



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA  
CUANTIFICACIÓN DE RETINOL EN AZÚCAR  
FORTIFICADA DE CONSUMO NACIONAL**

**César Omar Méndez Hurtarte**

**Asesorado por: Ing. Erik Javier Maldonado Velásquez**

**Guatemala, septiembre de 2003**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICACIÓN  
DE RETINOL EN AZÚCAR FORTIFICADA DE CONSUMO NACIONAL**

TRABAJO DE GRADUACIÓN  
PRESENTADO A JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE INGENIERÍA

**CÉSAR OMAR MÉNDEZ HURTARTE**

ASESORADO POR EL ING. ERIK JAVIER MALDONADO VELÁSQUEZ  
AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE  
**INGENIERO QUÍMICO**

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2003

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



**NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA**

<b>DECANO</b>	<b>Ing. Sydney Alexander Samuels Milson</b>
<b>VOCAL I</b>	<b>Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos</b>
<b>VOCAL II</b>	<b>Lic. Amahán Sánchez Alvarez</b>
<b>VOCAL III</b>	<b>Ing. Julio David Galicia Celada</b>
<b>VOCAL IV</b>	<b>Br. Kenneth Issur Estrada Ruiz</b>
<b>VOCAL V</b>	<b>Br. Elisa Yasmina Vides Leiva</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco</b>

**TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO**

<b>DECANO</b>	<b>Ing. Sydney Alexander Samuels Milson</b>
<b>EXAMINADOR</b>	<b>Ing. Jaime Domingo Carranza G.</b>
<b>EXAMINADOR</b>	<b>Ing. Federico Guillermo Salazar R.</b>
<b>EXAMINADOR</b>	<b>Ing. Carlos Salvador Wong Davi</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco</b>

**HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

Cumpliendo con los preceptos que establece la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICACIÓN  
DE RETINOL EN AZÚCAR FORTIFICADA DE CONSUMO NACIONAL**

Tema que me fuera asignado por la dirección de la Escuela de Ingeniería Química  
Con fecha 12 de septiembre de 2003.

César Omar Méndez Hurtarte

## **ACTO QUE DEDICO**

### **A DIOS**

Por haberme concedido la vida.

### **A MIS PADRES**

César Augusto Méndez y Ana Héliida de Méndez por su amor y apoyo que siempre me han brindado.

### **A MIS HERMANOS**

Melissa y Byrón por su cariño y apoyo.

### **A MIS ABUELOS**

Maria Victoria Morales, Luis Hurtarte y en especial a Olga de Hurtarte (Q.E.P.D) por su cariño y enseñanzas.

### **A MIS AMIGOS**

Tomás, José Fernando, Erick, Carlos, Alex, Derick, Ludin, Jorge Vásquez, Evelyn Corzantes, Familia Ramírez y Familia Bravo, en especial a Yobanna Carcámo por los momentos compartidos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE INGENIERÍA

A LA ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Por otorgarme los conocimientos necesarios para desempeñarme como profesional.

A EL LABORATORIO NACIONAL DE SALUD (L.N.S.)

En especial a la Licda. Indira Marroquín e Inga. Mónica Méndez por el apoyo que me han brindado.

A LA SECCIÓN DE FÍSICO QUÍMICO DE ALIMENTOS (L.N.S.)

A mis compañeros por su colaboración incondicional.

A MI ASESOR

Ing. Erik Maldonado

A MIS PADRINOS DE GRADUACIÓN

Ing. Tomás Argueta

Lic. José de Mata

## **ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	III
GLOSARIO.....	IV
RESUMEN.....	VI
OBJETIVOS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	VII
I	

## 1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

1.1. Selectividad o especificidad.....	1
1.2. Linealidad.....	1
1.3. Precisión.....	2
1.3.1. Repetibilidad.....	2
1.3.2. Reproducibilidad .....	2
1.4. Exactitud .....	3
1.5. Sensibilidad .....	3
1.5.1. Límite de detección.....	3
1.5.2. Límite de cuantificación.....	3
1.6. Robustez.....	4

## 2. PALMITATO DE RETINOL (Vitamina A)

2.1. Química y nomenclatura.....	5
2.2. Funciones.....	7
2.3. Deficiencia.....	7

2.4.Toxicidad.....	8
2.4.1. Toxicidad aguda.....	8
2.4.2. Toxicidad crónica.....	9
2.4.3. Toxicidad teratogénica.....	9
<b>3. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL RETINOL EN AZÚCAR FORTIFICADA</b>	
3.1. Recomendaciones a seguir.....	11
3.2. Procedimiento.....	12
3.3. Cálculos.....	14
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
5.1 Discusión de resultados.....	26
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>29</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>34</b>

## II

# ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### FIGURAS

1	Fórmulas de los retinoides principales y del $\beta$ -caroteno.....	6
2	Linealidad del método concentración de retinol.....	25

