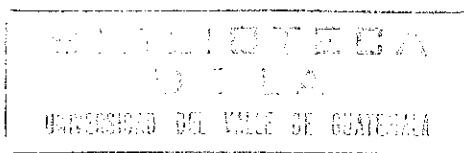


UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DEL RETINOL
EN LA GALLETA NUTRICIONALMENTE MEJORADA

MONICA SIOMARA GUAMUCH CASTAÑEDA



Guatemala

1995

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DEL RETINOL
EN LA GALLETA NUTRICIONALMENTE MEJORADA

MONICA SIOMARA GUAMUCH CASTAÑEDA

Trabajo de graduación para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica

Guatemala

1995

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DEL RETINOL
EN LA GALLETA NUTRICIONALMENTE MEJORADA

A mis padres,
Luis Felipe Guamuch Aguirre y
Thelma Dalila Castañeda de Guamuch
con amor y gratitud

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi asesor, Dr. Omar Dary por la oportunidad que me brindó de trabajar con él en la realización de esta tesis, por su ejemplo, apoyo, paciencia y enseñanzas.

A las siguientes personas por la ayuda que me proporcionaron:

Ing. Leonardo de León

Lic. Roberto Benavides

Dr. Ricardo Sibrián

Sr. Rubén de la Cruz

Lic. Maynor Ordóñez

Al personal del Laboratorio de Química y Bioquímica, por su incondicional apoyo y cariño.

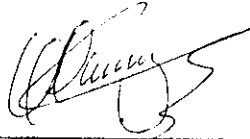
A todas las personas que colaboraron para la realización de este trabajo.

Vo. Bo.

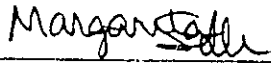


Dr. Omar Dary Mansilla
Asesor

Tribunal



Dr. Omar Dary Mansilla
Asesor



Licda. Margarita Selle



Dr. Alvaro Molina Cruz

RESUMEN

Por medio de este trabajo se logró implementar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de retinol en harina y galleta nutricionalmente mejorada. Este método servirá para el control de calidad de la fortificación de estos alimentos con vitamina A. El método demostró ser preciso, exacto y específico para análisis de retinol en harina y galletas fortificadas. Además, tiene la ventaja de que no requiere de solventes orgánicos para la extracción de retinol, ya que se usa un cartucho Sep-Pak con una resina de 18 carbonos.

También se realizó el estudio de estabilidad del retinol en la galleta nutricionalmente mejorada, encontrándose que el porcentaje de pérdida de retinol durante el proceso de horneado fue de $(9 \pm 2)\%$. Al final de la vida de anaquel de la galleta (45 días), ésta retiene el 77% de su contenido inicial de retinol. Actualmente, la galleta nutricionalmente mejorada tiene en promedio 633 equivalentes de retinol, lo que representa el 160% de la recomendación diaria para niños en edad escolar según FAO/OMS. De acuerdo a los resultados y razonamientos de este trabajo, se recomienda que se disminuya el nivel de fortificación, de modo que la galleta proporcione el 50% de la recomendación diaria. En conclusión, la galleta es un buen vehículo para la fortificación con vitamina A, ya que su costo es mínimo y la estabilidad del nutriente durante la producción y almacenamiento son compatibles con lo esperado.

CONTENIDO

	Páginas
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
A. El retinol	3
1. Aspectos generales	3
2. Estabilidad	8
B. Fortificación de alimentos con retinol	9
1. Condiciones para fortificar alimentos	9
2. Alimentos fortificados con retinol en Guatemala ..	11
a. Azúcar	11
b. Harina	11
c. Galleta nutricionalmente mejorada	12
C. Estabilidad del retinol en alimentos fortificados	13
1. Efectos del proceso térmico	14
2. Estabilidad del retinol durante el almacenamiento de alimentos procesados	16
D. Método de determinación de retinol por cromatografía líquida de alta resolución	17
1. Saponificación y extracción	17
2. Cromatografía	18
3. Estabilidad del retinol durante el análisis	18
III. JUSTIFICACION	19
IV. OBJETIVOS	21
V. HIPOTESIS	23
VI. TRABAJO EXPERIMENTAL	25
A. Materiales y métodos	25
B. Montaje del método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	27
1. Elección de la composición de la fase móvil	28
2. Capacidad máxima del cartucho Sep-pak-1cc Vac ..	28
3. Lavado de los cartuchos Sep-pak-1cc Vac	28

C.	Validación del método para análisis de retinol por cromatografía líquida de alta resolución	29
1.	Precisión (Variación intraensayo)	29
2.	Exactitud	30
a.	Harina	30
b.	Galleta nutricionalmente mejorada	31
3.	Linealidad y rango	31
4.	Límites de detección y cuantificación	32
D.	Pérdida de retinol durante el proceso y durante el almacenamiento en la galleta nutricionalmente mejorada	32
1.	Análisis de materia prima	33
2.	Galleta nutricionalmente mejorada	34
VII.	RESULTADOS	35
A.	Montaje del método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	35
1.	Elección de la composición de la fase móvil	35
2.	Capacidad máxima del cartucho Sep-Pak-Vac-1cc	35
3.	Selección de solución de lavado de los cartuchos Sep-pak-1cc Vac	35
B.	Validación del método	39
1.	Precisión	39
2.	Porcentaje de recuperación	40
3.	Linealidad y rango	40
4.	Límite de detección y cuantificación	41
C.	Pérdida de Retinol Durante el Proceso y Almacenamiento en la Galleta Nutricionalmente Mejorada	42
VIII.	DISCUSION	45
IX.	CONCLUSIONES	49
X.	RECOMENDACIONES	51
XI.	BIBLIOGRAFIA	53

	x
CUADROS	57
ILUSTRACIONES	67
ANEXOS	79
A Formulación y preparación de la galleta nutricionalmente mejorada	81
B Determinación por HPLC de retinol en alimentos fortificados con palmitato de retinol	83
C Determinación de humedad de la galleta	93
D Determinación espectrofotométrica de palmitato de retinol en azúcar fortificada	95
E Ecuaciones para pruebas estadísticas	101

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
II-1	Actividad biológica relativa de los isómeros del retinol 5
II-2	Composición y valor nutritivo de la galleta nutritiva 13
VI-1	Diagrama general del diseño experimental para la galleta nutricionalmente mejorada 33
VII-1	Capacidad de retención del cartucho Sep-Pak para el retinol obtenido de una muestra de harina fortificada usando diferentes volúmenes . . . 36
VII-2	Análisis del eluato de los cartuchos Sep-Pak luego de lavarlos con diferentes mezclas de solventes 38
VII-3	Pérdida de retinol en la galleta nutricionalmente mejorada durante el horneo 43
VII-4	Estabilidad de retinol en la galleta nutricionalmente mejorada a diferentes tiempos de almacenamiento 44
1	Resolución entre los picos de retinol y acetato de retinol en diferentes fases móviles 59
2	Variación intraensayo de la determinación de retinol en harina . . . 60
3	Variación intraensayo de la determinación de retinol en galleta . . . 61
4	Porcentaje de recuperación del método para determinación de retinol en muestras de harina y galleta 62
5	Concentraciones de retinol ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y respuesta obtenida 63
6	Valores de las regresiones calculadas 64

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura		Página
II-1	Estructura de la vitamina A (todo- <i>trans</i> retinol)	
II-2	Estructuras de retinal, ácido retinóico, palmitato de retinol y acetato de retinol	4
II-3	Estructuras de β -caroteno y α -criptoxantina, precursores carotenoides importantes del retinol	4
II-4	Estructuras de antioxidantes usados para aumentar la estabilidad del retinol	9
1	Cromatogramas de la solución patrón de retinol y acetato de retinol	69
2	Cromatogramas de la solución de desecho que contiene los compuestos que no fueron retenidos al pasar por el cartucho.	70
3	Cromatogramas de la solución de desecho resultante al cargar el cartucho con 1 mL de muestra	71
4	Comparación de los cromatogramas obtenidos de una muestra de harina con dos tratamientos diferentes.	72
5	Cromatograma de la solución de desecho, luego de lavar el cartucho Sep-Pak con una solución de acetonitrilo:agua (30:70, v/v)	73
6	Recta de regresión; respuesta vrs. concentración de retinol por HPLC	74
7	Cromatogramas de una muestra de harina sin fortificar (blanco de matriz) y blanco de reactivos	75
8	Límites de detección y cuantificación de retinol por el método HPLC	76
9	Intervalos de confianza para la comparación de medias de retinol en la galleta nutricionalmente mejorada durante su vida de anaquel	76
10	Cromatograma de una muestra de galleta nutricionalmente mejorada	77

I. INTRODUCCION

Desde que se advirtió que existía deficiencia de vitamina A en la población guatemalteca, se han tomado medidas para tratar de eliminar o disminuir su deficiencia. La estrategia de mayor cobertura e impacto ha sido la fortificación del azúcar con palmitato de retinol, ya que es un vehículo adecuado y económico para suministrar este nutriente.

A nivel escolar, se distribuye la galleta nutricionalmente mejorada, que no sólo proporciona al niño energía y proteína de alta calidad, sino que también su composición se ha modificado para incluir vitamina A. Sin embargo, por la falta de un método analítico con el cual se pudiera determinar el contenido de retinol de la galleta y el harina fortificada utilizada en su preparación, la cantidad de retinol a agregar se estimó solamente mediante cálculos teóricos. Se asumió que existía una pérdida del 10% durante el proceso de horneado y 15% durante la vida de anaquel.

Con la realización de este trabajo, se ha logrado desarrollar un método analítico para la determinación de retinol en las galletas y en el harina de maíz y soya, contribuyendo así con una herramienta fundamental para el control de calidad. Se estableció la pérdida real de retinol durante el horneado y durante el período de almacenamiento de las galletas. En estos estudios se encontró que se pierde el 9% de retinol durante el horneado, y el 23% después del tiempo de anaquel (45 días) de la galleta. Con base en los resultados obtenidos, se sugiere que al final de la vida de anaquel de la galleta, el nivel de fortificación de ésta sea del 50% de la recomendación de la FAO/OMS como ingesta diaria para niños (200 ER). Para esto, el harina de maíz y soya debe contener 42 μg de retinol/g para que la galleta tenga 260 μg de retinol/galleta luego del proceso de horneado.

II. ANTECEDENTES

A. El retinol

1. Aspectos generales

Estructuralmente, el retinol consiste en un anillo de β -ionona con dos unidades isoprenoides con configuración todo-trans y un grupo hidroxilo al final de la cadena (Fig.II-1).

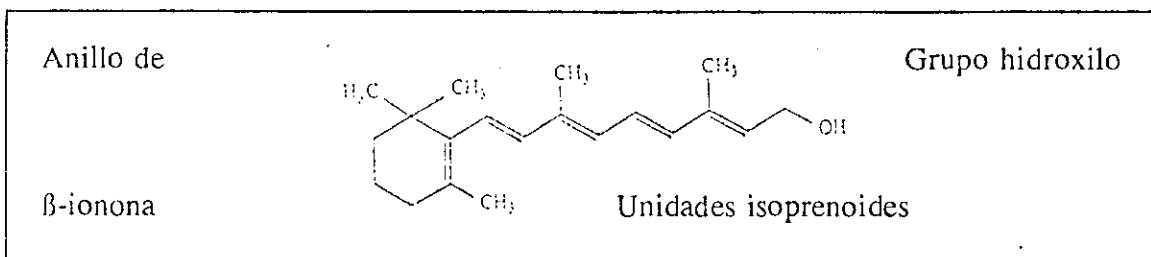


Figura II-1. Estructura de la vitamina A (todo-trans-retinol).

El concepto de vitamina A incluye compuestos relacionados al todo-trans retinol, así como sus precursores carotenoides. Entre los primeros se encuentra el aldehído (retinal), el ácido (ácido retinóico), y los ésteres del retinol, principalmente con ácido palmítico o acético. (Fig. II-2). Entre los carotenoides precursores del retinol se encuentran el β -caroteno, α -caroteno, la α -criptoxantina y β -criptoxantina; de los cuales se muestran algunas estructuras en la Fig. II-3 (Aurand *et al.*, 1987; Olson, 1990).

