No. 3 Porcentaje de Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo, Valor Predictivo negativo utilizando el punto de corte de 15 mg/Kg en la determinación de yodo en sal

No. de corridas	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Corrida No. 1	0.8919	0.8554	0.9466	0.7333
Corrida No. 2	0.9412	0.8488	0.9733	0.7111
Corrida No. 3	0.9394	0.8795	0.9733	0.6889
Promedio	0.9242	0.8612	0.9644	0.7111
PORCENTAJE	92.42%	86.12%	96.44%	71.11%

Para la concentración de 20 mg/Kg de yodo en sal puede observarse en la tabla No. 4, la clasificación de los resultados obtenidos al comparar los análisis de la muestra medidos por el método cuantitativo o de referencia con el método cualitativo de punto de corte fijo.

Tabla No. 4 Comparación del método cualitativo para el punto de corte de 20 mg/Kg en la determinación de yodo en sal con el método de referencia:

Resultado cuantitativo/ No. de corrida	Cualitativo Negativo		Cualitativo Positivo		Total de muestras
	< 20 mg/Kg	> 20 mg/Kg	< 20 mg/Kg	> 20 mg/Kg	
Corrida No.1	50	5	9	56	120
Corrida No. 2	53	2	6	59	120
Corrida No. 3	52	5	7	56	120
PROMEDIO	52	4	7	57	120

En la tabla No. 5 se presentan los valores obtenidos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo de yodo en sal a la concentración de 20 mg/Kg, así como los respectivos porcentajes.

Tabla No. 5 Resultado de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo, y valor predictivo negativo, utilizando el punto de corte de 20 mg/Kg en la determinación de yodo en sal

No. de Corridas	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Corrida No. 1	0.9091	0.8615	0.9180	0.8475
Corrida No. 2	0.9636	0.9077	0.9672	0.8983
Corrida No. 3	0.8814	0.8889	0.9180	0.8814
Promedio	0.9180	0.8860	0.9344	0.8757
PORCENTAJE	91.80%	88.60%	93.44%	87.57%

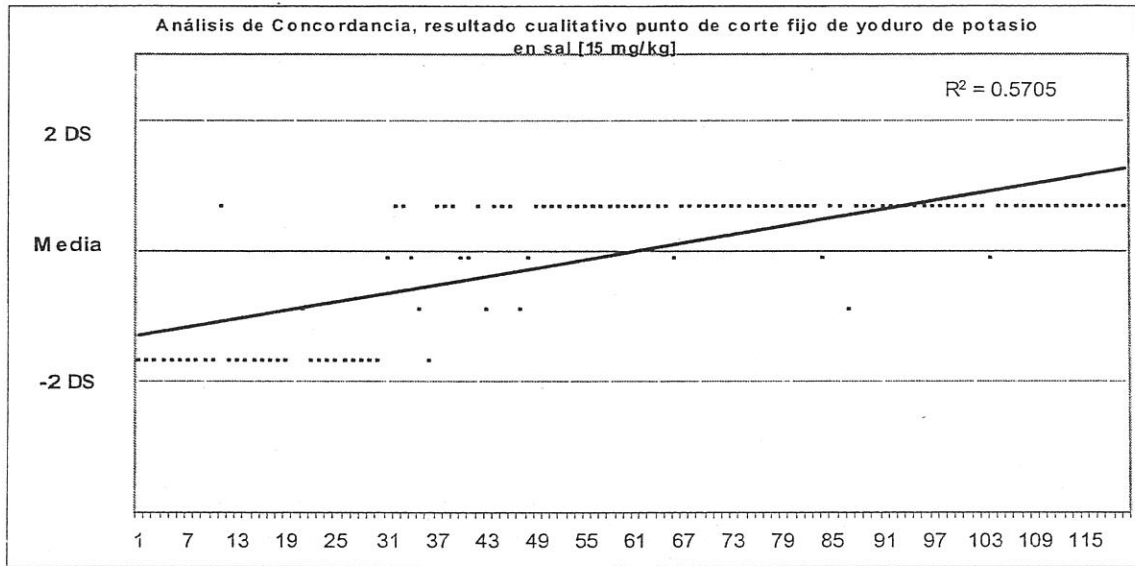
3. Análisis de concordancia KAPA, estadístico STATA versión 7.0 para muestras de yodo en sal:

Asimismo los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de concordancia KAPA a través del análisis estadístico STATA versión 7.0, en el cual la determinación de yodo en sal a la concentración de 15 mg/kg posee un KAPA de 0.69 a 0.71 con un KAPA medio de 0.70 basados en la comparación del método cualitativo de punto de corte fijo y el método de referencia. En la concentración de 20 mg/kg en la determinación de yodo en sal se obtuvo un valor de KAPA de 0.75 a 0.88 con un KAPA medio de 0.81.

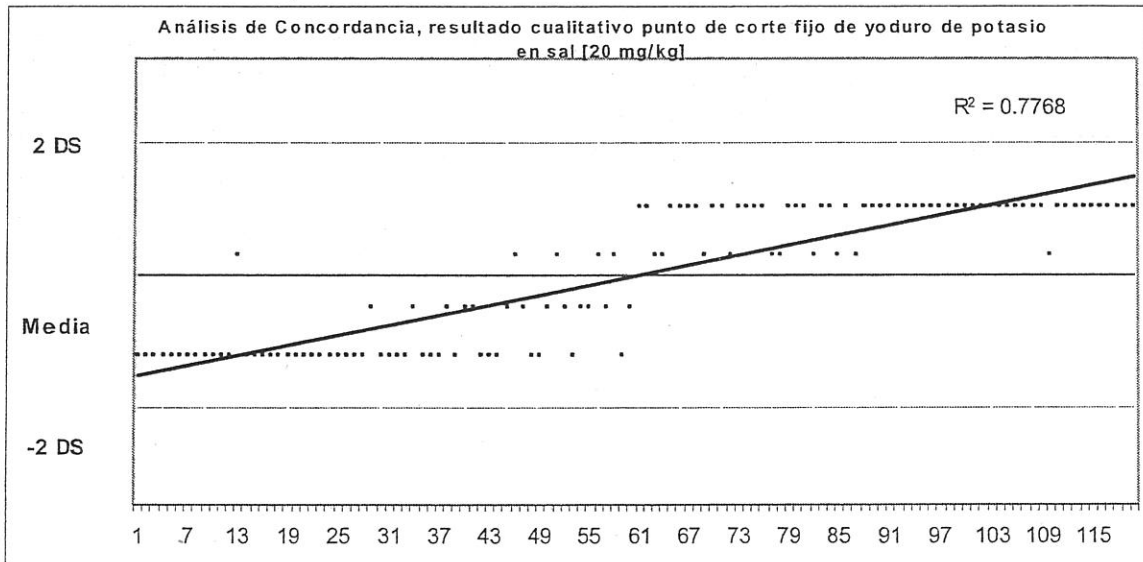
4. Análisis de coeficiente de concordancia y regresión lineal para muestras de yodo en sal:

En las gráficas No.1 y No.2 se observa el análisis de concordancia y su respectiva regresión lineal en las dos concentraciones utilizadas en este experimento.

Gráfica No. 1 Análisis de concordancia y regresión lineal para yoduro de potasio en sal [15 mg/Kg]



Gráfica No. 2 Análisis de concordancia y regresión lineal para yoduro de potasio en sal [20 mg/Kg]



Vitamina "A" en muestras de Azúcar

1. Análisis de desarrollo y caracterización de reactivo cromógeno

Se partió de una concentración de Ácido tricloroacético (CCl_3COOH), Diclorometano (CH_2Cl_2) y Anhídrido acético ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$) que se utilizan para preparar el reactivo cromógeno, se desarrolló y modificó las concentraciones de cada uno de los componentes en la realización del método cualitativo para la determinación de palmitato de retinol en azúcar, obteniéndose las cantidades necesarias para cada metodología (ver anexo 5 y 6, formato INCAP), obteniéndose lo siguiente:

Tabla No. 6 Reactivo cromógeno: Modificaciones obtenidas para la determinación de palmitato de retinol a las concentraciones de: 3.5 mg de retinol /kg de azúcar y 5.0 mg de retinol /kg de azúcar, respectivamente a partir de la concentración original.

	CCl_3COOH (gramos)	CH_2Cl_2 (mL)	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ (mL)
Concentración inicial	120	61	2
Concentración final para 3.5 mg/kg	60	61	2
concentración final para 5.0 mg/kg	30	31	2

Se evaluó el tiempo de duración del reactivo por medio del almacenamiento de este a temperatura ambiente y en refrigeración de lo cual se obtuvo una duración de 15 días guardado a temperatura ambiente sin contacto con humedad y 18 días en refrigeración y sin contacto con luz para evitar oxidación del mismo.

2. Análisis de Contingencia de muestras de vitamina A en azúcar :

En la determinación de retinol en azúcar de acuerdo al análisis estadístico bivariado de contingencia se puede observar que en la tabla No. 7 se clasificó en 4 formas los resultados obtenidos al comparar los análisis de la muestra medidos por el método cuantitativo o de referencia con el método cualitativo de punto de corte fijo.

Tabla No.7 Comparación del método cualitativo de punto de corte fijo 3.5 mg/Kg para la determinación de retinol en azúcar con el método de referencia:

Resultado cuantitativo/ No. de corrida	Cualitativo Negativo		Cualitativo Positivo		Total de muestras
	< 3.5 mg/Kg	> 3.5 mg/Kg	< 3.5 mg/Kg	> 3.5 mg/Kg	
Corrida No.1	31	4	5	80	120
Corrida No. 2	33	7	3	77	120
Corrida No. 3	35	1	1	83	120
PROMEDIO	33	4	3	80	120

En la tabla No. 8 se presentan los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo de retinol en azúcar a la concentración de 3.5 mg/Kg, así como los porcentajes obtenidos.

Tabla No. 8 Porcentaje de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo, Valor Predictivo Negativo, utilizando el punto de corte de 3.5 mg/Kg en la determinación de retinol en azúcar

No. de Corridas	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Corrida No. 1	0.8857	0.9412	0.9500	0.8600
Corrida No. 2	0.8250	0.9625	0.9166	0.9166
Corrida No. 3	0.9700	0.9880	0.9880	0.9700
Promedio	0.8936	0.9639	0.9515	0.9155
PORCENTAJE	89.36%	96.39%	95.15%	91.55%

A través del análisis estadístico bivariado de contingencia para la concentración de 5.0 mg/Kg de retinol en azúcar se puede observar que en la tabla No. 9, se obtuvo 4 formas de clasificar los resultados obtenidos al comparar los análisis de la muestra medidos por el método cuantitativo con el método cualitativo de punto de corte fijo.

Tabla No. 9 Comparación del método cualitativo de punto de corte fijo 5.0 mg/Kg para la determinación de retinol en azúcar con el método de referencia:

Resultado cuantitativo/ No. de corrida	Cualitativo Negativo		Cualitativo Positivo		Total de muestras
	< 5.0 mg/Kg	> 5.0 mg/Kg	< 5.0 mg/Kg	> 5.0 mg/Kg	
Corrida No.1	57	2	3	58	120
Corrida No. 2	57	0	3	60	120
Corrida No. 3	56	0	4	60	120
PROMEDIO	57	1	3	59	120

De acuerdo a la tabla No. 10 se obtuvieron los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo, de retinol en azúcar a la concentración de 5.0 mg/Kg, así como los porcentajes

Tabla No. 10 Porcentaje de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo, Valor Predictivo Negativo, utilizando el punto de corte de 5.0 mg/Kg en la determinación de retinol en azúcar

No. de corridas	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Corrida No. 1	0.9661	.9508	0.9666	0.9500
Corrida No.2	1.0000	0.9524	1.0000	0.9500
Corrida No.3	1.0000	0.9375	1.0000	0.9333
Promedio	0.9887	0.9469	0.9889	0.9444
PORCENTAJE	98.87%	94.69%	98.89%	94.44%

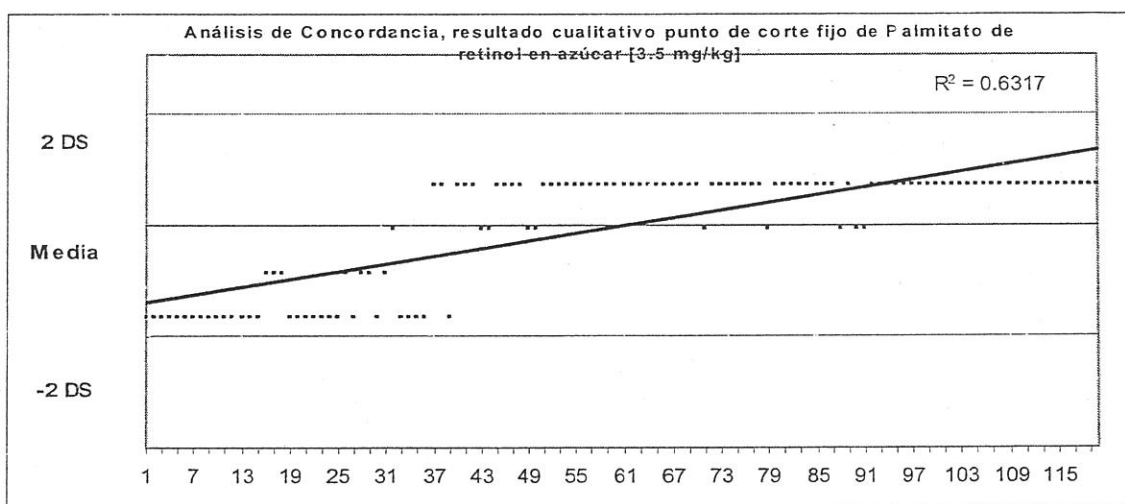
3. Análisis de concordancia KAPA, estadístico STATA versión 7.0 para muestras de vitamina A en azúcar:

Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de concordancia KAPA a través del análisis estadístico STATA versión 7.0, en el cual la determinación de retinol en azúcar a la concentración de 3.5 mg/kg posee un KAPA de 0.806 a 0.95 con un KAPA medio de 0.82 basados en la comparación del método cualitativo de punto de corte fijo y el método de referencia. En la concentración de 5.0 mg/kg en la determinación de retinol en azúcar se obtuvo un valor de KAPA de 0.91 a 0.96 con un KAPA medio de 0.925.

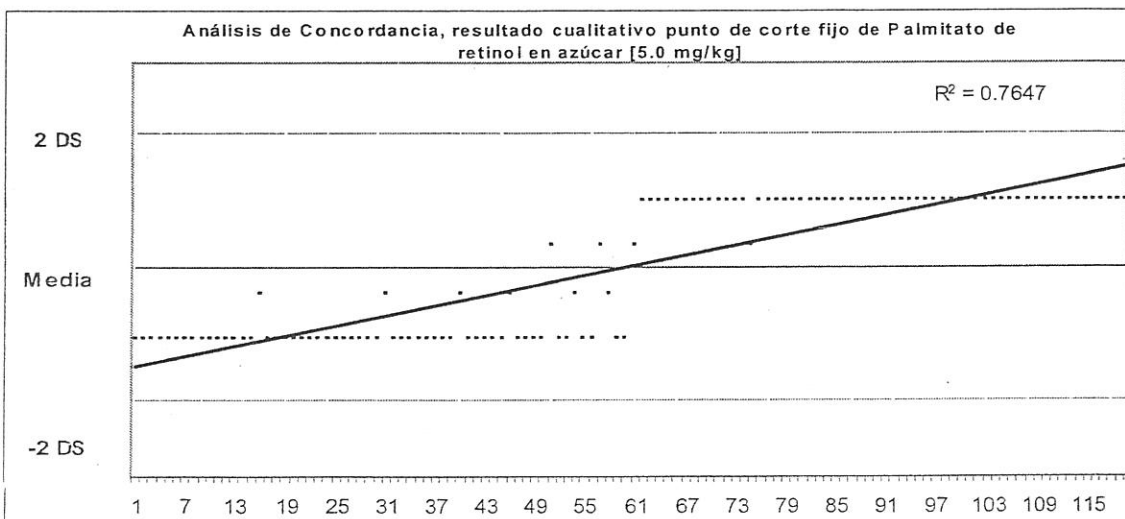
4. Análisis de coeficiente de concordancia y regresión lineal para muestras de palmitato de retinol en azúcar:

En las gráficas No. 3 y No.4 se observa el análisis de concordancia y su respectiva regresión lineal en las dos concentraciones utilizadas en este experimento.

Gráfica No. 3 Análisis de concordancia y regresión lineal para palmitato de retinol en azúcar, [3.5 mg/Kg]



Gráfica No. 4 Análisis de concordancia y regresión lineal para palmitato de retinol en azúcar, [5.0 mg/Kg]



B. Método espectrofotométrico de campo UMS:

En este experimento se utilizaron 80 muestras de sal de concentración conocida escogidas y analizadas al azar, las cuales posteriormente al análisis se agruparon en bloques de acuerdo a la concentración que posee cada una, dichas muestras provienen del laboratorio de Bioquímica Nutricional del INCAP. Cada muestra fue analizada cuatro veces utilizando las concentraciones estándar de 50 mg/kg y 65 mg/Kg de yodo en sal, además se midieron dichas muestras adicionando 50 mL de agua destilada en el procedimiento de dilución de la muestra de las cuales se obtuvo una dilución 1:2, se realizaron curvas de calibración del equipo a las dos concentraciones trabajadas (Anexo 7, formato INCAP).

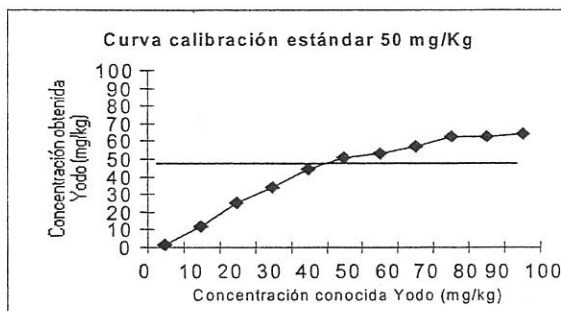
1. Curva de calibración

Se trabajó una curva de calibración en un rango de 0 a 100 mg/Kg de yodo, utilizando las concentraciones 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/Kg de yodo, realizando diluciones bajo las condiciones utilizadas por el método de referencia (Anexo 1). Cada concentración fue analizada por duplicado obteniéndose posteriormente un promedio de las lecturas. Obteniéndose un promedio entre lecturas de 42.53 mg/Kg y un coeficiente de variación de 10.40 %. En la tabla No. 11 se presentan los valores obtenidos en la lectura utilizando la concentración del estándar 50 mg/Kg; en la gráfica 5 se presenta la curva calibración utilizando el estándar de 50 mg/Kg.

Tabla No. 11 Resultados obtenidos curva de calibración con estándar 50mg/Kg de yodo

Concentración conocida mg/Kg	Valor obtenido, 1a. corrida	Valor obtenido, 2a. corrida	Promedio entre corridas	Coefficiente de variación %
0.00	1.9	0.7	1.3	4.77
10.00	9.8	13.3	11.55	4.14
20.00	27.6	23.5	25.55	3.06
30.00	32.0	35.9	33.95	2.18
40.00	42.4	42.5	44.5	1.04
50.00	50.3	50.9	50.6	2.11
60.00	53.7	52.9	53.3	2.44
70.00	56.3	58.3	57.3	2.85
80.00	62.2	63.2	62.7	3.39
90.00	63.7	61.7	62.7	3.39
100.00	63.7	64.7	64.4	3.48
			42.53	10.40

Gráfica No. 5 Curva de calibración utilizando el promedio de la concentración estándar 50 mg/Kg de yodo

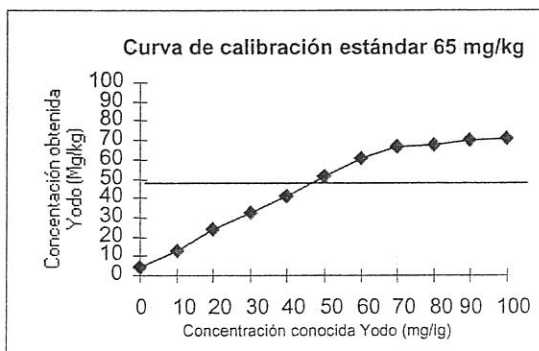


En la tabla No. 12 se presentan los valores de la curva de calibración utilizando estándar de 65 mg/Kg de yodo, donde se obtuvo un promedio de 45.7 mg/Kg entre lecturas y un coeficiente de variación de 10.42 %; en la gráfica 6 se presenta la curva de calibración con el estándar de 65 mg/Kg.