### TABLAS

I	Concentración teórica de retinol esperada para cada muestra de azúcar.....	15
II	Resultados de exactitud a la concentración teórica de retinol de 5.33 ppm.....	19
III	Resultados de exactitud a la concentración teórica de retinol de 10.66 ppm....	20
IV	Resultados de exactitud a la concentración teórica de retinol de 21.33 ppm....	21
V	Resultados de repetibilidad a la concentración teórica de retinol de 10.66 ppm.....	22
VI	Resultados de reproducibilidad a la concentración teórica de retinol de 10.66 ppm (día 1 y día 2).....	23
VII	Resultados de la linealidad .....	24

### III

## GLOSARIO

<b>Alícuota</b>	Porción pequeña de un total.
<b>Cefalea</b>	Dolor de cabeza.
<b>Cuantificación</b>	Cantidad de compuesto presente en una sustancia.
<b>Degradación</b>	Descomposición de una sustancia en sus componentes o sus derivados.
<b>Espectrofotometría</b>	Empleo del espectrofotómetro en el análisis.
<b>Espectrofotómetro</b>	Instrumento de medición o aparente reflectancia a la luz visible en función de longitud de onda, permitiendo un análisis exacto de color o comparación exacta de intensidad luminosa de dos fuentes a longitud de onda específica.
<b>Fortificación</b>	Estrategia de uso común en alimentos que tiene la ventaja de incorporar el nutriente a la dieta habitual.

#### IV

<b>Morbilidad</b>	Cantidad de enfermos en una población.
<b>Mortalidad</b>	Cantidad de defunciones en una población.
<b>ppm</b>	Unidades que representa concentración en partes por millón.
<b>Retinol</b>	Vitamina A.
<b>Teratogénico</b>	Malformaciones congénitas y desarrollo mental subnormal.
<b>Xeroftalmia</b>	Xeros = seco, oftalmia = ojo; Enfermedad oftalmológica, condición grave por deficiencia de vitamina A
<b><math>\alpha</math></b>	Intervalo de significancia

## RESUMEN

Para que toda marca comercial de azúcar que se consuma a nivel nacional debe cumplir con la fortificación declarada por la ley, por lo que es necesario verificar la cuantificación de retinol en azúcar a través del método de análisis de “Determinación Espectrofotométrica de Retinol en Azúcar”. Los resultados provenientes de este análisis, llevan consigo la toma de decisiones, por lo que es necesario que los resultados obtenidos sean confiables, y debido al tratado de libre comercio y a la globalización que existe, se requiere que el método de análisis sea un método válido para que los resultados emitidos por el Laboratorio Nacional de Salud tengan un respaldo científico y técnico cumpliendo con los parámetros exigidos de control de calidad nacionales e internacionales.

Los parámetros considerados en este estudio son la exactitud, la repetibilidad, la reproducibilidad y la linealidad. Esta validación se realizó utilizando estadísticas básicas como lo es la desviación estándar y los coeficientes de variación, así, como, también se realizaron regresiones lineales. Durante la validación se logró obtener coeficientes de variaciones menores del 3% y porcentajes de recuperación entre  $100 \pm 5\%$ , se determinó que la concentración teórica en [ppm] y la concentración obtenida en [ppm] guardan una relación que se puede representar por un modelo matemático.

Con estos resultados y el cumplimiento de los Parámetros de validación, se demostró que el método bajo estudio es confiable para su uso rutinario y da la

seguridad para la aprobación de los resultados emitidos por el Laboratorio Nacional de Salud.

## VI

# OBJETIVOS

- **General**

Validar el método analítico actual de determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar de consumo humano para el Laboratorio Nacional de Salud.

- **Específico**

1. Estandarizar el tiempo de homogenización de la muestra a analizar para obtener los resultados precisos al cuantificar el retinol en azúcar de consumo nacional
2. Que el presente trabajo de graduación pueda ser utilizado por cualquier persona para determinar la cuantificación de retinol presente en el azúcar.

## VII

# INTRODUCCIÓN

La confiabilidad de los datos que se obtienen al realizar el análisis, dependerá sobre qué tan sensible sea el método a factores externos y la repetibilidad de los resultados obtenidos. Esto se logra con la validación apropiada del método de análisis.

Para una validación se toman en consideración varios aspectos, principalmente, en el análisis estadístico de los resultados y estimar que la dispersión de resultados no sobrepasan los límites de confianza, establecidos para el método.

El parámetro estadístico que se utiliza en este trabajo de graduación es la desviación estándar de los resultados obtenidos. Los parámetros de validación que se toman en consideración para este método analítico de determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar son: La exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y la linealidad.

Una vez establecido el procedimiento estadístico, para la validación, se procedió con el método de análisis de determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar para la cuantificación del mismo, se trabajaron muestras de azúcar a diferentes concentraciones dependiendo del parámetro de validación.

## VIII

El equipo de espectrofotometría, utilizado para la validación, es un espectrofotómetro uv / visible marca **Perkins Elmer Lambda 25** con doble celda. Todo el equipo es controlado desde una computadora personal Compaq Dell.

Mediante la utilización del procedimiento de validación, el método analítico para la determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar, fue validado y se determinó, principalmente la consistencia de sus resultados, obteniéndose desviaciones menores del 3% cumpliendo con los rangos de aceptación, al mismo tiempo que se aseguró la confiabilidad de los resultados al comprobar la exactitud, precisión y la linealidad del método.