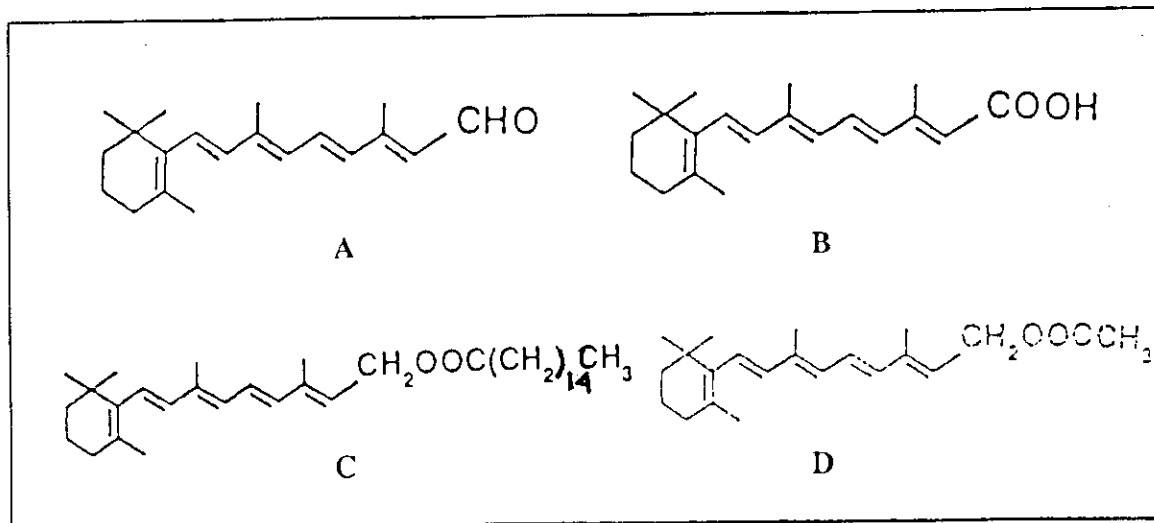


Figura II-2. Estructuras de: A. retinal, B. ácido retinóico, C. palmitato de retinol, D. acetato de retinol (Olson, 1990).

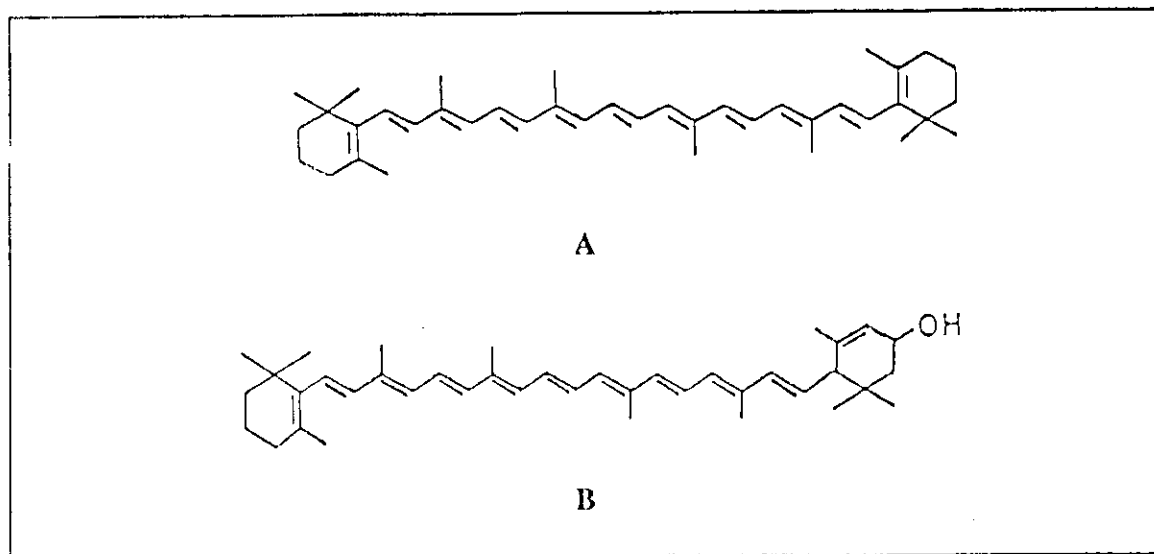


Figura II-3. Estructuras de: A. β -caroteno, B. α -criptoxantina, carotenoides precursores importantes del retinol.

El retinol cristalino forma prismas de color amarillo pálido. El retinol y sus derivados son solubles en grasa y en la mayoría de solventes orgánicos, pero son insolubles en soluciones acuosas (Aurand *et al.*, 1987). La absorción de radiación por el retinol en solventes orgánicos es mayor en el rango de 325 - 335 nm y todos los compuestos presentan fluorescencia natural (333 - 470 nm) (Speek, 1989).

El isómero todo-*trans* del retinol es el que tiene la actividad biológica más alta (Cuadro II-1).

Cuadro II-1
Actividad biológica relativa de los isómeros del retinol

Isómero Retinol	Porcentaje de actividad relativa
Todo- <i>trans</i>	100
13- <i>cis</i>	75
9- <i>cis</i>	21
9,13-di- <i>cis</i>	24
11- <i>cis</i>	24
11,13-di- <i>cis</i>	15

(Ames, 1966)

El retinol participa en el proceso de la visión y es esencial para el mantenimiento de la integridad de los tejidos epiteliales del cuerpo. Es necesario para la reproducción, el crecimiento normal y el desarrollo y está involucrado en el crecimiento de los huesos, en particular en la actividad de los osteoblastos (Olson, 1990).

Las fuentes alimentarias comunes de retinol y sus derivados son de origen animal, principalmente el hígado, la leche, el queso, la mantequilla, y el pescado como sardinas

y atún (Olson, 1990). Se consideran también buenas fuentes de vitamina A las frutas amarillas, tales como la zanahoria, el camote, el melocotón, el güicoy, el melón, la papaya y las hortalizas de hojas verdes como el brócoli y otros, ya que contienen carotenoides precursores de vitamina A (Aurand *et al.*, 1987).

La ingesta diaria recomendada para vitamina A es de 350 ER (Equivalentes de Retinol)¹ para infantes, 400 para niños, 600 para hombres adultos y 500 para mujeres adultas. La ingesta diaria recomendada durante el embarazo y la lactancia es de 600 ER y 850, respectivamente (FAO/OMS, 1991).

La deficiencia de vitamina A es un problema de salud pública en muchas áreas de países en desarrollo. Se ha estimado que 500,000 niños en edad pre-escolar quedan ciegos cada año debido a la deficiencia de vitamina A (Olson, 1990). Una deficiencia en vitamina A provoca poca visibilidad en luz tenue y prolonga el período de recuperación visual después de recibir estímulo momentáneo de luz intensa. Esta condición se conoce como ceguera nocturna. En estados más avanzados de deficiencia de vitamina A, las membranas mucosas pierden su poder de secreción de glicoproteínas, las que producen la lubricación de las mucosas. En el ojo, los párpados se inflaman y siguen infecciones secundarias. En el caso de la conjuntiva del ojo, se produce lo que se conoce comúnmente como xeroftalmía, que significa "resequedad de los ojos" (Aurand *et al.*, 1987). En los casos más graves hay perforación del ojo, y por lo tanto ceguera permanente (Olson, 1990). También se alteran los mecanismos inmunitarios, se reduce la síntesis de anticuerpos y se producen alteraciones en la inmunidad celular. La pérdida de los cilios epiteliales y las secreciones mucosas, favorece la penetración de microorganismos en el tejido de los aparatos digestivo y respiratorio (McLaren *et al.*, 1983).

¹ Un equivalente de retinol (ER) = 1.0 µg de retinol

Los indicadores clínicos más usados para determinar la deficiencia de vitamina A es la presencia de manchas de Bitot en los niños. Estas son acumulaciones blancas esponjosas de células muertas de la conjuntiva que usualmente aparecen en el cuadrante temporal del ojo (Olson, 1990).

La ingesta excesiva de retinol puede producir intoxicación. La toxicidad aguda es causada por el suministro de una o más dosis, poco espaciadas, de retinol en concentraciones grandes, usualmente mayor de 100 veces la ingesta recomendada para adultos y niños. Los primeros signos de toxicidad incluyen náusea, vómitos, dolor de cabeza, vértigo, visión borrosa, incoordinación muscular. Estos signos son transitorios y desaparecen en algunos días. Cuando la dosis es muy grande, sigue una segunda fase caracterizada por somnolencia, falta de apetito, inactividad física, picazón, exfoliación de la piel y vómitos. La toxicidad crónica, que es más común que la aguda, es inducida por ingestiones recurrentes en un período de semanas a años, de dosis excesivas de retinol que son usualmente mayores de diez veces la ingesta recomendada. Los efectos más graves de la ingesta elevada de retinol son las malformaciones congénitas. La toxicidad teratogénica se caracteriza por resorción fetal, aborto, defectos de nacimiento e incapacidades permanentes de aprendizaje. Se ha observado que las drogas implicadas en producir teratogenicidad en seres humanos son acutano (ácido 13-*cis*-retinóico) y etretinato, un análogo aromático del éster etílico del ácido todo-*trans* retinóico. El acutano ingerido al inicio del embarazo, en dosis de 30-90 mg/día produce una alta incidencia en abortos y una serie de defectos de nacimiento. Para evitar este tipo de toxicidad, la Sociedad de Teratología de los Estados Unidos recomienda que las mujeres en edad fértil limiten su consumo diario total de retinol, incluyendo alimentos y suplementos, a menos de 3000 ER, prefiriéndose que los suplementos sean en forma de carotenoides provitamina A (Olson, 1990).

2. Estabilidad

El retinol es más estable en una atmósfera inerte, es decir en ausencia de oxígeno, y a pH neutro o básico (Harris, 1988). En una atmósfera inerte es estable al calor; pero sensible a la acción de la luz, especialmente a la radiación ultravioleta (Aurand *et al.*, 1987). Debido a la presencia de cinco dobles enlaces conjugados en la estructura del retinol, éste es susceptible a oxidación, por lo que es inestable en la presencia de oxígeno o aire (Harris, 1988), acelerándose su descomposición en presencia de iones metálicos (DeRitter, 1976) tales como cobre y hierro, que catalizan procesos oxidativos (Bender, 1978). Aparentemente, los dobles enlaces en el anillo de la β -ionona se oxidan primero a epóxidos, reduciéndose así su actividad vitamínica (Cort, 1988).

Generalmente, se usan antioxidantes para estabilizar el retinol agregado a los alimentos. Los antioxidantes más usados son 3,5-bis(t-butil)-4-hidroxi-tolueno (BHT), 3,5-bis(t-butil)-4-hidroxi-anisol (BHA), α -tocoferol (vitamina E) y ácido ascórbico (Fig. II-4). Este último reduce el hierro (III) a hierro (II) y cobre (II) a cobre (I), protegiendo contra las reacciones que promueven estos iones metálicos, tales como el rompimiento de tocoferoles y los antioxidantes fenólicos mencionados anteriormente (Cort, 1988).

En general, los antioxidantes se mezclan con el palmitato de retinol, el cual es homogenizado con gelatina para la preparación de microcápsulas. La gelatina actúa como una barrera impermeable para evitar la oxidación (Cort, 1988). Usualmente, las microcápsulas también son protegidas por el uso de antioxidantes, siendo uno de los más utilizados el Ronoxán A de Hoffmann-La Roche. Este está compuesto por di- α -tocoferol (50 mg/g), palmitato de ascorbilo (250 mg/g) y lecitina (700 mg/g) (Pineda, 1989). En experimentos realizados sobre la estabilidad de retinol como acetato, en presencia de Ronoxán A y sus componentes en forma individual, se encontró que el Ronoxán A tuvo el mejor efecto estabilizador (Blatná *et al.*, 1982).

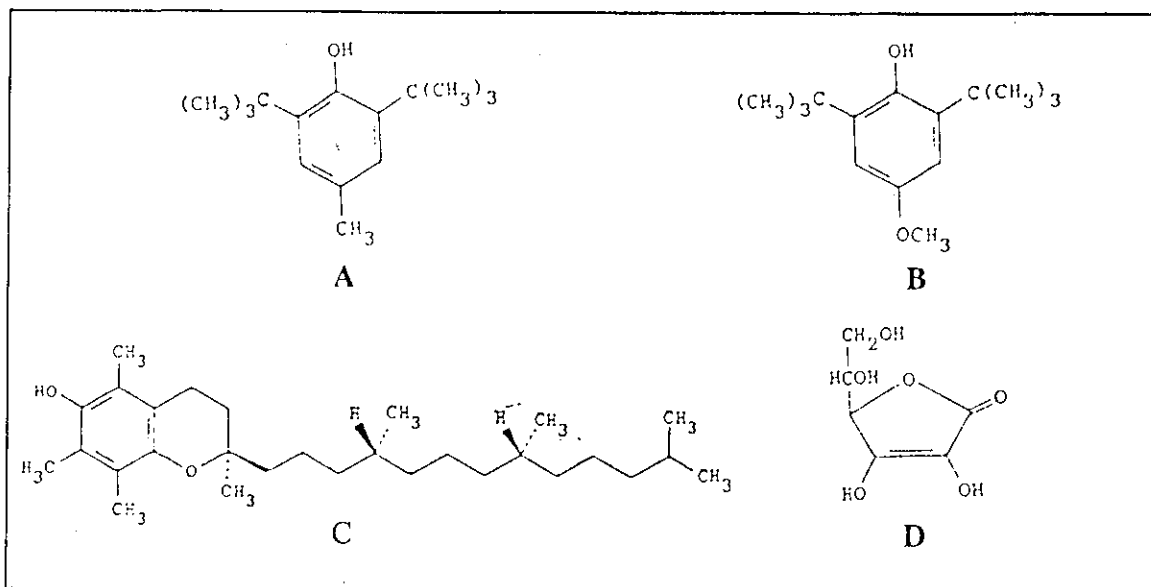


Figura II-4. Estructuras de antioxidantes usados para aumentar la estabilidad del retinol. A. BHT; B. BHA; C. α -tocoferol; y D. ácido ascórbico.

