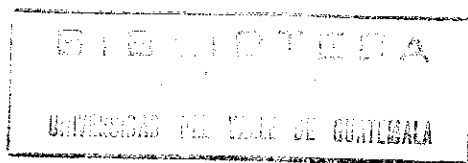


Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación del contenido de riboflavina en una muestra
de pan de consumo popular de Guatemala

Lorena Beatriz Mejía Lazo


Trabajo de investigación presentado para optar al grado
académico de Licenciatura en Bioquímica

Guatemala


2001


DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE RIBOFLAVINA EN
UNA MUESTRA DE PAN DE CONSUMO POPULAR DE
GUATEMALA

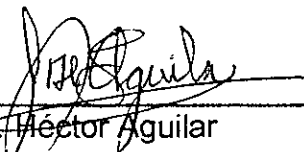
Vo. Bo. :

(f) 
Licenciada Mónica Guamuch
Asesora

Tribunal:

(f) 
Licenciada Mónica Guamuch

(f) 
Dr. Omar Dary

(f) 
Dr. Héctor Aguilar

Fecha de aprobación: 23 de marzo, 2001

A mis padres, Federico Ronaldo Mejía Morales
y Carmen Beatriz Lazo de Mejía por
su amor y por ser el mejor ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme vida y amor.

A mis padres, hermanos y a Edwin, por su amor y comprensión.

A Lcda. Mónica Guamuch por confiar en mi, por su paciencia y su apoyo.

Al personal del Laboratorio de Bioquímica de Alimentos en el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, INCAP, por su ayuda y su amistad.

RESUMEN

Por medio de la realización de este trabajo se logró la implementación y validación de un método analítico para la detección y cuantificación de riboflavina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en harina de trigo, pan francés y pan dulce. Este método es exacto, preciso, sensible y lineal en el rango de concentraciones y matrices de trabajo. Podrá ser utilizado para el control de calidad de harinas fortificadas y otros alimentos, incluyendo la harina de trigo, las harinas compuestas y la galleta nutricional.

Este estudio permitió la determinación del contenido de riboflavina en una muestra del pan de consumo popular en Guatemala, el pan francés y dulce. Se encontró que el pan francés contiene 0.20 ± 0.01 mg de riboflavina / 100 g de porción comestible, mientras que el pan dulce contiene 0.18 ± 0.02 mg de riboflavina / 100 g de porción comestible. En términos generales, el consumo de pan por un adulto promedio al día, le proporciona 5.82 ± 2.67 % de la dosis diaria recomendada de riboflavina. Pudo establecerse que durante el proceso de manufactura del pan francés se pierde alrededor del 33.6% de la riboflavina, y en la manufactura del pan dulce se pierde alrededor del 30.3%.

Los niveles encontrados en el pan francés y dulce corresponden a un incremento en el contenido de riboflavina de 2.8 veces para el pan francés y 4.5 veces en el pan dulce (equivalentes al 186% y 350%, respectivamente),

comparados con los niveles reportados en la Tabla de Composición de Alimentos (TCA) del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP, de 1996. Se recomienda la actualización de estos datos en la TCA – INCAP, lo cual permitirá al usuario tener acceso a esta información. Además, este estudio será un punto de lanza para nuevos estudios relacionados con las matrices estudiadas, las harinas, el pan francés y el pan dulce, y para nuevos estudios del contenido de riboflavina en diversos alimentos.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
A. RIBOFLAVINA	
1. Química	3
2. Absorción, transporte, metabolismo y función	5
3. Requerimientos nutricionales y recomendaciones dietéticas	7
4. Fuentes	7
5. Deficiencia	9
6. Antagonistas y sinergistas	9
B. ESTABILIDAD DE LA RIBOFLAVINA EN LOS ALIMENTOS Y PROCESOS	10
C. FORTIFICACION DE ALIMENTOS CON MICRONUTRIENTES	11
1. Bases conceptuales	11
2. Programas de fortificación	12
a. Objetivos	12
b. Vehículo de fortificación	13

c. Nutrientes fortificantes	13
d. Control de calidad	14
3. Fortificación de harinas de trigo con micronutrientes	17
D. DETERMINACION DE RIBOFLAVINA EN PRODUCTOS DERIVADOS DE CEREALES	22
E. VALIDACION	24
III. JUSTIFICACION	27
IV. OBJETIVOS	30
V. HIPOTESIS	31
VI. TRABAJO EXPERIMENTAL	
A. Materiales y métodos	32
B. Validación	32
C. Trabajo de campo	34
VII. RESULTADOS	37
VIII. DISCUSIÓN	46

IX. CONCLUSIONES	51
X. RECOMENDACIONES	54
XI. BIBLIOGRAFIA	55
CUADROS	58
FIGURAS	71
APENDICES	79

LISTA DE CUADROS

	Página
1. Parámetros de la validación del método para la determinación de riboflavina para harina de trigo, pan francés y pan dulce	41
2. Contenido de riboflavina en el pan de consumo popular en Guatemala: pan francés y dulce	42
3. Diferencia en el contenido de riboflavina en el pan de consumo popular en Guatemala, pan francés y dulce, respecto de lo reportado en la Tabla de Composición de Alimentos de INCAP en 1996	43
4. Datos para la obtención de la curva de calibración de riboflavina 0 – 0.32 µg/mL	58
5. Datos para la obtención de la curva de calibración de riboflavina 0 – 1.0 µg/mL	59
6. Exactitud del método analizando el estándar de cereales VMA-399	59
7. Variación intraensayo del método para harina de trigo	60
8. Variación intraensayo del método para pan francés	60
9. Variación intraensayo del método para pan dulce	61
10. Variación interensayo del método para harina de trigo	61
11. Variación interensayo del método para pan francés	62
12. Variación interensayo del método para pan dulce	62
13. Datos para el cálculo de límites de detección y cuantificación	63
14. Porcentaje de humedad del pan francés	64

15. Porcentaje de humedad del pan dulce	64
16. Niveles de riboflavina en el pan francés y pan dulce de Guatemala, base seca	65
17. Niveles de riboflavina en el pan francés y pan dulce de Guatemala, base húmeda	66
18. Cantidad de riboflavina obtenida por consumo de pan francés, de acuerdo a la encuesta de consumo aparente de pan realizada por el INE (Apéndice 5)	67
19. Cantidad de riboflavina obtenida por consumo de pan dulce, de acuerdo a la encuesta de consumo aparente de pan realizada por el INE (Apéndice 5)	68
20. Porcentaje de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR)* de riboflavina, obtenida por medio del consumo de pan francés y pan dulce en Guatemala	69
21. Cantidad de panes consumidos por el guatemalteco, según la Encuesta de Consumo Aparente del INE (Apéndice 5) y datos del peso del pan de este estudio (Cuadros 15 y 16)	70
22. Estabilidad de la riboflavina en el proceso de la manufactura del	70

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Estructura de riboflavina y flavin-mononucleótido, como componentes del flavin-adenin-dinucleótido.	4
2. Estados óxido-reducción importantes de las flavocoenzimas en el organismo.	7
3. Impacto bioquímico del Enriquecimiento de la harina de trigo en Newfoundland, Canadá	21
4. Curva de calibración para el método de riboflavina, 0 – 0.32 $\mu\text{g/mL}$	71
5. Curva de calibración para el método de riboflavina, 0 – 1.00 $\mu\text{g/mL}$	71
6. Curva para la determinación de límites de detección y cuantificación del método	72
7. Cromatograma de una inyección de estándar de riboflavina 0.12 $\mu\text{g/mL}$ en ácido sulfúrico 0.1 M	73
8. Cromatograma de una inyección de blancos de reactivos	74
9. Cromatograma de una inyección de muestra de harina de trigo sin fortificar	75
10. Cromatograma de una inyección de muestra de harina de trigo	76
11. Cromatograma de una inyección de muestra de pan francés	77
12. Cromatograma de una inyección de muestra de pan dulce	78

APÉNDICES

APÉNDICE	Página
1. Determinación de la humedad del pan	79
2. Determinación de riboflavina en el pan de consumo popular en Guatemala por medio de cromatografía líquida de alta resolución	80
3. Recolección de muestras y manipulación en el laboratorio	85
4. Prueba de blancos de matriz usando harina de trigo no fortificada	86
5. Resumen de la Encuesta Nacional de Consumo Aparente de Pan en Guatemala	88
6. Certificado VMA – 399, estándar para cereales	89
7. Porcentaje de harina en pan francés y pan dulce de Guatemala	90

I. INTRODUCCION

Este estudio pretendió obtener datos actualizados del contenido de vitamina B2 o riboflavina en el pan francés y pan dulce de consumo popular de Guatemala. La importancia de este estudio radica en que, desde inicios de la década de los 90, los niveles de vitaminas y hierro agregadas a la harina de trigo han sido modificados y son diferentes a los que se usaron al introducir las prácticas de fortificación en los años 60. Por lo tanto, el contenido de riboflavina en los productos fabricados con harina de trigo también ha variado, siendo de mayor interés el pan de consumo popular, forma en la cual se consume principalmente la harina de trigo en nuestro país.

Los datos obtenidos contribuirán a la documentación del Sistema de Garantía de Calidad de la harina de trigo en Guatemala y a actualizar los datos en la Tabla de Composición de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) con relación al contenido de riboflavina en el pan francés y dulce. Además, será un punto de referencia para la planificación de estudios futuros relacionados con la vigilancia del proceso de fortificación de harina de trigo en Centro América.

La determinación de la vitamina B2 se llevó a cabo por medio del método usado por la compañía Hoffman - La Roche de cromatografía líquida de alta resolución,

con detección fluorométrica. Debido a que el método ha sido validado en dicho laboratorio, para este trabajo de investigación sólo se verificaron los parámetros mínimos de validación para asegurar que dicho método, aplicado en el laboratorio de INCAP, proporcione resultados confiables. La validación de la metodología incluyó la determinación de exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango. Aunque el método se validó para harina de trigo, pan francés y pan dulce, también es aplicable a harinas compuestas y galleta nutricionalmente mejorada; debido a la similitud de las matrices de trabajo, el método es aplicable a otros alimentos fortificados.

Se analizaron muestras representativas del país basándose en los datos de consumo de pan de la Encuesta de Consumo Aparente del Instituto Nacional de Estadística (INE) y de la población de cada departamento de la República de Guatemala. Pudo establecerse que el pan francés consumido en Guatemala contiene 0.20 ± 0.01 mg de riboflavina/100g de porción comestible, mientras que el pan dulce contiene 0.18 ± 0.02 mg riboflavina/100g de porción comestible (ambos en base fresca). Se estableció que, en general, el contenido de riboflavina ha aumentado 2.9 veces en el pan francés, y 4.5 veces en el pan dulce, desde la década de los 60, tiempo desde el cual se han cambiado los niveles de fortificación y prácticas de manufactura del pan.

II. ANTECEDENTES

A. RIBOFLAVINA

1. Química

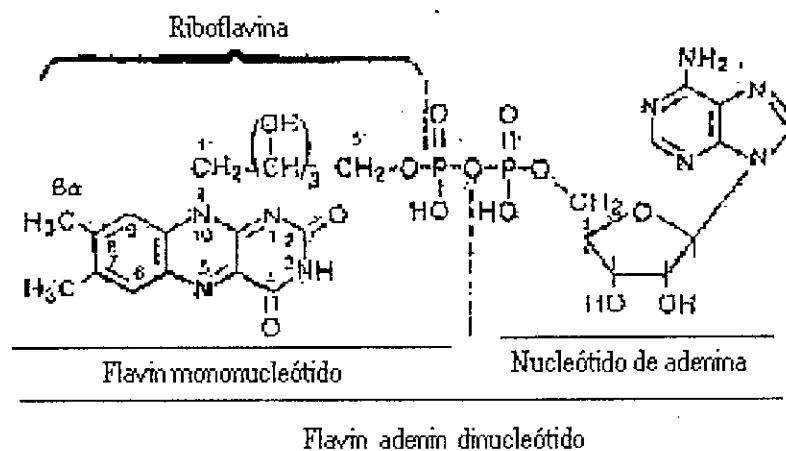
El nombre químico de la riboflavina es 7,8-dimetil-10(1-O-ribitol)isoaloxacina. El peso molecular de la riboflavina es de 376.4; 1 mg equivale a 2.66 μmol de la vitamina. En forma libre la vitamina es una base débil, generalmente se presenta en forma de un sólido amorfo amarillo-naranja. La coenzima más simple de la riboflavina es el flavinmononucleótido (FMN), y la más abundante el flavindinucleótido (FAD). Para formar el FMN, se da la reacción del residuo 5'-hidroxi-metil de la cadena ribitol para formar un éster ortofosfato. Sobre el mismo lado de la cadena se puede dar la reacción para formar el FAD, el cual tiene un dominio adenilado. La estructura de la riboflavina se presenta en la Figura 1. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

La riboflavina es muy poco soluble en soluciones acuosas, por lo que las sales ácidas formadas a $\text{pH} < 1$ o las básicas formadas a $\text{pH} > 10$, son más solubles. Las soluciones neutras o moderadamente alcalinas son amarillas, con un máximo de absorción cerca de los 450 nm. Las soluciones ácidas fuertes son más pálidas, pues su banda de absorción está desplazada hacia los 385 nm. Las soluciones

de la forma neutra oxidada de la vitamina, o forma quinoide, son fluorescentes con una línea de emisión a los 525 nm. La riboflavina también es fosforescente. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

Figura 1

Estructura de riboflavina y flavin-mononucleótido, como componentes del flavin-adenin-dinucleótido. (Shils, Olson y Shike, 1994)



La riboflavina es sensible a la luz, debido a la fotolabilidad de la cadena lateral; es fotodegradada a formas inactivas de la vitamina, como la lumiflavina o el lumicromo, según el pH de la solución. Además, las flavinas se reducen química y biológicamente a las formas 1,5-dihidro, las cuales se oxidan rápidamente al contacto con el aire. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

2. Absorción, transporte, metabolismo, excreción y función

Las coenzimas de la vitamina son liberadas de las proteínas ingeridas, por medio de la acidificación gástrica. En la parte superior del tracto gastrointestinal actúan de forma no específica, las enzimas pirofosfatasa y fosfatasa. Algunas 8-alfa-aminoácidos riboflavinas son liberados de la unión covalente con otras enzimas por proteólisis. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

La riboflavina se absorbe principalmente en el intestino delgado proximal, por medio de un mecanismo de transporte saturable rápido y proporcional a la dosis de vitamina. Las sales biliares facilitan la absorción; una pequeña porción de riboflavina circula en el sistema enterohepático. A bajos niveles de vitamina, la absorción puede darse por transporte activo dependiente de sodio y fosforilaciones. Una parte de la riboflavina sérica se encuentra unida a la albúmina y en menor cantidad a otras proteínas y moléculas, como las inmunoglobulinas. Se cree que el paso de la vitamina a la placenta se da por difusión facilitada a concentraciones fisiológicas, y por difusión simple a mayores concentraciones. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

El almacenamiento de riboflavina en el cuerpo es casi inexistente; debido a esto, la excreción de la vitamina en la orina refleja la ingesta y catabolismo degradativo. La riboflavina en la orina contribuye al color amarillo. Además, se excretan pequeñas cantidades de riboflavina en el sudor y la bilis. En las heces,