Tabla No. 12 Resultados obtenidos curva de calibración con estándar 65 mg/Kg de yodo

Concentración conocida mg/Kg	Valor obtenido, 1a. corrida	Valor obtenido, 2a. corrida	Promedio entre corridas	Coefficiente de variación %
0.00	2.30	1.8	4.1	4.46
10.00	13.8	12.5	13.1	3.95
20.00	25.4	22.6	24.0	3.22
30.00	34.5	31.3	32.9	2.47
40.00	41.6	40.7	41.1	1.48
50.00	50.4	53.0	51.7	5.36
60.00	60.1	62.1	61.1	2.72
70.00	68.0	66.7	67.0	3.19
80.00	68.8	65.7	67.25	3.21
90.00	70.5	69.3	69.9	3.40
100.00	69.0	72.1	70.55	3.45
			45.7	10.42

Gráfica No. 6 Curva de Calibración utilizando el promedio de la concentración estándar 65 mg/Kg de yodo



2. Análisis de varianza (ANOVA)

En tablas No. 13 a la tabla No.16 se observan los resultados obtenidos en el análisis de varianza en la determinación de yodo utilizando el espectrofotómetro UMS utilizando el estándar 50 mg/Kg, 50 mg/Kg + 50 ml de agua destilada Dil 1:2, además de los resultados obtenidos al utilizar la concentración de 65 mg/kg de yodo y 65 mg/Kg de yodo + 50 ml de agua destilada Dil 1:2 respectivamente.

Tabla No. 13 Resultados del análisis de varianza para la determinación de yodo en muestras de sal utilizando estándar 50 mg/Kg.

	Datos cualitativos resultados obtenidos	Datos cuantitativos resultados obtenidos
Media	38.87	55.34
Desviación estándar	19.30	40.76
Varianza	372.62	1661.41
No de observaciones	80	80
Coefficiente de correlación de Person	0.8887	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	79	
Estadístico t	-5.841724263	
P(T<=t) una cola	5.49423E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1.292360139	
P(T<=t) una cola	1.09885E-07	
Valor crítico de t (dos colas)	1.664370757	

Tabla No. 14 Resultados del análisis de varianza para la determinación de yodo en muestras de sal utilizando estándar 50 mg/Kg + 50 ml de agua destilada, Dil 1:2.

	Datos cualitativos resultados obtenidos	Datos cuantitativos resultados obtenidos
Media	51.67	55.34
Desviación estándar	35.81	40.76
Varianza	1282.35	1661.41
No de observaciones	80	80
Coefficiente de correlación de Person	0.8761	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	79	
Estadístico t	-1.672002363	
P(T<=t) una cola	0.04924018	
Valor crítico de t (una cola)	1.292360139	
P(T<=t) una cola	0.098480359	
Valor crítico de t (dos colas)	1.664370757	

Tabla No. 15 Resultados del análisis de varianza para la determinación de yodo en muestras de sal utilizando estándar 65 mg/Kg.

	Datos cualitativos resultados obtenidos	Datos cuantitativos resultados obtenidos
Media	44.25	55.34
Desviación estándar	22.74	40.76
Varianza	517.1802433	1661.41
No de observaciones	80	80
Coefficiente de correlación de Person	0.893	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	79	
Estadístico t	-4.3787745	
P(T<=t) una cola	1.8125E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1.292360139	
P(T<=t) una cola	3.6225E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	1.664370757	

Tabla 16 Resultados del análisis de varianza para la determinación de yodo en muestras de sal utilizando estándar 65 mg/Kg + 50 ml de agua destilada, Dil 1:2..

	Datos cualitativos resultados obtenidos	Datos cuantitativos resultados obtenidos
Media	66.30	55.34
Desviación estándar	36.79	40.76
Varianza	1353.69	1661.41
No de observaciones	80	80
Coefficiente de correlación de Person	0.8767	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	79	
Estadístico t	4.99192002	
P(T<=t) una cola	1.74565E-06	
Valor crítico de t (una cola)	1.292360139	
P(T<=t) una cola	3.49131E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	1.664370757	

3. Coeficiente de correlación de concordancia y Regresión lineal

Para obtener el coeficiente de correlación de concordancia se utilizo la fórmula siguiente, donde existe una magnífica concordancia si es valor obtenido es 0.

$$E[(Y_1 - Y_2)^2] = (\mu_1 - \mu_2)^2 + (\sigma_1 - \sigma_2)^2 + 2(1 - \rho)\sigma_1\sigma_2$$

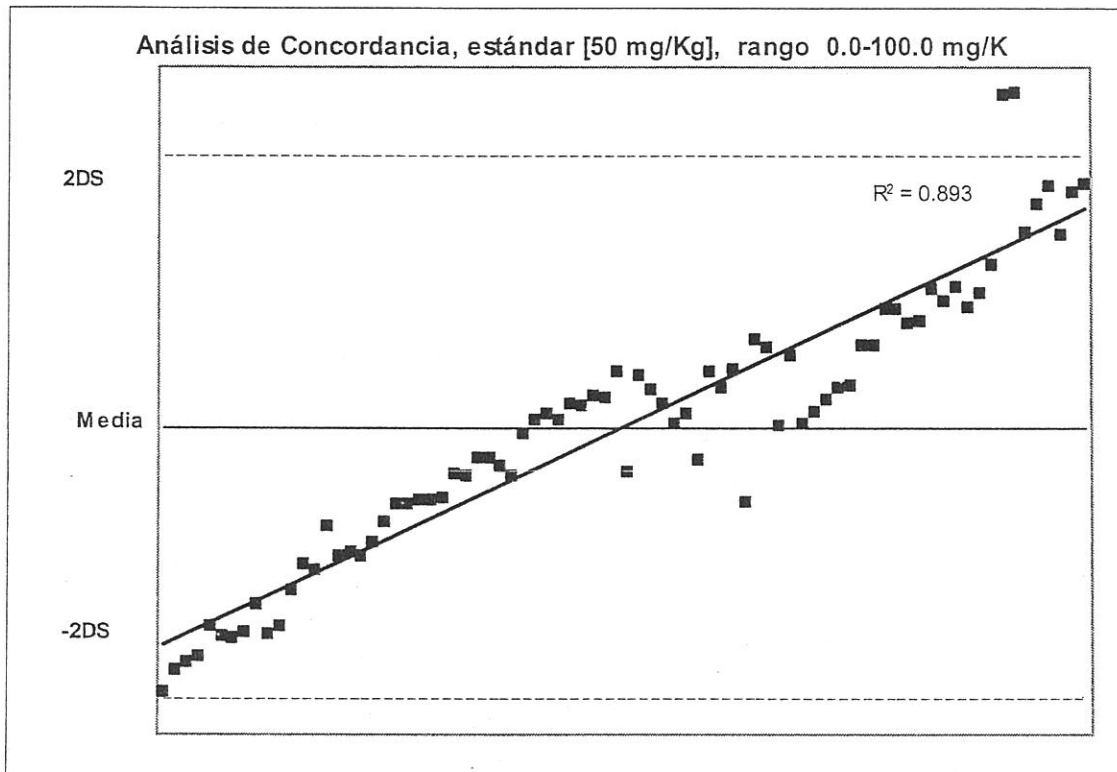
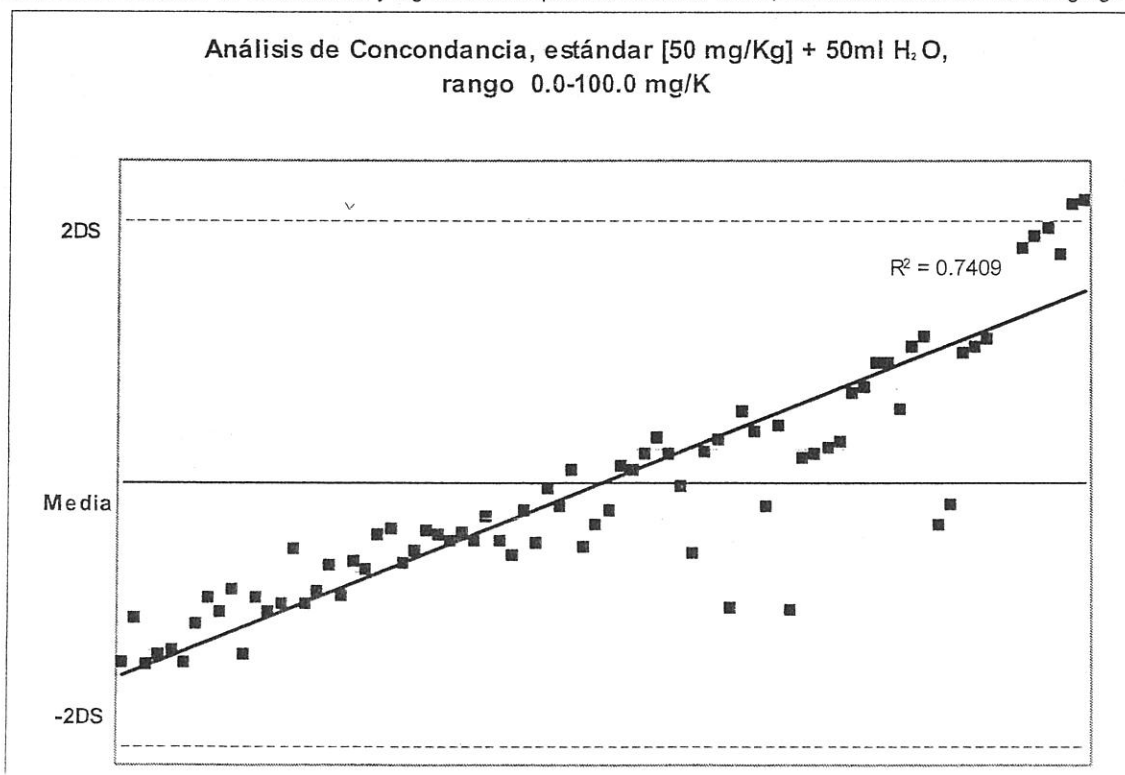
En la tabla No. 17 se puede observar el coeficiente de concordancia obtenido al utilizarse el equipo espectrofotométrico UMS, respectivamente de las diversas concentraciones utilizadas en el experimento.

Tabla No. 17 Resultados del coeficiente de correlación de concordancia, en las concentraciones 50mg/Kg y 65 mg/Kg y sus diluciones.

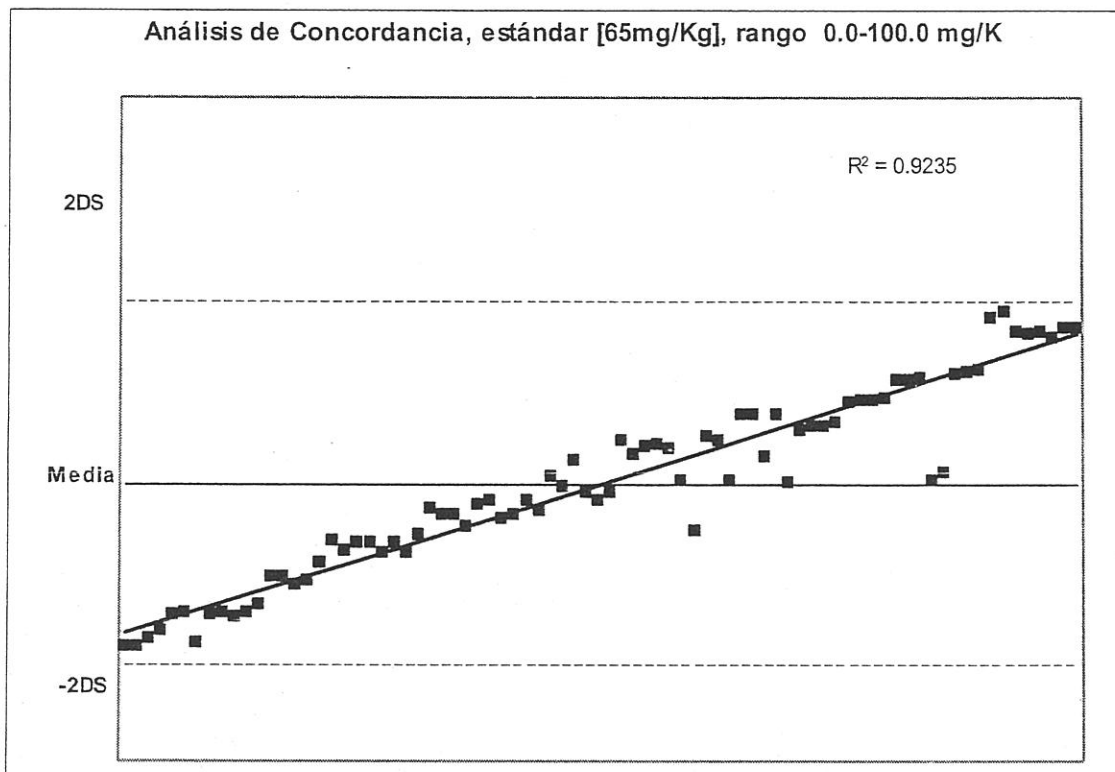
Concentración	Valor Obtenido
Utilizando estándar 50 mg/Kg	30.08
Utilizando estándar 50 mg/Kg + 50 ml de agua destilada, Dil1:2	19.71
Utilizando estándar 65 mg/Kg	25.16
Utilizando estándar 65mg/Kg + 50 ml de agua destilada, Dil1:2	22.26

De las gráficas No. 7 a la No. 10, se encuentra el análisis de concordancia y regresión lineal obtenida de todas las muestras de sal analizadas a las diversas concentraciones planteadas en este estudio. Estas a su vez se desglosaron por rangos y se evaluaron de la misma forma, ver anexo 8: gráficas 11 a 14.

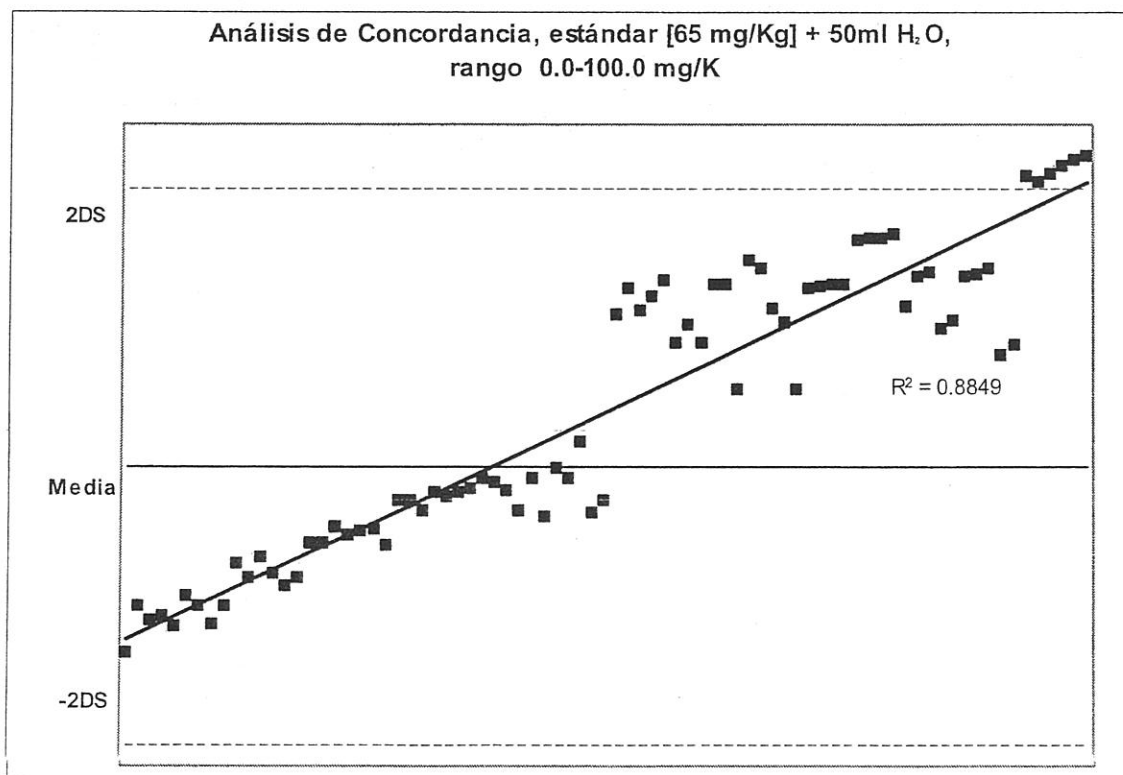
Gráfica No. 7 Análisis de concordancia y regresión lineal para las muestras de sal, utilizando el estándar de 50 mg/Kg.

Gráfica No. 8 Análisis de concordancia y regresión lineal para las muestras de sal, utilizando el estándar de 50 mg/Kg + 50 ml H₂O

Gráfica No. 9 Análisis de concordancia y regresión lineal para las muestras de sal, utilizando el estándar de 65mg/Kg.



Gráfica No. 10 Análisis de concordancia y regresión lineal para las muestras de sal, utilizando el estándar de 65 mg/Kg + 50 ml de agua



IX. DISCUSION

1. Método cualitativos de punto de corte fijo

Para el desarrollo de los reactivos en la determinación de yodo en sal a dos diversas concentraciones se partió de una concentración inicial conocida, de la cual fueron modificadas las cantidades de los reactivos según la capacidad de los mismos, al captar el analito a la concentración de 15 mg/Kg y 20 mg/Kg respectivamente tabla No. 1, dichas concentraciones de los reactivos fueron determinadas tras varias repeticiones en la elaboración del reactivo, y medidos a través de la utilización de muestras de sal con una concentración conocida de 15 mg/Kg y 20 mg/Kg, también se evaluó la forma y tiempo de almacenaje, tiempo de oxidación, y la calidad de los reactivos que se elaboraron.

Para la verificación del reactivo en la detección de yodo a una concentración de 15 mg/kg, se utilizaron 120 muestras de sal elegidas al azar previamente analizadas por el método de referencia utilizado en el laboratorio de bioquímica del INCAP, estos resultados se compararon con los datos obtenidos al ser utilizado el método cualitativo de punto de corte fijo, para ello se realizaron tres corridas diferentes y se clasificaron los resultados según la tabla No. 2, donde se puede observar en promedio que 32 muestras que presentaron resultado cuantitativo menor de 15 mg/Kg y cualitativo negativo, 3 muestras con resultado cuantitativo mayor de 15 mg/Kg y cualitativo negativo; 13 muestras con cuantitativo menor de 15 mg/Kg y cualitativo positivo y 72 muestras con cuantitativo mayor de 15 mg/Kg y cualitativo positivo.