# 1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Los parámetros a considerar en la validación son:

- Selectividad
- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Sensibilidad
- Robustez

## 1.1. Selectividad o especificidad

Es la capacidad de un método analítico, de diferenciar una sustancia de otra que se presente durante el análisis, para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra (referencia 6).

## 1.2. Linealidad

Es la capacidad que posee un método de análisis para definir en forma matemática, que el resultado obtenido es proporcional a la concentración teórica esperada.

Esta linealidad se debe comprobar a diferentes concentraciones; es decir, que el activo se puede evaluar en los puntos del 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, del valor teórico esperado. Esta muestra se trabaja por sextuplicado y los valores obtenidos del análisis se grafican en función de la concentración. Debe calcularse el intercepto, la pendiente y la regresión lineal de la recta, para verificar que los datos tengan relación entre sí.

### **1.3. Precisión**

La precisión esta relacionada con la dispersión de las medias alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La precisión se puede expresar matemáticamente con tres variables; la desviación standard  $\sigma$ , estimada analíticamente por  $S$  o comúnmente como coeficiente de variación CV. En el presente estudio se utiliza el coeficiente de variación CV.

#### **1.3.1. Repetibilidad**

Es la constancia de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones dependientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, reactivo, laboratorio). Se determina mediante el análisis de una misma muestra, la cual no debe tener un coeficiente de desviación mayor de 3%.

#### **1.3.2 Reproducibilidad**

Este método se expresa como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones, (analista, tiempo, aparato, reactivos, laboratorio). Y debe tener un coeficiente de variación menor o igual de 3%.

### **1.4. Exactitud**

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido durante el análisis (media) y el valor real. Se acepta un  $C_v$  menor o igual de 3%.

## **1.5. Sensibilidad**

Esta corresponde a la mínima cantidad de concentración de retinol que puede producir un resultado significativo.

### **1.5.1. Límite de detección**

Corresponde a la menor concentración de retinol que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración [ppm]. Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ ruido.

### **1.5.2. Límite de cuantificación**

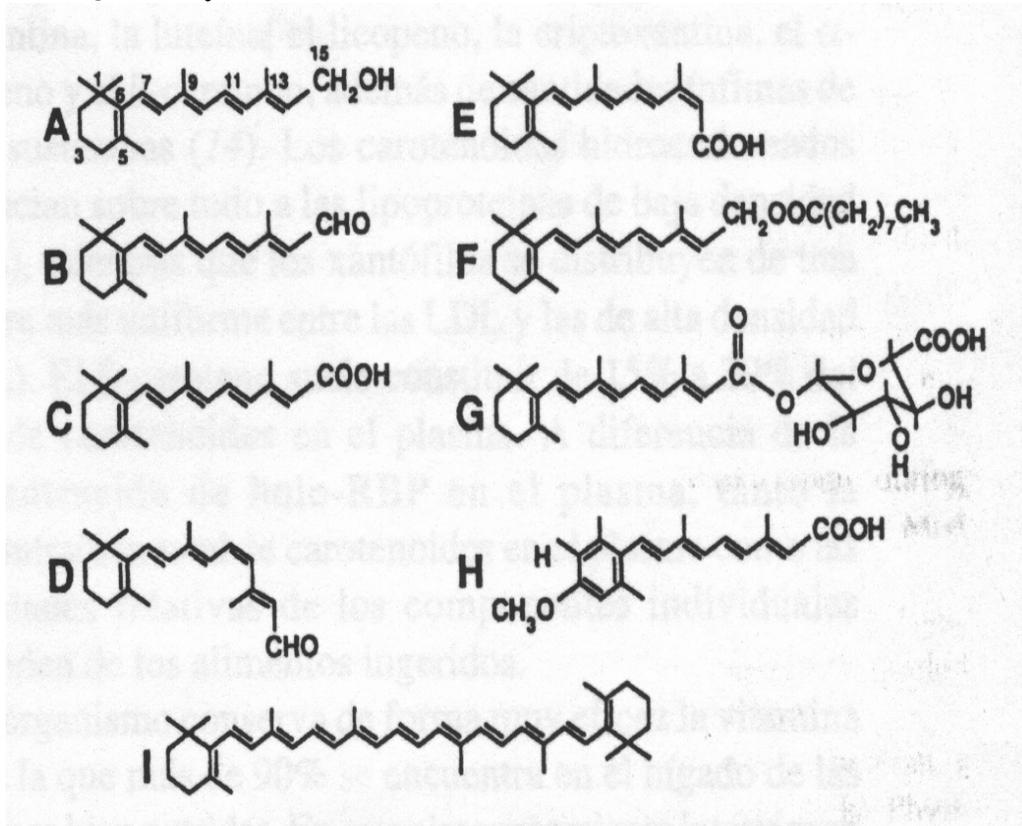
Corresponde a la menor concentración de retinol que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración [ppm], en este caso generalmente se mide la señal de fondo relación señal/ruido, efectuando mediciones repetidas sobre un blanco.