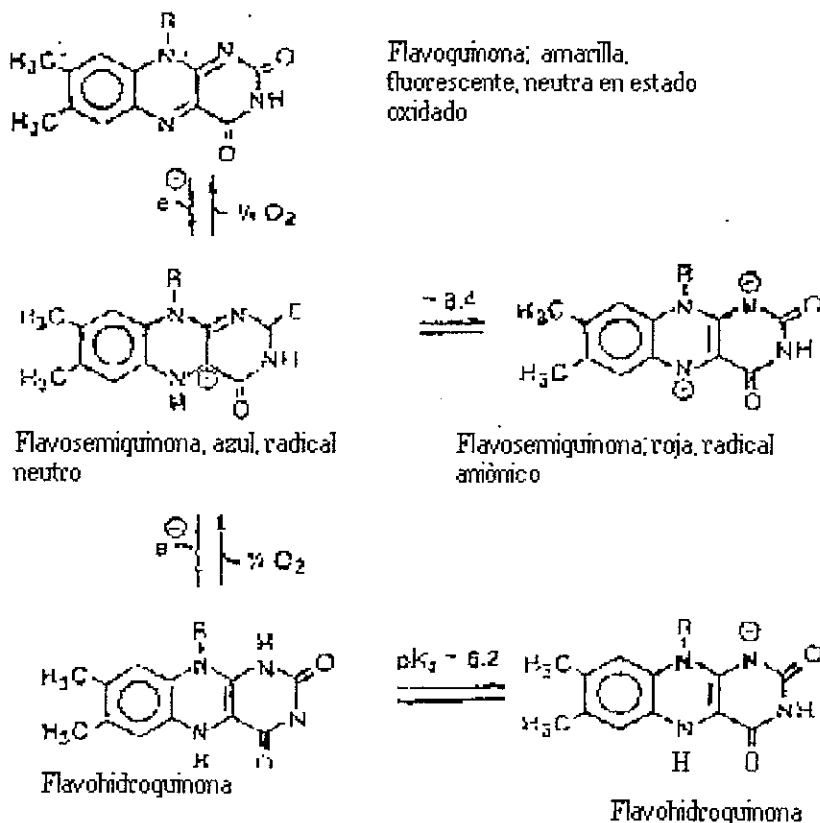
la riboflavina encontrada es producto de actividad bacteriana. Durante el período de lactancia se secreta alrededor de 10% de la vitamina absorbida, en la leche. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

En su forma de coenzima, la riboflavina toma parte en reacciones de óxido reducción en numerosas vías metabólicas y en la cadena respiratoria para la producción de energía. Las reacciones incluyen transferencias de uno y dos electrones, deshidrogenaciones dependientes e independientes de nucleótidos de piridina, reacciones de tio-compuestos, hidroxilaciones, descarboxilaciones oxidativas, dioxigenaciones y reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno. Los principales estados de óxido reducción de las flavocoenzimas se presentan en la Figura 2. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

La riboflavina participa en reacciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas. Además, participa en la conversión de piridoxina (vitamina B6) y ácido fólico a sus formas de coenzima, y en la conversión de triptófano a niacina. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

Figura 2

Estados óxido-reducción importantes de las flavocoenzimas en el organismo. (Shils, Olson y Shike, 1994)



3. Requerimientos nutricionales y recomendaciones dietéticas

Los requerimientos nutricionales para la riboflavina no han sido determinados con precisión, por lo que los grupos de investigación han dado recomendaciones que cubren las necesidades de toda la población basándose en la ingesta y gasto energético. Por esta razón, la dosis recomendada es de 0.6 mg / 1000 kCal, lo que da una ingesta diaria recomendada de 0.4 mg/día - 1.7

mg/día, para infantes y adultos, respectivamente. Para personas que ingieren menos de 2000 kCal diarias, se recomienda una ingesta mínima de riboflavina de 1.2 mg diarios. Las mujeres embarazadas requieren una ingesta extra de 0.3 mg diarios y las mujeres en período de lactancia requieren una ingesta extra de 0.5 mg diarios para compensar lo que se pierde en la leche. (Torún, Menchú y Elías, 1996)

4. Fuentes

La riboflavina es una de las vitaminas más ampliamente distribuidas; se encuentra en todos los tejidos vegetales y animales, pero son muy pocas las fuentes ricas en su contenido. Las fuentes más ricas de riboflavina son las levaduras y el hígado, pero las más consumidas son la leche, productos lácteos, carnes, huevos y vegetales verdes. Los cereales como tales son pobres en contenido de riboflavina, pero las prácticas de fortificación han superado esta limitación y han convertido a los cereales, harinas y productos de panificación en una de las principales fuentes de riboflavina. Las fuentes animales son mejor absorbidas que las vegetales; la riboflavina se encuentra unida a proteínas, principalmente, pero también puede encontrarse en forma libre. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

5. Deficiencias

La deficiencia de riboflavina se encuentra generalmente asociada con deficiencia de otras vitaminas hidrosolubles. Los síntomas producidos por la deficiencia son: dolor de garganta, hiperemia, edema de las membranas mucosas de la faringe y boca, queilosis, estomatitis angular, glositis (lengua magenta), dermatitis seborreica, anemias normocrómica y normocítica, prurito, vascularización de la córnea y efectos teratogénicos. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

La deficiencia puede ser producto de: ingesta inadecuada, malabsorción, desórdenes que agilizan el paso del bolo fecal, desórdenes genéticos en la producción normal de flavoproteínas, desórdenes hormonales (tiroides), fototerapia y acción de antagonistas. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

6. Antagonistas y sinergistas

Existen diversas drogas que son antagonistas de la riboflavina. Entre éstas se encuentran: ouabaina, teofilina, penicilina y ácido bórico (rompen unión de riboflavina con su proteína transportadora); probenecid (inhibe la absorción gástrica y secreción tubular renal); clorpromazina (análogo que inhibe incorporación al FAD); las fenotiazinas, barbituratos, estreptomina y anticonceptivos orales (influyen la absorción o metabolismo de la riboflavina). (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994)

La tiroxina y triyodotironina aumentan la síntesis de FMN y FAD. Las drogas anticolinérgicas aumentan la absorción de riboflavina, prolongando el tiempo de contacto con los sitios de absorción. (Shils, Olson y Shike, 1994; Roche, 1994).

B. ESTABILIDAD DE LA RIBOFLAVINA EN LOS ALIMENTOS Y PROCESOS

La riboflavina es inestable a la luz, álcali y temperaturas altas. También se producen pérdidas en procesos de lavado, cocción y escaldado de alimentos, así como al usar cal para cocer la masa del maíz. La esterilización de alimentos por irradiación o tratamiento con óxido de etileno también puede reducir los niveles de riboflavina. Los procesos de pasteurización permiten retener la riboflavina en los alimentos, y los procesos de fermentación aumentan su contenido por la síntesis bacteriana. (Torún, Menchú y Elías, 1996; Roche, 1994)

La riboflavina es relativamente estable a procesos de horneado; generalmente se observan retenciones entre el 90 – 100%. En general, dicha estabilidad se ve afectada por el pH y presencia de ciertos agentes como la grasa. (Harris y Karmas, 1975; Ranhotra y Gelroth, 1986)

C. FORTIFICACION DE ALIMENTOS CON MICRONUTRIENTES

La malnutrición es un problema que ataca a todas las poblaciones en desarrollo a nivel mundial. Específicamente, la malnutrición por falta de micronutrientes es uno de los problemas más comunes y de mayor impacto al nivel de salud y economía. La ingesta adecuada y disponibilidad de estos micronutrientes son básicas para la supervivencia, desarrollo mental y físico, buena salud y bienestar de todos los individuos y poblaciones. Desde la década de 1980 se han desarrollado estrategias para eliminar la deficiencia de micronutrientes en la mayoría de la población. Las estrategias más promocionadas son la educación en nutrición, suplementación y fortificación de alimentos. La educación nutricional es efectiva, pero no es suficiente para erradicar el problema; la suplementación generalmente va dirigida a sectores específicos de población, y no se aplica a la gran mayoría. Por otro lado, los programas de fortificación están mejor diseñados y tienen la capacidad de llegar a combatir la deficiencia de micronutrientes en la población que participa del programa. (Lotfi *et al* ; Nestel, 1993)

1. Bases conceptuales

Varios términos ameritan ser definidos al hablar de la fortificación de alimentos. El término restauración se refiere a la adición de nutrimentos a un alimento para compensar las pérdidas que pudieron darse durante el procesado

del alimento. La fortificación de un alimento se refiere a la adición de nutrientes a niveles más altos que aquellos encontrados originalmente en el alimento. El término *nutricación* es sinónimo de fortificación. El alimento que transporta o acarrea el nutriente se conoce como el vehículo de fortificación; el nutriente a ser agregado se conoce como fortificante. La fortificación múltiple consiste en la adición de más de un fortificante a un mismo vehículo de fortificación. (FAO e ILSI, 1997)

2. Programas de fortificación

a. Objetivos

El objetivo primordial de un programa de fortificación de alimentos es incrementar la ingesta de micronutrientes para mejorar la situación nutricional de la población. La primera consideración que se debe hacer al planear un programa de nutricación, es la determinación de la naturaleza y la extensión de las deficiencias nutricionales, la magnitud de los déficit dietéticos respecto a las recomendaciones dietéticas y la distribución del problema entre las diferentes regiones, estratos sociales y grupos de edad. (Arroyave, 1992; AID, 1993; FAO e ILSI, 1997)

b. Vehículo de fortificación

Una vez establecidos los objetivos del programa, es necesario seleccionar el vehículo de fortificación. Dicha selección debe fundamentarse en las consideraciones siguientes: el vehículo debe ser un alimento de amplio consumo en la población objetivo; el consumo de dicho alimento, por persona, debe ser alto y constante; que la fortificación de dicho alimento no altere sus propiedades organolépticas; y, que la adición del fortificante pueda darse en condiciones bien controladas. (Arroyave, 1992; AID, 1993; FAO e ILSI, 1997)

c. Nutrientes fortificantes

Luego de seleccionar el vehículo, debe seleccionarse el tipo de nutriente y la forma en que será agregado. Los criterios a tener en cuenta son: naturaleza química y física del nutriente, debe asegurarse que éste no interactúe químicamente con el vehículo, ni con otros nutrientes en una fortificación múltiple; los nutrientes deben ser estables al almacenamiento y procesos de cocción para asegurar que las personas que los consuman ingieran los niveles previstos; el tamaño de partícula del nutriente debe mezclarse bien con el vehículo y no debe separarse; y, el costo de la adición de nutrientes debe afectar en mínimo grado el costo del producto final. (Arroyave, 1992; AID, 1993; FAO e ILSI, 1997)

d. Control de calidad

Paralelamente a las consideraciones mencionadas se debe llevar a cabo un estricto control de calidad del producto a nivel de producción, distribución y venta, para asegurar el cumplimiento de las especificaciones establecidas para el alimento fortificado. (Arroyave, 1992; AID, 1993; FAO e ILSI, 1997)

La garantía y control de calidad permite aseverar que el alimento fortificado es sano, no está adulterado, está debidamente identificado y satisface las normas establecidas. Un sistema de control de calidad debe incluir: ensayo de todos los ingredientes del alimento contra normas de referencia; definición de criterios de calidad, riesgos químicos, físicos y microbiológicos, en el ámbito de la planta de producción; establecimiento de un control de distribución. (Nestel, 1993)

El INCAP ha desarrollado un Sistema de Garantía de Calidad para los Programas de Fortificación de Alimentos para países en desarrollo. El Sistema de Garantía de Calidad (SGC) incluye el aseguramiento que el producto satisfaga las características esperadas y la verificación y monitoreo por parte del Estado en centros de producción, distribución y venta. Al programa de SGC lo complementa un Sistema de Vigilancia y Evaluación (SVE) cuyo propósito es determinar la calidad de la fortificación en el ámbito de los hogares del consumidor y determinar el efecto biológico en los mismos. Cada etapa de estos sistemas es un punto crítico de control. (Dary *et al*, 1998)

El SGC consta de tres componentes importantes. El primer componente, el Control y Aseguramiento de la Calidad, es responsabilidad de los productores. El control de calidad se refiere a las técnicas y acciones usadas para la documentación del cumplimiento de los requerimientos técnicos; el aseguramiento de la calidad se refiere, por otro lado, a la implementación de acciones planificadas y periódicas necesarias para asegurar que se cumplan los requerimientos de calidad. Tanto el control como el aseguramiento de calidad deben permitir hacer correcciones rápidas, y deben quedar documentadas siempre. Se recomienda que los parámetros de calidad de fortificación se introduzcan dentro de los procedimientos rutinarios del control de calidad del resto de las propiedades del producto; esto hace que sea más práctico y eficaz. (Dary *et al*, 1998)

El segundo componente del SGC lo conforman la Inspección y Auditorías de Calidad en centros de producción o sitios de importación, llevadas a cabo por inspectores de entes del Estado encargados del Control de Alimentos. Por Inspección se refiere a la acción de examinar, medir o verificar las características del producto para compararlos con los requerimientos del mismo. Por Auditorías de Calidad se refiere a los exámenes sistemáticos e independientes para determinar si los parámetros de calidad son congruentes con las disposiciones

establecidas, y si las mismas han alcanzado los objetivos propuestos. (Dary *et al*, 1998)

El tercer componente del SGC es el Monitoreo, el cual se refiere a la verificación periódica de la calidad y etiquetado del producto durante su transporte, distribución y venta. Este componente está a cargo de Unidades de Evaluación de la Conformidad o de Defensa del Consumidor, y representa una forma de asegurar la calidad. Debido a que en muchos países se centraliza la distribución de acciones, se sugiere que las Unidades de Control de Alimentos trabajen conjuntamente con autoridades locales. (Dary *et al*, 1998)

La complementación al SGC está dada por el Sistema de Vigilancia y Evaluación de Proceso. Este sistema es útil para documentar la evolución e impacto en la población de los programas de fortificación. El SVE debe realizarse por parte de entidades relacionadas con departamentos de Nutrición, centros de estadística, escuelas públicas, instituciones académicas, instituciones de cooperación técnica, entre otras. Para llevar a cabo el SVE, se recomienda recolectar muestras en hogares de toda la nación una vez al año, y analizar las muestras en un solo laboratorio para evitar variaciones interlaboratoriales. (Dary *et al*, 1998) Un ejemplo del éxito de este componente lo representa el Proyecto Escuelas Centinela, un esfuerzo conjunto del Ministerio de Educación, el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF, por sus siglas en inglés) y el INCAP,

en el cual se seleccionaron 420 escuelas de todo el país, donde se seleccionaron 20 estudiantes que proporcionaron muestras de azúcar y sal provenientes de sus hogares. Las muestras se analizaron en el INCAP, y los resultados permitieron establecer los niveles fortificación del azúcar con vitamina A y de la sal con yodo, que llegan a los niños y sus familias por su consumo. (Ministerio de Educación y UNICEF, 1996)

3. Fortificación de harinas de trigo con micronutrientes

El trigo es el cereal más ampliamente producido a nivel mundial, por lo que su contribución a la ingesta energética diaria en el ser humano es significativa. La principal forma de uso de trigo como alimento es la harina, en forma de pan, pasta, bizcochos, etc. El grano en su forma natural, contiene buenas cantidades de tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, vitamina E, hierro y zinc. Sin embargo, es muy raro que se utilice el grano completo para la producción de harina; generalmente se remueven el germen y otras capas exteriores, donde se pierde la mayoría de estos nutrientes, previo al proceso de molienda. (Arroyave, 1992; OMNI, Roche y USAID)

El porcentaje del grano original utilizado para la harina se llama grado de extracción. Las harinas de baja extracción son mejores vehículos de fortificación, considerando diversas ventajas: tienen un menor contenido de grasas, lo que las hace menos susceptibles a la oxidación y les da una vida media más larga;

tienen menos contenido de fibra y ácido fólico, los cuales interfieren con la biodisponibilidad de algunos microminerales; y, son más blancas y uniformes en textura y en cualidades de cocción, lo que las hace preferidas para la fabricación de pan. (Arroyave, 1992)

El uso de harinas de baja extracción tiene la desventaja que se pierden altas cantidades de vitaminas del complejo B, hierro y calcio, respecto al contenido original. En este descubrimiento se fundamentó el concepto de restauración, hace ya varias décadas. Actualmente, la harina de trigo se fortifica con tiamina, riboflavina, niacina y hierro; en varios países del mundo también agregan vitamina A y D, y en los últimos años se introdujo ácido fólico. (Arroyave, 1992)

La implementación de prácticas de fortificación en el mundo está aumentando día a día. Actualmente por lo menos 14 países tienen leyes de fortificación de harinas de trigo con micronutrientes.