Al ser comparados los resultados de la metodología cualitativa de punto de corte fijo, para la determinación mínima de 15 mg/Kg con la metodología cuantitativa de referencia del INCAP, muestra que ésta posee el 92.42 % de sensibilidad para la detección de yodo ante dicha concentración, asimismo la especificidad del mismo presenta un 86.12 % de su capacidad de reaccionar ante dicha concentración, esto puede deberse a un mal homogenizado de las muestras a analizar.

La posibilidad de que las muestras sean positivas al ser analizadas por esta metodología que contengan concentración por arriba de lo esperado es del 96.44%, mientras tanto que las muestras que sean negativas o no contengan la concentración establecida por debajo de lo esperado poseen 71.11 %, lo cual indica que este método es confiable para la detección de 15 mg/kg de yodo en muestras de sal tabla No. 3, lo cual puede verse afectada por los procesos de homogenicidad de las muestras, además debe ser monitoreada constantemente la calidad de las concentraciones de los reactivos, ya que los mismos al pasar tiempo sin ser utilizados pueden oxidarse, razón por la cual siempre deben llevarse a cabo corridas de controles diarios para verificar la calidad de los mismos, utilizando para ello muestras de sal con concentraciones de yodo conocido.

Al evaluar los resultados obtenidos por medio del análisis KAPA, estadístico STATA versión 7.0 se obtiene un valor Kapa medio de 0.70 con un rango de detección entre los valores de 0.69 a 0.71, estos valores al ser analizados por medio del índice de Fleiss refleja que la metodología evaluada se

encuentra en un rango donde los valores que presenta son confiables ya que tiene una buena aceptación o confiabilidad entre cada lectura. Debido a ello no debe excluirse ya que puede ser utilizada la metodología cualitativa en el análisis de muestras de sal que no se conoce su concentración, ya que detecta el punto de corte fijo establecido, el cual puede ser confirmado posteriormente al realizar el seguimiento de los análisis con el método cuantitativo.

De acuerdo a la tabla No. 4 se puede observar el promedio de las 3 corridas realizadas a las muestras de sal para comparar la capacidad del reactivo en detectar la concentración de 20 mg/Kg de yodo, con el método cuantitativo donde se obtuvo lo siguiente: 52 muestras con resultado cuantitativo menor de 20 mg/Kg y resultado cualitativo negativo, 4 muestras con resultado cuantitativo mayor de 20 mg/Kg y cualitativo negativo, además de 7 muestras con resultado menor de 20 mg/Kg y cualitativo positivo, 57 muestras con resultado cuantitativo mayor de 20 mg/Kg y cualitativo positivo.

La metodología cualitativa de punto de corte fijo para la concentración de 20 mg/Kg de yodo en sal posee una sensibilidad del 91.80 % para determinar la presencia de yodo a dicha concentración, presenta una especificidad del 88.6 % en captar la presencia del yodo en la sal. Lo que genera un alto valor predictivo (93.44%), o capacidad de detectar la presencia del yodo a la concentración deseada. Así como tiene el (87.57 %) de probabilidad de detectar muestras que no contengan el analito en cuestión tabla No. 5, dichos valores al ser comparados con los obtenidos a través del análisis de concordancia KAPA, refleja que existe una verdadera concordancia entre el método cualitativo y cuantitativo ya que posee un KAPA medio de 0.81 en un rango de 0.75 a 0.88, lo cual al ser analizado bajo el criterio de Fleiss muestra que tanto el método cualitativo y cuantitativo pueden ser utilizados indistintamente y detectarán específicamente la concentración de 20mg/Kg de yodo.

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de concordancia y regresión lineal se puede decir que posee una buena aceptación ya que por ser una metodología cualitativa el resultado va a depender más que nada de la interpretación que el observador de al resultado, razón por la cual va a variar la exactitud y precisión del mismo, al ser utilizado por diversas personas gráficas 1 y 2.

Los reactivos cromógenos fueron llevados a cabo a partir de métodos cualitativos preexistentes dentro del laboratorio de bioquímica de INCAP, los cuales permiten identificar retinol tabla No.6, dichos métodos son utilizados para concentraciones más altas, en este experimento se utilizaron como base para obtención de las diversas proporciones de los componentes a utilizar en el punto de corte fijo requerido. Para cada componente se realizaron diversos experimentos en los cuales variaron las cantidades iniciales de los mismos, donde se midió con cada uno la capacidad de detectar la concentración en cuestión, estabilidad, durabilidad.

Al llevar a cabo la verificación del reactivo en la detección de palmitato de retinol a una concentración de 3.5 mg/kg, se utilizaron 120 muestras de azúcar elegidas previamente analizadas por el método de referencia utilizado en el laboratorio de bioquímica del INCAP dichas muestras se escogieron al azar, estos resultados se compararon con los datos obtenidos del método cualitativo de punto de corte fijo, para ello se realizaron tres corridas diferentes y se clasificaron los resultados según la

tabla No. 7, donde se puede observar en promedio que 33 muestras que presentaron resultado cuantitativo menor de 3.5 mg/Kg y cualitativo negativo, 4 muestras con resultado cuantitativo mayor de 3.5 mg/Kg y cualitativo negativo; 3 muestras con cuantitativo menor de 3.5 mg/Kg y cualitativo positivo y 80 muestras con cuantitativo mayor de 3.5 mg/Kg y cualitativo positivo.

La evaluación de las metodologías cualitativas de punto de corte fijo para determinar retinol a una concentración de 3.5 mg/Kg en muestras de azúcar analizadas por la metodología cuantitativa de referencia del INCAP, muestra un 89.36 % de sensibilidad lo que permite identificarlas como positivas, la especificidad presenta un 96.36 % de capacidad de reaccionar ante dicha concentración. Ante la posibilidad de que las muestras sean positivas al ser analizadas por esta metodología que contengan concentración por arriba de lo esperado es del 95.15%, mientras que no contengan la concentración establecida por debajo de lo esperado es de 91.55% tabla No. 8.

Al analizar los resultados obtenidos por medio del análisis KAPA, se obtiene un valor Kapa medio de 0.82 con un rango de detección entre los valores de 0.806 a 0.95, estos valores al ser analizados demuestran que este valor medio se encuentra en un rango excelente donde el grado de aceptación o confiabilidad entre lecturas permite que ambos métodos sean utilizados por igual en la detección de 3.5 mg/Kg de retinol.

Según la tabla No. 9 se puede observar el promedio de las 3 corridas realizadas a las muestras de azúcar para comparar la capacidad del reactivo en detectar la concentración de 5.0 mg/Kg de palmitato de retinol, con el método cuantitativo donde se obtuvo lo siguiente: 57 muestras con resultado cuantitativo menor de 5.0 mg/Kg y resultado cualitativo negativo, 1 muestra con resultado cuantitativo mayor de 5.0 mg/Kg y cualitativo negativo, además de 3 muestras con resultado menor de 5.0 mg/Kg y cualitativo positivo, 59 muestras con resultado cuantitativo mayor de 5.0 mg/Kg y cualitativo positivo.

Para concentración de 5.0 mg/Kg de retinol en azúcar se puede decir que éste posee una sensibilidad del 98.87% para determinar la presencia de retinol a dicha concentración, y la metodología donde éste es específico en la determinación del analito en cuestión ya que presenta una especificidad del 94.69% en captar la presencia del retinol en azúcar. Lo que genera un alto valor predictivo (98.89%) tabla No. 10, lo cual es la capacidad de detectar la presencia del retinol a la concentración deseada. En el análisis KAPA la concentración de 5.0 mg/Kg refleja que existe una verdadera concordancia entre el método cualitativo y cuantitativo ya que posee un KAPA medio de 0.925 en un rango de 0.91 a 0.96, lo cual al ser analizado con el criterio de Fleiss refleja que tanto el método cualitativo y cuantitativo pueden ser utilizados indistintamente y detectarán específicamente la concentración deseada.

En la determinación del palmitato de retinol en azúcar puede establecerse que posee una buena regresión lineal ya que el resultado permite en ambas concentraciones un acercamiento a la obtención de precisión y exactitud del método, aunque no es del todo confiable ya que depende de la capacidad de captación que posea la persona que utilice esta metodología gráfica 3 y 4.

2. Método espectrofotométrico de campo para la determinación de yodo en sal: UMS-probador instantáneo

En este experimento se validó el método espectrofotométrico de campo UMS, para ello se utilizaron 80 muestras de sal, de concentración conocida integradas por rangos de 0.0 a 100 mg/Kg de yodo, se efectuaron 4 corridas de cada una posteriormente se realizó un promedio entre cada una, se utilizó la concentración del estándar sugerido por el fabricante del instrumento 50 mg/Kg de yodo y un estándar de 60 mg/Kg elaborado para este experimento, además se verificó si este instrumento podía mantener sus condiciones de lectura al realizar una dilución 1:2 de las muestras adicionando 50 ml de agua a cada una y en las dos concentraciones de los estándares antes mencionados.

Se realizaron curvas de calibración utilizando los estándares a 50 mg/Kg y 60 mg/Kg respectivamente utilizándose como muestras las soluciones patrón del método de referencia (anexo 1), de lo cual se obtuvo un promedio de 42 mg/Kg y un coeficiente de variación de 10.40 % entre corridas tabla No.11, y 45.7 mg/Kg y un coeficiente de variación de 10.42 % tabla No.12; en la detección del yodo por el método espectrofotométrico, reflejando exactitud entre lecturas pero no especificidad al ir incrementando y sobrepasando la concentración del estándar utilizado. Además los resultados obtenidos en él, no son muy significativos ya que desde la curva de calibración gráfica 5 y 6, se observa que al momento de llegar la muestra analizar por arriba o igual a la concentración del estándar de 50 mg/Kg o 60 mg /Kg las lecturas siguientes mayores a dicha concentración no son detectados por el equipo, observándose que la linealidad del método se pierde al llegar a dicha concentración, además por ser un método espectrofotométrico se da una poca o leve variabilidad en las lecturas que se realizan, ya que luego de transcurrido un tiempo y es medido nuevamente el estándar, éste sufre alguna variación en la lectura de concentración original.

Se analizaron las 80 muestras al azar de concentración cuantitativa conocida por el método de referencia, se trabajo de igual manera cada corrida, al inicio de cada experimento se midió calibración del equipo utilizando siempre el mismo estándar 50 mg/Kg o 60 mg/Kg respectivamente. A la concentración de 50 mg/Kg se observa en la tabla No. 13 su análisis de varianza donde se comparan los datos semi-cualitativos con los datos cuantitativos apreciando una gran diferencia entre resultados: media 38.67, desviación estándar 19.30, varianza 372.52; contra resultados cuantitativos: media 55.34, desviación estándar 40.76 y varianza 1661.41 respectivamente. En la gráfica No. 7 se muestra la regresión lineal, donde $r^2 = 0.893$ reflejando una alta linealidad del mismo, por lo que puede decirse que este presenta una gran estabilidad, precisión y exactitud.

Al efectuar las corridas a la concentración estándar de 50 mg/Kg y añadiendo 50 ml de agua a cada muestra, dilución 1:2 se observa en la tabla No. 14 su análisis de varianza donde se comparan los datos semi-cualitativos con los datos cuantitativos obteniendo lo siguiente: media 51.67, desviación estándar 35.81, varianza 1282.35; contra resultados cuantitativos: media 55.34, desviación estándar 40.76 y varianza 1661.41 respectivamente. En la gráfica No. 8 se muestra la regresión lineal, $r^2 = 0.7409$

que presenta este método reflejando una buena linealidad del mismo, por lo cual este presenta estabilidad, precisión y exactitud.

En la concentración de 65 mg/Kg se observa en la tabla No. 15 el análisis de varianza donde se comparan los datos semi-cualitativos con los datos cuantitativos apreciando una diferencia significativa entre resultados: media 44.25, desviación estándar 22.74, varianza 517.18; contra resultados cuantitativos: media 55.34, desviación estándar 40.76 y varianza 1661.41 respectivamente. En la gráfica No. 9 se muestra la regresión lineal: $r^2 = 0.923$ donde este método refleja una muy buena linealidad del mismo, por lo cual este presenta una gran precisión y exactitud.

A la concentración de 65 mg/Kg más 50 ml de agua a cada muestra se observa en la tabla No. 16 su análisis de varianza donde se comparan los datos semi-cualitativos con los datos cuantitativos apreciando una gran diferencia entre resultados: media 66.30, desviación estándar 36.79, varianza 1353.69; contra resultados cuantitativos: media 55.34, desviación estándar 40.76 y varianza 1661.41 respectivamente. En la gráfica No. 10 se muestra la regresión lineal: $r^2 = 0.8849$ que presenta este método reflejando una buena linealidad del mismo, por lo cual este presenta una estabilidad, precisión y exactitud aceptable y confiable.

Se puede decir que este método no posee un buen coeficiente de correlación de concordancia ya que los resultados obtenidos no se acercan a 0, sino que estos son valores muy altos, ver tabla No. 17, por lo que se puede decir que este método es muy inespecífico, en la detección de yodo en muestras de sal.

X. CONCLUSIONES

1. Los métodos cualitativos de punto de corte fijo desarrollados, caracterizados y validados en este estudio para la determinación de micronutrientes como el yodo en sal a concentraciones de 15 mg/Kg y 20 mg/Kg y el palmitato de retinol en azúcar a 3.5 mg/Kg y 5.0 mg/Kg, proporcionan resultados comparables con el método de referencia o cuantitativo.
2. Los métodos cualitativos de punto de corte fijo, cumplen con las condiciones de precisión y exactitud necesarias para ser implementadas al sistema de vigilancia de alimentos fortificados ya que son métodos rápidos, confiables, válidos, sensibles, precisos, y reproducibles para detectar yodo en sal a concentraciones de 15 mg/Kg y 20 mg/Kg y palmitato de retinol en azúcar a concentraciones de 3.5 mg/Kg y 5.0 mg/Kg.
3. Para reducir el tiempo y costo de los análisis futuros de muestras de sal y azúcar, pueden ser utilizadas las metodologías cualitativas de punto de corte fijo, ya que se pueden formar muestras compuestas de las mismas, y medir posteriormente su cantidad con el método de referencia.
4. Se determinó el desarrollo, caracterización y validación de ensayos cualitativos de punto de corte fijo, que permiten identificar muestras con contenidos mínimo específicos establecidos actualmente por la legislación guatemalteca, a partir de una metodología preexistente de la cual se establecieron nuevas concentraciones de los componentes de los reactivos (20 mg/Kg de yodo en sal y 5.0 mg/Kg de retinol en azúcar).
5. Los reactivos de las metodologías cualitativas de punto de corte fijo deben ser verificados todos los días por medio de controles de sal y azúcar de concentración conocida de yodo y vitamina A respectivamente, ya que estos se oxidan fácilmente (aprox. 5 días de vida útil), al no ser bien guardados y almacenados en frascos oscuros.
6. Se establece que el método espectrofotométrico de campo UMS, no presenta valores de correlación, análisis de varianza, y regresión que reflejen que este sea capaz de medir con precisión las concentraciones de yodo en sal.
7. El equipo y método espectrofotométrico de campo UMS si posee exactitud de lectura hasta la concentración de estándar de 50 mg/Kg en muestras que contengan yodo en un rango de 00.00 a 50 mg/Kg.

8. Al utilizar el estándar de 65 mg/Kg de yodo se refleja cierta exactitud en las lecturas, pero se dan más variaciones a partir de 50 mg/kg a 65 mg/kg, ya que el instrumento espectrofotométrico fue elaborado para lecturas de hasta 50 mg/Kg, por lo que no son muy confiable los resultados. Al realizar lecturas con los estándares diluidos se da una mayor inestabilidad entre lecturas, reflejando pérdida de captación por parte del instrumento.

XI. RECOMENDACIONES

1. Antes de ser analizadas las muestras de sal almacenarlas en un lugar seco, y oscuro ya que al presentar alto grado de humedad se pierde cantidad neta de muestra a analizar, así como las muestras de azúcar deben ser recolectadas y almacenadas en oscuridad para que no se de la pérdida del palmitato de retinol. Para asegurar la integridad de las muestras de sal y azúcar para las determinaciones de yodo y vitamina A, respectivamente, las mismas se deben almacenar protegiéndolas de la luz directa ya sea dentro de bolsas oscuras y en cajas, a temperatura ambiente y buena ventilación.
2. Los reactivos para las metodologías cualitativas de punto de corte fijo deben ser guardados en frascos color ámbar, privados de luz, plenamente identificados lo que incluye nombre del reactivo, composición y concentración del mismo, fecha de producción y posible caducidad, además datos de la persona que lo elaboró, para el reactivo de yodo debe guardarse a temperatura ambiente y en el caso del reactivo para el palmitato este debe ser debidamente refrigerado.
3. Se recomienda utilizar el reactivo cromógeno de yodo en sal hasta 5 días, luego de ser preparado ya que al sexto día inicia a oxidarse, además de correr controles diarios al momento de utilizarlos de muestras con concentración de yodo conocida, almacenarlos en lugares a temperatura ambiente, en frascos oscuros, además de libres de luz e identificados correctamente.
4. El reactivo cromógeno para el palmito debe ser guardado en refrigeración hasta 18 días después de su elaboración, en frasco bien identificado y de color ámbar, del cual se deben correr controles diariamente al momento de su utilización, con muestras de concentración conocida.
5. Homogenizar cada muestra a analizar por los menos de 3 a 5 minutos, utilizando bolsas o recipientes de mayor tamaño a la muestra que se posea, agitándolo entre las manos en forma circular, tomando de ahí de una vez la muestra, posteriormente regresarlo a su empaque original.
6. Generar proyectos de investigación donde sean aplicados estas metodologías ya que a través de su utilización serán evaluados en una forma más rápida, los programas de fortificación implementados en Guatemala, medidos a través del estudio de muestras obtenidas por medio del Programa de Escuela Centinela.
7. Implementar e integrar éstas metodologías por las diversas instituciones nacionales que evalúan los programas de fortificación, capacitando al personal de toma de muestra para realizar estos análisis una vez que recolecten muestras, en los diversos establecimientos del país.

8. Proveer al los diversos establecimientos productores de sal y azúcar en Guatemala, éstas metodologías para que también puedan realizar inspecciones rápidas y cortas de la fortificación que llevan a cabo.

9. Se debe verificar el funcionamiento del detector óptico del probador instantáneo de yodo cada vez que se utiliza, ya que su composición es similar a un espectrómetro, por lo que puede presentar variaciones en las lecturas, utilizando cada vez el estándar de 50 mg/Kg.