## **1.6. Robustez**

Es un método analítico que corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, reactivos, analistas y laboratorios. Todo esto influye en los resultados del análisis. Si existe alguna variación esta deberá ser documentada como referencia futura. Es evidente que un método debe ser “robusto” (reproducible) frente a cambios de analistas o instrumentos, pero no necesariamente debe serlo frente a todos los cambios que se estudien.

## **2. PALMITATO DE RETINOL (Vitamina A)**

## 2.1. Química y nomenclatura



todo-trans  
y el ácido  
de la visión  
ido 13-cis  
s la forma  
drosoluble  
aromático  
cuenta el

todos los  
también se  
e activos.

En el cuerpo, solo cerca de 50 de los aproximadamente 500 carotenoides que se encuentran en la naturaleza se convierten en vitamina A. Por otra parte, casi todos ellos, incluidos los que poseen actividad de provitamina A, sirven también como captadores de átomos inestables de oxígeno y, en determinadas circunstancias, como antioxidantes (referencia 7).

**Figura 1. Fórmulas de los retinoides principales y del  $\beta$ -caroteno**

- A) todo-trans retinol
- B) todo-trans retinal
- C) ácido todo-trans retinoico
- D) 11-cis retinal
- E) ácido 13-cis retinoico
- F) todo-trans retinil palmitato
- G) todo-trans retinoíl  $\beta$ -glucurónido
- H) análogo trimetil metoxifenol del ácido todo-trans retinoico (etretina, acitretina)
- I) todo-trans  $\beta$ -caroteno

## **2.2. Funciones**

El retinol tiene funciones esenciales en la visión, el crecimiento, el desarrollo óseo, el desarrollo y mantenimiento del tejido epitelial, los procesos inmunológicos y la reproducción normal.

La vitamina A, es un componente de los pigmentos visuales, y como tal es esencial para la integridad de la fotorrepción en los bastones y conos de la retina. También la vitamina A es necesaria para el crecimiento y el desarrollo del esqueleto y los tejidos blandos mediante su efecto sobre la síntesis de proteínas y la diferenciación celular ósea normal y para las células epiteliales que forman el esmalte en el desarrollo de los dientes (referencia 7).

### **2.3. Deficiencia**

La deficiencia de retinol es un problema nutricional a nivel mundial. En latinoamérica fue reconocida como una de las tres deficiencias más comunes de micronutrientes, las otras son: deficiencia de hierro y deficiencia de yodo.

En Guatemala la deficiencia de Retinol (vitamina A), ha sido documentada desde 1965 por encuestas nutricionales realizadas por el INCAP; a partir de entonces, se han realizado algunas acciones con el propósito de resolver o minimizar esta desnutrición, la fortificación del azúcar fue un programa que en forma exitosa disminuyó considerablemente este problema. En los países menos industrializados se calcula que cada año pierden la visión 500 000 niños en edad preescolar por deficiencia de retinol muchos de estos niños ciegos no pueden sobrevivir, los signos habituales por deficiencia de la retinol son la ceguera nocturna y la xeroftalmía.

La deficiencia de esta vitamina es una de las causas más importantes de muerte en niños en desarrollo, incluyendo la elevada mortalidad y morbilidad que resulta de las mayores frecuencias de enfermedades respiratorias y diarréicas. Cerca de 2 millones de niños mueren por sarampión al año, se piensa que el retinol es de beneficio para su tratamiento. Se sabe que la deficiencia de retinol aumenta la frecuencia, gravedad y mortalidad en casi todas las enfermedades infecciosas ( referencia 7 ).

## **2.4 Toxicidad**

Si se ingiere en grandes dosis, el retinol puede ser tóxico. Existen tres categorías de toxicidad:

- Aguda
- Crónica
- Teratogénica

### **2.4.1. Toxicidad Aguda**

La toxicidad aguda se produce por la toma, de una o varias dosis de vitamina, en general cien o más veces superiores a los aportes recomendados (adultos 600 micro gramos y para niños 400 micro gramos) de Ingesta Nutricional Recomendados (INR) en adultos y 20 ó más veces superiores a la INR en niños, sus primeros signos consisten en náuseas, vómitos, vértigo, visión borrosa, incoordinación muscular (referencia 8).

### **2.4.2. Toxicidad crónica**

La toxicidad crónica, que es mucho más frecuente que la aguda, se debe a la ingesta repetida, a lo largo de semanas o años, la dosis excesiva de retinol superiores, en general, a 10 veces más de INR producen signos de toxicidad que consisten habitualmente en cefalea, labios agrietados, piel seca, dolores óseos y articulares .

### **2.4.3. Toxicidad teratogénica**

Los efectos teratogénicos del retinol, se han observado en especies de mamíferos, incluyendo al hombre. Se manifiesta por reabsorción fetal, abortos, malformaciones congénitas y desarrollo mental subnormal que se traduce en dificultades en el aprendizaje (referencia 8).

### **3. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL RETINOL EN AZÚCAR FORTIFICADA**

#### **3.1. Recomendaciones**

1. Se sugiere el uso de tela negra o papel aluminio para cubrir los tubos o balones que contienen retinol evitando la degradación del mismo.