La fortificación de harinas de trigo se lleva a cabo a nivel industrial. En los molinos se agrega la premezcla de nutrientes, para distribuirla homogéneamente en la harina. La tecnología para llevar a cabo la fortificación en harinas es relativamente simple. Generalmente se prepara la premezcla que contenga los micronutrientes que se desean agregar, en las concentraciones adecuadas. Se prefiere agregar los micronutrientes en forma de premezcla y no individualmente

porque de esta forma se asegura una distribución homogénea de los mismos. La adición de la premezcla se logra utilizando un dosificador volumétrico, el cual consiste básicamente de un rotor motorizado de velocidad variable. El rotor gira dentro del contenedor empujando la premezcla hacia la salida. La cantidad de premezcla agregada se controla al supervisar la velocidad del rotor. Generalmente el dosificador se encuentra cerca del final de la línea de molienda, lo que de algún modo asegura que se mezcle adecuadamente la premezcla con la harina. (OMNI, Roche y USAID)

La tiamina, riboflavina y niacina son vitaminas del complejo B, solubles en agua. Se consiguen a nivel comercial en forma cristalina y pura, listas para agregarse a la harina de trigo. Su manejo es sencillo y tienen alta estabilidad. (Arroyave, 1992) Generalmente se utiliza mononitrato de tiamina como fuente de tiamina debido a que es más estable que el clorhidrato de tiamina. Por otro lado, la niacina se agrega en forma de niacinamida, debido a que esta carece del efecto vasodilatador del ácido nicotínico en el consumidor. (Ranum, Loewe y Gordon, 1981) Según diversos estudios, la pérdida de estas vitaminas durante almacenamiento es nula o insignificante, y además, se retienen satisfactoriamente durante procesos de horneado y cocción. Por lo tanto, el pan que ha sido preparado a partir de harina de trigo fortificada, mantiene los niveles de estas vitaminas. (Arroyave, 1992)

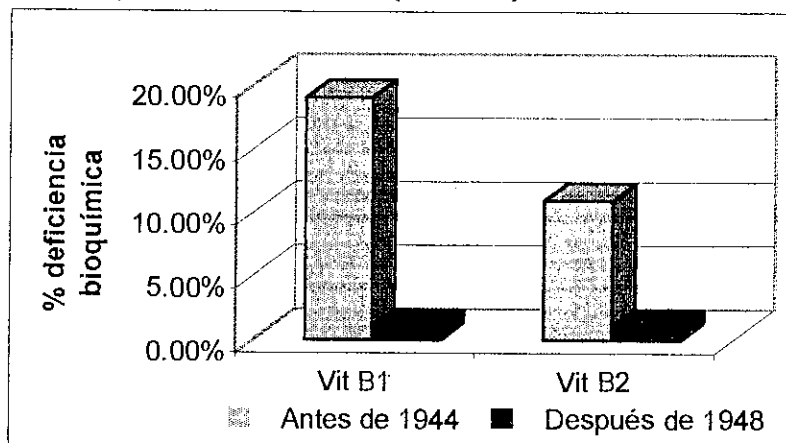
La riboflavina es una de las vitaminas agregadas a casi todas las harinas y productos de panificación, para compensar las pérdidas durante el procesamiento. También se fortifica con riboflavina la leche, cereales y productos dietéticos. En los Estados Unidos se exige la fortificación de panes, harinas, macarrones, espaguetis, arroz y otras pastas. (AID, 1974; Roche, 1994) En Guatemala se tienen leyes generales de enriquecimiento de alimentos y leyes específicas de fortificación de la harina de trigo, las cuales dictan los niveles requeridos de micronutrientes tanto en harinas importadas como elaboradas en el país. La Ley General de Enriquecimiento de Alimentos corresponde al Decreto Gubernativo 44-92, del Congreso de la República. El reglamento para la fortificación de harina de trigo corresponde al Acuerdo Gubernativo No. 498-93 de la Presidencia de la República, y establece que el contenido de riboflavina en la harina de trigo debe ser de 2.5 a 3.5 mg/kg.

En la Figura 3 se presenta un gráfico que ilustra el impacto de las prácticas de fortificación con tiamina y riboflavina. Se observa que tanto con la tiamina (vitamina B1) como con la riboflavina (vitamina B2) hubo un descenso en el porcentaje de deficiencia bioquímica luego de introducir las prácticas de fortificación. En ambos casos se observa que antes del año 1944 los porcentajes de deficiencias eran aproximadamente del 18% para tiamina y del 10% para riboflavina. Después de introducidas las prácticas de fortificación en 1946 para

ambas vitaminas, los porcentajes de deficiencia bajaron casi al 1%. (OMNI, Roche y USAID)

Figura 3

Impacto bioquímico del Enriquecimiento de la harina de trigo en Newfoundland, Canadá. (OMNI, Roche y USAID)



Akroyd, WR. et al 1949. Medical Survey of Nutrition in Newfoundland 1948. The Canadian Med. Assoc. Journal. 60:4.

Según la Tabla de Composición de Alimentos del INCAP se encontró que los valores de tiamina, riboflavina y niacina en pan francés de Guatemala, son de 0.10, 0.07 y 1.26 mg por 100 gramos de porción comestible, respectivamente; y, 0.13, 0.04 y 0.42 mg por 100 gramos, respectivamente, en el pan dulce. Sin embargo, estos datos son de un análisis del pan guatemalteco en los años 60. (Menchú *et al*, 1996)

D. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE RIBOFLAVINA EN PRODUCTOS DERIVADOS DE CEREALES

El análisis de micronutrientes en los alimentos se lleva a cabo según la naturaleza y propiedades de cada uno. Algunos se pueden detectar colorimétricamente; otros pueden detectarse al utilizar métodos sofisticados, como cromatografía líquida de alta resolución con detección espectrofotométrica o fluorimétrica. (OMNI, Roche y USAID)

En la actualidad se han desarrollado y evaluado métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), para la determinación de la mayoría de vitaminas del complejo B. Sin embargo, estas aún no han sido validadas como métodos oficiales, por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, AOAC por sus siglas en inglés. Se han logrado desarrollar métodos por HPLC para la determinación fluorimétrica simultánea de tiamina y riboflavina; y métodos de determinación en la región ultravioleta para niacina. (OMNI, Roche y USAID; Skurray, 1981; Sadek, 1996; Lawrence, 1984)

Debido a sus propiedades químicas y fisicoquímicas, la riboflavina puede ser determinada por varios métodos. El principal es el método fluorométrico, en el cual se mide la fluorescencia amarillo-verdosa característica de esta vitamina con excitación en los 470 nm y emisión máxima en los 565 nm. El color amarillo de esta vitamina también hace posible que pueda determinarse fotométricamente.

El método de lumiflavina se basa en el hecho que al irradiar la riboflavina en solución alcalina, se forma lumiflavina, la cual se extrae de la solución acidificada con cloroformo, y luego puede determinarse fluorométrica o fotométricamente. Aparte de estos métodos, también existen métodos microbiológicos que miden el crecimiento del microorganismo *Lactobacillus casei*, dependiente de riboflavina. El crecimiento de este microorganismo se puede determinar por titulación o por mediciones de turbidez. El método microbiológico es más sensible, pero requiere varios días para completarse. (OMNI, Roche y USAID; Roche, 1994) El método oficial de análisis de riboflavina es el 43.039 del AOAC, "Riboflavin (Vitamin B2) in Foods and Vitamin Preparations – Fluorometric Method – Final Action". (Williams, 1984; Strohecker and Henning, 1966)

De los métodos anteriormente mencionados se prefiere el método fluorométrico, debido a que es más sensible que el fotométrico y se adapta al análisis de preparaciones farmacéuticas y de alimentos. El método de lumiflavina es el más específico de los métodos fisicoquímicos y tiene la ventaja de que no hay interferentes. (Strohecker and Henning, 1966)

La fluorescencia de la riboflavina depende del pH de la solución así como de la concentración. Las intensidades máximas se obtienen entre pH 6 y 7, pero generalmente las mediciones se hacen dentro del rango pH 3 a 5, donde la curva

de intensidad es horizontal, y la intensidad depende sólo de la concentración. (Strohecker and Henning, 1966)

Las muestras de alimentos secos deben ser molidas y desgrasadas por extracción con éter, y calentadas con ácido en un baño de agua caliente. Luego, las muestras deben ser digeridas enzimáticamente para remover almidones y gomas y para convertir todas las flavinas en riboflavina. Generalmente se agrega la enzima y se incuba en un baño a 40 - 45°C por el tiempo requerido, según la enzima y el tipo de muestra. Previo al análisis de la muestra, es necesario purificarla. Esto se puede lograr, al igual que para la tiamina, por cromatografía de intercambio iónico o utilizando tierra de Fuller. El extracto purificado es analizado en el fluorómetro. (Strohecker and Henning, 1966) Recientemente, se desarrollaron los métodos para llevar a cabo la separación por cromatografía líquida de alta resolución al utilizar una columna de fase invertida y un detector de fluorescencia para la detección de la riboflavina. (Speek, 1989)

E. VALIDACION

Los parámetros de desempeño principales que deben tomarse en consideración para la validación de un método incluyen exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y rango lineal. (Conacher, 1990)

La exactitud se refiere a la cercanía de un valor determinado al valor real esperado. Generalmente la exactitud se determina por el análisis de materiales estándar de referencia. Cuando no se dispone de estos estándares, se puede determinar por medio de ensayos de recuperación del analito agregado dentro de un rango de concentraciones adecuadas. Recuperaciones del 70 – 120 % se consideran aceptables en niveles traza, cerca de las partes por millón. (Conacher, 1990)

La precisión, por otro lado, se refiere a qué tan bien se desempeña el método bajo distintas condiciones frecuentemente. Debe considerarse precisión interlaboratorios e intralaboratorios. La precisión puede determinarse realizando múltiples análisis de muestras en distintos niveles en el mismo día, y en días distintos. Dentro de un mismo laboratorio es importante establecer la precisión intraensayo (durante el mismo día) y la precisión interensayo (en días distintos). (Conacher, 1990)

La especificidad se refiere a la capacidad del método para medir únicamente el analito de interés. El límite de detección se refiere a la menor concentración de analito que el método puede diferenciar del ruido. Generalmente se determina el límite de detección al medir el analito en la matriz a utilizar más 3 desviaciones estándar de este nivel. Por otro lado, el límite de cuantificación se refiere a la

menor concentración de analito medida por el método con cierto nivel de confianza. El límite de cuantificación se ha definido como el blanco de sustrato más 10 desviaciones estándar. De hecho, el límite de cuantificación debe considerarse como la concentración mínima que es analizada con una exactitud y precisión aceptables, por el método. Finalmente, el rango lineal del método se refiere al rango de concentraciones para el cual el detector proporciona una respuesta lineal. (Conacher, 1990)

III. JUSTIFICACION

A partir de los años 40 se observó en Estados Unidos y Canadá, una disminución general en los índices de enfermedad y mortandad por deficiencias de vitaminas del complejo B debido a la introducción de prácticas de fortificación. Desde entonces se inició la fortificación de la harina de trigo alrededor del mundo, incluyendo el área de Centro América. En los años 60, en Guatemala se inició el programa de fortificación de harina de trigo con hierro y vitaminas del complejo B. Además, se fortifica actualmente sal con yodo, y azúcar con vitamina A. Desde 1996, UNICEF, el Ministerio de Educación y el INCAP, unieron esfuerzos para determinar la cantidad de yodo y vitamina A que estaba llegando a la población en Guatemala a través de la fortificación de la sal y del azúcar, respectivamente, por medio del Proyecto de Escuelas Centinela. Sin embargo, este sistema de vigilancia no se aplicó a la fortificación de la harina de trigo con hierro y vitaminas del complejo B. Hasta hoy día, aún no se tiene información sobre los niveles de hierro y vitaminas del complejo B que contiene el pan de consumo popular en Guatemala, forma principal de consumo de la harina de trigo.

La carencia de un Sistema de Vigilancia y Evaluación para la fortificación de harina de trigo, ha interrumpido el proceso de documentación del éxito de este

programa de fortificación y la evaluación del impacto de los mismos en nuestra población. Por otro lado, se carece de datos de los niveles de vitaminas B que llegan a la población guatemalteca a través del consumo de harina de trigo y, considerando que ésta se consume principalmente como pan, y que la fabricación del mismo conlleva un proceso que puede alterar el contenido original de vitaminas B en la misma, es necesario conocer la cantidad real de éstas que está llegando a la población a través del consumo de pan.

A pesar que en la Tabla de Composición de Alimentos del INCAP hay datos del contenido de vitaminas B1, B2 y B3 en el pan de Guatemala, estos datos fueron recabados en la década de los años 60, tiempo desde el cual han cambiado los niveles de vitaminas B agregados a la harina de trigo, que en ese tiempo se agregaban en niveles de restauración, mientras que ahora se realiza a niveles de fortificación. Por otro lado, a pesar que no existe literatura al respecto, se ha notado un cambio general en las propiedades organolépticas del pan, producto de cambios en las técnicas de panificación por la introducción de equipo nuevo, cambios en las proporciones de los ingredientes y modificaciones en las técnicas de amasado. Aunque es necesario conocer el contenido real de vitaminas (B1, B2 y niacina) en el pan, este estudio da prioridad a la determinación del contenido de riboflavina en el pan de consumo popular en Guatemala, debido a que, según datos no publicados, se sospecha que es una deficiencia que afecta a la población guatemalteca. La información obtenida contribuirá a la

documentación del Sistema de Garantía de Calidad de la fortificación de la harina de trigo, así como a la actualización de los datos presentados en la Tabla de Composición de Alimentos del INCAP, que permitirá el acceso a información de suma importancia en estudios de nutrición, planificación de dietas, tratamiento de enfermedades e investigación.

IV. OBJETIVOS

A. GENERALES

- Obtener datos del contenido de riboflavina en muestras de pan francés y dulce consumido en Guatemala.

B. ESPECIFICOS

- Validar el método analítico para la determinación de riboflavina en cereales y productos de cereales por medio de cromatografía líquida de alta resolución.
- Contribuir a la actualización de la Tabla de Composición de Alimentos del INCAP por medio del análisis del pan preparado actualmente en las panaderías populares de Guatemala.
- Estimar la cantidad de riboflavina que llega a la población guatemalteca por medio del consumo de pan francés y dulce.

V. HIPOTESIS

El valor real de riboflavina en el pan francés y dulce de Guatemala es mayor al reportado en la Tabla de Composición de Alimentos del INCAP de 1996.

VI. TRABAJO EXPERIMENTAL

A. MATERIALES Y METODOS

Los materiales y métodos utilizados se describen en la sección de apéndices, Apéndice 2.

B. VALIDACION

1. Matrices

El método se validó para las siguientes matrices: harina de trigo, pan francés y pan dulce.

2. Parámetros evaluados

a. Linealidad, curva de calibración

Se determinó la curva de calibración al preparar 11 soluciones de riboflavina en ácido sulfúrico 0.1 M, de concentraciones conocidas (0.000, 0.002, 0.004, 0.008, 0.012, 0.020, 0.04, 0.08, 0.12, 0.20 y 0.32 $\mu\text{g/mL}$) e inyectar cada una en duplicado en el cromatógrafo bajo las condiciones mencionadas en el Apéndice 2. Se graficaron las respuestas obtenidas, como altura del pico en cm ($\pm 0.05\text{cm}$) en función de la concentración en $\mu\text{g/mL}$, y se calculó la recta de regresión, así como el coeficiente de correlación, por el método de mínimos

cuadrados. Se escogieron estas concentraciones de acuerdo a los niveles de riboflavina esperados en la harina de trigo, que corresponde a 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inyectados, que equivale a 4mg/kg que contiene la harina. Sin embargo, en los análisis preliminares también se corrió una curva, analizada de la misma forma que la anterior, que abarca el rango de 0 – 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), rango que permite el análisis de harinas compuestas y galleta nutricionalmente mejorada que contengan hasta 3mg riboflavina/100 g muestra.

b. Exactitud

Se analizó la muestra estándar de referencia, VMA-399, de Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC, por sus siglas en inglés) para determinar el contenido de riboflavina. La exactitud se calculó como porcentaje de recuperación con base en el dato proporcionado en el Certificado (Apéndice 5).

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida} * 100}{\text{concentración reportada en certificado.}}$$

c. Precisión

Intraensayo: Se analizó una misma muestra de cada matriz (harina de trigo, pan francés y pan dulce) 6 veces, durante dos días distintos, y se calculó el coeficiente de variación durante el día.