XII. REFERENCIAS

1. Documento INCAP (Instituto de Nutrición de Centro America y Panamá), *et. al.* Situación de los alimentos fortificados. Guatemala. 2001. 13p.
2. Dary, O. Importancia de la fortificación de alimentos en el mundo. Seminario Internacional de Fortificación de Alimentos Santa Fé de Bogotá, Colombia. Guatemala INCAP/OPS. 1998. 4p.
3. Dary, O. Fortificación de alimentos: Estrategia esencial para cumplir los compromisos para la prevención de la deficiencia de micronutrientes en Guatemala. Guatemala. INCAP/OPS. 2000. 6p.
4. Buzina, R. Micronutrient Deficiencies: a global health problem. *Nutriview*. Switzerland. 1995. 4:4-5.
5. Blum, M. Food Fortification: a key strategy to end micronutrition malnutrition. *Nutriview*. Switzerland. 1997. 2:1-22.
6. Sanghvi, T. Vital Nutrients: supporting life. Health and productivity through iron, iodine and vitamin A. USA. VITAL/ISTI/USAID. 1992. 36p.
7. Kim, S., Freire, W. Fortificación de Alimentos con Micronutrientes: fundamentos de las Garantía de Calidad. Washington, USA. OPS/OMS. 1997. 8p.
8. Dary, O. Introducción y Concepto de los Sistemas de Garantía de Calidad y sus Resultados en Centro-América. Informe de Panel Foro "Estado de los Programas de Fortificación de Alimentos en Centroamérica: documentación por los Sistemas de Garantía de Calidad". Guatemala. INCAP/OPS. 1999. 6p.
9. UNICEF & INCAP/OPS. Informe del Programa Escuelas Centinela Micronutrientes. Guatemala. 1995. 3p.
10. Vitamin A Field Support Project (VITAL). En Tercer Taller Regional Sobre Deficiencias de Vitamina A y otros micronutrientes en América Latina y el Caribe. 1993. 135p.
11. Vidor, G. Iodine Toxicity in Man and Animals. Vol 1. Florida/USA: Editorial Handbook Series in Nutrition and Food. 1978. 219-282pp.
12. Cavalieri, R. Iodine. 6a. ed. Filadelfia/USA: Editorial Modern Nutrition in Health and Disease. 1980. 395-407pp.
13. Fisher, R. Análisis Químico Cuantitativo. 3a. ed. México: Editorial Interamericana, S.A. 1970. 213-245pp.
14. Stanbury, J. Deficiencia de yodo y trastornos por deficiencia de yodo. En conocimientos Actuales sobre Nutrición. 7a. edición. Editores: Ziegler, E. Filer, J. Washington. E.U.A. ILSI. 1997. OPS/AOMS. 404-409pp.
15. Braverman, L. The thyroid. Lippincott. Philadelphia/E.U.A. 1991. 258-269pp.
16. Hurrel, R.F. Bioavailability of iodine. *European J. of Clin. Nutr.* 1997;51; Suppl. 1;S9-S12.
17. Hurrel, R. The Mineral Fortification of Foods. 1a. ed. England. Ed. Leather Head International Ltd. 1999. 94-111pp.

18. Matovinovic, J. *et al*. Iodine and Endemic Goiter. En Dunn, J.; Medeiros-Neto, A. Ed. Endemic Goiter and Cretinism: Continuing Threats to World Health. Pub. Científica No. 292 PAHO, Washington. 1974. 67-91pp.
19. WHO/UNICEF/ICCIDD. Recommended iodine levels in salt and guidelines for monitoring their adequacy and effectiveness. U.S.A. 1996. 1-2pp.
20. Delange, F. *et al* Regional variations in iodine nutrition and thyroid function during the neonatal period in Europe. *Biol. Neonate*; 1986; 49;322-333.
21. Refetoff, s. *et al* The syndromes of resistance to thyroid hormone. 1993. *Endocr. Rev* 14:348-398.
22. Delange, F. the disorders induced by iodine deficiency thyroid. *E.U.A.* 1994. 4:107-128pp.
23. Boyages, S. iodine Deficiency disorders. *J. Clin. Endr.and Met.*; 1993. 77:587-591.
24. Mazariegos, D. I. Análisis Semiautomatizado de Yodo en Orina y en Muestras de Sal. Adaptación de Métodos Espectrofométricos al Análisis Cinético en Microplaca. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, UVG.(Tesis de graduación, Facultad de Ciencias y Humanidades), 1994. 109p.
25. Dunn, J.; Van der Haar, F. Guía Práctica para la Corrección de la Deficiencia de Yodo. Consejo Internacional para el Control de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo. ICCIDD/UICEF/OMS, Holanda. 1992. 62p.
26. Hetzel, B. *et al* The Iodine Deficiency Disorders: Their Nature and Prevention. *Ann. Rev. Nutr.* 9:21-38.
27. INCAP/OPS/USAID/OMNI/SUSTAIN/BASIC. Informe del Taller de los Sectores Público y Productor, Sobre Requerimientos Técnicos y Garantía de Calidad de Alimentos fortificados en Centroamérica. Guatemala. 1998. 50p.
28. ROCHE. Vitamin A in Human Health. Switzerland. 1988. 15p.
29. Allen, O. Vitamina A. En conocimientos Actuales sobre Nutrición. 7a. edición. Editores: Ziegler, E. Filer, J. Washington. E.U.A. ILSI. 1997. OPS/AOMS. 118-127pp.
30. Dekker, M. Absorption of vitamin A. En *Vitamin A in health and disease*. New York. 37-72pp.
31. Wungaarden, JB. *et al* Tratado de Medicina Interna. 16a. ed. Arrubarrena FC, Thalheiner AG, trad. México: Interamericana. Vols 2., Vol. 2. 1985. 2600p.
32. Olson, J. Recommended Dietary Intakes (RID) of vitamin A in humans. 1987. *Am. J. Clin. Nutr.*:45:704-716pp.
33. Domínguez, S.P. Evaluación del Modelo para Estimar Calidad de los Programas de Fortificación de Alimentos en Guatemala. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala, USAC. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 2002. 65p.
34. Pineda, O. Fortificación de Azúcar con Vitamina A: Manual de Operaciones. Guatemala. INCAP. 1989. 23p.
35. MINEDUC & UNICEF. Convenio de Cooperación entre el Ministerio de Educación de Guatemala y UNICEF para la ejecución del Proyecto Escuelas Centinela Micronutrientes. Guatemala. 1998. s.p.

36. MINEDUC/UNICEF/INCAP/OPS. Informe del Programa de Escuelas Centinela Micronutrientes. Guatemala. 1999. 12p.
37. Dary, O. *et. al.* Sistema de Evaluación y Vigilancia de Hogares de los Programas de Fortificación de Alimentos de Guatemala. Guatemala. MINEDUC/UNICEF/INCAP. 1998. 11.p
38. Carey, N. Garber, C. Evaluación de Métodos. En Kaplan, L. Pesce, A. eds. Química Clínica. Teoría, correlación y análisis. 2ed. México: Cv Mosby Company. 1989. 392-417pp.
39. Horwitz, W. Evaluation on Analytical Methods Used for Regulation. J. Assoc Off. Anal Chem. 1982; 65:3, 525-530.
40. Conacher, H. Validation of Methods Used in Crisis Situations: Task Force Report. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1990; 73:2, 332-335.
41. AOAC. Guidelines for Collaborative Study Procedure to Validate Characteristics of a Method Analysis. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988; 71:1, 161-173.
42. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. (en sach.ch/doc/valid.htm).
43. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes. National Academy press. Washington DC. 1997; 1998; 2000; 2002.
44. Ritu Nalubola and Penelope Nestel, "The effect of Vitamin A nutriture on health. A review.", Ilsi Press, 6, 1999.
45. Datos de RDA Recommended Dietary Allowances, Food And Nutrition Board, National Research Council - National Academy of sciences 1989.
46. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements, "PRELIMINARY REPORT ON RECOMMENDED NUTRIENT INTAKES", FAO, Bangkok, Thailand, September 21-30, 1998
47. Portela, Ma. Luz. "Vitaminas y Minerales en Nutrición", Ed. Lopez, 10;19, 1994.
48. Alcoriza J, de Cos AI, Gómez AM, Larrañaga J, Gargallo M, Sola D, Vázquez C. Raciones estándar de materias primas y recetas culinarias para uso en encuestas alimentarias. Nutrición Clínica. Vol 10/2. 1990.
49. WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. A report of the WHO Study Group on Diet, Nutrition and Prevention of noncommunicable Diseases. Nutrition Reviews 49; 1991:291-301
50. OMS/WHO (World Health Organization). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report, Series 797. Ginebra. 1990
51. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado M. Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide. Madrid. 2001.
52. Grande F. El conocimiento científico de la Nutrición humana y su futuro. Nutr Clin Diet Hosp. 1985;V/1:11-22
53. Rodríguez-Ojea, Arturo. Deficiencia de yodo y sus implicaciones para la salud del hombre. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Revista Cubana Aliment Nutr 1996;10(2)

54. ICCIDD/WHO Statement. Iodized salt is safe! IDD newsletter 1994;10(4):42-3.
55. World Health Organization. Iodine and health. Eliminating iodine deficiency disorders safely through salt iodization. Geneva: WHO, 1994:5-8.
56. Boyages SC. Iodine deficiency disorders. J Clin Endocrinol Metabol 1993;77(3):587-91.
57. MSPAS. *et al.* Informe de la Encuesta Nacional de Micronutrientes. Guatemala. 1995. 99p.
58. MSPAS. *et al.* Encuesta Nacional de Micronutrientes. Informe Ejecutivo. Guatemala 1996. 27p.
59. Documento INCAP (Instituto de Nutrición de Centro America y Panamá), *et. al.* Situación de los alimentos fortificados. Guatemala. 2002. 13p.
60. Dunn, J.; Crutchfield, H.; Gutenkunst, R.; Dunn, D. Methods for Measuring Iodine in Urine. Publicación del Consejo Internacional para el Control de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo (ICCIDD)/UNICEF/WHO. 1993. 71p.
61. Arroyave, G. y Funes, C. Enriquecimiento de Azúcar con vitamina A. Método para la Determinación Cuantitativa de Retinol en azúcar Blanca de Mesa. 1974. Arch. Latinoamer. Nutr. 24:147-153.
62. Henninger, H. Determination of Vitamin A in Dry Vitamin Premixes by Spectrophotometry. En: Hofstetter, J. Analytical Methods for Vitamins in Food/Pharma Premixes. Roche Vitamins and Fine Chemical Division. Switzerland. 6-7pp.
63. Arroyave, G. Funes, C. Enriquecimiento de Azúcar con Vitamina A. Método rápido para la Fácil Inspección del Proceso. Arch. Latinoamer, Nutr. 24:155-2159.
64. Fleiss, J. L. Statistical Methods for rates and proportions. 2d. edition. Division of Biostatistic, School of Public Health. By: Wiley and sons. New York. 1981. 217-219pp.

XIII. ANEXOS

Anexo 1:

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMÁ LABORATORIO DE QUIMICA Y BIOQUIMICA	Página 1 de 8 Revisión No. 3 Fecha: marzo/1996
--	--

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE YODO TOTAL EN SAL

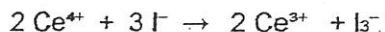
Técnica desarrollado por:	Licda. Dora Inés Mazariegos	Fecha: abril 1994
Ultima revisión efectuada por:	Licda. Dora Inés Mazariegos	
Aprobada por:	Omar Dary, Ph D.	

I. REFERENCIAS

Dunn, J.; Crutchfield, H.; Gutenkunst, R.; y Dunn, D. 1993. **Methods for Measuring Iodine in Urine**. Publicación del Consejo Intenacional para el Control de los Desórdenes por Deficiencia de Yodo (ICCIDD)/UNICEF/WHO. 71p.

II. PRINCIPIO

La reacción más ampliamente usada para cuantificar yodo en muestras biológicas es la reacción caracterizada por Sandell y Kolthoff (1937), que lleva su nombre. Se basa en que el yoduro (I^-) actúa como catalizador de la reducción del ión cérico (Ce^{4+}) a ión ceroso (Ce^{3+}) acoplado a la oxidación del arsenito As^{3+} , a As^{5+} . Las dos semi ecuaciones de la reacción son:



la reacción neta es:



El Ce^{4+} es amarillo, mientras que el Ce^{3+} es incoloro. Esto permite, manteniendo las demás condiciones constantes, cuantificar el yodo mediante la desaparición del color amarillo. La reacción catalítica tiene efecto amplificador, y es sensible a muy pequeños cambios en la concentración del catalizador.

El método original para análisis de yodato o yoduro en sal es por titulación redox. Se requieren por lo menos 100 gramos de sal para realizar el análisis en duplicado. Para determinar yoduro por este método se hace una retrovaloración y se emplea agua de bromo. Este reactivo es tóxico y de difícil manejo. Además el número de muestras que se pueden procesar diariamente es reducido. En el laboratorio de INCAP se modificó el método para análisis de yodo urinario para el análisis de sal. Con este método se puede usar una menor cantidad de muestra (mínimo 1 gramo, y 10 g para asegurar una muestra homogénea).

El método es capaz de determinar yodo total en la muestra, porque se deja reaccionar el ácido arsenioso con la muestra por un tiempo suficiente para convertir todas las especies de yodo a I^- , antes de agregar el sulfato cérico amónico. Esta ventaja hace que el método sea aplicable a cualquier sal, no importando si la fortificación se realiza con sales de yoduro o yodato.

III. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

1. La cuantificación de yodo se hace nivel de nanogramos, por lo que el análisis es sensible a contaminación, que proviene de reactivos concentrados. De ser posible no se deben preparar las soluciones patrón de yodo ni las diluciones de las sales en el mismo laboratorio en que se realiza la reacción final. Los reactivos deben ser de alta pureza, debe usarse agua desionizada en la preparación de todas las soluciones.
2. Los valores de los patrones de la curva se ajustan para que den el valor directo de la concentración de yodo en la muestra en ppm ($\mu\text{g l/g sal}$) de acuerdo a las tres diluciones recomendadas. Para muestras con valores menores a 20 ppm, se puede leer la dilución anterior a la dilución final, y multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución ($1/11=0.09091$). En microplaca es más práctico colocar las dos últimas diluciones de todas las muestras en la misma corrida, de modo que se obtienen los resultados para las muestras altas y las bajas al mismo tiempo.

IV. EQUIPO

Lector de microplacas Molecular Devices (Opción cinética, filtro 405)
Pipetas manuales (20-100 μL , 200-1000 μL)
Pipeta multicanales (25-100 μL)
Vortex

V. MATERIALES

Balón volumétrico de 1000 mL
Balones volumétricos de 200 mL
Balones volumétricos de 100 mL
Frascos de plástico de 250 mL
Frascos de vidrio oscuro
Microplacas
Puntas de pipeta
Tubos de ensayo de 10 mL

VI. REACTIVOS

Acido sulfúrico (H_2SO_4), 96-97%, 1.84 g/mL, Merck Art. 714 PM 98.08
Cloruro de sodio (NaCl), 99.5%, Merck Art. 6404, PM 58.44
Hidróxido de sodio (NaOH), 99%, Merck Art. PM 40.01
Sulfato cérico de amonio ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); Merck 2273; PM 632.55
Trióxido de arsénico (As_2O_3), 99.5% Merck Art. 119; PM 197.84
Yodato de potasio p.a. (KIO_3), 99.5%, Merck Art. 5051, PM 214.01

- A. Acido arsenioso (0.98% en H_2SO_4 1.75 M)
- B. Sulfato cérico amónico (0.6% en H_2SO_4 1.75 M)
 - B.1 Sulfato cérico amónico 0.15% en H_2SO_4 1.75 M
- C. Solución stock de yodo (10mg l/mL)
- D. Solución final de yodo (1mg l/mL = 1000 $\mu\text{g l/mL}$)
- E. Acido sulfúrico 1.75 M

Preparación de soluciones de trabajo

A. ACIDO ARSENIOSO 0.98% en H₂SO₄ 1.75 M

Trióxido de arsénico (As₂O₃), 99.5% Merck Art. 119; PM 197.84
Acido sulfúrico (H₂SO₄), 96-97%, 1.84 g/mL, Merck Art. 714 PM 98.08
Cloruro de sodio (NaCl), 99.5%, Merck Art. 6404, PM 58.44
Hidróxido de sodio (NaOH), 99%, Merck Art. PM 40.01

Precauciones

El ácido es corrosivo y tóxico. Maneje con guantes dentro de la campana. Evite el contacto directo con la solución.

Composición

AS.....0.1 mol/L
NaCl.....25 g/L

Preparación

En un beaker de 600 mL, agregar 4.9 g de trióxido de arsénico As₂O₃ y 3.5 g de NaOH. Disolver con 200 mL de agua desionizada. Agregar cuidadosamente 16.0 mL H₂SO₄. Enfriar, agregar 12.5 g de NaCl y 284 mL de agua desionizada.

Almacenamiento

Guardar en frasco oscuro bien cerrado

Expiración

La solución es estable indefinidamente.

B. SULFATO CERICO AMONICO 0.6% en H₂SO₄ 1.75 M

Sulfato cérico de amonio (Ce(SO₄)₂·2(NH₄)₂SO₄)·2H₂O; Merck 2273; PM 632.55
Acido sulfúrico (H₂SO₄), 96-97%, 1.84 g/mL, Merck Art. 714 PM 98.08

Precauciones

El ácido sulfúrico es caústico. Maneje con guantes dentro de la campana. Evite el contacto directo con la solución.

Composición

Ce⁴⁺.....9.5 mmoles/L
H₂SO₄.....1.75 mol/L

Preparación

En un beaker de 600 ml, agregar 3.0 g de sulfato cérico amónico y 500 mL de H₂SO₄ 1.75 mol/L. Disolver.

Almacenamiento

Guardar en frasco oscuro bien cerrado.

Expiración

La solución es estable indefinidamente.

C. SOLUCION STOCK DE YODO 10mg I/MI

Yodato de potasio p.a. (KIO_3), 99.5%, Merck Art. 5051, PM 214.01

Precauciones

El reactivo debe secarse previamente a $110^\circ C$ por 2 horas y dejarse enfriar en desecadora antes de usarse.

Composición

Yodo (I).....	10 g/L
HCl.....	0.1 mol/L

Preparación

Pesar 1.6881 g de yodato de potasio KIO_3 y transferir a un balón volumétrico de 100 mL. Disolver con 10 mL de HCl 1 M. aforar a 100 mL con agua desionizada.

Almacenamiento

Guardar en frasco oscuro bien cerrado.

Expiración

La solución es estable indefinidamente. Por ser solución estándar, preparar nuevo stock cada 2 meses.

D. SOLUCION FINAL DE YODO 1mg I/mL = 1000 μg I/mL

Yodato de potasio p.a. (KIO_3), 99.5%, Merck Art. 5051, PM 214.01

Precauciones

Deben usarse pipetas volumétricas en perfecto estado, por ser solución estándar.

Composición

Yodo (I).....	1 mg/mL
-----------------	---------

Preparación

Transferir 10.00 mL de la solución stock de yodo 10 mg/dL a un balón volumétrico de 100 mL. Aforar a 100 mL con agua desionizada.

Almacenamiento

Guardar en frasco oscuro bien cerrado.

Expiración

Es estable indefinidamente. Por ser solución estándar, preparar nuevo stock cada 2 semanas.

E. ACIDO SULFURICO 1.75 M

Acido sulfúrico (H_2SO_4), 96-97%, 1.84 g/mL, Merck Art. 714 PM 98.08

Precauciones

El ácido sulfúrico es caústico. Maneje con guantes dentro de la campana. Evite el contacto directo con la solución.

Composición

H_2SO_4 1.75 mol/L

Preparación

En un beaker de 2 L agregar 500 ml de agua desionizada y después 96 ml de H_2SO_4 . Agitar suavemente y deje enfriar. Agregar 404 mL de agua destilada.

Almacenamiento

Guardar en frasco de vidrio, alejado de bases.

Expiración

La solución es estable indefinidamente.

SOLUCIONES PATRON

Preparar a partir de la solución final de Yodo (sol. D), en balones volumétricos de 100 ml

[Yodo] (μmL)	Vol. Sol. E (mL)
0	0.00
5	0.50
10	1.00
20	2.00
40	4.00
60	6.00
80	8.00
100	10.00
150	15.00

VII. PROCEDIMIENTO

A. Preparación de las muestras

La dilución depende de la cantidad de muestra disponible. Si hay suficiente muestra, es mejor pesar la mayor cantidad, porque reduce el error debido a poca homogeneidad de la muestra. Si se dispone de poca muestra, se puede pesar hasta un mínimo de 1 gramo, pero hay que tener cuidado en la interpretación del valor obtenido, ya que la submuestra puede no ser representativa del lote de sal de donde proviene.