B. Fortificación de alimentos con retinol

1. Condiciones para fortificar alimentos

La fortificación de los alimentos con retinol se define como la adición de retinol a alimentos convencionales, usualmente procesados, para aumentar el consumo de este nutriente mediante estos vehículos alimentarios (Arroyave *et al.*, 1989).

Los objetivos de la fortificación son:

- Aumentar la disponibilidad de retinol para que la misma cantidad de consumo del alimento vehículo proporcione un nivel tan cercano como sea posible a una meta nutricional específica, por ejemplo la necesidad basal mínima.
- Mejorar la condición nutricional de la población en cuanto a retinol.

Para la fortificación con retinol es necesario escoger un vehículo con las siguientes características:

- que sea un alimento universalmente consumido por la población, especialmente por los individuos a mayor riesgo;
- que su consumo varíe poco de persona a persona y de día a día;
- que su incorporación al alimento vehículo no resulte en un cambio apreciable de sus características organolépticas; y
- que su precio y su naturaleza permitan el proceso de fortificación a costos razonables a escala industrial (INCAP, 1974).

Para el proceso de fortificación, el retinol se agrega como todo-*trans* palmitato o acetato de retinol, aunque también se ofrecen formas comerciales donde el éster de retinol se encuentra como una mezcla en equilibrio de los isómeros *cis-trans*. Ambos ésteres tienen una estabilidad mayor que el retinol libre. El acetato tiene propiedades similares a las del palmitato, excepto que es menos estable en presencia de humedad. Ambos compuestos están disponibles como soluciones oleosas, en emulsiones y en microcápsulas, cuya actividad está estandarizada. Las microcápsulas que son dispersables en agua, están formadas por emulsiones secas envueltas en una matriz con antioxidante (Borenstein, 1981). Aunque el retinol puro es susceptible al oxígeno, las preparaciones hidrodispersables que se usan para el proceso de fortificación, especialmente de azúcar, son formas especialmente diseñadas para enriquecimiento de alimentos y son mucho más estables al oxígeno y al calor (INCAP, 1974).

2. Alimentos fortificados con retinol en Guatemala

a. Azúcar

El nivel adecuado de fortificación de azúcar se determina tomando en cuenta el consumo de azúcar y el grado de deficiencia de retinol en la dieta. En Guatemala se propuso que el nivel de fortificación fuera de 50 Unidades Internacionales (U.I.²) por gramo de azúcar (15 ER de retinol/g). Se escogió el azúcar de mesa, que es del tipo blanco directo, centrifugada y lavada, por ser la más consumida por la población (INCAP, 1974).

La fuente de retinol para la fortificación del azúcar, es el palmitato de retinol en un microencapsulado de gelatina hidromiscible, llamado 250-CWS (CWS= "cold water soluble") de Hoffmann-La Roche. La metodología consiste en preparar una premezcla de azúcar, la cual contiene esta fuente de vitamina A, aceite vegetal -para adherir las microcápsulas con vitamina A a los cristales de azúcar y así evitar la segregación- y un antioxidante (Ronoxán A) para reducir la velocidad de oxidación del aceite (Pineda, 1989).

b. Harina

En Guatemala, el harina que se fortifica con retinol, está compuesta por maíz y soya, denominada Maisoy. Para la preparación del Maisoy, se utiliza harina

²1 U.I. = 0.3 μ g de retinol

de maíz degerminado, mientras que la soya se desgrasa y se prepara una torta para consumo humano. Luego de este proceso, el harina y la torta son extrusionadas y se enfrían. Al estar frías, se muelen y se mezclan. El harina compuesta debe contener 70% de maíz y 30% de soya. Se toma una parte del harina Maisoy para agregarle nutrientes esenciales, tales como palmitato de retinol en microcápsulas (Palmitato 500); vitaminas del complejo B y hierro elemental en partícula pequeña. Una vez preparada la mezcla, ésta se une a la parte restante de Maisoy en una mezcladora. Esta harina se pesa y se empaca en bolsas de papel Kraft³. Actualmente los niveles de fortificación por 100 g de harina son: 105 mg hierro; 9,555 ER (8,505-12,185 ER); 11 mg de tiamina; 11 mg de riboflavina; y 109 mg de niacina. El harina debe tener una humedad máxima de 12%, 17-18% de proteína, y antioxidante BHA y BHT (DIGEPA, 1992).

c. Galleta nutricionalmente mejorada

La galleta nutricionalmente mejorada fue creada por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) y está echa de una mezcla de harina compuesta de maíz y soya (Maisoy), fortificada con vitamina A, hierro y vitaminas del complejo B; harina de trigo, y otros ingredientes propios de la galletería como azúcar, manteca, sal, polvo de hornear, saborizantes y agua (INCAP, 1989). El cuadro II-2 muestra la composición de la galleta nutricionalmente mejorada.

³ De León, L. (INCAP), Nota técnica.

Cuadro II-2

Composición y valor nutritivo de la galleta nutritiva³

Componente	Cantidad ^a
Peso	28 g, mínimo
Humedad	1.4 g, máximo
Proteína	2.0 g, mínimo
Calorías	140 kcal, mínimo
Lisina disponible	215-250 mg/g N
Hierro	7.5 mg, mínimo
Vitamina A	525 µg, mínimo
Tiamina	0.5 mg, mínimo
Riboflavina	0.6 mg, mínimo
Niacina	6.5 mg, mínimo
Calidad proteínica	> 80% de la calidad proteínica de la leche

^a Expresado con base en una galleta de 28 gramos, excepto la cantidad de lisina disponible.

La fortificación con vitamina A de la galleta nutricionalmente mejorada, se inició con el propósito de proporcionar por lo menos el 75% de la recomendación diaria de vitamina A a niños en edad escolar, al final de la vida media de consumo de la galleta, que se estima es de 45 días. Se tomó como referencia 700 ER como recomendación diaria para niños de Estados Unidos de América³.

Con base en la formulación de la galleta descrita en el anexo A y calculando que durante el proceso hay un rendimiento del 95%, se calculó que cada galleta debería tener 600 µg de retinol. Según las normas de la Dirección General de Proyectos de Apoyo

(DIGEPA), una galleta debe tener 600 μg de retinol al final del horneo. Además se asumió la pérdida del 15% del retinol proveniente de la harina durante el almacenamiento. Por lo tanto, al consumir una galleta al final de la vida de anaquel, la galleta aún proporcionaría al niño cerca del 75% de la recomendación diaria de los Estados Unidos de América. Los cálculos anteriores no consideran el aporte de retinol del azúcar fortificada (15 $\mu\text{g}/\text{g}$), que podría ser tan alto como 113 μg al final del horneo. Esto significa que una sola galleta contendría 713 μg de retinol, que es superior a la recomendación diaria de los Estados Unidos, y 1.78 veces la recomendación de FAO/OMS de este nutriente para niños en edad escolar.

C. Estabilidad del retinol en alimentos fortificados

1. Efectos del proceso térmico

El proceso térmico es uno de los métodos más importantes para extender la vida de los alimentos durante el almacenamiento. Sin embargo, este proceso tiene un efecto negativo en algunos nutrientes debido a que puede ocasionar su degradación (Lund, 1988).

Durante el horneo ocurren pérdidas de nutrientes. Este efecto adverso se observa mayormente en las porciones externas (concha) del producto debido a que, a diferencia de las porciones interiores de la mayoría de alimentos horneados, éstas alcanzan las temperaturas del horno y están más expuestas al oxígeno del aire (Ranhotra y Bock, 1988). Al medir la cantidad de vitamina A retenida durante el horneo de pan blanco, se encontró que la cantidad de vitamina A de la concha del pan era 1% menor a la encontrada en la miga (interior) (Parrish *et al.*, 1980). Entre otros factores que influyen en la estabilidad de los nutrientes durante el horneo se encuentran: el pH, el tiempo de horneo, la humedad, la luz, el oxígeno y la presencia de metales, oxidantes, enzimas y posiblemente ciertos aditivos (Ranhotra y Bock, 1988). En alimentos líquidos o semi-

líquidos a pH igual o menor de 4, el retinol puede hidrolizarse e isomerizarse a las formas *cis*, que son menos bioactivas (Cort, 1988).

Con respecto a la pérdida de vitaminas liposolubles, se cree que el proceso de horneado probablemente ejerce un efecto adverso mínimo; aunque se conoce que el rompimiento entre los enlaces de la grasa causa oxidación de la vitamina E (Ranhotra y Bock, 1988). Esto se confirma al encontrarse que en un pan blanco fortificado con microcápsulas de palmitato de retinol, la vitamina A mostró una estabilidad del 90-100% luego del horneado (Ranum *et al.*, 1981), resultado similar al encontrado por Rubin *et al.* (1977) que encontró pérdidas del 5%. En un experimento en donde se midieron las pérdidas de vitaminas liposolubles en galletas tipo "Graham", se encontró que las pérdidas promedio de retinol fueron de 18.0% y las pérdidas máximas fueron de 24.8% (Ranhotra y Bock, 1988).

Rubin *et al.* (1977) y Cort *et al.* (1976), realizaron experimentos donde fortificaron harina con dos diferentes premezclas (A y B), y luego las usaron para la preparación de pan. Ambas premezclas contenían vitamina A, vitaminas del complejo B y hierro, pero la premezcla B contenía además calcio y magnesio. Se observó que durante el proceso de horneado del pan, las pérdidas de vitamina A eran mayores en el pan preparado con harina fortificada con la premezcla B, que en el pan donde se usó el harina fortificada con la premezcla A. Con base en estos resultados, los investigadores concluyeron que se puede realizar la fortificación de harinas con vitaminas y hierro sin problemas de estabilidad, no así con calcio y magnesio que pueden afectar la estabilidad de las vitaminas.

2. Estabilidad del retinol durante el almacenamiento de alimentos procesados

La calidad nutricional de los alimentos depende de su contenido nutricional inmediatamente al final de su preparación y de las transformaciones sufridas durante su almacenamiento. Los cambios durante el almacenamiento dependen de factores ambientales y de la composición inicial del alimento. Algunos autores indican que bajo ciertas condiciones, los nutrientes agregados son menos estables que aquellos presentes naturalmente (Karel, 1979).

En el caso de productos donde el retinol puede degradarse por oxidación en el proceso de extrusión u otros, puede perder actividad más rápidamente durante el almacenamiento, debido a que los productos están más expuestos a la acción del oxígeno por su mayor área superficial una vez que se han expandido (Harper, 1988). En experimentos donde se almacenó harina de trigo fortificada con retinol, dentro de frascos de vidrio fuertemente cerrados y sellados con parafina, se obtuvo una buena estabilidad a temperatura ambiente por seis meses. Las muestras que fueron almacenadas a 45°C, tenían una actividad de retinol del 90%, después de cuatro meses. Se observó que el contenido de humedad es dañino para la estabilidad del retinol, por lo que durante la preparación de la premezcla para la fortificación, se controló la humedad al 13.5%. Según Cort *et al.* (1976), la vitamina A en harina de maíz fortificada con este micronutriente, se pierde solamente en un 10% durante seis meses almacenada a temperatura ambiente. En el pan preparado con harina de trigo fortificada con retinol, este nutriente se mantiene hasta por cinco días después de su preparación (Cort *et al.*, 1976). En otro caso se determinó que el pan blanco retenía 85-95% después de cinco días de almacenado (Borenstein, 1981), mientras que en otro experimento se encontró que en pan blanco, el retinol se retenía del 94-95% luego de cinco días de almacenamiento a temperatura ambiente (Parrish *et al.*, 1980).

D. Métodos de determinación de retinol por cromatografía líquida de alta resolución

Los métodos de análisis por cromatografía líquida de alta resolución son utilizados para determinar simultáneamente el todo-*trans* retinol y sus derivados (Speek, 1989). Sin embargo, previo a esta determinación, es necesario realizar una saponificación para liberar el retinol de la matriz donde se encuentra y realizar la hidrólisis de sus ésteres. Para obtener el retinol, se realiza una etapa de extracción, separándolo así de las sales de ácidos grasos, pigmentos u otras sustancias que interfieren en el análisis (Thompson, 1986).

1. Saponificación y extracción

Debido a que los ésteres de retinol tienen la misma actividad biológica molar que el retinol, las muestras de alimentos a menudo se saponifican para determinar la actividad del todo-*trans* retinol como concentración total del mismo. La saponificación consiste en una digestión alcalina que sirve para romper los ésteres de retinol, así como para liberarlo de la matriz estabilizadora (Speek, 1989), lo que no se podría realizar si solamente se usara una extracción con un solvente orgánico. Es importante resaltar que durante el proceso de saponificación no se produce isomerización del retinol, ni se dan pérdidas significativas de éste mientras se use un antioxidante (Thompson, 1986). Para métodos en cromatografía líquida de alta resolución, se ha usado la saponificación con hidróxido de potasio etanólico, refluendo a 80°C. Algunos métodos no saponifican o lo hacen en frío para disminuir las pérdidas de retinol que se podrían dar debido a la temperatura a la que se somete éste durante la saponificación (Tee y Lim, 1991).