2. Una vez que el retinol se ha extraído en la fase orgánica, el análisis no debe de interrumpirse ya que el retinol es sensible a la luz.
3. Debe trabajarse rápidamente para evitar la evaporación de los solventes y de las soluciones.
4. Se requiere campana de extracción y, si el laboratorio está localizado en zonas cálidas, el uso de aparatos de aire acondicionado.
5. Se sugiere bulbos especiales para succionar solventes. El método usualmente no requiere la corrección de la absorbancia por una segunda lectura después de la destrucción del retinol por la luz ultravioleta, lo cual es una ventaja ya que la irradiación tiende a elevar la temperatura de los solventes. Sin embargo es preciso preparar un blanco experimental con azúcar sin fortificar de la misma procedencia que el azúcar fortificada. Este blanco debe dar una absorbancia menor a 0.050.
6. Si la variabilidad entre las réplicas extraídas de una misma solución de azúcar es tal que ésta se aparta de su promedio en mas del 5%, se rechazan los resultados y se repite la extracción.
7. Al preparar las soluciones de hidróxido de sodio usar guantes, anteojos de seguridad y trabajar en la campana de extracción, ya que el hidróxido de sodio es corrosivo para la piel y los ojos.

### **3.2. Procedimiento**

1. Homogenice la muestra mezclando varias veces durante 20 segundos.

2. En un vaso de precipitar de 250 ml. pese aproximadamente 20g. de azúcar registrando el peso exacto a centésimos de gramo, y disuelva con 60-70 ml. de solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 N. Agite hasta que todo el azúcar se disuelva completamente. Prepare un blanco de reactivos solamente con Hidróxido de Sodio (NaOH)-0.1N y llevándolo a través de los mismos pasos de la muestra.
3. Incube en baño de agua a 50-60°C por 15 minutos. Deje en reposo a temperatura ambiente hasta que las soluciones se enfríen. Agregue 2-3 gotas de fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>)-0.1%.
4. Transfiera cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 ml. Lave varias veces el vaso de precipitar con pequeñas porciones de agua destilada y transfiera los lavados al balón. Afore a 100 ml con agua destilada y mezcle.
5. Transfiera 2 ml. de la solución del paso 4 a cada uno de los tubos de vidrio de 20 ml. (con tapón esmerilado o de rosca) con el propósito de analizar cada solución en duplicado.
6. Agregue 2 ml de Etanol Absoluto (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) a cada tubo. Mezcle en agitador tipo Vortex por 5 segundos.
7. Mida 3 ml. de Hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) con una pipeta volumétrica y luego agregue cuidadosamente esa cantidad a cada uno de los tubos del paso 6. Tape cada tubo inmediatamente y agite con suficiente intensidad en el agitador tipo vortex por 30 segundos, para asegurar la extracción completa del retinol. Destape ligeramente los

tubos para aliviar la presión del gas. La fase acuosa es de color fucsia y mientras que la fase orgánica es incolora.

8. Con la mayor brevedad posible transfiera con una pipeta pasteur la solución de Hexano ( $C_6H_{14}$ ) a una celda de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz, y lea su absorbancia a 325 nm. Ajuste continuamente el cero del instrumento con Hexano ( $C_6H_{14}$ ) (referencia 4) .

### 3.2. Cálculos

1. Sustraiga la absorbancia promedio del blanco de reactivos de la absorbancia de las muestras.
2. La concentración de retinol en las muestras de azúcar se calcula según la ecuación siguiente:

$$\text{Retinol (mg/kg)} = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{983.67}{P} \times \text{FC}\lambda$$

$$\text{Abs}_{\text{corregida}} = \text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$$

Donde:

$$\text{Abs}_{\text{corregida}} = \text{Absorbancia corregida}$$

$Abs_{muestra}$  = Absorbancia muestra

$Abs_{blanco}$  = absorbancia blanco

$Abs_{blanco}$  = Promedio de tres lecturas, y que debería ser menor de 0.050

P = Peso de la muestra (g)

$FC_{\lambda}$  = Factor de corrección de longitud de onda para luz visible.

## 4. METODOLOGÍA

La validación de un método se basa en parámetros estadísticos para lograr de esta forma la determinación máxima aceptable en la dispersión de resultado. El procedimiento matemático que requiere se presenta en el anexo.

La metodología que se llevó a cabo durante la validación del método analítico para la determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada es la siguiente:

1. Se trabajó con tres muestras de azúcar a diferentes concentraciones conocidas de retinol.

**Tabla I** Concentración teórica de retinol esperada para cada muestra de azúcar.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración de retinol [ppm]</b>
1	5.33
2	10.66
3	20.33

2. Se trabajó de acuerdo a los parámetros de validación.
3. Las muestras fueron analizadas por sextuplicado para cada parámetros de validación, obteniendo un número de datos confiables.
4. El tiempo de homogenización de la muestra a trabajar debe ser mayor o igual a 20 segundos.
5. Luego se trabajó analizando las muestras de acuerdo a las especificaciones del capítulo “Método analítico para la determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada” del presente informe.
6. Se obtuvieron las absorbancias de cada corrida, con las cuales se calculó la concentración de retinol en [ppm], para cada corrida.
7. Con las concentraciones obtenidas en el paso anterior, se realizaron los cálculos correspondientes para cada parámetro de validación del método, encontrando coeficientes de variación y desviaciones estándar menores al 3%, porcentajes de

recuperación de  $100\% \pm 5\%$ , y un modelo matemático que representa la concentración teórica esperada y la concentración obtenida.