Interensayo: Se analizó una muestra de cada matriz (harina de trigo, pan francés y pan dulce), en duplicado, en tres días distintos y se calculó el coeficiente de variación del promedio de los resultados de los tres días.

d. Límite de detección

Se corrieron tres blancos de reactivos, en triplicado, y 10 puntos de distintas concentraciones de riboflavina (0.002, 0.004, 0.008, 0.012, 0.020, 0.04, 0.08, 0.12, 0.20 y 0.32 $\mu\text{g/mL}$). Se midió la altura de la línea base en los blancos (ruido, R), y del pico de riboflavina (señal, S). En una gráfica de señal/ruido (S/R) vrs. concentración de riboflavina, se calculó la recta de regresión y el coeficiente de correlación por el método de mínimos cuadrados, y con esto se calculó LD cuando razón S/R = 3.

e. Límite de cuantificación

Se determinó junto con el LD, cuando razón S/R = 10.

C. TRABAJO DE CAMPO

En el Apéndice 3 se presentan detalladamente las instrucciones de muestreo y el manejo de muestras en el laboratorio. Para la distribución de muestras se usó el Apéndice 4.

Parámetro	Caracterización
Unidad de muestreo	Pan francés y pan dulce
Tamaño de muestra	10
Muestra simple	2 tiras de pan francés, 10 pirujos o 10 desabridos; 10 panes dulces surtidos o 10 panes dulces tostados. En cada departamento se tomaron 8 muestras simples en total.
Muestra compuesta	Se hizo un "pool" de 16 panes tomando 2 panes de cada tipo, de cada una de las muestras simples. Al final se contó con una muestra compuesta de pan francés y una de pan dulce, por departamento. En Guatemala se hicieron 3 muestras compuestas.
Número de muestras compuestas	10 muestras compuestas analizadas.
Distribución de muestras	De la cabecera de cada departamento, exceptuando Quiché donde se muestreó Chichicastenango por accesibilidad, se muestrearon 8 panaderías, tomando una muestra simple de cada una. En total, se muestrearon 19 departamentos, exceptuando al Petén y Huehuetenango,

	<p>para tener un total de 152 muestras simples. La distribución y ponderación final de las muestras analizadas está basada en diversos aspectos según el departamento: Guatemala, por ser el departamento con mayor población y consumo aparente de pan, Quetzaltenango por ser la segunda ciudad del país con mayor población, Izabal por ser frontera con Honduras y Belice, San Marcos por ser frontera con México, Jalapa por ser frontera con El Salvador, Suchitepéquez representa la Costa Sur y Quiché y Baja Verapaz representa la región norte del país.</p>
Análisis estadístico	Promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y regresiones lineales.

VII. RESULTADOS

A. VALIDACION

1. Curva de calibración

En la Figura 4 se puede observar una gráfica que muestra la relación existente entre la respuesta obtenida (en $\text{cm} \pm 0.05\text{cm}$) y la concentración de la solución inyectada ($\mu\text{g/mL}$), para el rango de 0 – 0.32 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados en el Cuadro 4 muestran en detalle los datos utilizados para construir la gráfica. El coeficiente $R^2 = 0.9965$ indica que la curva obtenida es lineal, y que por ende, la respuesta obtenida es directamente proporcional a la concentración inyectada, en este rango de concentraciones, que es el rango de trabajo escogido con base en lo esperado en la harina de trigo. Puede observarse además, que el intercepto en el eje de las ordenadas es casi cero, lo que confirma la linealidad.

En la Figura 5 y Cuadro 5 se muestran datos similares para una curva de calibración en el rango de 0 – 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Se puede ver, tomando en cuenta el $R^2 = 0.9971$, que la respuesta es lineal hasta 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Esto permite la detección de riboflavina en matrices que tengan mayor contenido que la harina, como lo son las harinas compuestas y la galleta nutricional.

2. Exactitud

Según los datos mostrados en el Cuadros 6, el porcentaje de recuperación del método, al utilizar el VMA-399 fue de $98 \pm 4\%$. Puede decirse que este es un método exacto, teniendo en cuenta que los índices de exactitud recomendables oscilan entre el 70 y 120% de recuperación.

3. Precisión

El coeficiente de variación intraensayo para el método en harina fue de $3 \pm 1\%$, para pan francés $2.4 \pm 0.5 \%$, y para pan dulce $10 \pm 4 \%$. Los datos se presentan en los Cuadros 7, 8 y 9. Al comparar los coeficientes de variación intraensayo obtenidos, con los que se reportan en el certificado de la muestra estándar de referencia, puede verse que el método analítico analizado tiene una precisión intraensayo bastante aceptable. En general puede observarse que el método presenta un mayor coeficiente de variación para el pan dulce que para la harina o el pan francés. En parte, esto se debe a la amplia gama de ingredientes y aditivos que lleva la preparación del pan dulce, incluidos azúcar y royal. Esto hace que las muestras presenten mayor heterogeneidad y haga más difícil la parte de homogenizado.

Por otro lado, los coeficientes de variación interensayo, obtenidos para harina de

pesar que estos coeficientes de variación son mayores que los de la precisión intraensayo, siguen siendo aceptables, sobre todo considerando las concentraciones trabajadas y la heterogeneidad de las muestras.

4. Límites de detección y cuantificación

El Cuadro 14 y las Figuras 6, 7 y 8 presentan los datos utilizados para calcular los límites de detección y cuantificación. En primer lugar es importante observar la Figura 7, donde un estándar de riboflavina es inyectado. El tiempo de retención y región de elución del pico es distintivo. No existen interferencias de la fase móvil que coeluyan con el mismo. Al observar la Figura 8, una inyección de blanco de reactivos, se observa que en dicha región no existe ningún pico. Por lo tanto, el tiempo de retención donde eluye el pico de la riboflavina es específico para este compuesto. Al medir el alto de la línea base en el blanco de reactivos, se obtiene lo que se le llama ruido. Idealmente esta medición se realiza al usar blancos de matriz, pero como se mencionó anteriormente, en el caso de la harina no se pueden conseguir blancos reales de matriz, pues el trigo contiene riboflavina intrínseca, y cuánto retiene en el proceso de secado y molienda de harina depende de muchos factores. En este estudio se corroboró lo mencionado anteriormente en una prueba donde se analizaron muestras de harina de trigo sin fortificar y harina de trigo fortificada. Los resultados se presentan en el Apéndice 4, y comprueban que es mejor utilizar un blanco de reactivos que un blanco de matriz, debido a que las

concentraciones de riboflavina en la matriz no son constantes. Además, puede verse en la Figura 9, que efectivamente aparece el pico de la riboflavina intrínseca en la región de interés.

Luego se midió la señal, la altura de los picos de cada concentración, como se muestra en la Figura 7. Al tabular los datos, se calcularon las razones señal/ruido (S/R) y se obtuvieron los datos del Cuadro 13, con los cuales se construyó la Figura 6. Por el método de mínimos cuadrados se calculó la recta de regresión y el coeficiente de correlación, $R^2 = 0.9963$, lo cual por ser lineal, permitió hacer una intrapolación para calcular los límites de detección cuando $S/R = 3$, y de cuantificación cuando $S/R = 10$.

Al observar ambos límites, podemos aseverar que el método es sumamente sensible y detecta concentraciones hasta de $0.024\mu\text{g/mL}$, equivalentes a $0.007\text{mg}/100\text{ g}$ de muestra molida. El método es capaz de cuantificar a partir de concentraciones de $0.093\ \mu\text{g/mL}$, equivalentes a $0.028\text{mg}/100\text{g}$ de muestra, y muy probablemente se puedan cuantificar con un poco menos de exactitud, concentraciones menores. Considerando que la harina de trigo contiene aproximadamente $4\ \text{mg}$ de riboflavina/kg de muestra ($0.4\ \text{mg}/100\ \text{g}$ de muestra), se puede decir que el método es suficientemente sensible para cuantificar riboflavina en esta matriz.

a. Rango

El rango de trabajo, como se mencionó previamente, fue de 0 a 0.32 $\mu\text{g/mL}$. Se escogió basándose en los niveles de riboflavina esperados en la harina de trigo. Sin embargo, como se observa en el Cuadro 5, este rango puede ser ampliado hasta, por lo menos 0 – 1.0 $\mu\text{g/mL}$, para poder trabajar otras matrices como las harinas compuestas y galleta nutricional.

Cuadro 1

Resumen de los parámetros de la validación del método para la determinación de riboflavina para harina de trigo, pan francés y pan dulce

Parámetro	Resultado		
Curva de calibración (0-0.32 ppm)	$Y = (22.4 \pm 0.3) X - (0.007 \pm 0.028)$ $R^2 = 0.9965^a$		
Exactitud	Estándar VMA-399: $98 \pm 4 \%$		
Precisión		Intraensayo (C.V.± D.S.)	Interensayo (C.V.)
	Harina de trigo	$3 \pm 1 \%$	8.0 %
	Pan francés	$2.4 \pm 0.5 \%$	12.28 %
	Pan dulce	$10 \pm 4 \%$	9.5 %
Limite de detección	0.024 $\mu\text{g/mL}$ (0.007 mg/100g muestra)		
Limite de cuantificación	0.093 $\mu\text{g/mL}$ (0.028 mg/100g muestra)		
Rango	0 – 0.32 $\mu\text{g/mL}$		

^a Y corresponde a la altura del pico en cm, y X a la concentración de riboflavina en $\mu\text{g/mL}$.

B. Análisis del pan francés y dulce consumido en Guatemala

En el Cuadro 2 se presentan los resultados del contenido de riboflavina en el pan francés y dulce de Guatemala, por departamento analizado.

Cuadro 2

Contenido de riboflavina en el pan de consumo popular en Guatemala: pan francés y dulce

Concentración de riboflavina (mg/100g de porción comestible)		
Departamento	Pan francés	Pan dulce
Guatemala 1	0.167 ± 0.005	0.13 ± 0.04
Guatemala 2	0.180 ± 0.003	0.15 ± 0.03
Guatemala 3	0.189 ± 0.006	0.17 ± 0.02
Quetzaltenango	0.219 ± 0.007	0.23 ± 0.02
Quiché	0.222 ± 0.007	0.21 ± 0.03
Baja Verapaz	0.240 ± 0.01	0.20 ± 0.008
Izabal	0.184 ± 0.003	0.18 ± 0.03
San Marcos	0.200 ± 0.005	0.21 ± 0.03
Suchitepéquez	0.195 ± 0.005	0.14 ± 0.04
Jutiapa	0.208 ± 0.007	0.16 ± 0.02
Promedio ± D.S.	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.03
Promedio ± LC95%	0.20 ± 0.02 mg/100g	0.18 ± 0.02 mg/100g

Cuadro 3

Comparación del contenido de riboflavina en el pan de consumo popular en Guatemala, pan francés y dulce, respecto de lo reportado en la Tabla de Composición de Alimentos de INCAP en 1996

Contenido de riboflavina mg/100 g de porción comestible

	Contenido actual* (n = 10)	Contenido reportado en la TCA-1996	Magnitud del incremento (veces y %)
Pan francés	0.20 ± 0.02	0.07	2.9 veces, 186%
Pan dulce	0.18 ± 0.02	0.04	4.5 veces, 350%

* Muestras compuestas

C. Observaciones durante la colecta de muestras

En cada departamento donde se colectaron muestras se observaron particularidades que pueden influenciar los resultados obtenidos. En el departamento de Guatemala se analizaron 3 muestras, debido a que el mayor porcentaje de los guatemaltecos vive en la capital. De estas tres muestras compuestas, se observan diferencias en los niveles de riboflavina, las cuales pueden derivarse de varias fuentes: diferencia en los ingredientes utilizados para hacer el pan y diferencia en el contenido de harina del pan.

En Quetzaltenango se observaron factores culturales y comerciales importantes, como la producción de panes tradicionales del departamento como las "shecas",

un tipo de pan dulce que contiene anís, y que no se encuentra con facilidad en otros departamentos; además, se pueden encontrar importantes industrias panificadoras como Xelapan, cuyo mercado e influencia tiende a expandirse y a "sobrepoblar" la región.

En El Quiché se muestreó Chichicastenango, no Santa Cruz del Quiché, la cabecera, principalmente por la accesibilidad. En Chichicastenango se da el mismo fenómeno que en Quetzaltenango: un grupo de panificadoras distribuyen su pan al resto de "panaderías", las cuales incluso, se pueden encontrar en día de mercado, dentro de los locales. Se encontró que en dicha población no se produce el pan francés común, de dos "bolitas", ni el pirujo o desabrido, sino que se produce el pan francés en presentación de bollo o de pan redondo. Esto, por lo tanto, puede representar un factor cultural que da como resultado una homogeneidad en el contenido de riboflavina en el pan.

En Izabal se encontró otra diferencia culinaria referente a la calidad del pan. En este departamento se produce el pan de coco, el cual se consume casi tanto como el pan francés. Sin embargo, los ingredientes no son los mismos al francés común. Por tanto, las variaciones encontradas en este departamento pueden ser producto de variaciones en fórmula de pan.

San Marcos representa los departamentos que tienen frontera con México. Es importante tener datos de este departamento debido a la posibilidad de importación o contrabando de harinas mexicanas. Se escogió San Marcos en lugar de Huehuetenango, por su accesibilidad.

En Suchitepéquez, al igual que Retalhuleu, Escuintla y Santa Rosa, se caracteriza por ser muy caluroso y húmedo. Es muy probable que dichos factores atmosféricos afecten la producción del pan. Se encontraron variaciones interesantes en los tipos de pan, sobretodo en el pan francés. En la mayoría de panaderías se podía pedir pan francés en "rosca", una modificación del desabrido. En cuanto al pan dulce, casi no se vio pan tostado, sino que la mayoría era pan de manteca y pequeño.

A pesar de las diferencias observadas, es necesario hacer mención de la homogeneidad general de los valores de niveles de riboflavina determinados en toda la República. Con esto se quiere hacer notar que los valores de riboflavina en el pan de consumo popular en Guatemala son muy similares en todos los departamentos.

VIII. DISCUSIÓN

En el Cuadro 2 puede observarse que el contenido de riboflavina en el pan francés de Guatemala es de 0.20 ± 0.01 mg/100 g de porción comestible, mientras que el pan dulce contiene 0.18 ± 0.02 mg/100g de porción comestible, lo cual indica que el nivel de riboflavina es similar. Esto se corrobora al observar el Cuadro 22 y Apéndice 6, donde se indica que según lo que se analizó en este estudio, el pan francés pierde aproximadamente 34% de la riboflavina, y el pan dulce cerca del 30%; considerando la composición de los mismos, estos porcentajes de retención explican la similitud en los resultados. También se observa que se dan los resultados del contenido de riboflavina en el pan francés y dulce para cada departamento analizado. Al hacer un análisis visual comparativo de los niveles de riboflavina en el pan de los distintos departamentos, agrupándolos según similitud de climas, se puede ver aunque existen diferencias individuales, no existe una relación entre la concentración obtenida y el clima del departamento.

En el caso del contenido de riboflavina, por ser una vitamina hidrosoluble, fotosensible y termosensible, podría esperarse que los niveles de la misma fueran menores en los departamentos más calurosos. Sin embargo, esta diferencia no es notoria. Es importante recalcar que, para verificar si existe diferencia significativa entre los resultados de los departamentos, debe hacerse

un muestreo representativo de todo el departamento. En este caso el muestreo no es representativo para hacer una comparación estadística, puesto que sólo se muestrearon las cabeceras departamentales.

Comparando los niveles obtenidos para los departamentos de Guatemala, Baja Verapaz y Suchitepéquez, los cuales no tienen fronteras con otros países, con San Marcos (frontera con México), Jutiapa (frontera con El Salvador) e Izabal (frontera con Belice y Honduras), se puede ver que las variaciones en los niveles de riboflavina son bajas. Considerando que los países vecinos mencionados también fortifican sus harinas, los resultados obtenidos tienen sentido.

Por otro lado, en el Cuadro 3 se puede observar la diferencia existente entre el contenido de riboflavina en el pan de consumo popular actual, y el contenido de la misma reportado en la Tabla de Composición de Alimentos de INCAP de 1996 (TCA). Se observa que los niveles son distintos a los reportados, lo que refuerza la necesidad de actualizar los datos respecto del contenido de esta vitamina en el pan. La actualización de la Tabla de Composición de Alimentos de INCAP proporcionará a sus usuarios esta información respecto de los niveles de riboflavina encontrados en el pan francés y dulce, y sus usuarios podrán hacer uso de ella a su mejor conveniencia. En términos generales se dio un incremento de 2.9 veces en el pan francés, y de 4.5 veces en el pan dulce,

respecto a lo determinado en la década de los 60, tiempo en el cual se obtuvieron los datos de la TCA-1996.