Una vez realizada la hidrólisis alcalina, el retinol se separa de otros componentes del alimento, usando solventes orgánicos. Los solventes más usados son éter dietílico o hidrocarburos como hexano o éter de petróleo. Según el método de la Association of

Official Analytical Chemists (AOAC) de los Estados Unidos, para el análisis de alimentos se requiere una hidrólisis alcalina con hidróxido de potasio etanólico. El retinol se extrae con hexano y se realiza una cromatografía en columna (Thompson, 1986).

2. Cromatografía

Para el análisis cromatográfico de la muestra, se puede usar tanto fase normal como fase invertida. En el control oficial de alimentos se prefiere el uso de columnas de fase invertida, aunque en ella los isómeros del retinol no pueden separarse (Thompson, 1986). Para el análisis en fase invertida se usan fases móviles como metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, agua y mezclas de éstos. Previo a inyectar la muestra en el cromatógrafo, generalmente se evapora el disolvente usado para la extracción y el residuo se redisuelve en la fase móvil (Tee y Lim, 1991). Este paso también se utiliza para aumentar la concentración del retinol antes de la inyección (Thompson, 1986).

3. Estabilidad del retinol durante el análisis

En experimentos realizados sobre la cinética de la degradación del retinol en forma de éster de acetato en diversos sistemas de solventes, se encontró que su degradación es acelerada por exposición a la luz. La presencia de oxígeno en los diferentes sistemas de solventes, no afectó significativamente la velocidad de degradación del retinol. El contenido de agua del solvente influyó en la velocidad de degradación, ésta aumentó de cuatro a seis veces al utilizar etanol al 95%, en vez de etanol absoluto. Cuando se usó hexano como solvente, la cinética de degradación fue intermedia entre los resultados obtenidos con etanol absoluto y etanol al 95% (Paquette y Kanaan, 1985).

III. JUSTIFICACION

La galleta nutricionalmente mejorada ha sido propuesta por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) como un buen vehículo de micronutrientes, incluyendo la vitamina A, por lo que se ha estado fortificando con ella.

Debido a la falta de un método adecuado para la determinación de retinol en alimentos en el laboratorio del INCAP, no se ha podido llevar a cabo un control de calidad de este micronutriente en la galleta, desconociéndose la cantidad exacta de retinol que la galleta ha estado proporcionando a la población escolar. Por ende, uno de los propósitos al realizar este trabajo, ha sido implementar el método analítico para determinación de retinol y realizar este control. Otro de los propósitos fue determinar las pérdidas de retinol durante el proceso de horneado de la galleta nutricionalmente mejorada, así como su estabilidad durante su vida de anaquel (45 días).

Los resultados obtenidos sobre la pérdida de retinol durante el horneado y su estabilidad en el tiempo de almacenamiento, servirán para hacer los ajustes necesarios en la cantidad de retinol que se agrega a la harina de maíz y soya utilizada en la preparación de la galleta, de manera que por medio de ésta, los escolares reciban un porcentaje importante de la recomendación diaria de este nutriente.

IV. OBJETIVOS

A. Generales

- Evaluar la estabilidad del retinol durante el horneado y el almacenamiento de la galleta nutricionalmente mejorada.

B. Específicos

- Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para realizar la determinación cuantitativa de retinol en harina Maisoy y la galleta nutricionalmente mejorada.
- Determinar el porcentaje de pérdida de retinol, proveniente de harina de maíz y soya (Maisoy) y el azúcar, durante el proceso de horneado de la galleta.
- Determinar la estabilidad de retinol durante la vida de anaquel de la galleta nutricionalmente mejorada.

V. HIPOTESIS

- El retinol del azúcar y harina fortificada, usadas en la preparación de la galleta nutricionalmente mejorada, se pierde en un 10% durante el proceso de horneado.
- Durante la vida de anaquel de la galleta nutricionalmente mejorada (45 días), el retinol presente en la galleta luego de haber sido horneada se pierde en un 15%.

VI. TRABAJO EXPERIMENTAL

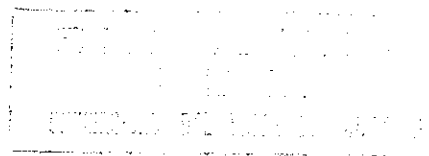
A. Materiales y Métodos

Los materiales y métodos usados en el trabajo se detallan en la sección de anexos.

El equipo utilizado fue el siguiente:

1. Espectrofotómetro UV-Visible, Varian Modelo 635

Fuente:	Ultravioleta-Deuterio Visible - Haluro de Tungsteno 50W
Doble haz	
Monocromador de rejilla Czerny-Turner	
Ancho de banda espectral:	0.5, 1.0 y 2.0 nm
Longitud de onda:	
Rango:	190 - 900 nm
Exactitud:	Mejor que ± 0.5 nm
Reproducibilidad:	Mejor que ± 0.25 nm
Exactitud fotométrica:	± 0.006 cerca de 1.0 A en el rango de 0.0 a 1.0
Reproducibilidad fotométrica:	± 0.003 A cerca de 1.0 A en el rango de 0.0 a 1.0.



2. Cromatógrafo líquido de alta resolución Varian Vista 5500**Bomba de pistón simple**

Velocidad de flujo:

Mínima:	0.01 mL/min
Máxima:	15 mL/min a 410 atm
Precisión:	$\pm 0.3 \%$ a 1.0 mL/min con acetona/agua a 68 atm
Exactitud:	$\pm 0.5 \%$ a 1.0 mL/min con metanol

Velocidad de purga: 10 mL/min con isopropanol a 136 atm

Precisión composicional: $\pm 0.1 \%$ absoluto a cualquier velocidad de flujo isocrático.Exactitud composicional: $\pm 0.5 \%$ absoluto a cualquier velocidad de flujo isocrático.Inyector Valco con un loop de 10 μL .**Detector UV-200 (UV-VIS longitud de onda variable)**

Longitud de onda:

Exactitud:	$\pm 1 \text{ nm UV, } \pm 2 \text{ nm visible}$
Reproducibilidad:	$\pm 0.1 \text{ nm}$
Rango:	190-700 nm

Sensibilidad al flujo: 2×10^{-4} ua a 240 nm para un cambio de flujo de 1 a 2 mL/min con agua.

Ancho de banda espectral: 5 nm (fijo)

Celda:

Volumen:	4.5 μL
Largo de paso:	4 mm

Autocero

Sistema procesador de datos DS-654

En el anexo B se encuentran las condiciones cromatográficas usadas para la determinación de retinol.

3. Columna para cromatografía líquida de alta resolución, Varian Micropak SP-18-5

Dimensiones	150 x 4.5 (D.I.) mm	
Tamaño de partícula	5 μ m	
Resina de empaque	Hidrocarburo de 18 carbonos (C ₁₈)	
Parámetro ^a	Calculado en base al pico de	
	Naftaleno	Antraceno
Platos teóricos/metro	49,839	42,561
Factor de capacidad (k')	4.69	11.78
Selectividad (α)	(Antraceno/Naftaleno) 2.51	

^a Calculados luego de inyectar 10 μ L de una solución de antraceno, naftaleno y resorcinol. Fase móvil: 55% acetonitrilo;45% agua, detector UV (254 nm), sensibilidad 0.2 ua/mV, flujo 1 mL/min, velocidad del papel 1 cm/min.

4. Sistema de vacío múltiple.

Con 16 posiciones para cartuchos Sep-pak. Waters, Millipore.

Usado con cartuchos Sep-Pak Vac 1cc, con 100 mg de material de empaque por cartucho.

B. Montaje del método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se tomó como base el método de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) donde se realiza una saponificación a temperatura de reflujo. Para extraer el retinol liberado se siguió el método utilizado por Dueker *et al.* (1993) por extracción en fase sólida, la cual consiste en la adsorción del retinol a una fase sólida de un hidrocarburo de 18 carbonos (C₁₈). Se utilizó acetato de retinol como patrón interno.

Se realizaron los siguientes experimentos, con las condiciones cromatográficas descritas en el anexo B, para encontrar las condiciones adecuadas para la determinación de retinol en cada alimento utilizado.

1. Elección de la composición de la fase móvil:

Se preparó una solución patrón de retinol y acetato de retinol de una concentración de 2.0 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente y se inyectó en el cromatógrafo en tres fases móviles distintas: 100 % metanol⁴, metanol:agua (97:3 v/v) y (95:5 v/v).

2. Capacidad máxima del cartucho Sep-pak-1cc Vac

Se utilizó una muestra de harina (Maisoy) fortificada con vitamina A (95.6 μg de retinol/g) y se saponificó según el procedimiento descrito en el anexo B. Por diferentes cartuchos se pasaron alícuotas de 10, 3, 2, y 1 mL respectivamente, recogiendo la solución que contenía los compuestos no retenidos en tubos de ensayo para inyectarlo en el cromatógrafo y así determinar si todo el retinol presente en la alícuota quedó retenido. Luego se eluyó el retinol con isopropanol absoluto y se inyectó en el cromatógrafo.

3. Lavado de los cartuchos Sep-pak-1cc Vac

Se tomó una muestra de harina fortificada, se saponificó, el retinol se extrajo de la matriz usando un cartucho y se eluyó de éste con isopropanol absoluto. En el paso de extracción en el cartucho, se tomaron varias alícuotas de muestra a las cuales se les dieron dos tratamientos.

⁴ Se escogió la fase móvil de 100% metanol con base en el artículo publicado por Collins y Chow (1984). A partir de esta fase móvil, se varió la composición de ésta, hasta obtener una buena resolución.

a. Tratamiento 1 (Muestra sin lavar)

Las alícuotas se pasaron por el cartucho y luego se eluyó el retinol con isopropanol absoluto.

b. Tratamiento 2 (Muestra lavada)

Se tomaron dos alícuotas de muestra por cada una de las soluciones de lavado listadas abajo. Se pasaron por el cartucho y se lavaron con la solución de lavado que les correspondía y por último, se eluyó con isopropanol absoluto.

- 3 mL de una solución etanol:agua (60:40 v/v)
- 1 mL de una solución acetonitrilo:agua (30% v/v)
- 1 mL de una solución acetonitrilo:agua (20% v/v)

El eluato obtenido al final se inyectó en el cromatógrafo en las condiciones indicadas en el anexo B.

C. Validación del método para determinación de retinol por cromatografía líquida de alta resolución

Luego que se montó la técnica, ésta se validó, determinando los siguientes parámetros: precisión, exactitud, linealidad, rango, límite de detección y cuantificación. Se usaron patrones de retinol, acetato de retinol y palmitato de retinol de la casa comercial Sigma, con 70%, 90%, 90% de pureza respectivamente.

1. Precisión (Variación intraensayo)

Se hizo el análisis de una misma muestra de seis a diez veces, en un mismo día, en tres muestras diferentes de una misma matriz (harina y galleta nutricionalmente mejorada). Se expresó la precisión como el coeficiente de variación (C.V.) o porcentaje de desviación estándar relativa.

$$C.V. = \frac{Desv. \text{ std.}}{\bar{X}} * 100$$

2. Exactitud

Esta se midió indirectamente mediante análisis de recuperación.

a. Harina

A una muestra blanco de harina, se le agregó una alícuota de una solución de palmitato de retinol para obtener una concentración de retinol de 96.0 $\mu\text{g/g}$. Además, se analizó una muestra blanco de harina agregándole etanol absoluto en un volumen igual al que contenía de palmitato de retinol. Este proceso se realizó en triplicado. Al obtener la concentración final, se calculó el porcentaje de recuperación del retinol con la fórmula:

$$\% \text{ Rec} = \frac{\text{Conc. obtenida}}{\text{Conc. basal} + \text{agregada}} * 100 \quad (\text{VI-2})$$

También se usó el método de adición de patrón, ya que además de obtener el porcentaje de recuperación del método, se obtiene la linealidad de éste, que cubre un rango amplio de concentraciones. En el método de adición de patrón se agregaron diferentes volúmenes de una solución patrón de retinol a una muestra de harina fortificada para obtener al final concentraciones de: 0.00, 0.40, 0.80, 1.19, 1.59 y 1.99 μg de retinol/mL. Se calculó una regresión de respuesta (razón Area de retinol/Area de acetato de retinol) multiplicado por la concentración de acetato de retinol en función de la concentración de retinol agregada. Para encontrar la concentración basal de retinol

entre la pendiente. Con la curva de calibración de retinol se calculó la concentración de retinol en cada una de las muestras, utilizando la respuesta obtenida. Al realizar una regresión entre la concentración obtenida en función de la concentración total (basal + agregada), se obtiene que la pendiente de la recta equivale al porcentaje de recuperación. El método de adición de patrón se realizó dos veces.

b. Galleta nutricionalmente mejorada

Se tomó una porción de una muestra de galleta nutricionalmente mejorada y se procesó según el procedimiento en el anexo B. A otra porción de esta misma muestra se le agregó una alícuota de una solución de palmitato de retinol para obtener una concentración final de retinol de $7.2 \mu\text{g/g}$, sin incluir la concentración basal. Se tomó como concentración basal, el resultado obtenido de la muestra sin agregarle palmitato de retinol. El proceso se realizó 2 veces.

El método de adición de patrón en la galleta nutricionalmente mejorada, se hizo de la misma forma que para harina, pero las concentraciones de retinol usadas fueron: 0.00, 0.20, 0.40, 0.79, 1.59, $2.38 \mu\text{g/mL}$. Este método se realizó tres veces.