8. Equipo utilizado:

- Agitador tipo Vortex
- Baño de agua (50-60°)
- Espectrofotómetro UV/Vis ( 325 ó 340 nm )
- Calculadora HP 48G

9. Materiales utilizados:

- Balones volumétricos 100 ml
- Celdas para espectrofotómetro (preferiblemente de cuarzo)
- Erlenmeyer de 250 ml
- Pipetas volumétricas de 2, 3 y 5 ml
- Pipetas pasteur y pipetas serológicas
- Tubos de ensayo de 20 ml. con tapón esmerilado o de rosca
- Varillas de vidrio
- Vasos de precipitar (Beaker) de 100 ml
- Papel aluminio
- Espátula de pesa

10. Reactivos utilizados:

- Etanol absoluto ( $C_2H_5OH$ )
- Fenolftaleína 1% ( $C_{20}H_{14}O_4$ )
- Hexano ( $C_6H_{14}$ )

- Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1N

11. Lugar de investigación; Laboratorio Nacional de Salud.

## 5. RESULTADOS

### Exactitud

Se trabajó con tres niveles de concentración de retinol .

**Tabla II. Concentración teórica de retinol esperada 5.33 ppm**

<b>Corrida</b>	<b>Concentración teórica [ppm]</b>	<b>Concentración obtenida [ppm]</b>
1	5.33	5.54
2	5.33	5.70
3	5.33	5.37
4	5.33	5.31
5	5.33	5.68

6	5.33	5.58
- Porcentaje de recuperación		103.68%
- Coeficiente de variación		2.89%
- Intervalo de confianza		98%
- $\alpha$		0.02
- $t_{\text{crítica}}$		3.3649
- $t_{\text{obtenida}}$		3.1102

**Tabla III. Concentración teórica de retinol esperada 10.66 ppm**

<b>Corrida</b>	<b>Concentración teórica [ppm]</b>	<b>Concentración obtenida [ppm]</b>
1	10.66	10.54
2	10.66	10.25
3	10.66	10.80
4	10.66	10.24
5	10.66	10.40
6	10.66	10.95
- Porcentaje de recuperación		98.78%
- Coeficiente de variación		2.78%
- Intervalo de confianza		98%
- $\alpha$		0.02
- $t_{\text{crítica}}$		3.3649

- $t$ obtenida	1.0746
----------------	--------

**Tabla IV. Concentración teórica de retinol esperada 21.33 ppm**

<b>Corrida</b>	<b>Concentración teórica [ppm]</b>	<b>Concentración obtenida [ppm]</b>
1	21.33	21.06
2	21.33	21.41
3	21.33	20.23
4	21.33	20.68
5	21.33	21.77
6	21.33	21.32
- Porcentaje de recuperación		98.86%
- Coeficiente de variación		2.62%
- Intervalo de confianza		98%
- $\alpha$		0.02
- $t$ crítica		3.3649

- t obtenida	1.0658
--------------	--------

## Precisión

**Tabla V. Repetibilidad, concentración teórica de retinol esperada 10.66ppm**

<b>Corrida</b>	<b>Concentración obtenida [ppm]</b>
1	10.36
2	10.39
3	10.78
4	10.58
5	10.76
6	10.37
- Porcentaje de recuperación	98.87%
- Coeficiente de variación	1.86%

- Desviación estándar	0.1956%
-----------------------	---------

**Tabla VI. Reproducibilidad, concentración teórica de retinol esperada 10.66ppm. con diferente analista y en dos días diferentes**

**Día 1**

<b>Corrida</b>	<b>Analista 1 Concentración obtenida</b>	<b>Analista 2 Concentración obtenida</b>
1	10.40	10.28
2	10.46	10.24
3	10.24	10.15

**Día 2**

<b>Corrida</b>	<b>Analista 1 Concentración obtenida</b>	<b>Analista 2 Concentración obtenida</b>
----------------	--	--