Dicho incremento puede deberse a varias razones, pero la principal y de mayor interés y beneficio para la población fue la introducción de prácticas de fortificación de la harina de trigo con una variedad de micronutrientes, incluidas las vitaminas del complejo B. Si bien es cierto que anteriormente se agregaban dichas vitaminas a la harina, es importante recordar que los niveles agregados eran los adecuados para restaurar el contenido original de las mismas en el trigo. Además, no se confirmó el cumplimiento de la fortificación durante años. Sin embargo, a partir de la década de los 90's, se cambió la restauración por la fortificación, agregando mayores cantidades a las que originalmente contenía el grano. Es a partir de este punto donde los niveles de dichas vitaminas, y específicamente la riboflavina, en la harina de trigo y productos derivados cambia drásticamente. Considerando que la harina de trigo se consume principalmente en forma de pan, surge la necesidad de determinar cuáles son los niveles reales de riboflavina que llegan a la población.

La ingesta diaria de riboflavina recomendada por el INCAP es de 0.4 mg/día - 1.7 mg/día, para niños y adultos, respectivamente. En el Cuadro 20 puede observarse qué porcentaje de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) de riboflavina está obteniendo un adulto promedio en cada departamento analizado

de Guatemala, por el consumo de pan. Los datos detallados para el pan francés y dulce, por separado, pueden verse en los Cuadros 18 y 19, respectivamente. Se observa en el Cuadro 20, sin embargo, que en promedio, un adulto ingiere el $5.82 \pm 2.67\%$ de la IDR de riboflavina a través del consumo de pan. Puede verse que en Izabal y Guatemala el pan aporta entre 8 – 10% de la IDR; en Suchitepéquez, Jutiapa y Quetzaltenango entre el 4 – 5%, y en Quiché, Baja Verapaz y San Marcos se obtiene un aporte del 3 % de la IDR de riboflavina a través del consumo de pan.

Este puede verse como un porcentaje bajo, si se considera que datos no publicados indican que en ciertos grupos de población en Guatemala hay deficiencia de riboflavina. Sin embargo, estos porcentajes se calcularon con base en los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística, INE, en la Encuesta Nacional de Consumo Aparente de Alimentos, 1991. En esta encuesta se proporcionan datos del consumo aparente, en gramos de pan/*per capita*/ día, datos presentados en el Apéndice 4. Considerando que son datos aparentes y observando el Cuadro 21 (donde se calcula que una persona se come aproximadamente 1 francés y 1 pan dulce diario), puede verse que es muy probable que en la realidad, una persona normal ingiera más de lo que se presenta en el Cuadro 21.

Analizando el aporte de riboflavina por el pan a la dieta, y considerando que se pierde entre el 30 y 35% de la riboflavina en los procesos de manufactura del pan, se puede considerar una seria revisión a las normas de fortificación. A pesar que se trata de un cálculo teórico, conocer qué porcentaje de la IDR de riboflavina aporta el pan francés y dulce, aunque sea bajo, puede servir para planeamiento de futuros proyectos para combatir la deficiencia de dicha vitamina. Esto puede lograrse aumentando los niveles de riboflavina con los cuales se fortifica la harina, aumentando el contenido de harina en el pan consumido, o ambos.

IX. CONCLUSIONES

- » El método analítico utilizado para la determinación del contenido de riboflavina en harina de trigo, pan francés y pan dulce, es un método lineal en el rango de 0 a 1.0 $\mu\text{g/mL}$, lo que permite el análisis de diversos alimentos derivados de cereales y otras matrices similares como la harina de trigo, harinas compuestas y galleta nutricional. El valor de 1.0 μg riboflavina/mL equivale a una concentración de 3.0mg/100g, pesando 10 gramos de muestra.

- » El método utilizado es un método exacto, puesto que presenta porcentaje de recuperación de $98 \pm 4 \%$, el cual cae dentro del rango de 70 – 120% que describe un método exacto y aceptable.

- » El método analítico utilizado para la determinación de riboflavina tiene una precisión intraensayo de $3 \pm 1\%$, para harina de trigo, $2.4 \pm 0.5 \%$, para pan francés, y $10 \pm 4 \%$ para pan dulce. Su precisión interensayo es del 8 % para harina de trigo, 12.28 % para pan francés, y 9.5% para pan dulce.

- » El método desarrollado permite la cuantificación de riboflavina en muestras o matrices cuyo contenido de riboflavina sea igual o mayor a 0.028 mg/100g muestra, equivalentes a 0.093 $\mu\text{g/mL}$ inyectados; el método detecta la presencia del analito en muestras cuyo contenido sea tan bajo como 0.007 mg/100g muestra, equivalentes a 0.024 $\mu\text{g/mL}$ inyectados. Los límites de detección y cuantificación permiten perfectamente el análisis de alimentos con una amplia gama de contenido de riboflavina.

- » El contenido de riboflavina en el pan francés de Guatemala es de 0.20 ± 0.01 mg/100 g de porción comestible, mientras que el pan dulce contiene 0.18 ± 0.02 mg/100g de porción comestible. Los resultados representan un incremento en el contenido de riboflavina de 2.9 veces en el pan francés, y de 4.5 veces en el pan dulce, respecto al contenido de dicha vitamina en el pan reportado en la Tabla de Composición de Alimentos de INCAP de 1996 (TCA).

- » El consumo de pan francés per cápita por día proporciona un 2.92 % de la ingesta diaria recomendada para riboflavina, en tanto el pan dulce proporciona 2.93 % de la misma. Teniendo en cuenta el consumo de pan aparente por persona por día, puede decirse que un adulto promedio obtiene 5.82 ± 2.67 % de la dosis diaria recomendada de riboflavina por

el consumo de pan popular, pan francés y dulce.

- » Según cálculos teóricos, los procesos de manufactura del pan hacen que se pierda cerca del 34 % del contenido original de riboflavina en el pan francés, y cerca de 30 % en el pan dulce. Esto hace necesaria una evaluación para determinar las pérdidas reales de esta vitamina en productos de panificación que usan harina de trigo fortificada.

X. RECOMENDACIONES

- » Los resultados obtenidos deben trasladarse a los encargados de la base de datos de Composición de Alimentos de INCAP para su actualización.
- » Se recomienda aumentar los niveles de fortificación con riboflavina en harina de trigo para elevar el aporte de la IDR proporcionado por el consumo de pan.
- » Se recomienda analizar otros alimentos fortificados para estimar el aporte de la IDR de riboflavina por el consumo de los mismos.
- » Se recomienda evaluar la estabilidad de la riboflavina en otros alimentos fortificados para establecer los niveles reales que llegan a la población a través de su consumo.

XI. BIBLIOGRAFIA

- » Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). 1993. Tercer taller regional sobre deficiencias de Vitamina A y otros micronutrientes en América Latina y el Caribe. Vitamin A Field Support Project (VITAL). Estados Unidos. 164 pp.
- » Agencia para el Desarrollo Internacional (AID). 1974. Mejoramiento de la calidad nutritiva de los cereales. 1a ed. AID. México. 120 pp.
- » Anderson, L.; Dibble, M.V.; Pirkko, R.T.; Mitchell, H.S.; Rynbergen, H.J. 1982. Nutrition in Health and Disease. 17th. ed. Lippincott Company. 794 pp.
- » Arroyave, G. 1992. Nutrificación de alimentos con énfasis en el agregado de micronutrientes a la harina de trigo. VITAL. Estados Unidos. 12 pp.
- » Conacher, H.B. 1990. "Validation Methods Used in Crisis Situations: Task Force Report". J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 73, No. 2. p. 332 – 334.
- » Dary, O.; Guamuch, M.; Martínez, C.; Chinchilla, D. 1998. Manual de un Sistema de Garantía de Calidad de los programas de fortificación de alimentos para países en desarrollo: Parte 1, Sistema de Garantía de Calidad de la Fortificación de Azúcar con Vitamina A. INCAP/OPS/USAID/IEF/OMNI. Guatemala. 58 pp.
- » Draper, A. 1996. The Potential for Micronutrient Fortification. USAID/OMNI. U.S.A. 67 pp.
- » Flores, M.; Menchú, M.T.; Lara, M.Y. 1971. Valor nutritivo de los alimentos para Centroamérica y Panamá. INCAP. Guatemala. 18 pp.
- » Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Life Sciences Institute. 1997. Preventing Micronutrient Malnutrition: A Guide to Food-based Approaches. International Life Sciences Institute. U.S.A. 103 pp.

- » Food, Nutrition and Agriculture. 1994. Food Composition Data. Food and Agriculture Organization. Vol. 12.
- » Harris, R.; Karmas, E. (Eds.) 1975. Nutritional Evaluación of Food Processing. 2nd.ed. The AVI Publishing Co. U.S.A. 670 pp.
- » Heiby, W.A. 1988. The Reverse Effect. How Vitamins and Minerals Promote Health and Cause Disease. MediScience. U.S.A. 1198 pp.
- » Instituto Nacional de Estadística. Comité de Acción de Apoyo al Desarrollo Económico y Social de Centro América y Secretaría de Planificación Económica. 1991. Encuesta Nacional de Consumo Aparente de Alimentos. INE. Guatemala.
- » Kanarek, R.B.; Marks-Kaufman, R. 1991. Nutrition and Behavior. Van Nostrand. U.S.A. 308 pp.
- » Krause, M.V. 1966. Food, Nutrition and Diet Therapy. 4th. ed. W.B. Saunders. U.S.A. 687 pp.
- » Lawrence, J.F. 1984. Food Constitutents and Food Residues, their Chromatographic Determination. Marcel Dekker. U.S.A. 617 pp.
- » Lofti, M.; Venkatesh Mannar, M.G.; Merx, R.J.H.M.; Naber,-van den Heuvel, P. Micronutrient Fortification of Foods. The Micronutrient Initiative (MI), International Development Research Centre (IDRC)/International Agriculture Centre (IAC). Canada. 108 pp.
- » Machlin, L.J. (Ed.) 1984. Handbook of Vitamins. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. 614 pp.
- » Menchú, M.T.; Méndez, H.; Barrera, M.A.; Ortega, L. 1996. Valor nutritivo de los alimentos para Centroamérica y Panamá. INCAP y OPS. Guatemala. 98 pp.
- » Ministerio de Educación de Guatemala; UNICEF. Escuelas Centinela Micronutrientes 1995. Ministerio de Educación de Guatemala/UNICEF. Guatemala.
- » Nestel, P. 1993. Fortificación de los alimentos en países en desarrollo. VITAL/USAID. Estados Unidos. 52 pp.
- » OMNI/ROCHE/USAID. Fortification Basics: Principles of Assay Procedures.

- » OMNI/ROCHE/USAID. Fortification Basics: Wheat Flour.
- » Organización Panamericana de la Salud; Instituto Internacional de Ciencias de la Vida. 1991. Conocimientos actuales sobre nutrición. 6a. ed. ILSI Press. Estados Unidos. 614 pp.
- » Ranhotra, G.S.; Gelroth, J.A. 1986. Stability of Enrichment Vitamins in Bread and Cookies. Cereal Chemistry. Vol 63. No. 5. p. 401 - 403.
- » Ranum, P.M.; Loewe, R.J.; Gordon, H.T. 1981. Effect of Bleaching, Maturing, and Oxidizing Agents on Vitamins Added to Wheat Flour. Cereal Chemistry. Vol 58. No. 1. p. 32- 35.
- » Robinson, C.H.; Lawler, M.R. 1982. Normal and Therapeutic Nutrition. 16th. ed. Macmillan Publishing. U.S.A. 849 pp.
- » Roche. 1994. Vitamins basics. F. Hoffman - La Roche. U.S.A. 74 pp.
- » Sadek, P.C. 1996. The HPLC Solvent Guide. John Wiley & Sons. U.S.A. 346 pp.
- » Shils, M.E.; Olson, J.A.; Shike, M. (Eds.). 1994. Modern Nutrition in Health and Disease. 8th. ed. Vol 1. Lea & Febiger. U.S.A. 923 pp.
- » Skurray, G.R. 1981. A Rapid Method for Selectively Determining Small Amounts of Niacin, Riboflavin and Thiamin in Foods. *Food Chemistry*.
- » Speek, A.J. 1989. Vitamin Analysis in Body Fluids and Foodstuffs with High Performance Liquid Chromatography. TNO-CIVO Toxicology and Nutrition Institute. Netherlands. 148 pp.
- » Strohecker, R.; Henning, H.M. 1966. Vitamin Assay-Tested Methods. 1st. ed. Verlag Chemie. Germany. 360 pp.
- » Torún, B.; Menchú, M.T.; Elías, L.G. 1996. Recomendaciones dietéticas diarias del INCAP. Edición XLV aniversario. INCAP y OPS. Guatemala. 137 pp.
- » Williams, S. (Ed). 1984. Official Methods of Analysis. 100th. ed. Association of Official Analytical Chemists. U.S.A. 1141 pp.

Cuadro 4

Datos para la obtención de la curva de calibración de riboflavina 0 – 0.32 $\mu\text{g/mL}$

Concentración de riboflavina ($\mu\text{g/mL}$)	Altura del pico (± 0.05 cm)
0.00	0.00
0.002	0.00
0.004	0.00
0.008	0.00
0.012	0.40
0.020	0.55
0.040	0.90
0.080	1.65
0.120	2.90
0.200	4.45
0.320	7.10

$$Y = (22.4 \pm 0.2) X - (0.0069 \pm 0.0278)^a$$

$$R^2 = 0.9965$$

^a Y corresponde a la altura del pico en cm, y X a la concentración de riboflavina en $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 5

Datos para la obtención de la curva de calibración de riboflavina 0.0 – 1.0 µg/mL

Concentración de riboflavina (µg/mL)	Altura del pico (±0.05cm)
0.0	0.0
0.1	1.3
0.2	2.4
0.4	5.4
0.6	8.4
0.8	10.3
1.0	13.7

$$Y = (13.6 \pm 0.2) X - (0.087 \pm 0.19)^a$$

$$R^2 = 0.9971$$

^a Y corresponde a la altura del pico en cm, y X a la concentración de riboflavina en µg/mL.