3. Linealidad y Rango

Se realizó una curva de soluciones patrón de retinol con 12 puntos que corresponden a las siguientes concentraciones de retinol: 0.00, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 8.0, 10.0, 15.0 y $28.0 \mu\text{g/mL}$, con una concentración constante del patrón interno, acetato de retinol, de $2.25 \mu\text{g/mL}$. Se inyectó cada solución en duplicado y luego se calculó una regresión lineal de la razón de las áreas de retinol/acetato de retinol multiplicado por la concentración de acetato de retinol, en función de la concentración de retinol. Para encontrar el rango óptimo lineal de la recta, se calcularon varias regresiones tomándose puntos correspondientes a concentraciones crecientes de retinol.

4. Límites de Detección y Cuantificación

Se corrió una muestra blanco de harina, un blanco de reactivos y se prepararon soluciones patrón de retinol de 0.03, 0.05, 0.08, 0.10 y 0.20 $\mu\text{g/mL}$. Los blancos y las soluciones se inyectaron en el cromatógrafo con las condiciones cromatográficas del anexo B pero con una atenuación de 1 y sensibilidad de 0.005 ua/mV.

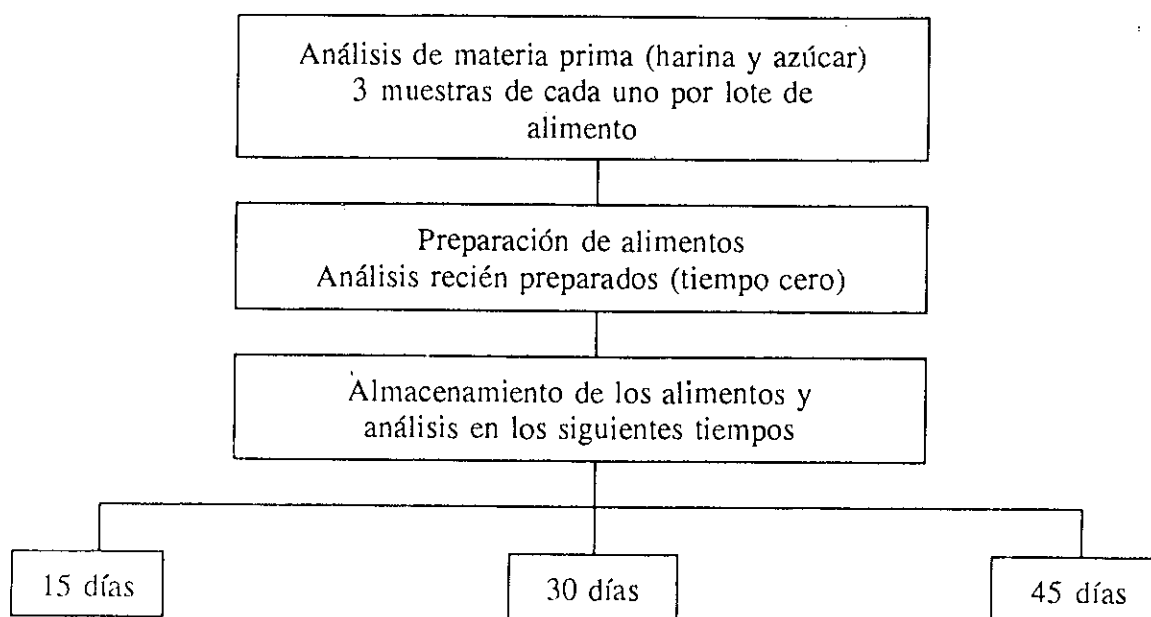
Se midió la altura de la señal del ruido de los blancos y la altura del pico de retinol en las soluciones patrón. Se calculó la razón de la altura del pico de retinol y la altura de la señal del ruido. En el caso del límite de cuantificación, también se calculó el coeficiente de variación entre las áreas de los picos de retinol de la solución inyectada.

D. Pérdida de retinol durante el proceso y durante el almacenamiento en la galleta nutricionalmente mejorada

Para la realización de este estudio se fabricaron en las instalaciones de INCAP tres lotes de galletas en días diferentes, conteniendo cada lote 80 galletas. Las galletas fueron preparadas según el proceso utilizado regularmente (Anexo C). Para cada lote se siguió el diseño experimental mostrado en el Cuadro VI-1.

Cuadro VI-1

Diagrama general del diseño experimental del estudio de pérdida de retinol durante el proceso y almacenamiento de la galleta nutricionalmente mejorada



1. Análisis de materia prima:

Antes de la preparación de los alimentos, se analizó la harina y el azúcar fortificada con retinol utilizados en la preparación de la galleta nutricionalmente mejorada para conocer la cantidad inicial de retinol.

Se tomaron tres muestras de azúcar de tres diferentes niveles de profundidad del saco, respecto de la abertura del mismo (arriba, en medio, fondo), las cuales fueron analizadas por el método detallado en el anexo E. Del saco de harina se tomaron tres muestras, las cuales fueron analizadas según el método del anexo B. Estas determinaciones se efectuaron cada vez que se hizo una preparación de galletas.

2. Galleta nutricionalmente mejorada

Recién preparadas las galletas, se muestrearon al azar 20 galletas por lote, las cuales fueron divididas en 5 submuestras (4 unidades de galleta en cada una). Cada uno de los cinco grupos de galleta fueron triturados y homogenizados independientemente, en una licuadora y luego analizados en duplicado.

Las galletas restantes, fueron almacenadas durante un período de tiempo de 15, 30 y 45 días, al final de los cuales se muestrearon y analizaron un grupo de 20 galletas como se indicó anteriormente. El almacenamiento se realizó bajo condiciones de temperatura (25°C) y humedad relativa (70-80 % de humedad) de la ciudad capital.

Para el estudio de estabilidad de retinol, se realizó la determinación de humedad de las muestras de galleta usando el procedimiento indicado en el Anexo D.

Experimentalmente, la cantidad de retinol al inicio del proceso de preparación de las galletas, se calculó a partir de los datos del análisis de la materia prima (harina Maisoy y azúcar). La cantidad de retinol encontrada se expresó en base al peso de harina Maisoy y azúcar que se utiliza en la preparación de 80 galletas, 568 y 681 g respectivamente. Todas las galletas preparadas se pesaron, y la cantidad de retinol se expresó como el total de retinol en el peso de todas las galletas. El porcentaje de retinol retenido durante el proceso se calculó dividiendo la cantidad de retinol encontrada en las galletas, entre la cantidad determinada en la materia prima, multiplicado por 100.

VII. RESULTADOS

A. Montaje del método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

1. Elección de la composición de la fase móvil

Al usar la fase móvil agua:metanol (3:97 v/v) se obtiene una mejor resolución entre el retinol y acetato de retinol (3.32), que usando 100 % metanol como fase móvil (Cuadro 1). Aunque la resolución entre el retinol y acetato de retinol es buena usando las tres fases móviles, al usar la fase móvil de agua:metanol (5:95 v/v) el tiempo de retención de retinol y acetato de retinol es mayor, implicando mayor tiempo de análisis. Además, el factor de asimetría del pico de acetato de retinol en las fases de 100% metanol y agua:metanol (5:95 v/v), es mayor que el que se obtiene en la fase móvil de agua:metanol (3:97 v/v), observándose picos más anchos. Por lo tanto, se seleccionó como fase móvil agua:metanol (3:97 v/v). (Fig. 1)

2. Capacidad máxima del cartucho Sep-Pak-Vac-Icc

Como se observa en el cuadro VII-1, al pasar 10.00 mL de una suspensión de muestra de harina por el cartucho Sep-Pak, la concentración de retinol que se obtiene, es menor que al pasar 3.00, 2.00 ó 1.00 mL de la misma solución por el cartucho. El hecho de que la concentración de retinol vaya aumentando al disminuir el volumen de suspensión de harina pasado por el cartucho, se debe a que éste tiene una capacidad limitada de retención y al estar saturado, deja pasar el resto de moléculas de retinol sin que éstas interaccionen con la fase sólida. Este fenómeno se observa claramente en el cromatograma obtenido al inyectar el desecho resultante de cargar 10 mL de muestra en el Sep-pak (Fig. 2A). Hay un pico de retinol ($t_R = 2.689$ min), mostrando que esta cantidad de retinol no se unió al Sep-pak.

Si se pasan 3.00 mL de muestra, se disminuye el tamaño del pico de retinol presente en el desecho, como se puede observar al comparar las áreas de los picos en el cromatograma A y B de la Fig. 2. En la Fig. 3 se nota que al pasar 1.00 mL de muestra, no se tiene pérdida de retinol, ajustándose este volumen de muestra a la capacidad del cartucho.

Al pasar 1.00 mL de muestra por el cartucho, se observa que éste retuvo 1.58 μg de retinol y al pasar 2.00 mL retuvo 3.19 μg . Por lo tanto, se considera que aproximadamente 3.20 μg de retinol es la capacidad máxima de retención del cartucho para retinol. Con base en esto, se tuvo el cuidado de que en ningún caso, los cartuchos se cargaran con más de 3.20 μg de retinol.

Cuadro VII-1

Capacidad de retención de retinol del cartucho Sep-Pak obtenido de una muestra de harina fortificada usando diferentes volúmenes

Volumen de suspensión de harina (mL) agregada al cartucho	Volumen de solvente (mL) para eluir el retinol	Concentración de retinol ($\mu\text{g}/\text{g}$ harina)
10.00	3.00	23 \pm 6
3.00	1.00	60 \pm 12
2.00	1.00	80 \pm 4
1.00	1.00	79 \pm 8

3. Selección de solución de lavado de los cartuchos Sep-pak-1cc Vac

Antes de pasar la muestra por el cartucho y realizar los lavados, la solución de la muestra debe neutralizarse después de la saponificación, por dos razones:

(1) el pH que debe tener la muestra al pasar por el cartucho es 7 y (2) a este pH precipitan proteínas y otros compuestos que no es deseable que pasen por el cartucho y al estar en estado sólido se separan fácilmente por centrifugación. En el caso de las galletas, es importante que además de proteínas, también precipiten los ácidos grasos. En experimentos realizados se notó que en las muestras que estaban neutralizadas con un ácido fuerte disuelto en agua, los ácidos grasos permanecían en solución y al pasar las soluciones de la muestra por el cartucho, éstos se retenían en él, disminuyendo la adsorción de retinol a la resina. Al eluir el retinol con isopropanol, los ácidos grasos no salen del cartucho, a menos que se utilice un solvente con menos polaridad que el isopropanol. Sin embargo, por el tipo de resina (C_{18}), no es recomendable el uso de dichos solventes, ya que en cromatografía por fase invertida, se usan solventes como metanol, acetonitrilo y agua. Si los ácidos grasos no son eluidos, al volver a utilizarse el cartucho, su capacidad de retención de retinol es limitada, dando resultados incorrectos en el análisis.

Dado que el cartucho Sep-Pak puede usarse más de una vez, si se cuida de tratar la muestra adecuadamente, se decidió neutralizar la solución de la muestra con ácido acético (0.4 g/mL) en acetonitrilo. Según Egberg *et al.* (1977) y Dueker *et al.* (1993), los ácidos grasos precipitan con acetonitrilo, lo que confirmaron al analizar el precipitado obtenido en una muestra, luego de tratarla con acetonitrilo. El análisis por cromatografía de gases mostró que el precipitado estaba compuesto de diferentes ácidos grasos. En este trabajo se notó la diferencia entre la muestra de galleta neutralizada, con la solución de ácido acético/acetonitrilo y otra neutralizada con un ácido sin acetonitrilo, observándose que en la primera solución de la muestra se formaba una fase sólida arriba de la solución. En el caso de las muestras de harina, ésta fase no se observó, ya que éstas no contienen grasa.

Es importante que al inyectar la solución de la muestra en el cromatógrafo, ésta esté limpia. Es decir, libre de componentes que pueden interferir en la determinación del analito o que puedan dañar la columna cromatográfica. Entre más limpia esté la solución de la muestra (Fig. 4), la columna cromatográfica se conservará en buen estado por más tiempo. Con el uso del cartucho Sep-pak se eliminan los compuestos que pueden tener el efecto arriba mencionado, eluyéndolos del cartucho, con solventes o mezclas de éstos por los que tengan afinidad por su polaridad, siempre y cuando el uso de estos solventes, permita que el analito, en este caso el retinol, quede retenido al cartucho para ser eluido posteriormente con otro solvente, ya libre de interferentes. Para determinar qué solvente o mezclas de éstos se deberían usar para lavar el cartucho y eliminar los compuestos que no eran de interés, se escogieron varias soluciones de lavado con base en el artículo de Dueker *et al.* (1993) quien trabajó con estos cartuchos para aislar el retinol del plasma.

Cuadro VII-2

Análisis del eluato de los cartuchos Sep-Pak luego de lavarlos con diferentes mezclas de solventes

Solución de lavado (mezcla de solventes)	Concentración de retinol ($\mu\text{g/g}$ harina)	
	Tratamiento 1 ^a	Tratamiento 2 ^b
Etanol:Agua (60:40 v/v)	516 \pm 52	146 \pm 61
Acetonitrilo:agua (30:70 v/v)	11 \pm 4	11 \pm 3
Acetonitrilo:agua (20:80 v/v)	53.8 \pm 0.9	56.0 \pm 0.2

^a Tratamiento 1: El retinol se eluyó con isopropanol absoluto después de pasar la solución de la muestra por el cartucho Sep-pak.