1. Preparar la 1a. dilución de la muestra pesando la cantidad indicada, disolviendo y aforando al volumen de agua destilada señalado:

Peso sal (g)	Vol. Agua (mL)
20.0	200.0
10.00	100.0
1.00	10.0

2. De esta solución concentrada preparar la 2a. dilución transferir 0.5 mL de la 1a. dilución a un tubo de ensayo y agregar 5.0 mL de agua destilada (Dilución 1:11).
3. Preparar la 3a. dilución transfiriendo 0.5 mL de la 2a. dilución a un tubo de ensayo y agregar 5.0 mL de agua destilada (Dilución 1:11, o 1:121 de la 1a. dilución).

B. Preparación de estándares:

1. Preparar estándares 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 150 $\mu\text{g l/mL}$. (Ver procedimiento de preparación de estándares a partir de solución 1 mg/mL).
2. En tubos de ensayo agregar 1.00 mL de estándar y 9.00 mL de agua desionizada. Esta es la solución 1.
3. Diluir 1:11 y 1:121 como se indica en los pasos 2 y 3 para las muestras. Estos estándares tienen concentración equivalente a muestras de sal con 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 150 $\mu\text{g l/mL}$ g l/mL sal, leyendo las diluciones 3 de las muestras.

C. Análisis de las diluciones

1. Agregar en duplicado 50 μL de cada estándar (La dilución 3), del control, y de la 3a. dilución a cada pozo en la microplaca. Los duplicados se colocan a la par, en sentido horizontal.
2. Cuando haya llenado la placa, agregue 50 μL de ácido arsenioso (Solución A) a cada pozo. Estos se hace rápidamente con una pipeta multicanales. Deje reposar la placa por 25 minutos.
3. Encender el lector de microplacas. Programar las siguientes condiciones para el análisis:

AUTOMIX	ONCE	El equipo agita la placa 1 vez antes de hacer la lectura.
READ MODE	KINETIC, 405 nm	El equipo hace lecturas automáticas cada 5 s.
TIEMPO DE LECTURA OD LIMIT	2 min -0.2 Unidades	Es el valor de absorbancia con el que el aparato hace los cálculos de velocidad, el signo negativo indica que cinética negativa.
DATA DISPLAY	ANALIZED, LINEAR	Es el tipo de análisis numérico para los datos.

En el lector también se indica (opción TEMPLATE F1) la posición de la curva de calibración y de las muestras, con su factor de dilución (inicialmente 1) para que el programa realice los cálculos automáticamente, con la regresión que se le haya indicado en DATA DISPLAY.

4. Con el equipo listo para leer la placa añadir, con ayuda de la pipeta multicanales, 100 µL de sulfato cérico amónico (Solución B) a cada pozo de la microplaca.
5. Inmediatamente coloque la microplaca en el lector y comience la lectura (presionando F5). Los resultados se obtienen en mOD/min.

VIII. CALCULOS

Con el programa Softmax 2.0, al ingresar la posición de las muestras y la curva de calibración (con los valores de concentración de 0-150 ppm), el programa hace los cálculos directamente. Para muestras abajo de 25 ppm, si se requiere más exactitud, se corre la 2a. dilución de la muestra. El factor de dilución será $1/11 = 0.09091$ (muestra más concentrada).

Si el cálculo de concentración es manual:

1. Calcular la recta de regresión concentración de yodo (ng/mL) versus velocidad de reacción.

$$\text{Vel. Reacción} = a + b * (\text{conc.}, \text{ppm})$$

2. Calcular la concentración de yodo en base a la recta de regresión y multiplicando por el factor de dilución de la muestra (1 o 0.09091, según lo explicado en el primer párrafo).

$$\text{Yodo (ppm)} = \frac{(\text{vel. Reacción} - a)}{b} \times \text{F.D.}$$

IX. VERIFICACIÓN DE LA RECUPERACION DEL METODO

El cálculo de recuperación no es necesario, debido a que se corren estándares desde el primer paso del análisis. Sin embargo puede calcularse agregando a tres muestras de sal diluidas (10 g en 100 mL) con concentraciones diferentes (en los rangos de 10-15 ppm; 40-60 ppm; y 80-100) una cantidad de estándar que suba la concentración de las muestras en 15 ppm. El volumen añadido no debe exceder 10 % del volumen de la muestra. Para corregir por dilución se agrega a otra porción de la muestra un volumen igual al que se añadió de estándar, pero de agua desionizada. La recuperación es el radio de la concentración recuperada sobre la concentración añadida.

X. VARIANTES

Cuando no se dispone de un lector de microplacas el análisis de yodato y yoduro en sal puede realizarse con las lecturas espectrofotométricas al tiempo 0 y 2.5 minutos. El procedimiento es igual para la preparación de muestras y estándares (A y B). las modificaciones a la parte C se detallan a continuación. Este método es preliminar pues todavía no ha sido validado, pero parece dar resultados concordantes con el análisis en microplaca y titulación redox.

Análisis de Yodo

1. En tubos de ensayo, agregar 0.6 mL de estándar, control o muestra.
2. Agregar 0.3 mL de ácido arsenioso (solución A). Dejar reposar por 25 minutos.
3. Transferir el contenido de un tubo a la celda del espectrofotómetro (Encendido 15 minutos antes en 405 nm y ajustando el 0 con agua destilada). Agregar 0.6 ml de sulfato cérico amónico 0.15% H₂SO₄ 1.75 M. Agitar rápidamente por inversión y leer la absorbancia de la solución (absorbancia inicial).
4. Esperar exactamente 2 minutos y medio y tomar la lectura de la absorbancia (absorbancia final).
5. Graficar los datos de los estándares usando concentración en el eje x versus (absorbancia inicial- absorbancia final) en el eje y. Utilizar la regresión para calcular la concentración de las muestras de acuerdo a las ecuaciones previamente presentadas en la sección de cálculos.

Anexo 2:

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMÁ LABORATORIO DE QUIMICA Y BIOQUIMICA		Página 1 de 4 Revisión No. 3 Fecha: 1996
--	--	--

DETERMINACION COLORIMETRICA SEMI-CUANTITATIVA DE PALMITATO DE RETINOL EN AZUCAR FORTIFICADA

Técnica desarrollado por:	María Elena de Sandoval	Fecha: 1993
Ultima revisión efectuada por:	Edna Ramos	
Aprobada por:	Omar Dary, Ph D.	

I. REFERENCIAS

Arroyave, G. y Funes, C. 1974. **Enriquecimiento de Azúcar con Vitamina A. Método rápido para la fácil inspección del proceso.** Arch. Latinoamer. Nutr. 24:155-159.

Bayfield, R.F. and Cole, E.R. 1980. **Colorimetric Determination of vitamin A with Trichloroacetic Acid.** In: Methods in Ezymology, vol 67. Vitamins and Coenzymes, Part F. Eds: McCormick, D.B. and L.D. Wringth. Academic Press, New York. pp. 189-195.

II. PRINCIPIO

El método aquí descrito es una modificación del propuesto por Arroyave, Pineda y Funes (1974). Este método se basa en la formación de anhidroretinol al mezclarse el retinol con un reactivo cromógeno que contiene ácido tricloroacético y diclorometano. Se genera un compuesto de color azul cuya intensidad puede medirse por comparación visual contra una escala de soluciones de sulfato de cobre. El color azul es transitorio por lo que la comparación debe hacerse dentro de 10 segundos después de haber agregado el reactivo.

III. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

Es preciso preparar el reactivo cromógeno con suficiente frecuencia, ya que es inestable debido a que la humedad del ambiente disminuye su reactividad con el palmitato de retinol presente en la solución de azúcar. Se sugiere utilizarlo dentro de cinco días si se guarda a 25°C y dentro de 14 días si se guarda en refrigeración. Si se agrega anhídrido acético a la solución recién preparada, el reactivo cromógeno es estable por lo menos 18 días (a temperatura ambiente y en refrigeración). En caso que el reactivo se encuentre en refrigeración, debe llevarse a temperatura ambiente de dos a tres horas antes de ser utilizado; si se forman cristales deben disolverse con movimientos rotativos. Para verificar la calidad del reactivo, se recomienda analizar un control de azúcar con concentración conocida de retinol y cerciorarse de que la intensidad del color azul coincida con la esperada según la escala.

El reactivo cromógeno es muy corrosivo, por lo que debe manejarse con precaución y sólo por personal adecuadamente capacitado. Pocos minutos antes de utilizarlo, la cantidad necesaria debe decantarse en un vaso de precipitar para que sea más fácil tomarlo con una jeringa. Se utiliza jeringa en vez de pipeta para asegurar el agregado vigoroso y rápido de reactivo sobre la solución de azúcar. NO debe regresarse el reactivo sobrante del vaso de precipitar al envase original.

IV. EQUIPO

No se aplica.

V. MATERIALES

Frasco de plástico de 50 mL
Frasco de vidrio de boca ancha (para descartar los desechos)
Frasco de 500 mL o termo (para transportar agua destilada)
Frasco oscuro con tapón de vidrio esmerilado
Guantes desechables de goma
Jeringa de vidrio de 5-10 mL con punta de polietileno de 3 cm en el extremo
Pipeta graduada de 10 mL
Soluciones de sulfato de cobre (escala colorimétrica, ver descripción adelante)
Tubos de ensayo de 15 X 100 mm con una marca a 1 ml y otra al nivel del volumen que ocupan 10 g de azúcar del tipo que se va a analizar
Vasos de precipitar (beaker) de 50-100 mL

VI. REACTIVOS

- A. Acido tricloroacético p.a. (Cl_3CCOOH), PM = 163.39, 99.5 %, Merck Art. 807
- B. Anhídrido acético p.a. (CH_3CO)₂O, PM = 102.092, Merck.
- C. Diclorometano p.a. (CH_2Cl_2), PM = 84.93, 99.5 %, d = 1.32 g/mL, Merck Art. 6050.
- D. Sulfato de cobre pentahidratado p.a. ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), PM = 249.68, 99%, Merck Art. 2790.

VII. SOLUCIONES

A. Reactivo Cromógeno: Acido tricloroacético/diclorometano

Precaución

El ácido tricloroacético es muy corrosivo. Al momento de preparar y utilizar el reactivo, se debe usar bata de manga larga, anteojos de seguridad, guantes y mascarilla para gases. Disolver en campana de gases. El reactivo debe almacenarse en un lugar fresco para evitar su descomposición por contacto con la humedad.

Composición

Acido tricloroacético.....	120 g
Diclorometano.....	61 mL
Anhídrido acético.....	2 mL

Preparación

Disolver 120.0 g de ácido tricloroacético en 80.0 g de diclorometano (60.6 mL). Para disolver por completo, entibie la mezcla (con el recipiente tapado) en baño de agua a 60°C, agitando constantemente.

Almacenamiento

Agregar 2 mL de anhídrido acético y guarde en frasco ámbar con tapón de rosca preferiblemente en refrigeración. La solución es estable por lo menos 18 días guardado a temperatura ambiente y en refrigeración.

B. Solución madre de sulfato de cobre pentahidratado 120 g/L.

Composición

Sulfato de cobre..... 120 g/L

Preparación

Pesar 12.121 g de sulfato de cobre pentahidratado y disolver con agua bidestilada. Transferir la solución a un balón de 100 mL y lave el beaker donde disolvió con agua bidestilada. Transferir los lavados al balón y aforar con agua bidestilada.

Almacenamiento

Guardar en frasco de polietileno a temperatura ambiente. La solución es estable indefinidamente.

VIII. PROCEDIMIENTO

A. Escala colorimétrica

1. A partir de la solución de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)-120 g/L (B) preparar 10 ml de las siguientes concentraciones:

Volumen de solución (B) (mL)	$[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ (g/L)	(Equivalencia aprox. de concentración) ($\mu\text{g/g}$ retinol en azúcar)
2.5	30	5
5.0	60	10
7.5	90	15
10.0	120	20

2. Colocar las soluciones patrón de sulfato de cobre en el mismo tipo de tubos de ensayo en los que se analizarán las muestras. Tápelos herméticamente para evitar evaporación. Rotular cada tubo de con su respectivo número de identificación, que indica el color aproximado que produce una muestra de azúcar con esa concentración de retinol en $\mu\text{g/g}$. Estas soluciones son estables indefinidamente a temperatura ambiente.

B. Preparación de la muestra

1. Homogenizar la muestra de azúcar mezclandola varias veces.
2. En el frasco de 50 mL, poner 10 g de azúcar (o con uno de los tubos de ensayo con menisco marcado, tome el volumen equivalente).
3. Agregar 10 mL de agua a 50-60°C, preferiblemente destilada. Disolver el azúcar, si es necesario calentar la solución.
4. Dejar la solución en reposo a temperatura ambiente hasta que se enfríe.
5. Transferir la solución de azúcar a un tubo de ensayo hasta el nivel marcado a 1 mL.
6. Vertir la cantidad estimada del cromógeno que se utilizará en un vaso de precipitar.

7. Utilizando la jeringa, agregar a cada solución de azúcar 3 mL del reactivo cromógeno y mezclar inmediata y vigorosamente. Utilizar guantes desechables para evitar el contacto accidental del reactivo cromógeno con la piel.
8. Comparar el color azul de la muestra con los patrones de la escala colorimétrica. Efectuar esta comparación antes de que hayan transcurrido 10 segundos de haber agregado el reactivo, ya que el color se mantiene por un corto tiempo.
9. Estimar el nivel de retinol en el azúcar ($\mu\text{g/g}$) con base en el patrón cuyo color es el más similar al desarrollado por la muestra. En la mayor parte de los casos, la intensidad del color azul cae entre dos de los tubos de referencia. La concentración de retinol, por lo tanto, debe informarse dentro de este rango. Por ejemplo, si la intensidad del color cae entre los niveles 30 y 60 g/L de sulfato de cobre, el contenido de retinol es entre 5 y 10 $\mu\text{g/g}$.
10. Desechar los residuos del reactivo cromógeno, incluyendo el que se ha hecho reaccionar con el azúcar, dentro del frasco de vidrio con solución de bicarbonato de sodio al 10 % y llevar al laboratorio para su deposición final.

IX. CALCULOS

No se aplica.

Anexo 3:

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMÁ LABORATORIO DE QUIMICA Y BIOQUIMICA		Página 1 de 4 Revisión No. 4 Fecha: septiembre/2003
--	--	---

**DETERMINACION CUALITATIVA DE YODATO DE POTASIO EN SAL FORTIFICADA
PUNTO DE CORTE FIJO 15 mg/Kg**

I. REFERENCIAS

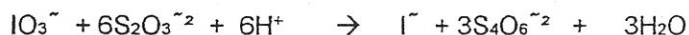
AOAC Official Methods of analysis. 1984. Sección 33.147

Fisher, R. y Peters, D. 1970. Análisis Químico Cuantitativo. 3a. ed. Interamericana, México D.F. pp 327-356.

II. PRINCIPIO

El yodato (como yodato de potasio, KIO_3) agregado a la sal para consumo humano en Guatemala es cuantificado por titulación redox con tiosulfato de sodio. El yodato es un oxidante fuerte y reacciona con el tiosulfato. La reacción se lleva a cabo en medio ligeramente ácido y en presencia de un exceso de iones I^- .

La ecuación global es la siguiente:



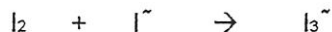
La semi ecuación para el tiosulfato de sodio es:



El yodato en medio ácido y con exceso de yoduro forma compuestos intermediarios de I_2 y triyoduro (I_3^-):



Con un exceso de yoduro (I^-) el yodo formado forma el complejo I_3^- :



Bajo condiciones reductoras el complejo triyoduro forma nuevamente yoduro según la ecuación:



III. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

Se debe disolver completamente la muestra de sal, al agregar el H_2SO_4 agitar la solución por 45 segundos en forma circular y visualizar el cambio de color a través del tubo, si hay problema de percepción utilizar una hoja blanca como fondo. Al haber muestras con concentraciones menores del punto de corte y son muy débiles casi imperceptibles se deben tomar como negativas.

IV. EQUIPO Y MATERIALES

- a) Balanza analítica ± 0.0001 g
- b) Desecadora
- c) Tubos de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.30 cm)
- d) Pipeta pasteur de polietileno (de 0.5 a 3 ml)
- e) Guantes descartables
- f) Lentes de protección
- g) Agua destilada
- h) Agua desionizada previamente hervida.
- i) Papel bond blanco, para utilizarlo como fondo
- j) Beakers de 50, 100, 250, 600 mL
- k) Erlenmeyers 50, 100, 250 mL
- l) Balones volumétricos 100, 200 mL
- m) Recipientes de vidrio ámbar

V. REACTIVOS

Punto de Corte Fijo 15 mg/Kg

- a. Reactivo Cromógeno: yoduro de potasio: KI 99.5%, Merck Art. 05043 PM 166.01
- b. Acido sulfúrico: H₂SO₄ 95-98%, EM Science SX1244-5 PM 98.08

VI. SOLUCIONES

Preparación de reactivos:

- a. Reactivo Cromógeno Yoduro de potasio

- i. Composición punto de corte 15 mg/Kg

Yoduro de potasio 0.0115 %.....	0.02875 g
H ₂ SO ₄ 0.75 M.....	10.0 mL

- ii. Preparación punto de corte de 15 mg/kg

Disolver 0.02875 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua desionizada, previamente hervida, transferir a un balón de 250 mL, añadir 10 mL de H₂SO₄ 0.75 N y aforar con agua desionizada.

- iii. Almacenamiento

Almacenar en frasco oscuro etiquetado correctamente.

- iv. Expiración

Cuando la solución se torne amarillenta descartar y preparar nuevamente.

b. Ácido sulfúrico H_2SO_4 0.75 M

i. Composición

H_2SO_40.75 mol/L

ii. Preparación

En un beaker graduado de 600 mL agregar 300 ml de agua destilada y 20.82 mL de ácido concentrado. Enfriar a temperatura ambiente, llegue a la marca de 500 mL con agua destilada.

iii. Almacenamiento

Guardar en frasco de vidrio bien tapado, alejado de bases.

iv. Expiración y Precaución

La solución es estable indefinidamente. El ácido es corrosivo, deshidratante e irritante para todos los tejidos. Su inhalación puede provocar daño hepático y el contacto con la piel necrosis. El reactivo concentrado y sus soluciones deben manipularse bajo campana.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Preparación de los controles y la muestra:

- a. Homogenizar el control y/o la muestra de sal, mezclándola varias veces dentro de una bolsa plástica. Un mal homogenizado de la muestra puede dar resultado falso.
- b. Añadir a cada tubo de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.3cm) alrededor de un cuarto de cucharadita del control y de las muestras de sal a analizar.
- c. Agregar, utilizando una pipeta pasteur de polietileno, alrededor de 2 mL de agua desionizada, a tubos de ensayo con la sal. Es importante que todos los tubos tengan la misma cantidad de agua desionizada y sal. Disolver la sal completamente agitando el tubo suavemente. Realizar este procedimiento con precaución para evitar derrames o salpicaduras.
- d. A un tubo unicamente añadir 2.0 mL de agua desionizada, sin muestra de sal. Este tubo será el control del reactivo. Este control lo debe correr cada día junto con las muestras.
- e. Utilizar otra pipeta pasteur de polietileno, vertir rápidamente 0.6 mL de reactivo cromógeno dentro los tubos. (Utilizar guantes y lentes de protección.) Mezclar perfectamente la solución.
- f. Las muestras que dan una reacción débil son difíciles de interpretar, para tales muestras utilice un fondo blanco para realizar las lecturas, puede utilizar una hoja de papel. El fondo blanco permite apreciar mejor el color amarillo, el cual debe ser claramente identificable para ser considerado como positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

- g. Anotar el resultado únicamente como positivo o negativo. Una vez realizadas todas las determinaciones descarte el contenido de cada tubo en el lavadero y dejar correr agua por 5 minutos.