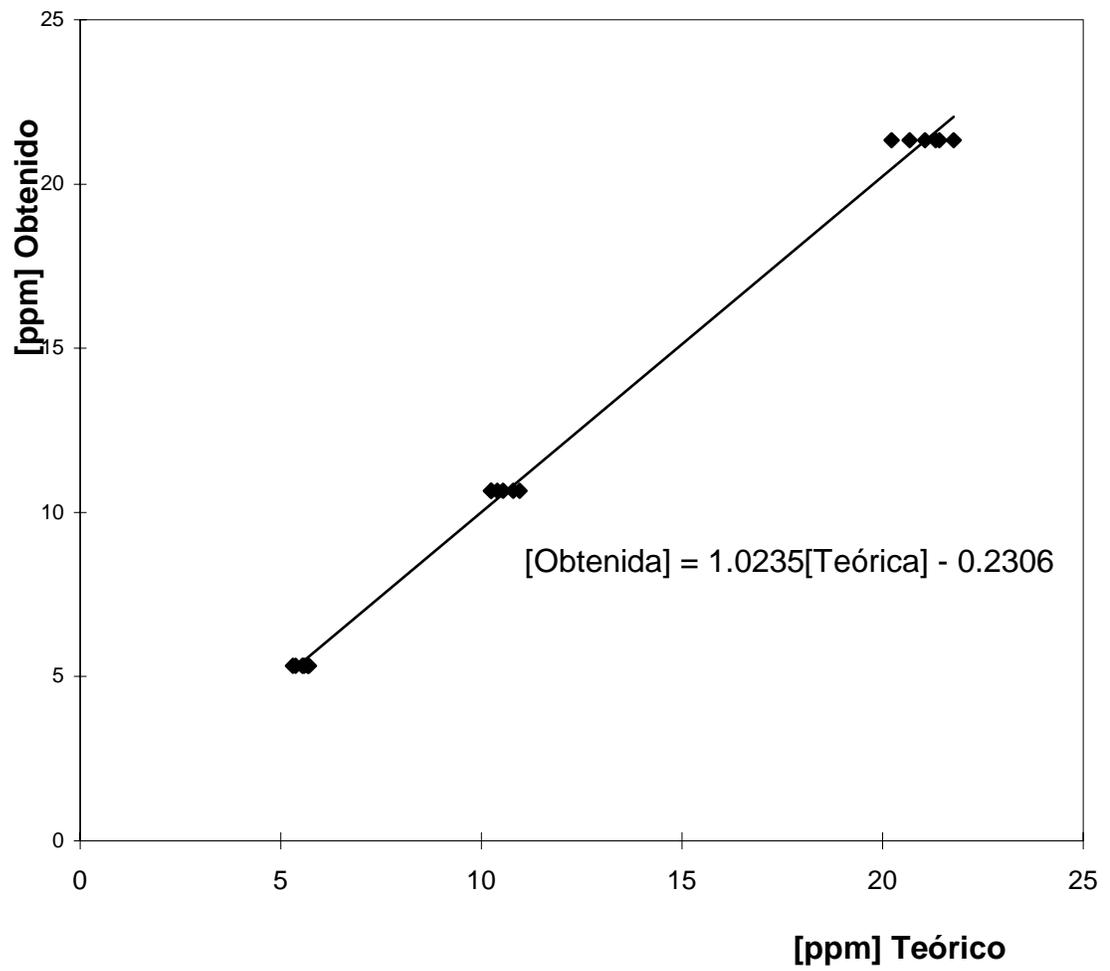
4	10.57	10.78
5	10.14	10.38
6	10.65	10.53
- Porcentaje de recuperación		97.57%
- Coeficiente de variación		1.95%

**Tabla VII. Linealidad**

<b>Corrida</b>	<b>Concentración teórica [ppm]</b>	<b>Concentración obtenida [ppm]</b>
1	5.33	5.54
2	5.33	5.70
3	5.33	5.37
4	5.33	5.31
5	5.33	5.68
6	5.33	5.58
7	10.66	10.54
8	10.66	10.25
9	10.66	10.80
10	10.66	10.24
11	10.66	10.40
12	10.66	10.95
13	21.32	21.06

14	21.32	21.41
15	21.32	20.23
16	21.32	20.68
17	21.32	21.77
18	21.32	21.32
- Regresión lineal		
$[Obtenida] = 1.0235 [Teórica] - 0.2306$		
Coeficiente de correlación		0.9985

Figura 2. Linealidad del método concentración de retinol



## 5.1. Discusión de resultados

Para determinar que el método de análisis es exacto, fue necesario trabajar con tres muestras de azúcar, cada una a diferente nivel de concentración, para, luego determinar que el resultado corresponde a la cantidad teórica esperada. Obteniéndose porcentajes de recuperación del  $100\% \pm 5\%$  y coeficientes de variación menores al 3%, encontrándose una dispersión no significativa entre el valor obtenido y valor Teórico esperado, satisfaciendo los criterios de aceptación para la exactitud, tablas II, III y IV.

Sabemos que la repetibilidad es la constancia de un método analítico realizada a las mismas condiciones. Esta se determinó mediante el análisis por sextuplicado de una misma muestra por un solo analista a la concentración del 100% establecida. Encontrando un coeficiente de variación menor al 3%, Por lo que se observa una concordancia entre ensayos al aplicar repetidamente el método a múltiples alícuotas de una misma muestra. Estos resultados se presentan en la tabla V.

A diferencia de la repetibilidad la reproducibilidad es la constancia de un método analítico realizada a diferentes condiciones. La reproducibilidad del método, se determinó mediante el análisis por triplicado de una muestra, valorada por dos analistas y en dos días diferentes para un total de 12 corridas. Encontrando que al trabajar el método a estas condiciones no existe dispersión significativa entre los resultados ya que la desviación estándar y el coeficiente de variación es menor al 3% y el porcentaje de recuperación esta entre el intervalo del  $100\% \pm 5\%$ . Indicando que el

método puede ser trabajado por cualquier persona, lo cual no debe de influir en los resultados finales. Estos resultados se presentan en la Tabla VI.