^b Tratamiento 2: Luego de pasar la solución de la muestra por el cartucho Sep-pak, éste se lavó con la solución de lavado indicada y después se eluyó el retinol con isopropanol absoluto.

En el cuadro VII-2 se muestran los resultados de recuperación del retinol de los cartuchos de Sep-Pak, luego de lavarlos con diferentes soluciones. Si se lava la muestra con la solución de etanol/agua (60:40 v/v), la concentración de retinol obtenida, disminuye con respecto a la concentración obtenida cuando se siguió el tratamiento 1. Esto puede deberse a la solubilidad del retinol en etanol. Al lavar con una solución de acetonitrilo/agua (30:70 v/v), la concentración de retinol obtenida es la misma que en el cartucho sin lavar. Sin embargo, en el cromatograma en la Fig. 5, que corresponde al desecho correspondiente a este lavado, se observa un pico de retinol. Aunque este pico no se observa en todos los desechos de los lavados inyectados, la presencia de éste indica que existe posibilidad de que al lavar con esta solución, se pierda retinol. Al realizar los lavados con una solución de acetonitrilo/agua (20:80 v/v), se observó que en ninguno de los cromatogramas correspondientes, apareció el retinol. Por lo tanto, se seleccionó esta solución para realizar los lavados .

B. Validación del método

1. Precisión

El coeficiente de variación del método en harina fue $(11 \pm 2)\%$, mientras que el de galleta fue de $(7 \pm 2)\%$ (Cuadros 2 y 3). El harina tiene un coeficiente de variación mayor que la galleta, principalmente por la dificultad para homogenizarla. Esto es porque contiene harina de soya, la cual forma agregados de harinas que en su interior atrapan las microcápsulas de vitamina A que contiene la premezcla. Por eso se recomienda que antes de pesar las muestras para iniciar el análisis, las muestras de harina se muelan en un mortero para deshacer estos agregados. Debido a que antes de procesar las galletas para el análisis de vitamina A, éstas son molidas, el coeficiente de variación es menor, ya que este proceso también sirve para homogenizar la muestra. Sin embargo, siempre es recomendable moler la muestra antes del análisis, ya que por la presencia de grasa en las galletas, también se forman estos grumos.

2. Porcentaje de recuperación

El porcentaje de recuperación de retinol en la harina fue del $(87 \pm 2)\%$ y en la galleta nutricionalmente mejorada del $(93 \pm 4)\%$ (Cuadro 4). El hecho de que la recuperación sea mayor en la galleta, puede deberse a que el retinol se extrae más fácilmente en esta matriz, además que la grasa adicional puede proteger el retinol durante la saponificación. Estos valores de recuperación fueron utilizados para hacer los cálculos de retinol en cada tipo de muestra.

3. Linealidad y rango

En la Fig. 6 se muestra la gráfica de concentración de retinol vrs. la respuesta obtenida, donde se puede observar la relación que existe entre estos dos parámetros. Los resultados del cuadro 5 muestran el área de retinol y acetato de retinol obtenidos al inyectar soluciones de retinol de diferentes concentraciones. No existe traslape en los intervalos de confianza de las soluciones de retinol, lo que indica que la cuantificación de retinol con la ecuación de la recta es precisa. En la regresión, usando las concentraciones de 0-27.8 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo un R^2 de 0.99699 (Cuadro 6) lo cual indica que es lineal; aunque al observar en la Fig. 6, se nota que al final de la recta se forma una ligera curvatura. Esto en parte, se debe a que la resolución entre los picos de retinol y acetato de retinol no es tan buena, ya que la columna de cromatografía se satura, observándose un coleo en el pico de retinol.

Como se observa en el cuadro 6, tanto en la regresión calculada usando las concentraciones de 0 a 14.9 $\mu\text{g/mL}$ como en la de 0 a 4.97 $\mu\text{g/mL}$, los parámetros son similares, difiriendo el coeficiente de correlación en el orden de 2.6×10^{-4} . Este coeficiente de correlación, indica que sí existe una relación lineal entre las variables usadas para el cálculo y es mejor que si se utiliza todo el rango de concentraciones. Para propósitos prácticos de control y chequeo de la recta de regresión, se tomó el intervalo de 0 a 5 $\mu\text{g/mL}$ como rango de trabajo, ya que al analizar muestras de harina y galleta

no se obtuvieron concentraciones mayores a $5 \mu\text{g/mL}$ (equivalente a $125 \mu\text{g/g}$ de muestra). Sin embargo, en el caso de que se presentara una muestra con una concentración mayor, ésta podría haber sido cuantificada hasta $15 \mu\text{g/mL}$ (equivalente a $375 \mu\text{g/g}$ de muestra) con total confiabilidad.

4. Límite de detección y cuantificación

En el área B marcada en el cromatograma del blanco de reactivos y el blanco de harina (Fig. 7) se nota que en el intervalo de tiempo, correspondiente a la elución de los picos de retinol y acetato, no se observa ningún pico, por lo que se puede garantizar que los picos corresponden exclusivamente a estos compuestos. Esto es una medida de la especificidad del método ya que no existen compuestos que co-eluyan con los picos de retinol y acetato de retinol. En el área A, se observa que los picos de compuestos que absorben a la longitud de onda utilizada, presentes en el harina, salen principalmente al inicio del cromatograma.

Para obtener la altura del ruido se usó la altura de la línea base en los blancos, en el tiempo de retención en el cual aparece el retinol y el acetato de retinol (Fig. 7, áreas A y B). Para el blanco de reactivos, la altura del ruido fue de 0.2 cm y para el blanco de matriz fue de 0.3 cm. (Cuadro 7). En la Figura 8 se muestra la relación entre la concentración de retinol y la razón señal:ruido, así como los límites de detección y cuantificación. Para obtener el límite de detección y cuantificación del método, se realizó una recta de regresión de concentración de retinol ($\mu\text{g/mL}$) vrs. razón señal:ruido. En esta regresión, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9973, indicando que la relación es lineal. Por medio de la ecuación obtenida, se calculó la concentración de retinol a la cual la razón señal:ruido es 3:1 y 10:1. El límite de detección encontrado fue de $0.063 \mu\text{g/mL}$ (correspondiente a $1.58 \mu\text{g}$ de retinol/g) y el de cuantificación fue $0.19 \mu\text{g/mL}$ (correspondiente a $4.75 \mu\text{g/g}$). Los coeficientes de variación entre las áreas

de diferentes inyecciones de las soluciones de retinol a concentraciones bajas, son altos debido a que la precisión es menor. La precisión al nivel intermedio ($2.5 \mu\text{g/mL}$) de la curva de trabajo, el coeficiente de variación es menor a 1.8 %.

C. Pérdida de retinol durante la preparación y el almacenamiento en la galleta nutricionalmente mejorada

Para la preparación de 80 galletas se usa 0.568 kg de harina Maisoy y 0.681 kg de azúcar. Experimentalmente se encontró que las galletas preparadas tenían un peso promedio de 27.46 g, lo que hace un total de 2.20 kg sumando el peso de todas las galletas. La prueba unilateral de T de Student demuestra que la pérdida de retinol durante el proceso es significativamente diferente de cero en los tres lotes de galletas, determinándose una pérdida de $(9 \pm 2)\%$ (Cuadro VII-3), con $\alpha=0.05$. $T_{\text{exp}} (7.30) > T_{\text{crítica}} (2.92)$ (Ver anexo F)

En el estudio de estabilidad de retinol durante la vida de anaquel de la galleta nutricionalmente mejorada (Cuadro VII-4), se encontró por medio del análisis de varianza (Cuadro 9), que existe diferencia entre las concentraciones de retinol de la galleta, en los diferentes tiempos de almacenamiento, lo que indica que sí se va perdiendo retinol durante el almacenamiento. No hubo diferencia entre las corridas (lotes) de preparación de galletas, lo que garantiza la confiabilidad de las interpretaciones hechas. Todos los resultados fueron expresados en base a peso seco, ya que como se muestra en el cuadro 8, el porcentaje de humedad en la galleta aumentaba mientras más tiempo estaba almacenada.

Cuadro VII-3

Pérdida de retinol en la galleta nutricionalmente mejorada durante el horneado

	Retinol ($\mu\text{g/g}$)	Retinol (μg)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio \pm D.S.
Harina	94.63	53731	53924	53731	
Azúcar	1.93	1000	1311	982	+
Total (Antes)		54731	54713	55235	54893 \pm 296
Galletas (Después)	22.61	48783	50939	49367	49696 \pm 1116
Pérdida ^a (μg)		5948	3774	5868	5197 \pm 1233
% Retenido ^b		89.13	93.10	89.38	90.54
% Perdido		10.87	6.90	10.62	9 \pm 2

^a La pérdida se calculó restando la cantidad de retinol de todas las galletas, del valor proporcionado en total por la materia prima.

^b El % de retinol retenido, se calculó dividiendo el valor de retinol obtenido en las galletas (después del horneado) entre el valor de retinol de la materia prima (antes del horneado), multiplicado por 100.

Por medio de la comparación múltiple de medias según el método de Scheffé, se encontró que la diferencia entre las corridas fue significativa entre galletas recién preparadas y las almacenadas durante treinta días. La diferencia en la cantidad de retinol también fue significativa entre galletas almacenadas quince y cuarenta y cinco días. Como se observa en la Figura 9, existe diferencia si el intervalo de confianza calculado no incluye al cero. No se detectó diferencia significativa entre los datos de los tratamientos separados quince días, pero la disminución de la cantidad de retinol empieza a ser significativa a los treinta días de haber sido preparada la galleta.

Cuadro VII-4

Estabilidad de retinol en la galleta nutricionalmente mejorada^a

Corrida	Tiempo (días), Retinol $\mu\text{g/g}$			
	0	15	30	45
1	23.96	22.29	20.39	14.34
	24.81	17.63	16.87	12.50
	21.94	21.03	16.81	19.16
	18.81	22.38	17.72	18.14
	22.89	20.29	16.87	13.61
Promedio \pm L.C.	22 \pm 3	21 \pm 1	18 \pm 2	16 \pm 1
2	23.52	22.83	16.87	23.61
	20.16	18.87	19.32	16.88
	22.97	16.87	19.42	21.38
	22.92	21.77	17.89	18.96
	25.19	17.80	15.84	14.24
Promedio \pm L.C.	23 \pm 2	20 \pm 3	18 \pm 2	19 \pm 5
3	27.88	23.68	16.36	24.45
	20.24	22.37	20.70	17.59
	20.90	22.06	20.26	18.05
	21.72	24.57	24.75	13.19
	21.31	26.18	22.09	14.64
Promedio \pm L.C.	22 \pm 1	24 \pm 2	21 \pm 4	16 \pm 5
Promedio	22	21	19	17
% de retinol retenido ^b	100.00	95	83	77

^a Medida mediante la concentración de retinol en tres diferentes periodos de tiempo después de preparadas y expresada en base a peso seco.

^b El valor de retinol del día 0 se tomó como 100 % de retención

VIII. DISCUSION

El porcentaje de pérdida de retinol de la galleta nutricionalmente mejorada durante el proceso de horneado fue de $(9 \pm 2)\%$. Estos resultados coinciden con las pérdidas de retinol que Borenstein (1981), Ranum *et al.* (1981) y Rubin *et al.* (1977) reportan para pan blanco. Los resultados muestran que el valor de pérdida de retinol de 10% durante el proceso de horneado, coincide con la hipótesis planteada .

Cort *et al.* (1976) realizaron experimentos preparando pan usando dos tipos de harina fortificada con retinol. Una recién fortificada (A) y otra almacenada durante cuatro meses luego de haber sido fortificada (B). Al realizar el análisis de los panes preparados, el retinol fue estable en ambos panes, aunque se observó una pérdida mayor del retinol en el pan preparado con el harina B. En el experimento realizado con la galleta nutricionalmente mejorada, la cantidad de retinol que tenía el harina Maisoy se encontraba dentro del rango esperado y aunque tenía un porcentaje de humedad menor al 6%, no se conoció el tiempo que ésta había estado almacenada. Se desconoce, por lo tanto, qué efecto podría tener el tiempo de almacenamiento sobre la estabilidad del retinol durante el proceso de horneado. Sería recomendable estudiar la estabilidad del retinol en el harina Maisoy durante almacenamiento y ver cómo el tiempo de su almacenamiento afecta la estabilidad del retinol durante el período de horneado.

Al final de la vida de anaquel de la galleta nutricionalmente mejorada (45 días), se encontró que ésta tenía una cantidad promedio de 17.38 μg de retinol/g de galleta. Esto es el 77% del valor inicial. A los 15 días de almacenamiento se retuvo el 95%, lo que coincide con los datos reportados para pan blanco enriquecido después de 5 días de almacenamiento (Borenstein, 1981; Parrish *et al.*, 1980). Aunque la premezcla agregada al harina Maisoy contiene hierro, según los resultados encontrados en la literatura, este

mineral no ejerce un efecto adverso significativo sobre la estabilidad del retinol encapsulado. Por otro lado, el hierro agregado en este caso está en su forma reducida por lo que no tiene capacidad de oxidar. Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de pérdida del retinol durante la vida de anaquel de la galleta fortificada fue ligeramente mayor que el esperado, 23% versus 15%. Sin embargo, aún bajo estas circunstancias la galleta es un buen vehículo alimentario para proporcionar este nutriente a poblaciones que lo necesiten.