VIII. INTERPRETACION DE RESULTADOS

1. Si el control y/o las muestras de sal están fortificados con yodato de potasio se observará la aparición de un color amarillo, indicando que el resultado es positivo.
2. El tubo utilizado como control de reactivo debe quedar con la solución incolora indicando un resultado negativo, si en la solución se forma un color amarillento, debe preparar reactivo nuevo o verificar la calidad del agua desionizada.
3. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de yodato que contenga el control y/o muestra analizada, únicamente indicar si se tornó amarilla. Si la concentración de yodato es baja la aparición del color amarillo es casi imperceptible, tome estas muestras como negativo.
4. Las muestras que dan una reacción débil son difíciles de interpretar, para tales muestras utilice un fondo blanco para realizar las lecturas, puede utilizar una hoja de papel. El fondo blanco permite apreciar mejor el color amarillo, el cual debe ser claramente identificable para ser considerado como positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

Anotar el resultado únicamente como positivo (+) o negativo (-).

Anexo 4:

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMÁ LABORATORIO DE QUIMICA Y BIOQUIMICA	Página 1 de 4 Revisión No. 4 Fecha: septiembre/2003
--	---

**DETERMINACION CUALITATIVA DE YODATO DE POTASIO EN SAL FORTIFICADA
PUNTO DE CORTE FIJO 20 mg/Kg**

I. REFERENCIAS

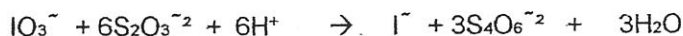
AOAC Official Methods of analysis. 1984. Sección 33.147

Fisher, R. y Peters, D. 1970. Análisis Químico Cuantitativo. 3a. ed. Interamericana, México D.F. pp 327-356.

II. PRINCIPIO

El yodato (como yodato de potasio, KIO_3) agregado a la sal para consumo humano en Guatemala es cuantificado por titulación redox con tiosulfato de sodio. El yodato es un oxidante fuerte y reacciona con el tiosulfato. La reacción se lleva a cabo en medio ligeramente ácido y en presencia de un exceso de iones I^- .

La ecuación global es la siguiente:



La semi ecuación para el tiosulfato de sodio es:



El yodato en medio ácido y con exceso de yoduro forma compuestos intermediarios de I_2 y triyoduro (I_3^-):



Con un exceso de yoduro (I^-) el yodo formado forma el complejo I_3^- :



Bajo condiciones reductoras el complejo triyoduro forma nuevamente yoduro según la ecuación:



III. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

Se debe disolver completamente la muestra de sal, al agregar el H_2SO_4 agitar la solución por 45 segundos en forma circular y visualizar el cambio de color a través del tubo, si hay problema de percepción utilizar una hoja blanca como fondo. Al haber muestras con concentraciones menores del punto de corte y son muy débiles casi imperceptibles se deben tomar como negativas.

IV. EQUIPO Y MATERIALES

- a) Balanza analítica ± 0.0001 g
- b) Desecadora
- c) Tubos de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.30 cm)
- d) Pipeta pasteur de polietileno (de 0.5 a 3 ml)
- e) Guantes descartables
- f) Lentes de protección
- g) Agua destilada
- h) Agua desionizada previamente hervida.
- i) Papel bond blanco, para utilizarlo como fondo
- j) Beakers de 50, 100, 250, 600 mL
- k) Erlenmeyers 50, 100, 250 mL
- l) Balones volumétricos 100, 200 mL
- m) Recipientes de vidrio ámbar

V. REACTIVOS

Punto de Corte Fijo 20 mg/Kg

- a. Reactivo Cromógeno: yoduro de potasio: KI 99.5%, Merck Art. 05043 PM166.01
- b. Acido sulfúrico: H₂SO₄ 95-98%, EM Science SX1244-5 PM98.08

VI. SOLUCIONES

Preparación de reactivos:

- a. Reactivo Cromógeno Yoduro de potasio

- i. Composición punto de corte 20 mg/Kg

Yoduro de potasio 0.0075 %.....	0.01875 g
H ₂ SO ₄ 0.50 M.....	10.0 mL

- ii. Preparación punto de corte de 20 mg/kg

Disolver 0.01875 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua desionizada, previamente hervida, transferir a un balón de 250 mL, añadir 10 mL de H₂SO₄ 0.75 N y aforar con agua desionizada.

- iii. Almacenamiento

Almacenar en frasco oscuro etiquetado correctamente.

- iv. Expiración

Cuando la solución se torne amarillenta descartar y preparar nuevamente.

b. Ácido sulfúrico H_2SO_4 0.50 M

i. Composición

H_2SO_40.50 mol/L

ii. Preparación

En un beaker graduado de 600 mL agregar 300 ml de agua destilada y 13.88 mL de ácido concentrado. Enfriar a temperatura ambiente. Llegue a la marca de 500 mL con agua destilada.

iii. Almacenamiento

Guardar en frasco de vidrio bien tapado, alejado de bases.

iv. Expiración y Precaución

La solución es estable indefinidamente. El ácido es corrosivo, deshidratante e irritante para todos los tejidos. Su inhalación puede provocar daño hepático y el contacto con la piel necrosis. El reactivo concentrado y sus soluciones deben manipularse bajo campana.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Preparación de los controles y la muestra:

- a. Homogenizar el control y/o la muestra de sal, mezclándola varias veces dentro de una bolsa plástica. Un mal homogenizado de la muestra puede dar resultado falso .
- b. Añadir a cada tubo de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.3cm) alrededor de un cuarto de cucharadita del control y de las muestras de sal a analizar.
- c. Agregar, utilizando una pipeta pasteur de polietileno, alrededor de 2 mL de agua desionizada, a tubos de ensayo con la sal. Es importante que todos los tubos tengan la misma cantidad de agua desionizada y sal. Disolver la sal completamente agitando el tubo suavemente. Realizar este procedimiento con precaución para evitar derrames o salpicaduras.
- d. A un tubo únicamente añadir 2.0 mL de agua desionizada, sin muestra de sal. Este tubo será el control del reactivo. Este control lo debe correr cada día junto con las muestras.
- e. Utilizar otra pipeta pasteur de polietileno, vertir rápidamente 0.6 mL de reactivo cromógeno dentro los tubos. (Utilizar guantes y lentes de protección.) Mezclar perfectamente la solución.
- f. Las muestras que dan una reacción débil son difíciles de interpretar, para tales muestras utilice un fondo blanco para realizar las lecturas, puede utilizar una hoja de papel. El fondo blanco permite apreciar mejor el color amarillo, el cual debe ser claramente identificable para ser considerado como positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

- g. Anotar el resultado únicamente como positivo o negativo. Una vez realizadas todas las determinaciones descarte el contenido de cada tubo en el lavadero y dejar correr agua por 5 minutos.

VIII. INTERPRETACION DE RESULTADOS

1. Si el control y/o las muestras de sal están fortificados con yodato de potasio se observará la aparición de un color amarillo, indicando que el resultado es positivo.
2. El tubo utilizado como control de reactivo debe quedar con la solución incolora indicando un resultado negativo, si en la solución se forma un color amarillento, debe preparar reactivo nuevo o verificar la calidad del agua desionizada.
3. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de yodato que contenga el control y/o muestra analizada, únicamente indicar si se tornó amarilla. Si la concentración de yodato es baja la aparición del color amarillo es casi imperceptible, tome estas muestras como negativo.
4. Las muestras que dan una reacción débil son difíciles de interpretar, para tales muestras utilice un fondo blanco para realizar las lecturas, puede utilizar una hoja de papel. El fondo blanco permite apreciar mejor el color amarillo, el cual debe ser claramente identificable para ser considerado como positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

Anotar el resultado únicamente como positivo (+) o negativo (-).

Anexo 5:

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMÁ LABORATORIO DE QUIMICA Y BIOQUIMICA		Página 1 de 3 Revisión No. 2 Fecha: septiembre/2003
--	--	---

DETERMINACION CUALITATIVA DE PALMITATO DE RETINOL EN AZUCAR FORTIFICADA PUNTO DE CORTE FIJO 3.5 mg/Kg

I. REFERENCIAS

Arroyave, G. y Funes, C. 1974. **Enriquecimiento de Azúcar con Vitamina A. Método rápido para la fácil inspección del proceso.** Arch. Latinoamer. Nutr. 24:155-159.

Bayfield, R.F. and Cole, E.R. 1980. **Colorimetric Determination of vitamin A with Trichloroacetic Acid.** In: Methods in Ezymology, vol 67. Vitamins and Coenzymes, Part F. Eds: McCormick, D.B. and L.D. Wringth. Academic Press, New York. pp. 189-195.

II. PRINCIPIO

El método aquí descrito es una modificación del propuesto por Arroyave, Pineda y Funes (1974). Este método se basa en la formación de anhidroretinol al mezclarse el retinol con un reactivo cromógeno que contiene ácido tricloroacético y diclorometano. Se genera un compuesto de color azul cuya intensidad puede medirse por comparación visual contra una escala de soluciones de sulfato de cobre. El color azul es transitorio por lo que la comparación debe hacerse dentro de 10 segundos después de haber agregado el reactivo.

III. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

Es preciso preparar el reactivo cromógeno con suficiente frecuencia, ya que es inestable debido a que la humedad del ambiente disminuye su reactividad con el palmitato de retinol presente en la solución de azúcar. Se sugiere utilizarlo dentro de cinco días si se guarda a 25°C y dentro de 14 días si se guarda en refrigeración. Si se agrega anhídrido acético a la solución recién preparada, el reactivo cromógeno es estable por lo menos 18 días (a temperatura ambiente y en refrigeración). En caso que el reactivo se encuentre en refrigeración, debe llevarse a temperatura ambiente de dos a tres horas antes de ser utilizado; si se forman cristales deben disolverse con movimientos rotativos. Para verificar la calidad del reactivo, se recomienda analizar un control de azúcar con concentración conocida de retinol y cerciorarse de que la intensidad del color azul coincida con la esperada según la escala.

El reactivo cromógeno es muy corrosivo, por lo que debe manejarse con precaución y sólo por personal adecuadamente capacitado. Pocos minutos antes de utilizarlo, la cantidad necesaria debe decantarse en un vaso de precipitar para que sea más fácil tomarlo.

IV. EQUIPO Y MATERIALES

- a) Balanza analítica ± 0.0001 g
- b) Desecadora
- c) Tubos de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.30 cm)
- d) Pipeta pasteur de polietileno (de 0.5 a 3 ml)
- e) Guantes descartables
- f) Lentes de protección
- g) Agua destilada
- h) Agua desionizada previamente hervida.
- i) Papel bond blanco, para utilizarlo como fondo
- j) Beakers de 50, 100, 250, 600 mL
- k) Erlenmeyers 50, 100, 250 mL
- l) Balones volumétricos 100, 200 mL
- m) Recipientes de vidrio ámbar

V. REACTIVOS

- a. Reactivo Cromógeno: Acido tricloroacético CCl_3COOH 99.5%. Merck Art. 807. PM163.39
- b. Diclorometano: CH_2Cl_2 , 99.5%, 1.32g/ml. Merck Art. 6050 PM 84.93
- c. Anhídrido acético: $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ 99.5%, Merck Art. PM 102.092
- d. Bicarbonato de sodio: Na_2CO_3 , 99.5% Merck Art. 6392 PM 105.99

VI. SOLUCIONES

a. Reactivo Cromógeno

i. Precaución

El ácido tricloroacético es altamente corrosivo. Al momento de preparar y utilizar el reactivo, se debe utilizar bata de manga larga, anteojos de seguridad, guantes y mascarilla para gases. Disolver en campana de gases. El reactivo debe almacenarse en un lugar fresco para evitar su descomposición por contacto con la humedad.

ii. Composición punto de corte de 3.5 mg/Kg

Acido tricloroacético.....	60 g
Diclorometano.....	61 mL
Anhídrido acético.....	2 mL

iii. Preparación punto de corte de 3.5 mg/Kg

Disolver 60 g de ácido tricloroacético en 80.0 g de diclorometano (60.6 mL). Para disolver por completo, entibie la mezcla (con el recipiente tapado) en baño de agua a 60°C, agitar constantemente.

iv. Almacenamiento

Agregar 2 mL de anhídrido acético y guardar en frasco ámbar con tapón de rosca preferiblemente en refrigeración. La solución es estable por lo menos 18 días guardado a temperatura ambiente y en refrigeración.

b. Bicarbonato de sodio 10 %

i. Composición

Bicarbonato de sodio..... 10 g

ii. Preparación

Disolver 10.0 g de bicarbonato de sodio en 100 ml de agua destilada.

iii. Almacenamiento

Almacenar en frasco oscuro a temperatura ambiente.

VII. PROCEDIMIENTO

Punto de Corte Fijo 3.5 mg vit. A / Kg

Preparación de los controles y la muestra

- a. Homogenizar el control y/o la muestra de azúcar, mezclándola varias veces dentro de una bolsa plástica. Un mal homogenizado de la muestra dará como resultado falso negativo.
- b. Añadir a cada tubo de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.3cm) alrededor de media cucharadita del control de azúcar y de las muestras de azúcar a analizar.
- c. Agregar alrededor de 2 mL de agua destilada a tubos de ensayo. Para agregar el agua, puede utilizar una pipeta pasteur de polietileno. Es importante que todos los tubos tengan la misma cantidad de agua destilada. Mezclar el tubo.
- d. Utilizando otra pipeta pasteur de polietileno, Vertir rápidamente 0.6 mL de reactivo cromógeno dentro de los tubos. (UTILICE GUANTES Y LENTES DE PROTECCION).
- e. Si el control y/o las muestras de azúcar están fortificadas con palmitato de retinol se observará la aparición de un color azul o celeste, indicando que el resultado es positivo. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de palmitato de retinol que contenga el control y/o las muestras analizadas, únicamente indique si se tornó celeste. Si la concentración de palmitato es baja, se observará que algunos cristales se tornan celestes depositándose en el fondo del tubo y se irán acumulando lentamente, esta muestra es positiva. Si el color celeste es muy tenue, casi imperceptible o no hubo aparición de color, la muestra se toma como negativa.
- f. Una vez realizadas todas las determinaciones depositar el contenido de cada tubo dentro de una solución de bicarbonato de sodio al 10 % para neutralizar el ácido.

VIII. INTERPRETACION DE RESULTADOS

1. Si el control y/o las muestras de azúcar están fortificadas con palmitato de retinol se observará la aparición de un color azul o celeste, indicando que el resultado es positivo. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de palmitato de retinol que contenga el control y/o las muestras analizadas, únicamente indique si se tornó celeste. Si la concentración de palmitato es baja, se observará que algunos cristales se tornan celestes depositándose en el fondo del tubo y se irán acumulando lentamente, esta muestra es positiva.
2. Si el color celeste es muy tenue, casi imperceptible o no hubo aparición de color, la muestra se toma como negativa. **Anotar el resultado únicamente como positivo (+) o negativo (-).**

Anexo 6:

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMÁ LABORATORIO DE QUIMICA Y BIOQUIMICA	Página 1 de 3 Revisión No. 2 Fecha: septiembre/2003
--	---

**DETERMINACION CUALITATIVA DE PALMITATO DE RETINOL EN AZUCAR FORTIFICADA
PUNTO DE CORTE FIJO 5.0 mg/Kg**

I. REFERENCIAS

Arroyave, G. y Funes, C. 1974. **Enriquecimiento de Azúcar con Vitamina A. Método rápido para la fácil inspección del proceso.** Arch. Latinoamer. Nutr. 24:155-159.

Bayfield, R.F. and Cole, E.R. 1980. **Colorimetric Determination of vitamin A with Trichloroacetic Acid.** In: Methods in Ezymology, vol 67. Vitamins and Coenzymes, Part F. Eds: McCormick, D.B. and L.D. Wringth. Academic Press, New York. pp. 189-195.

II. PRINCIPIO

El método aquí descrito es una modificación del propuesto por Arroyave, Pineda y Funes (1974). Este método se basa en la formación de anhidroretinol al mezclarse el retinol con un reactivo cromógeno que contiene ácido tricloroacético y diclorometano. Se genera un compuesto de color azul cuya intensidad puede medirse por comparación visual contra una escala de soluciones de sulfato de cobre. El color azul es transitorio por lo que la comparación debe hacerse dentro de 10 segundos después de haber agregado el reactivo.

III. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

Es preciso preparar el reactivo cromógeno con suficiente frecuencia, ya que es inestable debido a que la humedad del ambiente disminuye su reactividad con el palmitato de retinol presente en la solución de azúcar. Se sugiere utilizarlo dentro de cinco días si se guarda a 25°C y dentro de 14 días si se guarda en refrigeración. Si se agrega anhídrido acético a la solución recién preparada, el reactivo cromógeno es estable por lo menos 18 días (a temperatura ambiente y en refrigeración). En caso que el reactivo se encuentre en refrigeración, debe llevarse a temperatura ambiente de dos a tres horas antes de ser utilizado; si se forman cristales deben disolverse con movimientos rotativos. Para verificar la calidad del reactivo, se recomienda analizar un control de azúcar con concentración conocida de retinol y cerciorarse de que la intensidad del color azul coincida con la esperada según la escala.

El reactivo cromógeno es muy corrosivo, por lo que debe manejarse con precaución y sólo por personal adecuadamente capacitado. Pocos minutos antes de utilizarlo, la cantidad necesaria debe decantarse en un vaso de precipitar para que sea más fácil tomarlo.

IV. EQUIPO Y MATERIALES

- a) Balanza analítica ± 0.0001 g
- b) Desecadora
- c) Tubos de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.30 cm)
- d) Pipeta pasteur de polietileno (de 0.5 a 3 ml)
- e) Guantes descartables
- f) Lentes de protección
- g) Agua destilada
- h) Agua desionizada previamente hervida.
- i) Papel bond blanco, para utilizarlo como fondo
- j) Beakers de 50, 100, 250, 600 mL
- k) Erlenmeyers 50, 100, 250 mL
- l) Balones volumétricos 100, 200 mL
- m) Recipientes de vidrio ámbar

V. REACTIVOS

- a. Reactivo Cromógeno: Acido tricloroacético CCl_3COOH 99.5%. Merck Art. 807. PM163.39
- b. Diclorometano: CH_2Cl_2 , 99.5%, 1.32g/ml. Merck Art. 6050 PM 84.93
- c. Anhídrido acético: $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ 99.5%, Merck Art. PM 102.092
- d. Bicarbonato de sodio: Na_2CO_3 , 99.5% Merck Art. 6392 PM 105.99

VI. SOLUCIONES

a. Reactivo Cromógeno

i. Precaución

El ácido tricloroacético es altamente corrosivo. Al momento de preparar y utilizar el reactivo, se debe utilizar bata de manga larga, anteojos de seguridad, guantes y mascarilla para gases. Disolver en campana de gases. El reactivo debe almacenarse en un lugar fresco para evitar su descomposición por contacto con la humedad.

ii. Composición punto de corte de 5.0 mg/Kg

Acido tricloroacético.....	30 g
Diclorometano.....	61 mL
Anhídrido acético.....	2 mL

iii. Preparación

Disolver 30 g de ácido tricloroacético en 80.0 g de diclorometano (60.6 mL). Para disolver por completo, entibie la mezcla (con el recipiente tapado) en baño de agua a 60°C, agitar constantemente.

iv. Almacenamiento

Agregar 2 mL de anhídrido acético y guarde en frasco ámbar con tapón de rosca preferiblemente en refrigeración. La solución es estable por lo menos 18 días guardado a temperatura ambiente y en refrigeración.

b. Bicarbonato de sodio 10 %

i. Composición

Bicarbonato de sodio.....10 g

ii. Preparación

Disolver 10.0 g de bicarbonato de sodio en 100 ml de agua destilada.

iii. Almacenamiento

Almacenar en frasco oscuro a temperatura ambiente.