Cuadro 6

Exactitud del método analizando el estándar de cereals VMA-399

Concentración experimental (mg/100g)	Exactitud (% Recuperación)
6.04	101.13
5.51	92.29
5.89	98.61
5.89	98.61
Concentración esperada: 5.97 mg/100g	

Promedio ± D.S.: 98 ± 4 %

C.V. = 4%

Cuadro 7

Variación intraensayo del método para harina de trigo

No. Muestra	Concentración de riboflavina (mg/kg) ^a	
	1	3.64
2	3.87	4.11
3	3.76	4.00
4	3.72	4.02
5	3.90	3.90
6	3.76	4.07
Promedio	3.77	3.96
D.S.	0.09	0.15
C.V.	2.4 %	3.7 %

Promedio C.V.± D.S.: 3 ± 1%

^a Cada dato es promedio de dos inyecciones**Cuadro 8**

Variación intraensayo del método para pan francés, en base fresca

No. Muestra	Concentración de riboflavina (mg/100g) ^a	
	1	0.209
2	0.209	0.211
3	0.214	0.227
4	0.215	0.227
5	0.220	0.227
6	0.220	0.227
Promedio	0.215	0.223
D.S.	0.004	0.006
C.V.	2.08	2.77

Promedio C.V.± D.S.: 2.4 ± 0.5 %

^a Cada dato es promedio de dos inyecciones

Cuadro 9

Variación intraensayo del método para pan dulce, en base fresca

No. Muestra	Concentración de riboflavina (mg/kg) ^a	
1	0.17	0.16
2	0.19	0.21
3	0.19	0.19
4	0.15	0.17
5	0.19	0.15
6	0.18	0.22
Promedio	0.18	0.18
D.S.	0.01	0.02
C.V.	7.8	12.9

Promedio C.V.± D.S.: 10 ± 4 %

^a Cada dato es promedio de dos inyecciones**Cuadro 10**

Variación interensayo del método para harina de trigo

Concentración de riboflavina (mg/kg)		
Día 1	Día 2	Día 3
3.6	3.30	3.01
3.8	3.30	3.01
3.6	3.37	3.08
3.8	3.37	3.08
Promedio: 3.3	Promedio: 3.33	Promedio: 3.05
D.S.: 0.1	D.S.: 0.04	D.S.: 0.04

Promedio ± D.S. : 3.4 ± 0.3 mg/kg

C.V del promedio: 8.0%

Cuadro 11

Variación interensayo del método para pan francés

Concentración de riboflavina (mg/100g)		
Día 1	Día 2	Día 3
0.26	0.17	0.18
0.21	0.19	0.21
0.22	0.19	0.16
0.23	0.19	0.16
Promedio: 0.23	Promedio: 0.18	Promedio: 0.18
D.S.: 0.02	D.S.: 0.01	D.S.: 0.02
Promedio \pm D.S. : 0.20 \pm 0.02 mg/100g		

C.V del promedio: 12.28 %

Cuadro 12

Variación interensayo del método para pan dulce

Concentración de riboflavina (mg/100g)		
Día 1	Día 2	Día 3
0.16	0.16	0.13
0.21	0.17	0.18
0.21	0.21	0.18
0.21	0.13	0.15
Promedio: 0.20	Promedio: 0.17	Promedio: 0.16
D.S.: 0.02	D.S.: 0.03	D.S.: 0.02
Promedio \pm D.S. : 1.7 \pm 0.2 mg/100g		

C.V del promedio: 9.5 %

Cuadro 13

Datos para el cálculo de límites de detección y cuantificación

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Razón Señal / Ruido (adimensional) ^a
0.002	1.2
0.004	1.3
0.008	1.4
0.012	1.9
0.020	2.45
0.040	9.1
0.080	7.7
0.120	13.5
0.200	20.8
0.320	33.1

$$Y = (102 \pm 1) X + (0.6 \pm 0.2)$$

$$R^2 = 0.9963$$

Límite de detección : Razón S/R = 3 = 0.024 $\mu\text{g/mL}$

LD equivale a una concentración inicial de 0.07 mg/kg o 0.007mg/100g

Límite de cuantificación : Razón S/R = 10 = 0.093 $\mu\text{g/mL}$

LD equivale a una concentración inicial de 0.28 mg/kg o 0.028mg/100g

^a Cada dato es promedio de dos inyecciones

Cuadro 14

Porcentaje de humedad y peso promedio del pan francés

Departamento	Porcentaje de humedad	Peso promedio de cada pan \pm D.S. (g) ^a
Guatemala 1	25.1	28.1 \pm 0.9
Guatemala 2	27.4	28.1 \pm 0.9
Guatemala 3	25.4	28.1 \pm 0.9
Quetzaltenango	18.7	28 \pm 5
Quiché	18.4	42 \pm 5
Baja Verapaz	23.8	26 \pm 3
Izabal	25.9	33 \pm 3
San Marcos	20.7	No hay dato
Suchitepéquez	26.2	56 \pm 4
Jutiapa	No hay dato	29 \pm 2
Promedio \pm D.S. :	24 \pm 3 %	33 \pm 10 g
Promedio \pm LC95%:	24 \pm 2 %	33 \pm 7 g

^a Cada dato es promedio de cuatro datos**Cuadro 15**

Porcentaje de humedad y peso promedio del pan dulce

Departamento	Porcentaje de humedad	Peso promedio de cada pan \pm D.S. (g) ^a
Guatemala 1	13	35.7 \pm 0.1
Guatemala 2	12	35.7 \pm 0.1
Guatemala 3	12	35.7 \pm 0.1
Quetzaltenango	14	37 \pm 5
Quiché	19	41 \pm 5
Baja Verapaz	12	29 \pm 3
Izabal	16	32 \pm 2
San Marcos	6	No hay dato
Suchitepéquez	12	50 \pm 5
Jutiapa	11	43 \pm 2
Promedio \pm D.S. :	13 \pm 3 %	38 \pm 6 g
Promedio \pm LC95%:	13 \pm 3 %	38 \pm 4 g

^a Cada dato es promedio de cuatro datos

Cuadro 16

Niveles de riboflavina en el pan francés y dulce de Guatemala, base seca

Concentración de riboflavina
(mg/100g de porción comestible)

Departamento	Pan francés	Pan dulce
Guatemala 1	0.219 ± 0.006	0.14 ± 0.04
Guatemala 2	0.235 ± 0.003	0.17 ± 0.04
Guatemala 3	0.247 ± 0.008	0.19 ± 0.02
Quetzaltenango	0.286 ± 0.009	0.26 ± 0.02
Quiché	0.291 ± 0.009	0.24 ± 0.03
Baja Verapaz	0.31 ± 0.02	0.23 ± 0.01
Izabal	0.241 ± 0.004	0.20 ± 0.03
San Marcos	0.261 ± 0.006	0.24 ± 0.03
Suchitepéquez	0.255 ± 0.006	0.16 ± 0.05
Jutiapa	0.27 ± 0.01	0.18 ± 0.02
Promedio ± D.S.	0.26 ± 0.02	0.20 ± 0.04
C.V.	10.69 %	19.16 %
Promedio ± LC95%	0.26 ± 0.02 mg/100g	0.20 ± 0.03 mg/100g

Cuadro 17

Niveles de riboflavina en el pan francés y dulce de Guatemala, base húmeda

Concentración de riboflavina
(mg/100g de porción comestible)

Departamento	Pan francés	Pan dulce
Guatemala 1	0.167 ± 0.005	0.13 ± 0.04
Guatemala 2	0.180 ± 0.003	0.15 ± 0.03
Guatemala 3	0.189 ± 0.006	0.17 ± 0.02
Quetzaltenango	0.219 ± 0.007	0.23 ± 0.02
Quiché	0.222 ± 0.007	0.21 ± 0.03
Baja Verapaz	0.24 ± 0.01	0.204 ± 0.008
Izabal	0.184 ± 0.003	0.18 ± 0.03
San Marcos	0.200 ± 0.005	0.21 ± 0.03
Suchitepéquez	0.195 ± 0.005	0.14 ± 0.04
Jutiapa	0.208 ± 0.007	0.16 ± 0.02
Promedio ± D.S.	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.03
C.V.	10.69 %	19.16 %
Promedio ± LC95%	0.20 ± 0.02 mg/100g	0.18 ± 0.02 mg/100g

Cuadro 18

Cantidad de riboflavina obtenida por consumo de pan francés, de acuerdo a la encuesta de consumo aparente de pan realizada por el INE (Apéndice 5)

Departamento	mg Riboflavina/ 100 g pan francés	Gramos pan francés/per cápita/día*	mg de riboflavina obtenidos por consumo	Porcentaje de la ingesta diaria recomendada, 1.7mg/día**
Guatemala 1	0.167 ± 0.005	52	0.09	5.11
Guatemala 2	0.180 ± 0.003	52	0.09	5.51
Guatemala 3	0.189 ± 0.006	52	0.10	5.78
Quetzaltenango	0.219 ± 0.007	7	0.02	0.90
Quiché	0.222 ± 0.007	8	0.02	1.04
Baja Verapaz	0.24 ± 0.01	8	0.02	1.13
Izabal	0.184 ± 0.003	35	0.06	3.79
San Marcos	0.200 ± 0.005	7	0.01	0.82
Suchitepéquez	0.195 ± 0.005	24	0.05	2.75
Jutiapa	0.208 ± 0.007	19	0.04	2.32
Promedio	0.20	26.4	0.05	2.92
D.S.	0.02	19.9	0.03	2.00

* Ver Apéndice 4.

** Torún, Menchú y Elías, 1996.

Cuadro 19

Cantidad de riboflavina obtenida por consumo de pan dulce, de acuerdo a la encuesta de consumo aparente de pan realizada por el INE (Apéndice 5)

Departamento	mg Riboflavina/ 100 g pan dulce	Gramos pan dulce/per cápita/día*	mg de riboflavina obtenidos por consumo	Porcentaje de la dosis diaria recomendada, 1.7mg/día**
Guatemala 1	0.13 ± 0.04	42	0.05	3.21
Guatemala 2	0.15 ± 0.03	42	0.06	3.71
Guatemala 3	0.17 ± 0.02	42	0.07	4.20
Quetzaltenango	0.23 ± 0.02	21	0.05	2.84
Quiché	0.21 ± 0.03	15	0.03	1.85
Baja Verapaz	0.204 ± 0.008	15	0.03	1.80
Izabal	0.18 ± 0.03	38	0.07	4.02
San Marcos	0.21 ± 0.03	21	0.04	2.59
Suchitepéquez	0.14 ± 0.04	25	0.04	2.06
Jutiapa	0.16 ± 0.02	32	0.05	3.01
Promedio	0.18	29.3	0.05	2.93
D.S.	0.03	11.2	0.01	0.87

* Ver Apéndice 4.

** Torún, Menchú y Elías, 1996.

Cuadro 20

Porcentaje de la Ingesta diaria recomendada (IDR)* de riboflavina, obtenida por medio del consumo de pan francés y dulce en Guatemala

Departamento	mg riboflavina obtenidos por consumo de pan francés	mg riboflavina obtenidos por consumo de pan dulce	mg riboflavina obtenidos por consumo de pan total	Porcentaje de la IDR obtenido por consumo pan
Guatemala 1	0.09	0.05	0.14	8.2
Guatemala 2	0.09	0.06	0.15	8.8
Guatemala 3	0.10	0.07	0.17	10.0
Quetzaltenango	0.02	0.05	0.07	4.1
Quiché	0.02	0.03	0.05	2.9
Baja Verapaz	0.02	0.03	0.05	2.9
Izabal	0.06	0.07	0.13	7.6
San Marcos	0.01	0.04	0.05	2.9
Suchitepéquez	0.05	0.04	0.09	5.3
Jutiapa	0.04	0.05	0.09	5.3

Ingesta diaria recomendada de riboflavina para adulto: 1.7 mg/día

% de la IDR riboflavina obtenida a través del pan (\pm D.S.): 5.82 ± 2.67 %

* Torún, Menchú y Elías, 1996.

Cuadro 21

Cantidad de panes consumidos por el guatemalteco, según la Encuesta de Consumo Aparente del INE (Apéndice 5) y datos del peso del pan de este estudio (Cuadros 14 y 15)

Departamento	Panes francés/per cápita/día	Panes dulces/per cápita/día
Guatemala 1	1.8	1.2
Guatemala 2	1.8	1.2
Guatemala 3	1.8	1.2
Quetzaltenango	0.2	0.6
Quiché	0.2	0.4
Baja Verapaz	0.3	0.5
Izabal	1.1	1.2
San Marcos	No hay dato	No hay dato
Suchitepéquez	0.4	0.5
Jutiapa	0.7	0.7
Promedio ± D.S.	0.9 ± 0.7	0.8 ± 0.3

Cuadro 22

Estabilidad de la riboflavina en el proceso de manufactura del pan en la Ciudad de Guatemala (datos del Apéndice 7)

	Pan francés	Pan dulce
Porcentaje en peso de harina	75.3%	64.6%
Concentración de riboflavina esperada (mg/100 g)	0.3012	0.2584
Concentración de riboflavina determinada (mg/100 g)	0.2	0.18
Pérdida de riboflavina	33.6%	30.3%

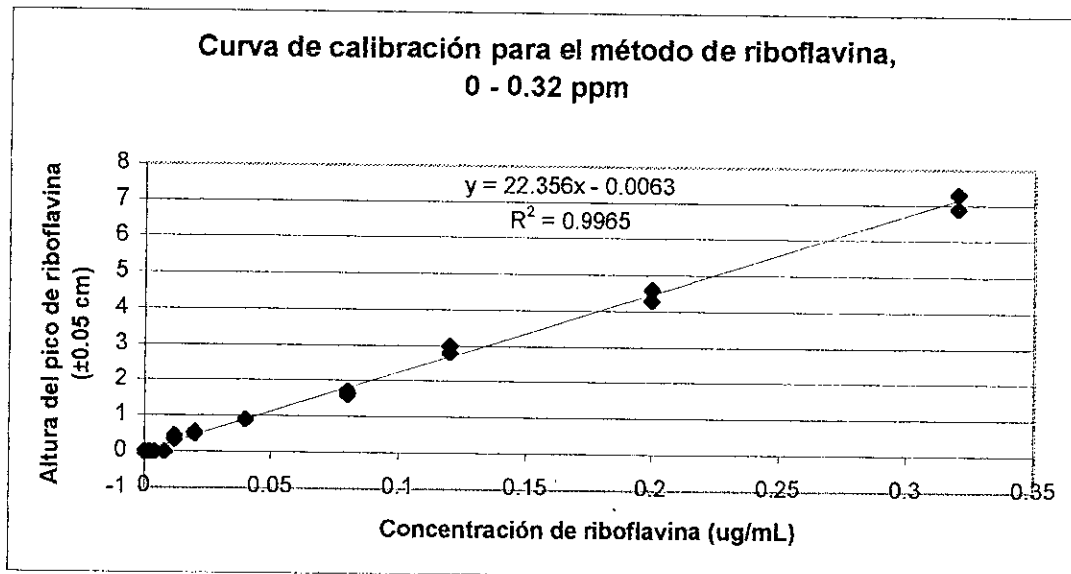
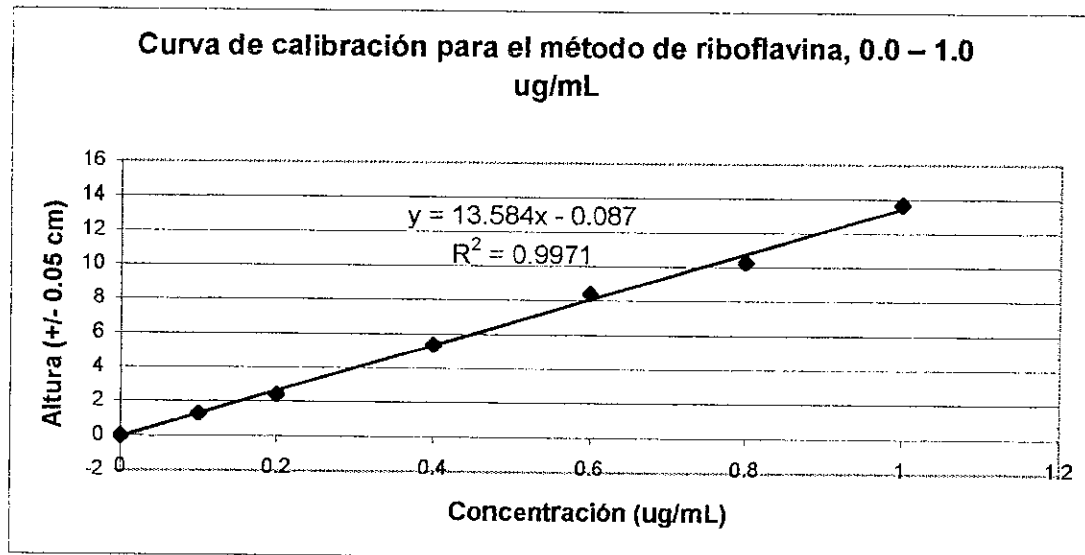
Figura 4Curva de calibración para el método de riboflavina, 0 – 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **Figura 5**Curva de calibración para el método de riboflavina, 0.0 – 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 