Tomando en cuenta que la recomendación diaria de FAO/OMS para un niño en edad escolar es 400 ER, un niño que come una galleta con 17.38 μg de retinol, estará obteniendo un promedio de 487 ER, lo que equivale al 120% de la recomendación diaria de vitamina A. Si la galleta es consumida recién preparada, se estaría consumiendo 22.61 $\mu\text{g/g}$, esto es 633 ER o 160 % de la recomendación diaria. Ya que en Guatemala se espera que el azúcar fortificada recién preparada tenga un nivel promedio ponderado de 15 μg de retinol por gramo, el nivel de fortificación de retinol de la galleta nutricionalmente mejorada podría disminuirse. Además, debería considerarse que por medio de la galleta se proporcione al niño el 50% de la recomendación diaria de retinol, ya que si el niño consume por lo menos 20 g de azúcar fortificada al día, estaría llenando por este medio el 50% de la recomendación. A estas cantidades hay que añadir la cantidad de vitamina A en la dieta normal del niño, la que se estima es cerca del 50% de la ingesta diaria recomendada.

En el caso de países donde la deficiencia de vitamina A sea un problema de Salud Pública, y no se haya implementado la fortificación del azúcar como una medida para combatir esta deficiencia, la galleta sí debiera suministrar el 50% o más de la recomendación diaria. La proporción a agregar, depende de la cantidad de vitamina A

obtenida a través de la dieta. Para cualquiera de los casos mencionados, países que fortifican el azúcar y países sin este programa, los niveles de retinol actualmente recomendados para fortificar la galleta nutricionalmente mejorada deben revisarse. Sugiriéndose que ésta contenga 200 ER al final de su vida de anaquel. En el primer caso, considerando que el azúcar contenga un mínimo de 5 μg de retinol por gramo, significa que la harina de Maisoy fortificada debiera contener 35.0 μg de retinol por gramo. De esta manera, la galleta después de horneado, debiera tener un mínimo de 260 ER, de los cuales al menos 38 ER provendrían del azúcar fortificada. Cuando no existe azúcar fortificada, los mismos niveles de retinol en la galleta, se conseguirían si la harina Maisoy contiene 42 μg de retinol/g. En los programas actualmente en marcha, la harina de Maisoy contiene 96 μg de retinol/g. De aceptarse las recomendaciones expuestas anteriormente, se obtendría un ahorro de US\$ 212 y US\$ 187.50 por cada millón de galletas producidas en países que fortifican azúcar y en los que no, respectivamente. En estos cálculos se considera que un kilogramo de vitamina A encapsulado es de US\$ 78.

En el caso de Guatemala, se reparten galletas diariamente a 1,660,091 niños en todo el país durante el año escolar, esto es aproximadamente 180 días hábiles. Por lo tanto, el programa de la galleta nutricionalmente mejorada ahorraría US\$ 52,788 (Q 303,531) si se redujera la cantidad de vitamina A en la galleta. Por otro lado, si el programa de fortificación de azúcar con vitamina A continúa operando óptimamente, la adición de retinol a la galleta es injustificado, por lo que si este nutriente se elimina entre sus ingredientes, el ahorro sería de US\$ 333.60 por cada millón de galletas producidas, es decir US\$ 83,066 (Q 477,631) al año. Actualmente se dedican Q38 millones de quetzales (aproximadamente seis millones de dólares), por lo que este ahorro equivaldría a 0.7-1.2% del costo total del programa. Estos cálculos muestran el bajo costo que significa aregar un nutriente a un vehículo alimentario, una vez que el proceso de fortificación ha sido implementado.

IX. CONCLUSIONES

1. El método desarrollado para la determinación de retinol en harinas y galletas, por cromatografía líquida de alta resolución, es un método selectivo, específico, exacto y preciso. Una ventaja adicional del método, es que no requiere el uso de solventes orgánicos para la extracción del retinol, ya que es un preparado acuoso de la muestra el que se separa por un cartucho Sep-pak con una resina de 18 carbonos para extraerlo. Con ésto se logra disminuir el tiempo de análisis, reducir el volumen de desechos orgánicos, y aumentar el número de muestras que se pueden analizar en un día.
2. Con base en la concentración máxima de retinol con que se puede fortificar el harina, el rango de trabajo del método de cuantificación de retinol es de 0.2-5 μg de retinol/mL, aunque por la linealidad de la curva, ésta es confiable hasta 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los valores de 0.2, 5 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalen respectivamente a 5, 125 y 375 $\mu\text{g}/\text{g}$. de retinol en harina o galleta, si se siguen los procedimientos establecidos en el método propuesto.
3. El porcentaje de recuperación del método de cuantificación de retinol es $(87 \pm 2)\%$ y $(93 \pm 4)\%$ para harina Maisoy y la galleta nutricionalmente mejorada, respectivamente. La variación intraensayo es de $(11 \pm 2)\%$ para harina Maisoy y $(7 \pm 2)\%$ para la galleta nutricionalmente mejorada.

4. En el método desarrollado para la cuantificación de retinol, se puede detectar una concentración mínima de $1.53 \mu\text{g}$ de retinol/g de muestra (equivalente a $0.063 \mu\text{g/mL}$ de solución inyectada) y se puede cuantificar a partir de $4.75 \mu\text{g/g}$ (equivalente a $0.19 \mu\text{g/mL}$ de solución inyectada). Abajo del valor de límite de cuantificación, el método no es preciso, ya que el coeficiente de variación (6%) aumenta a medida que disminuye la concentración de retinol.
5. Durante el proceso de horneado de la galleta nutricionalmente mejorada se pierde el $9\% \pm 2$ del contenido original de retinol.
6. La vitamina A agregada a la galleta nutricionalmente mejorada, se pierde en un 23% durante el tiempo de vida de anaquel (45 días) de ésta. La disminución de retinol empieza a ser significativa a partir de los treinta días, cuando se ha perdido el 17% de retinol. Estas pérdidas coinciden con la ganancia en humedad de la galleta, de 4.1% después del horneado, 5.2 y 6.3 %, a los 30 y 45 días, respectivamente.
7. Si se reduce la cantidad de vitamina A con que se fortifica la galleta nutricionalmente mejorada para satisfacer el 50% de la recomendación diaria para este nutriente, se podría ahorrar US\$ 187.50 por cada millón de galletas producidas.

X. RECOMENDACIONES

1. Con base en los resultados obtenidos, se recomienda disminuir la cantidad de retinol con la que se está fortificando el harina de maíz y soya a $42 \mu\text{g}$ de retinol/g de harina. En esta recomendación ya se consideran las pérdidas de retinol durante el horneado y almacenamiento, para que una galleta todavía tenga al final de su vida de anaquel (45 días) el 50% de la recomendación diaria de vitamina A (400 ER) para niños en edad escolar. Este nivel podrá reducirse aún más, si se considera el nivel real de retinol del azúcar fortificada.
2. Se recomienda hacer un estudio para medir la estabilidad del retinol durante la vida de anaquel de la galleta nutricionalmente mejorada, bajo las condiciones ambientales en las que se almacena en los distintos centros de producción de la galleta nutricionalmente mejorada.
3. Se recomienda considerar la eliminación de este nutriente dentro de los ingredientes de la galleta, en aquellos países o regiones en donde el programa de fortificación de azúcar con vitamina A se desarrolla en forma eficiente, esto es que el azúcar fortificada tenga en promedio $15 \mu\text{g}$ de retinol/g.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Ames S.R. (1966) Methods for Evaluating Vitamin A Isomers. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **49** (5): 1071-1078.
2. Arroyave G., Baltazar J., Kusin J., Lepkowski J.M., Milton R.C., Srikantia S.G. (1989) *Methodologies for Monitoring and Evaluating Vitamin A Deficiency Intervention Programs*. International Vitamin A Consultative Group, Washington D.C. 66 p.
3. Aurand L.W., Wood A.E. y Wells M.R. (1987) *Food Composition and Analysis*. Van Nostrand Reinhold, New York. 690 p.
4. Bender A.E. (1978) *Food Processing and Nutrition*. Academic Press, London. 243 p.
5. Blatná J., Parížková H. y Kucerová Z. (1982) Fat and Vitamin A Stability in the Presence of Ronoxan A and other Antioxidants. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **52**: 241-247.
6. Borenstein B. (1981) Vitamins and Amino Acids. En Furia T.E. (Ed.). *Handbook of Food Additives*, 2 ed. Vol. 1. CRC Press, New York. pp 107-108.
7. Collins C. y Chow Ch. (1984) Determination of vitamin A and Vitamin A Acetate by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chromat.* **317**: 349-354.
8. Cort W.M. (1988) Treatment with Food Additives. En Karmas E. y Harris R. (Eds.). *Nutritional Evaluation of Food Processing*. 3 ed. Van Nostrand Reinhold, New York. pp 448, 450, 452.

9. Cort W.M., Borenstein B., Harley J.H., Osadca M. y Scheiner J. (1976) Nutrient Stability of Fortified Cereal Products. *Food Tech.* 30(4): 52-62.
10. DeRitter E. (1976) Stability characteristics of vitamins in processed foods. *Food Tech.* 30(1): 48-51,54.
11. Dirección General de Proyectos de APOYO (DIGEPA). (1992) *Bases y documentos de licitación pública para el suministro de la galleta escolar nutricionalmente mejorada*. Ministerio de Educación. Guatemala.
12. Dueker S., Lunetta J.M., Jones A.D., y Clifford A.J. (1993) Solid-Phase Extraction Protocol for Isolating Retinol-d, and Retinol from Plasma for Parallel Processing for Epidemiological Studies. *Clin. Chem.* 39(11): 2318-2322.
13. Egberg D., Heroff J. y Potter R. (1977) Determination of all-trans and 13-cis Vitamin A in Food Products by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 25:(5) 1127-1132
14. FAO/OMS. (1991) Necesidades de Vitamina A, Hierro, Folato y Vitamina B₁₂. *Estudios FAO, Alimentación, Nutrición*. No. 23. 124 p.
15. Harper J.M. (1988) Extrusion Processing. En Karmas E. y Harris R. (Eds.). *Nutritional Evaluation of Food Processing*. 3 ed. Van Nostrand Reinhold, New York. pp 384.
16. Harris R.S. (1988) General Discussion on the Stability of Nutrients. En Karmas E. y Harris R. (Eds.). *Nutritional Evaluation of Food Processing*. 3 ed. Van Nostrand Reinhold, New York. pp 3-5.
17. Helrich K. (Ed.) (1990) *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, New York. 1298 p.

18. Institute of Nutrition for Central America and Panama (INCAP). (1974) *Fortification of Sugar with Vitamin A in Central America and Panama*. INCAP, Guatemala. 34 p.
19. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). (1989) *Manual de normas y procedimientos para la producción artesanal de la galleta nutricionalmente mejorada*. INCAP, Guatemala. 92 p.
20. Karel M. (1979) Effect of Storage on Nutrient Retention of Foods. *Food Tech.* 33(2):36-37.
21. Lund D. (1988) Effects of Heat Processing on Nutrients. En Karmas E. y Harris R. (Eds.). *Nutritional Evaluation of Food Processing*. 3 ed. Van Nostrand Reinhold, New York. pp 319, 334-335.
22. McLaren D., Ballintine E.J., ten Doesschate J., Hodges R.E., Pararajaseram, Sommer A., Venkataswamy G., Teply L.J. y Chichester C.O. (1983) *La sintomatología de la deficiencia de vitamina A y su relación con la nutrición aplicada*. International Vitamin A Consultory Group, Washington D.C. 38 p.
23. Neter J. y Wasserman W. (1974) *Applied Linear Statistical Models*. 3 ed. Irwin Dorsey, Ontario. 842 p.
24. Olson J.A. (1990) Vitamin A. En Brown, M.L. (Ed.), *Present Knowledge in Nutrition*. 6 ed. International Life Sciences Institute-Nutrition Foundation, Washington D.C. pp 96-107.
25. Paquette G. y Kanaan M.A. (1985) Degradation of Retinyl Acetate in Simple Solvent Systems. *Food Chem.* 18 (2):211-231.