VII. PROCEDIMIENTO

Punto de Corte Fijo 5.0 mg vit. A / Kg

Preparación de los controles y la muestra

- a. Homogenizar el control y/o la muestra de azúcar, mezclar varias veces dentro de una bolsa plástica. Un mal homogenizado de la muestra dará como resultado falso negativo.
- b. Añadir a cada tubo de ensayo (Pyrex No. 9825, de 10*1.3cm) alrededor de media cucharadita del control de azúcar y de las muestras de azúcar a analizar.
- c. Agregar alrededor de 2 mL de agua destilada a tubos de ensayo. Para agregar el agua, puede utilizar una pipeta pasteur de polietileno. Es importante que todos los tubos tengan la misma cantidad de agua destilada. Mezclar el tubo.
- d. Utilizando otra pipeta pasteur de polietileno, Vertir rápidamente 0.6 mL de reactivo cromógeno dentro de los tubos. (UTILICE GUANTES Y LENTES DE PROTECCION).
- e. Si el control y/o las muestras de azúcar están fortificadas con palmitato de retinol se observará la aparición de un color azul o celeste, indicando que el resultado es positivo. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de palmitato de retinol que contenga el control y/o las muestras analizadas, únicamente indique si se tornó celeste. Si la concentración de palmitato es baja, se observará que algunos cristales se tornan celestes depositándose en el fondo del tubo y se irán acumulando lentamente, esta muestra es positiva. Si el color celeste es muy tenue, casi imperceptible o no hubo aparición de color, la muestra se toma como negativa.
- f. Una vez realizadas todas las determinaciones depositar el contenido de cada tubo dentro de una solución de bicarbonato de sodio al 10 % para neutralizar el ácido.

VIII. INTERPRETACION DE RESULTADOS

1. Si el control y/o las muestras de azúcar están fortificadas con palmitato de retinol se observará la aparición de un color azul o celeste, indicando que el resultado es positivo. Aunque la intensidad del color varía dependiendo la concentración de palmitato de retinol que contenga el control y/o las muestras analizadas, únicamente indique si se tornó celeste. Si la concentración de palmitato es baja, se observará que algunos cristales se tornan celestes depositándose en el fondo del tubo y se irán acumulando lentamente, esta muestra es positiva.
2. Si el color celeste es muy tenue, casi imperceptible o no hubo aparición de color, la muestra se toma como negativa.

Anotar el resultado únicamente como positivo (+) o negativo (-).

Anexo 7:

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMÁ LABORATORIO DE QUIMICA Y BIOQUIMICA	Página 1 de 3 Revisión No. 2 Fecha: septiembre/2003
--	---

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE CAMPO PARA LA DETERMINACIÓN DE YODO EN SAL: UMS-PROBADOR INSTANTÁNEO

I. REFERENCIAS

Desarrollado con las asistencia técnica brindada por MOM y UNICEF Myanmar, septiembre 2000.

II. PRINCIPIO

El probador instantáneo de yodo es similar al espectrómetro y utiliza una sola longitud de onda con la función de lectura digital. La muestra de referencia será irradiada por el sistema óptico que pasa a través de la solución de referencia y llega al detector. La concentración de yodo se ajusta a cero girando dos botones de autocalibración para ajuste cero. Cuando se inserta la muestra la luz que llega al detector, se reduce por absorbancia de la muestra y la señal óptica es captada por el detector.

III. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES

El equipo debe calentarse por lo menos 10 minutos antes de utilizarse, en el caso de no haberlo utilizado con anterioridad dejarlo calentar por más tiempo. Antes de usar el equipo, la calibración de ajuste cero y la calibración de ajuste estándar deben estar alineados con las marcas en la superficie de la llave de calibración cero y estándar del equipo UMS. Verificar la batería del equipo cada cierto tiempo. Evite contacto con ácido sulfúrico ya que es altamente corrosivo. Asegurese que las cubetas estén completamente limpias antes de utilizarlas.

IV. EQUIPO Y MATERIALES

- a) Balanza analítica ± 0.0001 g
- b) Campana de extracción
- c) Desecadora
- d) Probador instantáneo de yodo "UMS"
- e) Celdas plásticas para realizar lecturas en el espectrofotometro UMS
- f) Pipeta pasteur de polietileno (de 0.5 a 3 ml)
- g) Guantes descartables
- h) Lentes de protección
- i) Agua destilada
- j) Agua desionizada previamente hervida.
- k) Beakers de 50, 100, 250, 600 mL
- l) Erlenmeyers 50, 100, 250 mL
- m) Balones volumétricos 100, 200 mL
- n) Recipientes de vidrio ámbar

V. REACTIVOS

- a. Yodato de potasio solución estándar KIO_3 , 99.7% Merck Art. 05051 PM 214.00
- b. Solución estándar (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 20%NaCl) 99.5%, Merck Art. 06404 PM 58.44.
- c. Solución de almidón de KI 99.5%, Merck Art. 05043 PM 166.01
- d. Acido sulfúrico 1 mol/L H_2SO_4 95-98%, EM Science SX1244-5 PM 98.08

VI. SOLUCIONES

Preparación química para uso en el probador instantáneo de yodo "UMS"

1. Solución estándar KIO_3 (yodato de potasio 1000 μg /1 ml)

Pesar 0.8432 g de KIO_3 que se seca a 100-110°C por tres horas y disolver en 500 mL de agua destilada.

2. Solución estándar (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 20% NaCl)

Tomar 5 mL de solución estándar KIO_3 y agregar 100 g de NaCl y 0.5 g de Na_2CO_3 , agregar agua destilada hasta la marca de 500 mL y agite bien la solución. Esta puede utilizarse durante seis meses. La concentración de 5 mL de solución KIO_3 es igual a 50 Mg/Kg en la muestra de sal yodada.

3. Solución de almidón de KI

Pesar 2.0 g de almidón soluble, agregar agua destilada y agitar bien, vierta esta solución en 200 mL de agua hirviendo y dejar hervir durante dos minutos, luego enfríela. Agregar 1.0 g de KI y 40 g de $\text{H}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Esta solución puede guardarse en una botella durante tres meses.

4. H_2SO_4 1 mol/L

Colocar en un beaker graduado de 600 mL, 300 mL de agua destilada. Adicionar 27.5 mL de H_2SO_4 . Deje enfriar y termine de agregar agua destilada hasta la marca de 500 mL, mezclar bien. Guarde en frasco de vidrio oscuro, alejado de bases.

5. Solución estándar para calibrar el probador de yodo

Preparar solución estándar para calibrar el probador de yodo o utilice el vidrio de color. Transferir 5.0 mL de la solución estándar de yodo (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a un tubo de 50 mL, agregar 2 ml KI-solución de almidón y 2 mL de H_2SO_4 (1 mol/L). Mezclar bien la solución y agregar agua destilada hasta completar 50 mL. Agitar bien. Esta solución es equivalente a la concentración de 50 mg I /Kg de sal.

6. Solución de la muestra

Pesar 1.0 g de sal yodada bien mezclada en un tubo de 50 ml, agregar 10 mL de agua destilada, 2 mL de KI-solución de almidón y 2 mL de H_2SO_4 (1mol/L). Seguir el mismo procedimiento de la solución estándar.

VII. PROCEDIMIENTO

Direcciones para el uso del probador instantáneo de yodo "UMS"

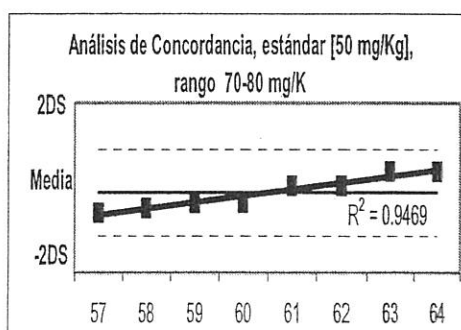
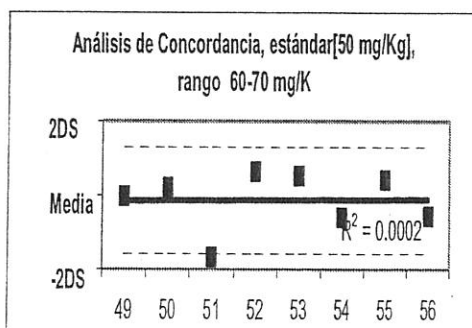
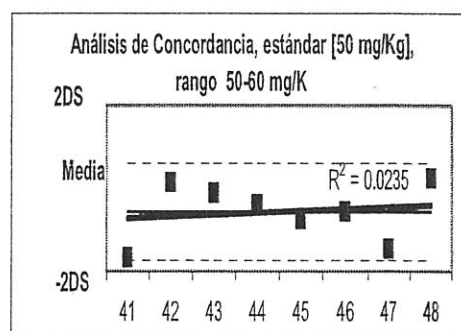
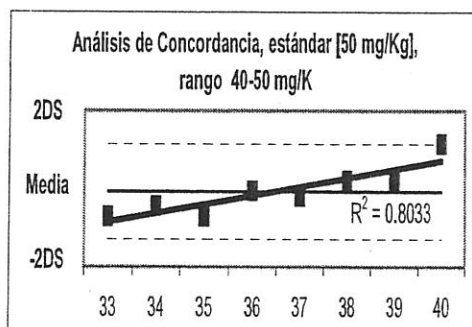
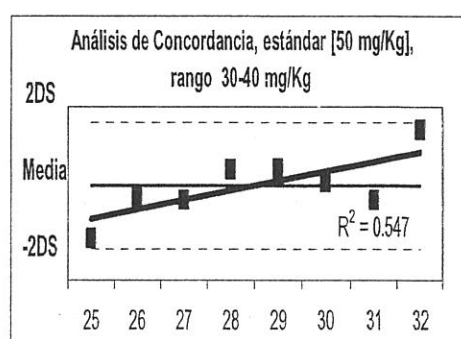
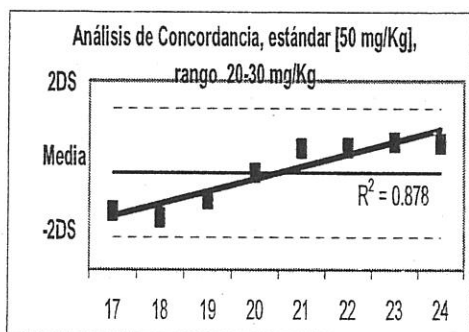
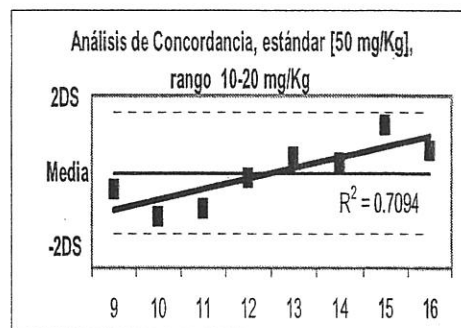
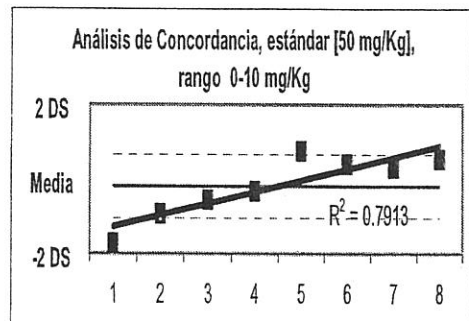
1. Encender el equipo UMS y calentar durante 10 minutos. Si este no se usa durante un periodo largo de tiempo, necesita más tiempo de calentamiento.
2. Antes de usar el probador, la calibración de ajuste cero y la calibración de ajuste estándar deben estar alineados con las marcas mencionadas en la superficie de la llave de calibración cero y estándar del equipo UMS.
3. Colocar agua destilada dentro de la celda, ponga la celda en la cámara y cierre la tapa. La superficie transparente de la celda debe estar alineada con el rayo óptico de la izquierda a la derecha (mirar dentro de la cámara). Mantenga la superficie clara del vidrio cerca de la cabeza de la flecha de la cámara que contiene la celda.
4. Girar la llave de calibración azul del ajuste cero (la izquierda) hasta que aparezca en la lectura digital. Gire la llave de calibración azul (la izquierda) para ajustar los números enteros hasta cero y la otra llave de calibración blanca (la derecha) para ajustar los decimales a cero. Cuando se lea cero en la lectura digital LCD, mantenga constante la calibración cero. **NOTA:** No toque más la calibración cero.
5. Insertar la solución estándar o el vidrio de color en la cámara de la celda y gírelo hasta llegar a 50 en la lectura del LCD ajustando la calibración azul (la izquierda) para ajustar los números enteros hasta el cero y la calibración blanca (la derecha) para ajustar los decimales hasta cero en la lectura del LCD. Tan pronto como se lea cero en el LCD, mantenga la calibración estándar constante. **NOTA:** No toque más la calibración estándar.
6. Sacar la solución estándar o el vidrio de color, inserte la solución desconocida de sal yodada en la cámara de la celda y cierre la cubierta. La concentración mg/Kg de yodo se lee claramente en el UMS. Anotar el contenido de yodo en la muestra de sal. Siga leyendo el contenido de yodo en diferentes muestras de manera simultánea una después de la otra. **NOTA:** No es necesario cambiar entre calibración cero y calibración estándar, pero al apagar la calibración cero y la estándar deben estar alineadas con las marcas sobre la superficie de la calibración cero y la calibración estándar antes de usar el UMS (véase No.2).
7. Seguir el mismo procedimiento para que el UMS lea un contenido de yodo en sal desconocido.

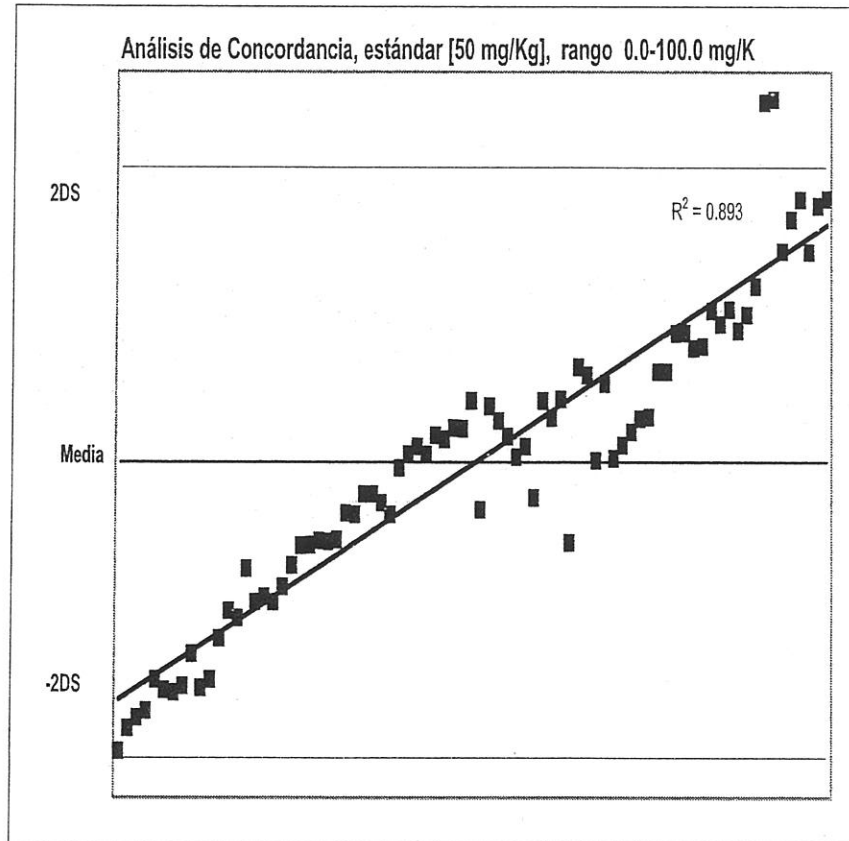
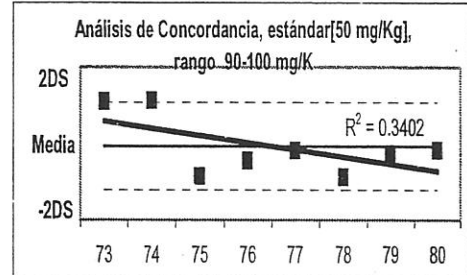
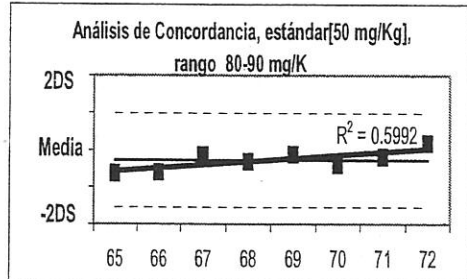
VIII. INTERPRETACION DE RESULTADOS

Anote el resultado que se obtiene en la pantalla del equipo. La concentración esta dada en mg/Kg de yodo en sal.