Figura 6

Curva para la determinación de límites de detección y cuantificación del método

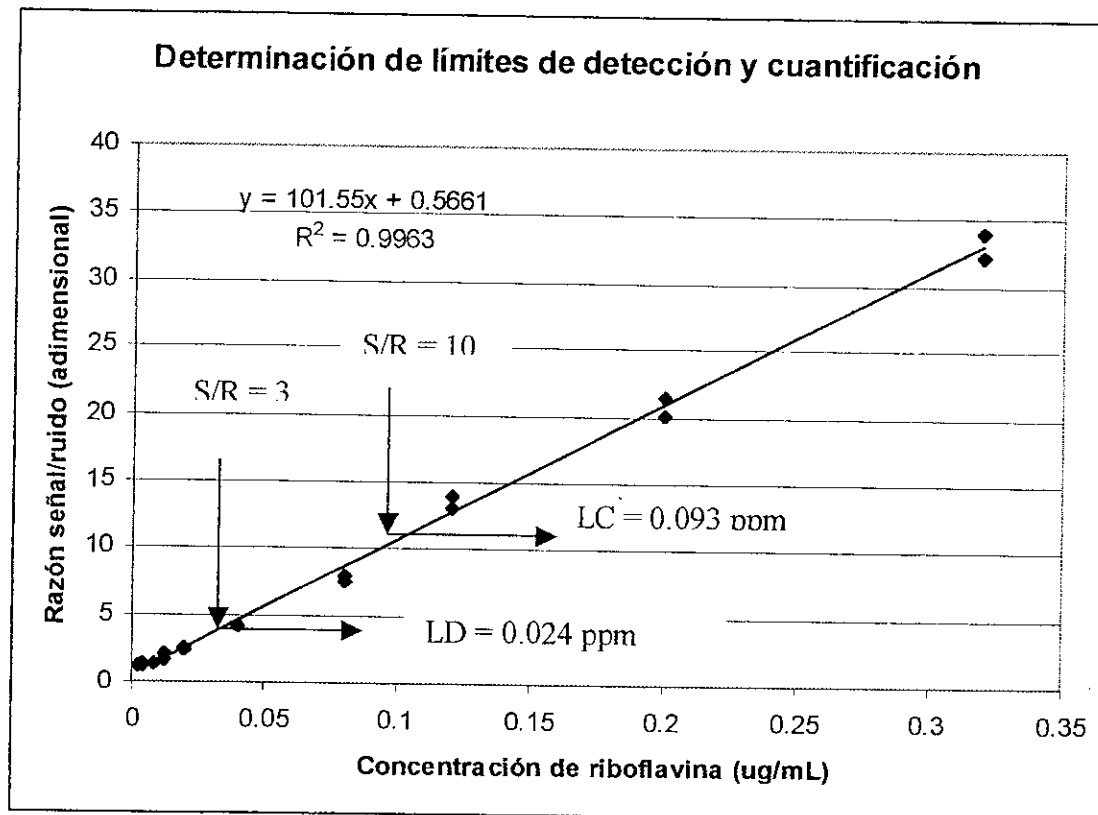
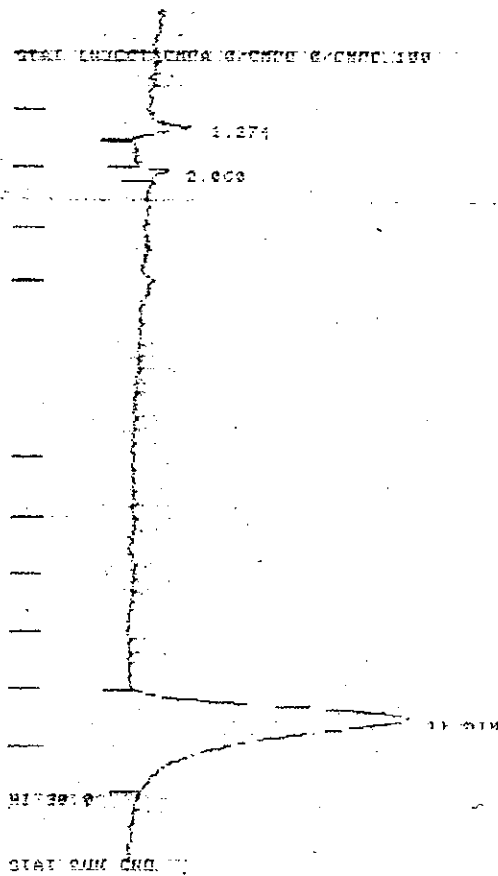


Figura 7

Cromatograma de una inyección de estándar de riboflavina 0.12 µg/mL en ácido sulfúrico 0.1 M

CHART SPEED 1.0 CM/MIN
ATTEN: 2 ZERO: 5% 1 MIN/TICK



CHANNEL: 2A - 2 TITLE: VITAMINAS B EN ALIMENTOS 12:41 16 NOV 99

SAMPLE: B2 0.12 PPM METHOD: VITAMINA-B CALCULATION: AX - ANALYS - OP

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT HT%	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1		15.24	1.274	126	BB
2		84.76	11.510	701	BB

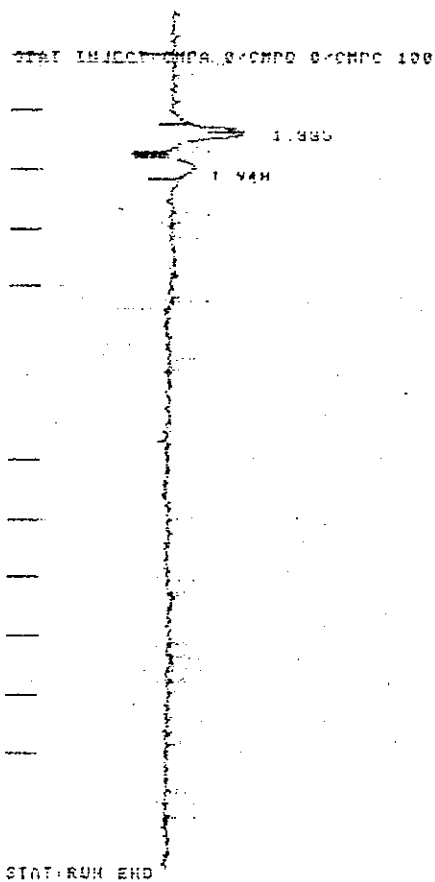
TOTALS: 100.00 927

DIVISOR: 1.00000 AMT STD: 1.00000 MULTIPLIER: 1.00000

POST RUN:
SAVE FILE: RAW VIT-9999

Figura 8
Cromatograma de un blanco de reactivos

CHART SPEED 1.0 CM/MIN
ATTEN: 2 ZERO: 5% 1 MIN/TICK



CHANNEL: 2A - 2 TITLE: VITAMINAS B EN ALIMENTOS 13:46 16 NOV 99

SAMPLE: BLANCO METHOD: VITAMINA-B CALCULATION: AX - ANALYS - OP

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT RT%	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1		52.48	1.335	180	BV
2		47.51	1.368	172	VB

TOTALS: 100.00 352

DIVISOR: 1.00000 AMT STD: 1.00000 MULTIPLIER: 1.00000

POST RUN:

SAVE FILE: RAW VIT-B092

Figura 9

Cromatograma de una muestra de harina de trigo sin fortificar

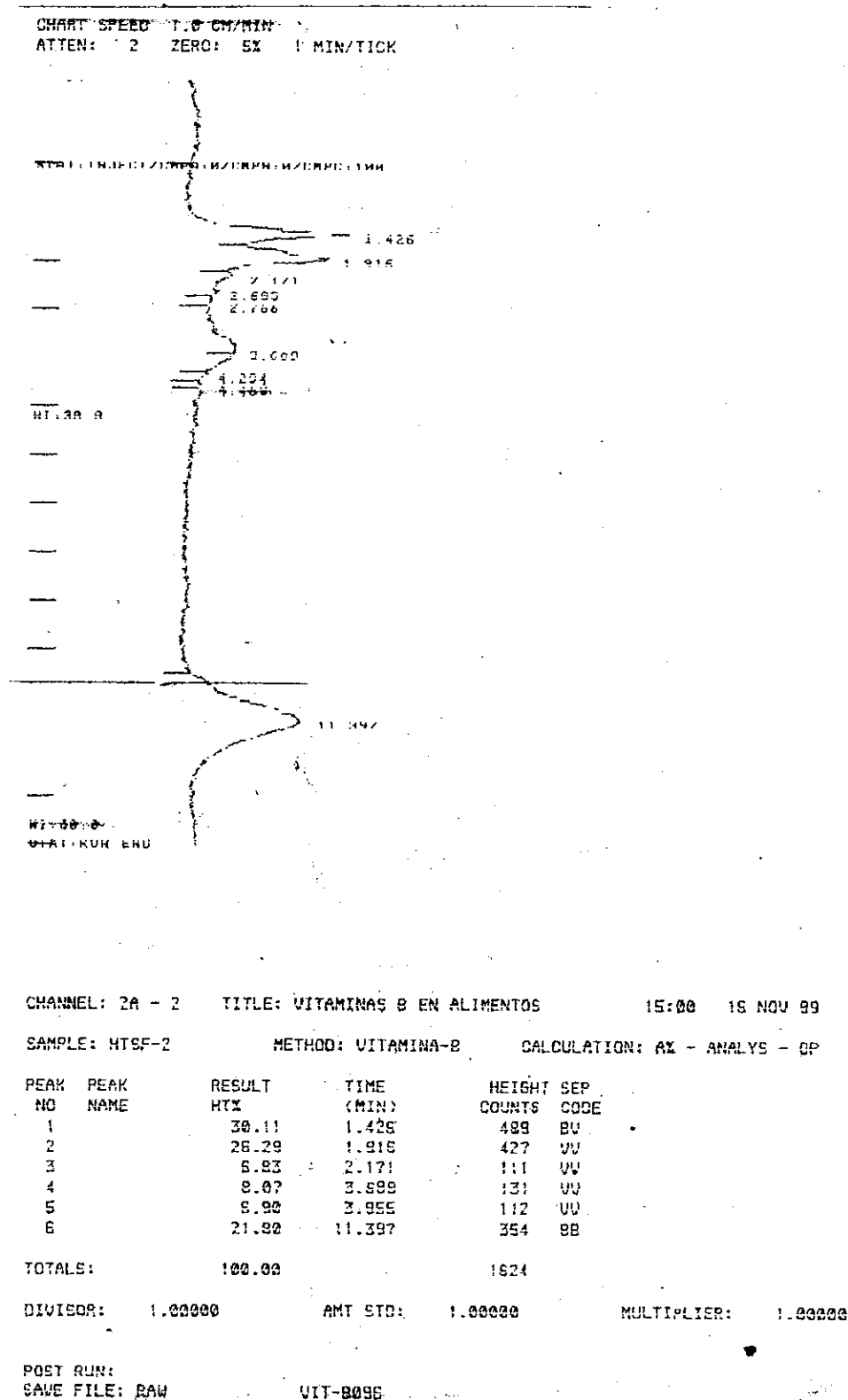
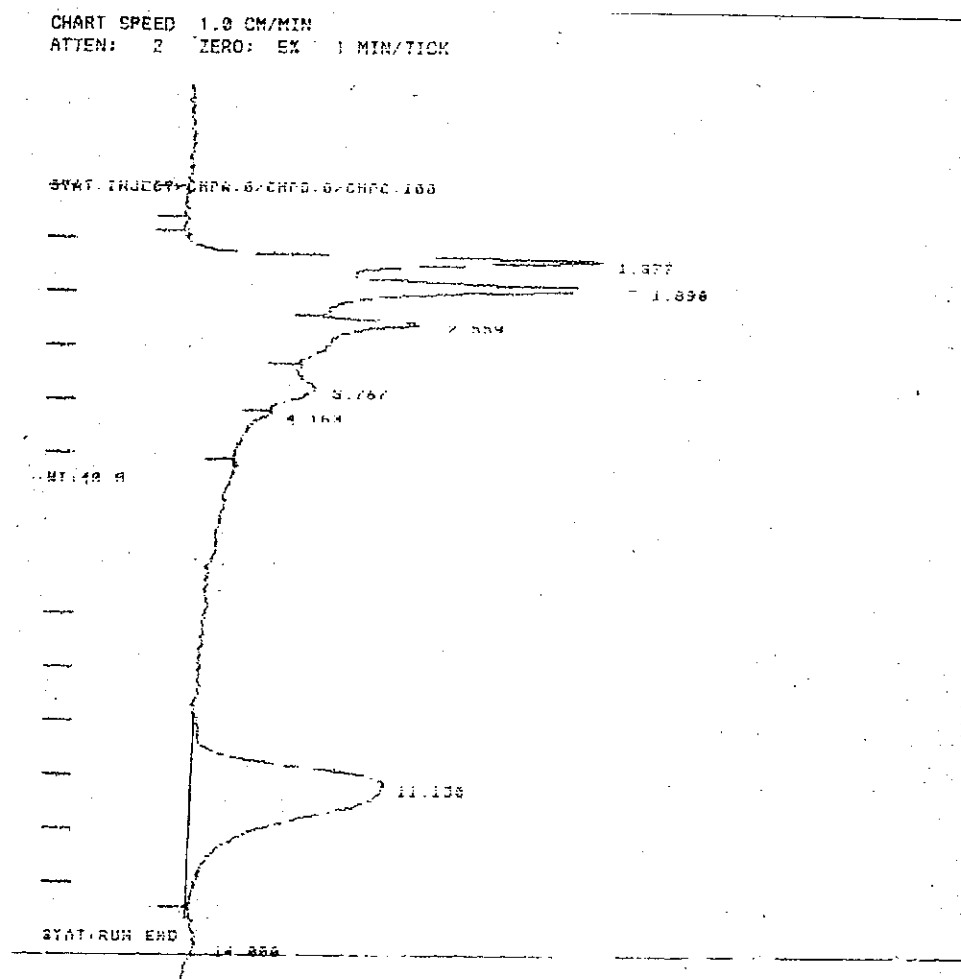


Figura 11
Cromatograma de una muestra de pan francés



CHANNEL: 2A - 2 TITLE: VITAMINAS B EN ALIMENTOS 12:12 1 DEC 99

SAMPLE: FRANCES 3 METHOD: VITAMINA-B CALCULATION: AX - ANALYS - OP

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT WT%	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1		29.97	1.377	1129	9U
2		31.02	1.898	1208	UU
3		15.61	2.559	609	UU
4		7.11	3.767	277	UU
5		3.57	4.163	139	UE
6		13.71	11.130	534	BU

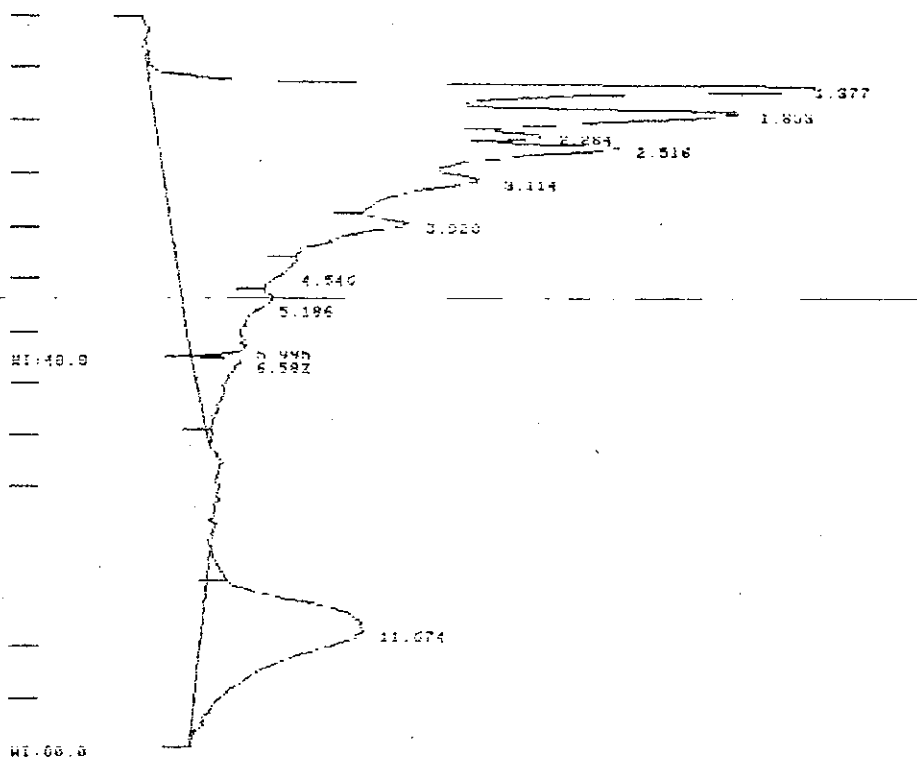
TOTALS: 100.00 3994

DIVISOR: 1.00000 AMT STD: 1.00000 MULTIPLIER: 1.00000

POST RUN:
SAVE FILE: RAW VIT-9011

Figura 12**Cromatograma de una muestra de pan dulce**

CHART SPEED 1.0 CM/MIN
ATTEN: 2 ZERO: 5% 1 MIN/TICK



CHANNEL: 2A - 2 TITLE: VITAMINAS 9 EN ALIMENTOS 14:58 9 DEC 99

SAMPLE: DULCE 2 METHOD: VITAMINA-B CALCULATION: AX - ANALYS - OP

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT HT%	TIME (MIN)	HEIGHT COUNTS	SEP CODE
1		25.63	1.377	2370	9V
2		17.79	1.853	1845	VV
3		11.67	2.284	1879	VV
4		14.04	2.516	1298	VV
5		9.57	3.114	985	VV
6		7.14	3.928	680	VV
7		3.55	4.546	338	VV
8		2.52	5.196	233	VV
9		1.61	5.995	149	VV
10		1.47	6.582	136	VB
11		4.81	11.674	454	9B

TOTALS: 100.00 9247

DIVISOR: 1.00000 AMT STD: 1.00000 MULTIPLIER: 1.00000

POST RUN:
SAVE FILE: RAW VIT-8967

Apéndice 1

DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD DEL PAN

El pan se compró fresco y se pesó en grupos de 5. Luego, se formaron las muestras compuestas y se congeló. Una vez congelado se pesó nuevamente, y se removió la humedad por liofilización 24 horas. Posteriormente se volvió a pesar y se determinó la humedad con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Apéndice 2

DETERMINACION DE RIBOFLAVINA EN EL PAN DE CONSUMO POPULAR EN GUATEMALA, POR MEDIO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Referencias

Referencia: Schuep, W.; Steiner, K. Determination of Vitamin B2 in Complete Feeds and Premixes with HPLC. En: Keller, H.E. *Analytical Methods for Vitamins and Carotenoids in Feeds*. Animal Nutrition and Health Vitamins and Fine Chemicals Division, Roche. Switzerland. pp. 30 -32.