La linealidad del método se comprobó analizando la cantidad de retinol a las concentraciones teóricas de 5.33ppm, 10.66ppm y 21.33ppm. cada concentración se analizó por sextuplicado. Para esto se encontró la regresión lineal, en donde se determinó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación siendo este de 0.9985 muy cercano a 1, encontrando una aproximación cerrada con una línea recta, concluyendo que los resultados obtenidos tienen relación entre sí y que estos son directamente proporcional a la concentración de retinol. Los resultados correspondientes se encuentra en la tabla VII y figura 2.

Se realizó la prueba t de *Student*, trabajando con un intervalo de confianza al 98% e intervalo de significancia de  $\alpha = 0.02$  encontrándose resultados de  $t_{obtenida} < t_{critica}$ , indicando que los resultados se encuentran en una tendencia central dentro de una distribución normal ya que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de recuperación y las concentraciones teóricas esperadas, asegurando que el método es confiable y que puede ser utilizado por cualquier persona para la determinación de retinol en el azúcar.

## **CONCLUSIONES**

1. El método analítico para determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada presenta un porcentaje de recuperación del  $100\% \pm 5\%$ .
2. La precisión del método es confiable, ya que los resultados no varían significativamente entre la valoración de una u otra persona en diferentes días, presentando repetibilidad en los resultados con coeficiente de variación de 1.86% y una reproducibilidad con coeficiente de variación de 1.95%.
3. El método para determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada es lineal, obteniendo resultados cercanos a su media central con coeficientes de variación menores al 3%, y un coeficiente de correlación de 0.9985 siendo este muy cercano a 1.

## **RECOMENDACIONES**

1. Revisar periódicamente el funcionamiento del equipo, utilizando estándares o muestras de concentración conocida, verificando la exactitud del método.
2. Es importante que la muestra a trabajar se encuentra bien homogenizada, siendo vital para obtener un resultado preciso.
3. Verificar que las celdas de cuarzo no se encuentren sucias o ralladas de lo contrario pueden interferir en la lectura del equipo.
4. Para obtener una extracción completa de retinol es importante agitar por un tiempo igual o mayor a los treinta segundos, ya que si se agita por menos tiempo el resultado puede variar.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Analítica S.C **Manual de Validación de Métodos Analíticos**. Guatemala 2002.
2. Arroyave G. y Funes. **Enriquecimiento de azúcar con vitamina A. Método para la determinación cuantitativa de retinol en azúcar blanca de mesa**. Arch. Latinoamerica. Nutr. 24:147
3. Guttman, Irwin; Hunter, J. Stuart. *Introductory engineering statistics*. 3<sup>rd</sup> Ed U.S.A 1990.
4. INCAP. **Método analítico para la determinación espectrofotométrica del retinol en azúcar fortificada**.
5. Laboratorio Nacional de Salud. **Métodos analíticos**.
6. Quattrocchi, Oscar y otros **Introducción a la HPLC**. Argentina: Editorial Artes Gráficas Farro. 1992.
7. Shils, Maurice y otros. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8ed U.S.A 1994
8. Ziegler, Ekhard . **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 7ed U.S.A .1997

## **ANEXOS**

## A. Porcentaje de Recuperación

Calcular el porcentaje de recuperación ( R ) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$R = ( x/x^{\bar{}} ) * 100$$

Donde:

R = Porcentaje de recuperación

x = valor medio

$x^{\bar{}}$  = Valor teórico esperado

1. Tabular los resultados:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

2. Cálculos preliminares:

$$\Sigma R = R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2, R_2^2, R_3^2, \dots, R_n^2$$

$$R^{\bar{}} = (\Sigma R) / n$$

Donde:

$R^{\bar{}}$  = Promedio de porcentaje de recuperación

n = Número de corridas

**B. Calcular la desviación estándar (s) con la siguiente ecuación**

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

Donde:

S = Desviación estándar

$x_i$  = Valor medio

$\bar{x}$  = Valor teórico esperado

n = Número de corridas

**C. Calcular el coeficiente de variación (Cv) con la siguiente ecuación**

$$Cv = ( S / \bar{R} ) * 100$$

Donde:

Cv = Coeficiente de Variación

S = Desviación estándar

$\bar{R}$  = Porcentaje de recuperación promedio.

**D. Comparación del valor medio obtenido con el valor teórico esperado, utilizando un ensayo t de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando el t experimental,  $t_{obtenida}$ , que se compara con la tabla para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido, p = 0.05.**

1. El valor  $t_{obtenida}$  puede calcularse como:

$$t_{ob} = ( [ 100 - R ] * \sqrt{n} ) / Cv$$

Donde:

$t_{ob}$  = Valor de t de student obtenida

R = Porcentaje de recuperación promedio

n = Número de corridas

Cv = Coeficiente de variación

2. Calcular grados de libertad

$$GL = n - 1$$

Donde:

GL = Grados de libertad