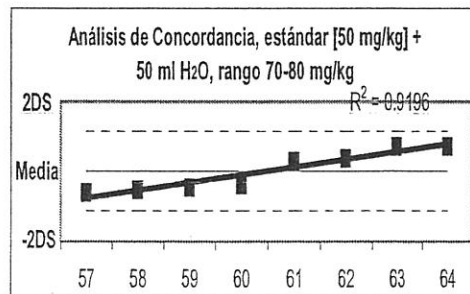
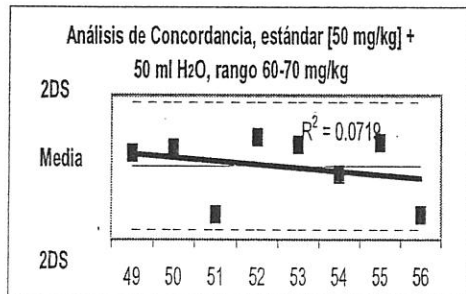
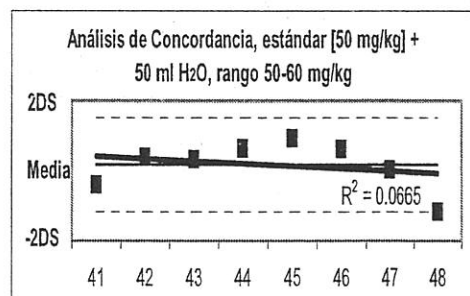
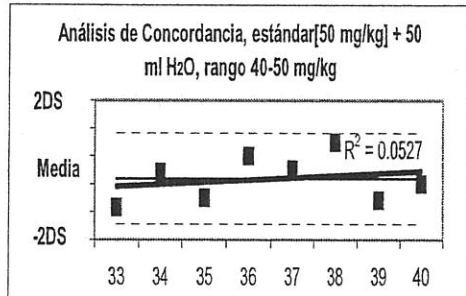
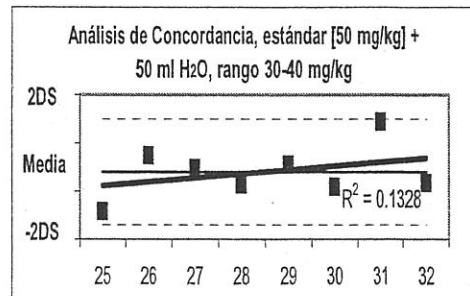
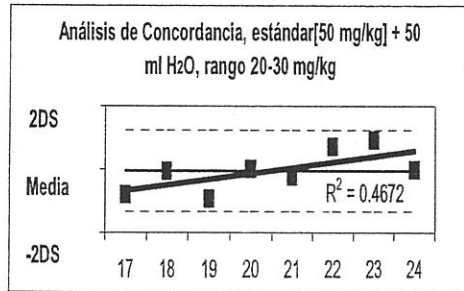
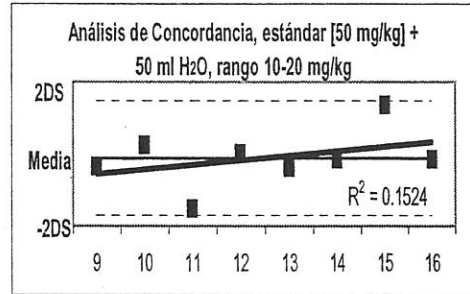
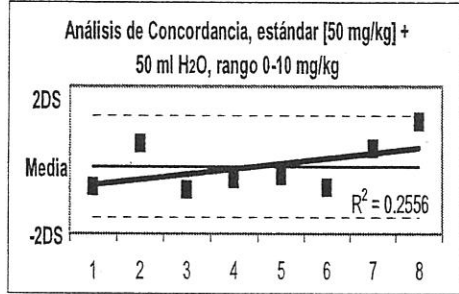
Anexo 8:

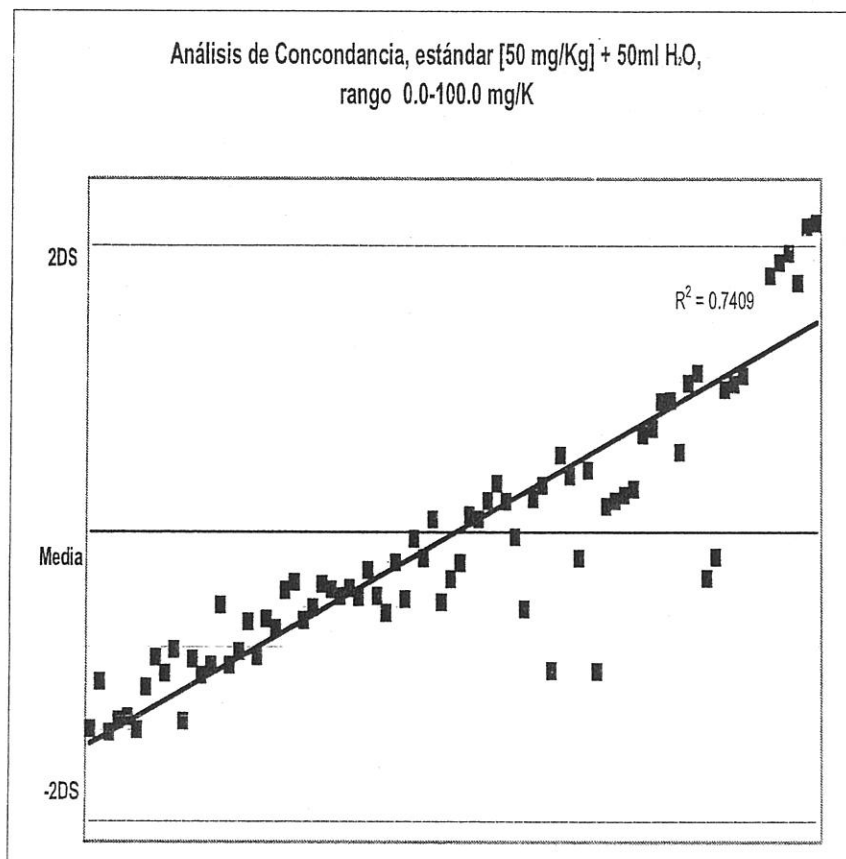
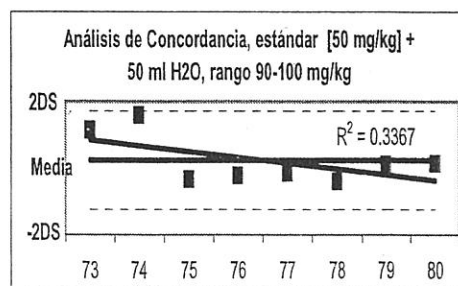
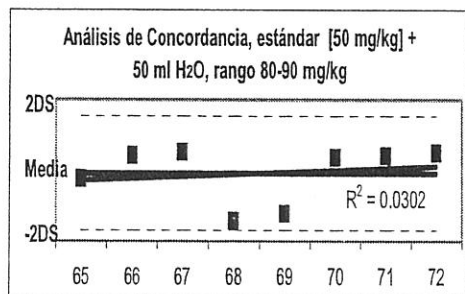
Gráfica No. 11 Análisis de concordancia para las muestras de sal, utilizando el estándar de 50 mg/Kg.



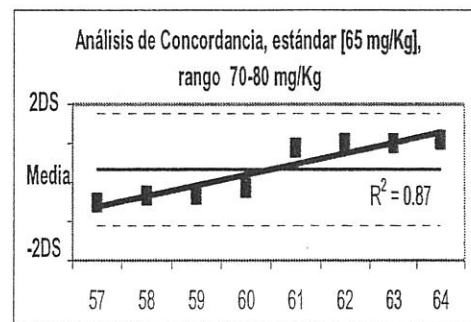
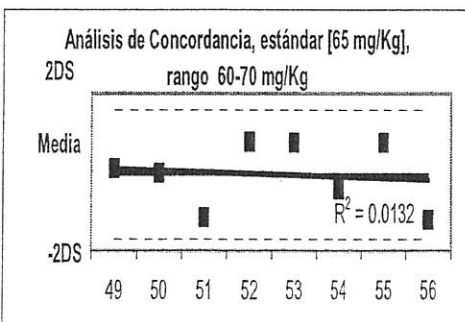
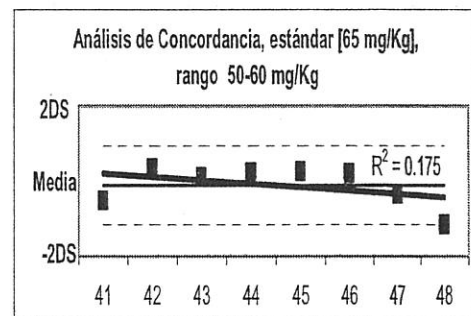
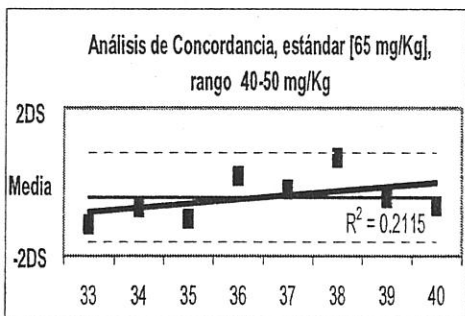
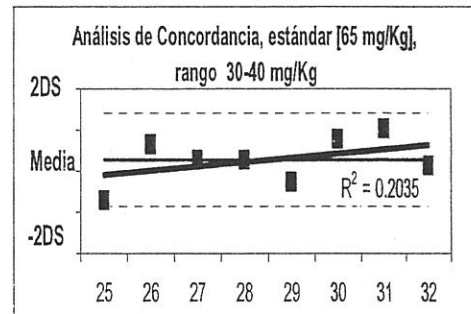
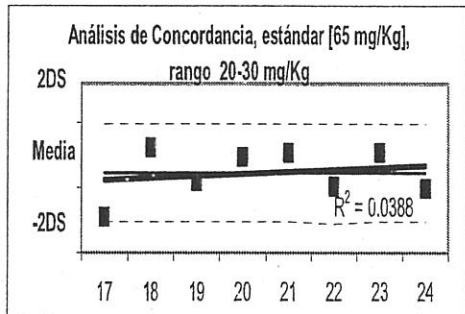
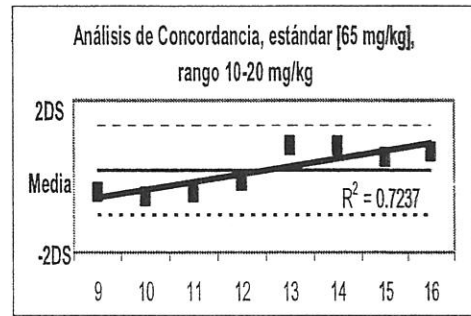
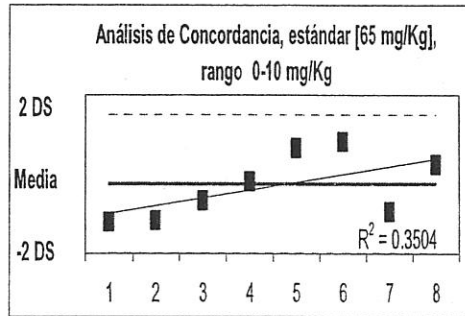


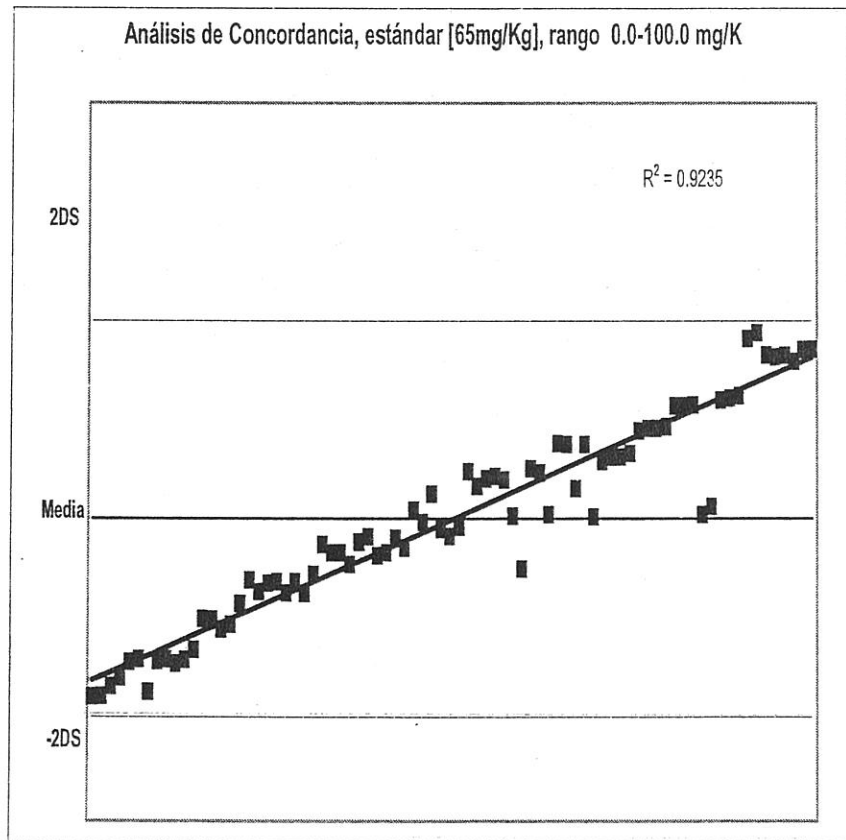
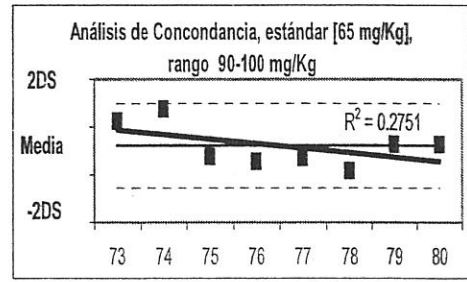
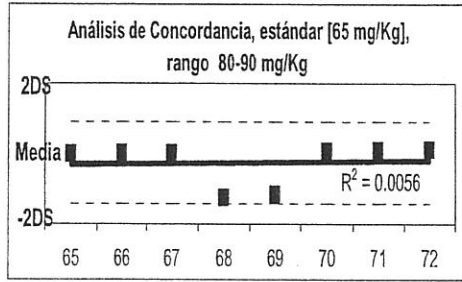
Gráfica No. 12 Análisis de concordancia para las muestras de sal, utilizando el estándar de 50 mg/Kg + 50 ml de H₂O



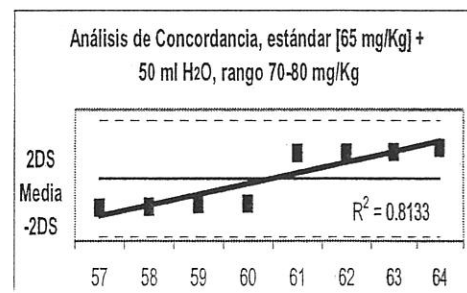
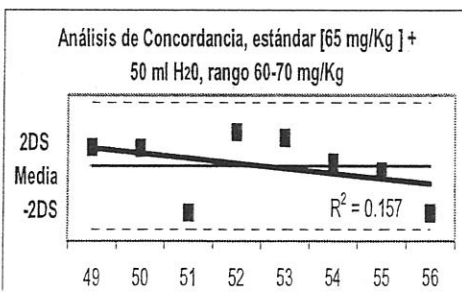
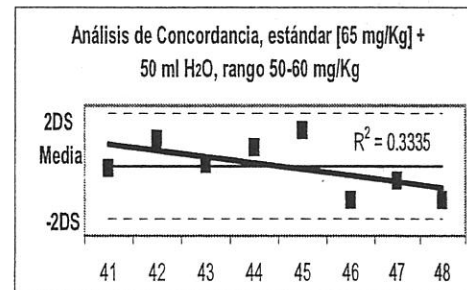
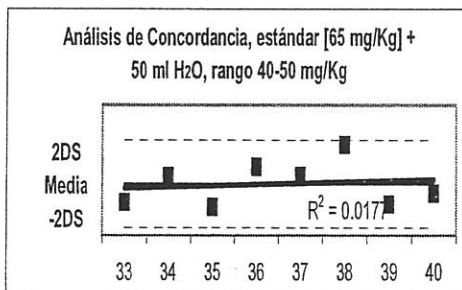
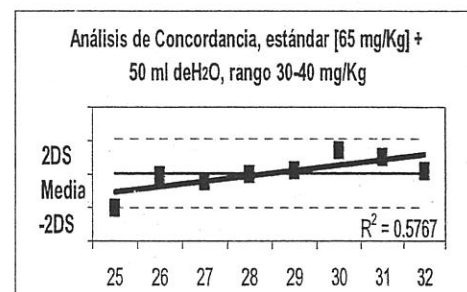
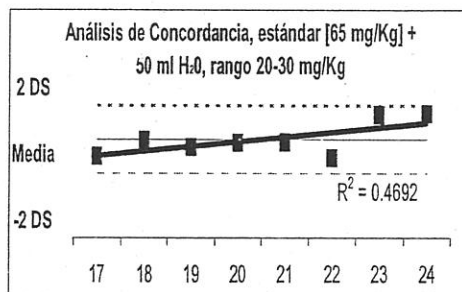
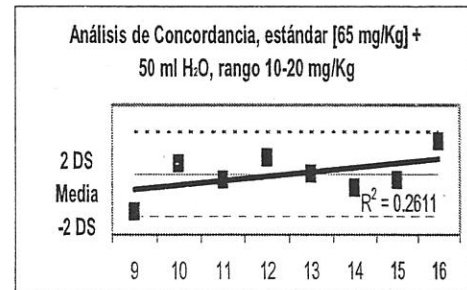
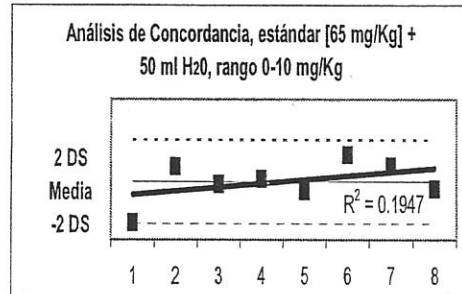


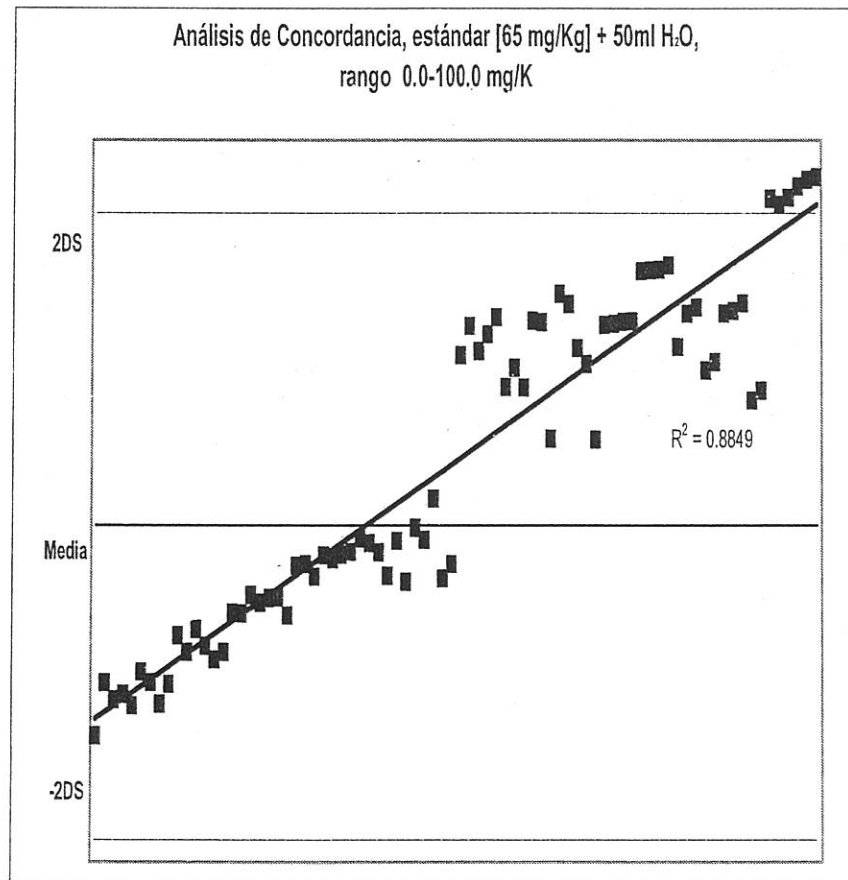
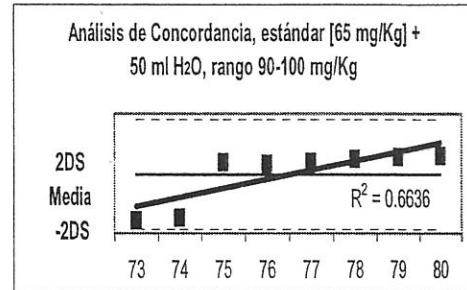
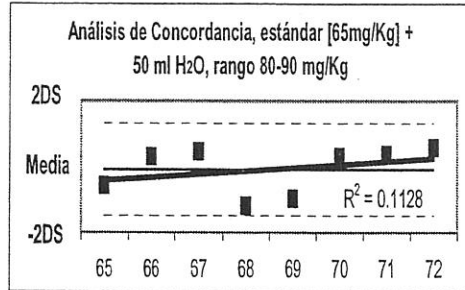
Gráfica No. 13 Análisis de concordancia para las muestras de sal, utilizando el estándar de 65mg/Kg.





Gráfica No. 14 Análisis de concordancia para las muestras de sal, utilizando el estándar de 65 mg/Kg + 50 ml de agua







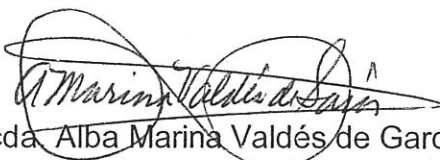
Anabella Quezada Calderón

Autora



Licda. Ana Carolina Martínez

Asesora



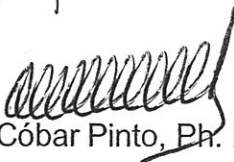
Licda. Alba Marina Valdés de García, M. Sc.

Revisora



Licda. María Eugenia Faredes, M.A.

Directora



Oscar Cobar Pinto, Ph. D.

Decano