Principio

La riboflavina y sus formas coenzimáticas (FMN y FAD) se extraen de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico diluido. Los ésteres con ácido fosfórico se hidrolizan con amilasa. El extracto se diluye en metanol y cualquier precipitado se elimina por centrifugación. El contenido de riboflavina se determina por HPLC en una columna de fase invertida (C18) con un detector de fluorescencia.

Puntos críticos y precauciones

Para evitar la destrucción de la riboflavina, la muestra debe protegerse de la luz durante el análisis.

Al terminar de inyectar la corrida del día, la columna debe lavarse con agua HPLC durante una hora (1mL/min) y guardarla en metanol. NUNCA dejar la columna en la fase móvil.

Equipo

Autoclave
Agitador Vortex (Marca)

Balanza Analítica Sartorius (± 0.0001 g)
Baño térmico de agua
Centrífuga
Columna Supelco, C18, 150x.5(D.I.) mm, 5 μ m partícula
Cromatógrafo líquido de alta resolución, Varian Vista 5500
Detector de fluorescencia (Fluorichrom II)
Sistema de procesamiento de datos (Data System, DS)
Pipeteador

Materiales

Balones volumétricos
Beakers
Embudos de vidrio
Frascos de vidrio oscuro
Pipetas volumétricas
Probetas
Tubos de centrifuga de 50 y 10 mL
Tubos de ensayo de 10 mL
Varillas de vidrio
Papel filtro Whatman No. 41, libre de cenizas
Cinta indicadora para autoclave

Reactivos

Acetato de sodio trihidratado p.a. ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 99.5%, PM = 136.08, Merck Art.6267
Acido acético glacial p.a. (CH_3COOH), 99.8%, PM = 60.05, D = 1.05, Merck Art. 2500
Acido sulfúrico p.a. (H_2SO_4), 95-97%, PM = 98.08, d = 1.84, Merck Art. 731
Alfa-amilasa, Sigma A-1278
1-hexanosulfonato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3\text{SNa}$), Sigma Ultra 98%, PM = 188.2, Sigma H-9026
Hidróxido de sodio p.a. (NaOH), 99.0%, PM = 40.0, Merck Art. 430
Metanol anhidro p.a. (CH_3OH), 99.8%, PM = 32.04, d = 0.791, Omnisolv MX0485-7
Metanol HPLC (CH_3OH), 99.99%, PM = 32.04, d = 0.791, Omnisolv MX0488-1

Riboflavina (C₁₇H₂₀N₄O₆), PM = 376.4, Sigma R-4500
Trietilamina (C₆H₁₅N), >99%, PM = 101.19, d = 0.73, Merck Art. 1296

Soluciones

Acetato de sodio 2 M

Acido sulfúrico 0.1 M

Acido sulfúrico 30% (v/v)

Suspensión de amilasa 10% (p/v)

Hidróxido de sodio 0.5 M

Fase móvil: [Hexanosulfonato de sodio-5mM, trietilamina-0.13% (v/v), ácido acético-1% (v/v)]:[Metanol] , (80:20) .

Solución madre de riboflavina: 100µg/mL

Solución hija de riboflavina: 1µg/mL

Solución nieta de riboflavina: 0.12µg/mL

Procedimiento de preparación y extracción de la muestra

1. En un beaker de 100 mL pesar 10 g de muestra molida, en duplicado.
2. Agregar 10 - 20 mL de ácido sulfúrico 0.1 M. Agitar la muestra y agregar el volumen necesario para completar 50 mL.
3. Cubrir el beaker con papel de aluminio y colocar en autoclave a 121 – 123°C, por 15 minutos.
4. Transvasar la solución caliente a un balón volumétrico de 100 mL que contenga 6.4 mL de acetato de sodio 2.5M.
5. Dejar enfriar la solución y agregar 5 mL de la solución de amilasa 10%.
6. Incubar a 40°C por 20 minutos. Agregar 4 mL de ácido sulfúrico 30% v/v para detener la reacción. Enfriar la solución y aforar con agua destilada.
7. Filtrar la solución en un embudo con papel filtro No. 41. Descartar los primeros 5 - 10 mL de filtrado.

8. En un tubo de ensayo de 10 mL poner 4 mL de filtrado y agregar 4 mL de metanol. Agitar y centrifugar 10 minutos.
9. Tomar 4 mL del sobrenadante y agregar 2 mL de agua. Agitar.
10. Inyectar cinco veces la solución de riboflavina 0.12 µg/mL en las condiciones cromatográficas que se especifican a continuación.
11. Filtrar la solución del paso (9) con una membrana de 0.2 µm e inyectar.

Condiciones para el análisis de riboflavina en HPLC

Parámetro	Condición
Columna	Supelco – 5µ Reduced Activity C ₈ , 150mm x 4.5 I.D.
Fase móvil	Metanol:(5mM de hexanosulfonato de sodio, 0.13% de trietilamina y 1% de ácido acético en agua) (20:80 v/v)
Flujo	1.5 mL/min
Temperatura de la columna	40 °C
Detector	Fluorescencia: Filtro de excitación 7-60, 7-54 Filtro de emisión 3-73, 4-76
Volumen de inyección	100 µL
Velocidad del papel	1.0 cm/min
Atenuación	2

Cálculos

La concentración de riboflavina se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{Riboflavina (mg/100g)} = \frac{\text{Altura m.} * \text{C Est.}}{\text{Altura est.} * \text{R}} * \frac{\text{Vi}}{\text{Pm}} * \frac{\text{D}}{10}$$

Los parámetros de la ecuación son:

Parámetro	Significado	Valor
Altura m	Altura del pico de riboflavina en la muestra cm
Altura est.	Altura del pico de riboflavina en solución patrón cm
C Est.	Concentración de solución patrón de riboflavina	0.12 µg/mL
D	Dilución de la muestra	3
Vi	Volumen inicial	100
R	Recuperación	98%
Pm	Peso de la muestra g

Apéndice 3

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y MANIPULACIÓN EN EL LABORATORIO

Recolección

1. Tomar las muestras de pan aproximadamente a la hora en que se produce.
2. Verificar que la bolsa a utilizar se encuentre limpia y sin agujeros. De preferencia utilizar una bolsa Ziploc nueva.
3. Comprar 10 franceses o desabridos y 10 panes dulces o tostados y colocarlos, fríos, en bolsas separadas. Debe evitarse el ingreso de contaminantes y debe sacársele el aire a la bolsa previo a cerrarla.
4. Si las muestras están calientes, deben dejarse enfriar.
5. Asegurar el cierre de la bolsa, removiendo el aire.
6. Rotular la bolsa, con un marcador indeleble, con los siguientes datos: Nombre del recolector, lugar y fecha, hora de recolección, nombre de la panadería, cabecera y departamento, y tipo de pan.
7. Colocar las bolsas con las muestras dentro de bolsas negras.
8. Cerrar la bolsa de empaque.
9. Si las muestras deben ser transportadas por largo tiempo, deben transportarse a bajas temperaturas y protegerse de la luz.

Manejo en el laboratorio

1. Pesar las muestras frescas en grupos de 5 panes. Siempre deben protegerse las muestras de la luz, y evitar su contacto prolongado con el aire.
2. Si no se preparan las muestras compuestas instantáneamente, las muestras deben congelarse.
3. Las muestras compuestas se preparan tomando un pan de cada muestra simple (de cada tipo de pan), hasta completar 15 de una cabecera o departamento.
4. Congelar las muestras compuestas.
5. Pesar las muestras compuestas y remover la humedad por medio de liofilización, 24 horas.
6. Remover las muestras del liofilizador y pesar nuevamente.
7. Moler las muestras en un mini-blender.
8. Homogeneizar las muestras molidas.
9. El polvo queda listo para analizarse.

Apéndice 4

PRUEBA DE BLANCOS DE MATRIZ USANDO HARINA NO FORTIFICADA

Como parte de la validación del método de determinación de riboflavina en harinas y productos de harinas, se hizo una prueba para determinar si se podía utilizar blancos de matriz en lugar de blancos de reactivos para calcular los límites de detección y cuantificación, y para obtener los rangos. Con este propósito se consiguió harina no fortificada (no contenía la mezcla de fortificación que incluye la riboflavina), y se hizo la siguiente prueba.

1. Se inyectaron 5 estándares de concentración conocida para hacer los cálculos.
2. Se inyectaron 2 blancos de reactivos; 3 muestras de blancos de matriz (harina de trigo sin fortificar), en duplicado; y, 2 muestras de harina de trigo fortificada, en duplicado.
3. Utilizando las concentraciones y alturas del estándar, se calcularon las concentraciones en las muestras y se calculó el porcentaje de recuperación correspondiente.

Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

Estándar de 0.12ppm	Altura (Hc)
1	4.8
2	4.6
3	4.9
4	4.4
5	5.0
Promedio	4.7
Desviación estándar	0.2
Coefficiente de variación	5.1

Concentraciones esperadas	
Harina de trigo sin fortificar	0.5 mg/kg
Harina de trigo	4 mg/kg

Muestra	Altura (Hc)	Concentración (mg/kg)	Exactitud (%)	Promedio	D.S.	C.V.
Blanco	0.0	0.0	100.0			
Blanco	0.0	0.0	100.0			
HTSF-1	2.3	1.7	349.4	329.1%	26.6%	8.1%

HTSF-1	2.1	1.6	319.0			
HTSF-2	2.4	1.8	364.6			
HTSF-2	1.9	1.4	288.6			
HTSF-3	2.1	1.6	319.0			
HTSF-3	2.2	1.7	334.2			
HT-1	5.6	4.3	106.3	104.0%	1.8%	1.7%
HT-1	5.4	4.1	102.5			
HT-2	5.5	4.2	104.4			
HT-2	5.4	4.1	102.5			

Los resultados obtenidos muestran que la harina posee riboflavina intrínseca, lo que hace complicado el uso de la misma como blanco de matriz. Además, es posible observar que las concentraciones de riboflavina intrínseca en la harina de trigo no son constantes, varían según la muestra, y la variación es significativa. El uso de un blanco de matriz para efectos de validación no es adecuado, debido a que las concentraciones de riboflavina intrínseca van a variar con una serie de factores imposibles de normalizar. Por lo tanto, puede verificarse utilizando estos datos y el cromatograma de la Figura 9, que en este caso, es perfectamente válido utilizar blancos de reactivos en lugar de blancos de matriz.

Apéndice 5

RESUMEN DE LA ENCUESTA NACIONAL DE CONSUMO APARENTE DE PAN EN GUATEMALA

Departamento	Porcentaje de población	Consumo de pan (gramos/día/ <i>per capita</i>)			
		Pan francés	Pan dulce	Pasta	Total
Guatemala	21.8	52	42	25	119
Izabal	3	35	38	11	84
Chimaltenango	3.7	27	26	22	75
Sacatepéquez	2.1	27	26	22	75
El Progreso	1.3	27	26	22	75
Escuintla	4.6	24	25	21	70
Suchitepéquez	3.7	24	25	21	70
Santa Rosa	3	24	25	21	70
Retalhuleu	2.3	24	25	21	70
Jutiapa	3.7	19	32	14	65
Chiquimula	2.8	19	32	14	65
Jalapa	2.4	19	32	14	65
Zacapa	1.9	19	32	14	65
Alta Verapaz	6.5	8	15	19	42
Quiché	5.3	8	15	19	42
Baja Verapaz	1.9	8	15	19	42
San Marcos	7.7	7	21	19	47
Huehuetenango	7.6	7	21	19	47
Quetzaltenango	6	7	21	19	47
Totonicapán	3.3	7	21	19	47
Sololá	2.7	7	21	19	47

Instituto Nacional de Estadística (INE). 1991. Encuesta Nacional de Consumo Aparente de Alimentos. Comité de Acción de Apoyo al Desarrollo Económico y Social de Centroamérica y la Secretaría de Planificación Económica. Guatemala, 1992.

INE. 1996. Censo de Población, 1994. Guatemala.

Apéndice 6

CERTIFICADO VMA – 399, ESTÁNDAR PARA CEREALES

AACC Standard Reference Sample VMA 399*					
Ensayo	Promedio **	No. Análisis	Desviación estándar	Coefficiente variación(%)	Rango
Humedad, %	2.73	23	0.53	19.4	1.50–3.71
Grasa, % Extracto de éter posterior a hidrólisis ácida	4.34	33	0.44	10.1	3.55–5.20
Grasa, % Extracto de éter	1.63	15	0.17	10.4	1.23–1.93
Cenizas, %	3.651	23	0.064	1.8	3.550–3.800
Proteína, % (Nx6.25)	8.40	22	0.20	2.4	7.86–8.72
Vitamina A, IU/100g	556.4***	19	147.3	26.5	265.1–813.6
Vitamina C, IU/100g	75.74	20	6.72	8.9	62.70–88.40
Tiamina, mg/100g	6.93	14	0.70	10.1	6.06–8.28
Riboflavina, mg/100g	5.97	16	0.79	13.2	4.89–7.60
Niacina, mg/100g	74.96	11	6.54	8.7	66.74–82.20
Vitamina B6, mg/100g	8.50	11	0.94	11.1	7.30–10.05
Vitamina B12, µg/100g	21.20	10	4.25	20.1	12.19–25.00
Acido fólico, mg/100g	1.395	9	0.143	10.3	1.160–1.620
Acido pantoténico, mg/100g	37.35	9	3.25	8.7	31.01–41.90
Hierro, mg/100g	56.8***	19	21.0	37.0	3.5–92.2
Calcio, mg/100g	415.3	19	22.1	5.3	394.0–481.0
Magnesio, mg/100g	88.7	16	5.5	6.2	74.0–100.2
Cinc, mg/100g	56.5	19	2.9	5.1	50.0–61.0
Cobre, mg/100g	0.282	14	0.055	19.5	0.158–0.390
Fósforo, mg/100g	320.1	18	12.7	4.0	301.0–356.0
Potasio, mg/100g	293.6	18	16.4	5.6	254.0–356.0
Manganeso, mg/100g	1.78	18	0.13	7.3	1.59–2.01
Sodio, %/100g	0.656	18	0.033	5.0	0.560–0.702

* VMA 399 es un cereal molido fortificado listo para ingerirse

** Los promedios se calculan después de eliminar los valores extremos según Grubbs, F.E. 1969. Technometrics. 11(1): 4, Tabla 1

*** Estos datos no califican dentro de nuestro criterio para un estándar de referencia analítico, pero se incluyen acá para lo que pueda serle útil al usuario de esta muestra.

Apéndice 7

PORCENTAJE DE HARINA EN EL PAN FRANCÉS Y DULCE DE GUATEMALA

Ingrediente	Peso de cada ingrediente en el pan (onzas)	
	Pan francés	Pan dulce
Harina de trigo	32	32
Levadura	0.5	-
Manteca	2	2
Agua o leche	8	8
Royal	-	0.5
Azúcar	-	7
Peso total (onzas)	42.5	49.5
% peso de harina	75.3%	64.6%
Concentración esperada de riboflavina en el pan (mg/100g)	0.3012	0.2584