26. Parrish D.B., Herod L., Ponte J.G., Seib P.A., Tsen C.C., y Adams K.A. (1980) Recovery of Vitamin A in Processed Foods Made From Fortified Flours. *J. Food Sci.* **45**:1438-1439.
27. Pineda O. (1989) *Fortificación de Azúcar con Vitamina A*. Manual de Operaciones. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala. 23 p.
28. Ranhotra G.S. y Bock M.A.. (1988) Effects of Baking on Nutrients. En Karmas E. y Harris R. (Eds.). *Nutritional Evaluation of Food Processing*. 3 ed. Van Nostrand Reinhold, New York. pp 355, 358, 360.
29. Ranum P.M., Loewe R.J., y Gordon H.T. (1981) Effect of Bleaching, Maturing, and Oxidizing Agents on Vitamins Added to Wheat Flour. *Cereal Chem.* **58**(1):32-35.
30. Rubin S.H., Emodi A., y Scialpi L. (1977) Micronutrient Additions to Cereal Grain Products. *Cereal Chem.* **54**(4):895-904.
31. Speek A.J. (1989) *Vitamin Analysis in Body Fluids and Foodstuffs with High-Performance Liquid Chromatography*. Krips Repro Meppel, Amsterdam. 148 p.
32. Tee E. y Lim Ch. (1991) The Analysis of Carotenoids and Retinoids: A Review. *Food Chem.* **41**(2):47-193.33. Thompson J.N. (1986) Review: Official Methods for Measurement of Vitamin A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**(5):727-738.

CUADROS

Cuadro 1

Resolución entre los picos de retinol y acetato de retinol en diferentes fases móvil^a

Fase móvil (1 mL/min)	Tiempo de retención (min)		Resolución ^b	Factor de asimetría (b/a) ^c
	Retinol (2.0 ug/mL)	Acetato de retinol (2.5 ug/mL)		
100% metanol	2.765	3.595	2.13	1.25
Agua:metanol (3:97 v/v)	3.507	4.800	3.32	1.50
Agua:metanol (5:95 v/v)	4.038	6.056	3.96	1.59

^a Condiciones cromatográficas: Columna SP-18-5, detector UV-325 nm, sensibilidad 0.005 UA/mV, Atenuación 4, velocidad del papel 1 cm/min.

^b Calculado con la siguiente ecuación:

$$R = 2 \left(\frac{t_{R_{Acetato}} - t_{R_{Retinol}}}{W_{Retinol} + W_{Acetato}} \right)$$

donde:

W = Ancho del pico en la base (cm)

t_R = Tiempo de retención (min)

^c Calculado usando el pico de acetato de retinol, a = ancho de inicio hasta el centro del pico. b = ancho del centro al final del pico, medido a 10% de la altura del pico.

Cuadro 2

Variación intraensayo de la determinación de retinol en harina^a

Concentración de retinol (ug/g)		
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
86.26	39.59	52.01
85.00	47.84	64.67
74.27	46.56	61.24
69.44	46.99	74.09
94.80	54.84	63.95
78.25	47.32	67.11
71.37	53.27	65.27
83.60	42.75	54.95
71.43	40.00	52.58
78.60	52.23	
79 ± 8	47 ± 5	62 ± 7
CV: 10 %	CV: 11 %	CV: 12 %
Promedio C.V. ± L.C ^b .: 11 ± 2		

^a Muestra analizada de ocho a diez veces en un mismo día.

^b Límite de confianza al 95% de confianza.

Cuadro 3

Variación intraensayo de la determinación de retinol en galleta^a

Concentración de retinol (ug/g)		
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
14.82	13.92	10.86
14.26	13.03	9.37
15.44	14.43	8.95
14.68	13.79	9.79
14.30	16.30	9.20
13.82	15.46	9.57
13.04		
13.10		
14 ± 1	14 ± 1	9.6 ± 0.7
CV : 7 %	CV: 8 %	CV: 7 %
Promedio ± L.C. ^b : 7 ± 2		

^a Muestra de galleta analizada de seis a ocho veces en un mismo día.

^b Límite de confianza al 95% de confianza.

Cuadro 4
Porcentaje de recuperación del método para determinación de
retinol en muestras de harina y galleta

Muestra	Porcentaje de recuperación (% \pm D.S.) ^a	
	Harina	Galleta
1	86 \pm 8	96 \pm 2
2	88 \pm 10*	91 \pm 5
3	87 \pm 2*	96 \pm 6*
4		94 \pm 2*
5		88 \pm 1*
Promedio \pm L.C. ^b	87 \pm 2	93 \pm 4

^a Cada valor es el promedio de tres réplicas, excepto donde se usó el método de adición de patrón, donde se usaron de 5 a 6 puntos para la recta de regresión.

^b Límite de confianza al 95% de confianza.

* Porcentaje de recuperación obtenido por el método de adición de patrón ($r > 0.99$)

Cuadro 5

Concentraciones de retinol ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y respuesta obtenida

Concentración de retinol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Area de retinol	Area de acetato de retinol	Respuesta: (Ret/Ac.)*(Conc.Ac.) ^a	I.C. de la respuesta ($\alpha=0.05$) ^b
0.00 \pm 0.00	0	35848	0.00	-0.27 - 0.27
0.10 \pm 0.03	2628	35821	0.1658	-0.17 - 0.37
0.50 \pm 0.03	10027	35721	0.6343	0.29 - 0.70
0.99 \pm 0.11	18266	34970	1.1805	0.74 - 1.25
1.99 \pm 0.12	38044	35216	2.4415	1.77 - 2.21
2.98 \pm 0.14	55237	35338	3.5326	2.73 - 3.24
3.98 \pm 0.15	76096	35352	4.8648	3.26 - 4.70
4.97 \pm 0.09	91687	35167	5.8923	4.78 - 5.17
7.96 \pm 0.19	150576	35342	9.6293	7.09 - 8.83
9.95 \pm 0.15	186683	35719	11.812	9.67 - 10.2
14.9 \pm 0.2	277657	35289	17.782	13.6 - 16.2
27.8 \pm 2.6	505385	37977	30.076	27.5 - 28.1

^a Ret = retinol, Ac. = acetato de retinol^b De cada solución, se inyectaron 10 μL en duplicado. Para todas las soluciones se obtuvo un coeficiente de variación menor a 1.8 % entre inyecciones. Todos los resultados de área y respuesta representan el promedio de dos inyecciones.

Cuadro 6

Valores de las regresiones calculadas^a

Parámetro	Rango de concentraciones de retinol ($\mu\text{g/mL}$)		
	0 - 27.8	0 - 14.9	0 - 4.97
Intercepto (A)	0.3 ± 0.5	0.03 ± 0.07	0.03 ± 0.06
Pendiente (B)	1.10 ± 0.02	1.19 ± 0.01	1.19 ± 0.01
R ²	0.99699	0.99988	0.999430
No. de observaciones	12	11	8

^a La ecuación de la regresión es $Y = A + BX$ donde
 $Y = (\text{Area retinol/Area acetato}) * (\text{Conc. acetato de retinol})$
 $X = \text{Concentración de retinol } (\mu\text{g/mL})$

Cuadro 7

Altura del ruido en los blancos y de los picos de retinol en las soluciones de retinol^a

Concentración de retinol ($\mu\text{g/mL}$)	Altura de picos (cm \pm 0.05)	Razón señal:ruido	Area de retinol (Prom. \pm D.S.)	C.V.
Blanco-reactivos	0.2			
Blanco-matriz	0.3			
0.03	0.45	1.5	588 ± 102	17.3
0.05	0.65	2.3	899 ± 194	21.6
0.08	1.10	3.7 ^b	1213 ± 165	13.6
0.10	1.45	4.8	1402 ± 79	5.6
0.20	3.15	10.4 ^c	2844 ± 182	6.4

^aAtenuación 1 y sensibilidad (0.005 $\mu\text{A/mV}$).

^bLímite de detección (razón señal/ruido 3:1), tomándose como altura del ruido 0.3 cm

^cLímite de cuantificación (razón señal/ruido 10:1)

Cuadro 8

Porcentaje de humedad de la galleta nutricionalmente mejorada a los diferentes tiempos de almacenamiento

Corrida	Porcentaje de humedad (% \pm D.S.) ^a			
	0	15	30	45
1	3.5 \pm 0.1	4.90 \pm 0.06	5.29 \pm 0.03	6.04 \pm 0.09
2	4.2 \pm 0.2	4.82 \pm 0.07	5.2 \pm 0.3	6.4 \pm 0.5
3	4.5 \pm 0.2	4.80 \pm 0.02	5.16 \pm 0.05	6.3 \pm 0.4
Promedio	4.1 \pm 0.5	4.84 \pm 0.05	5.21 \pm 0.07	6.3 \pm 0.2

^a Cada valor es el promedio de los valores encontrados en las cinco muestras que tenía cada corrida en cada período de tiempo de almacenamiento. El análisis de humedad en cada muestra se realizó por duplicado.

Cuadro 9

Análisis de varianza para un diseño de bloques al azar^a

Fuente	g.l.	SC	CM	F _{α} ($\alpha = 0.05$) ^b	
				Crítica	Exp.
Bloques	2	42.08	21.04	3.15	2.76
Tratamientos	3	254.74	84.91	2.76	11.13
Error	56	411.89	7.63		
Total	59	708.71			

^a Las ecuaciones utilizadas en el análisis de varianza, se presentan en el anexo F.

^b Se rechaza la hipótesis nula si $F_{exp.} > F_{critica}$

FIGURAS

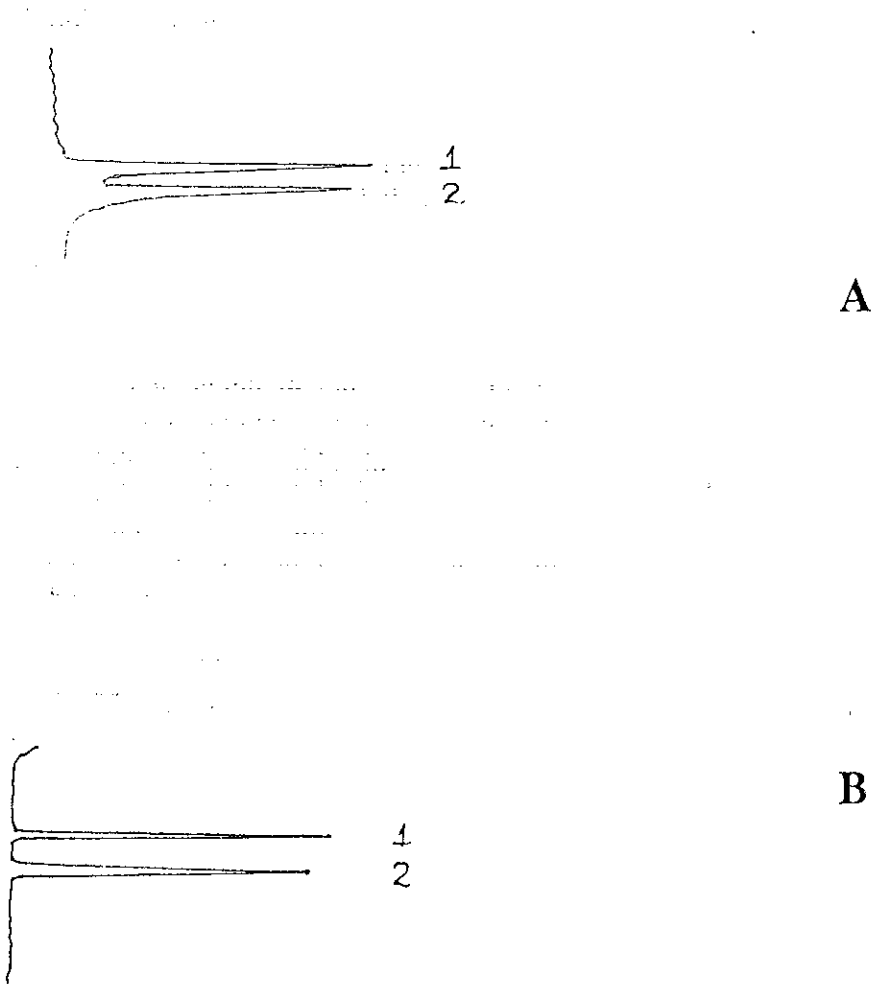
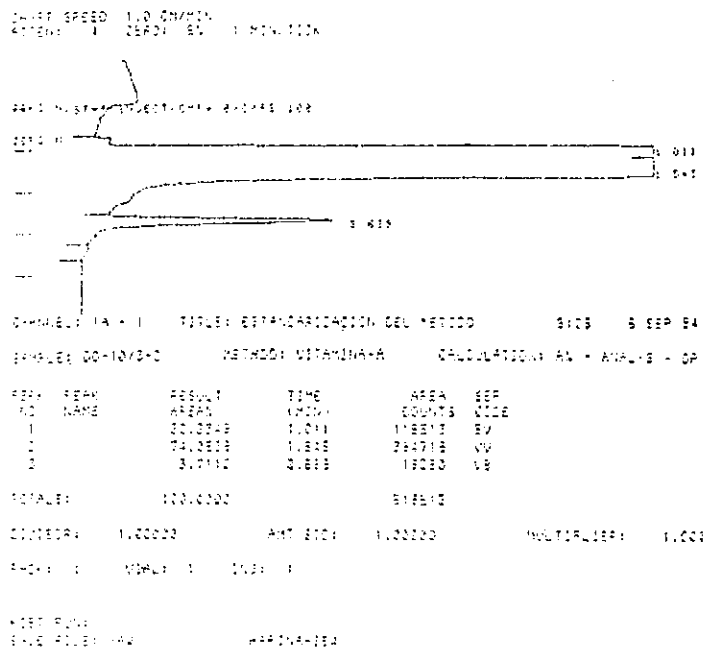
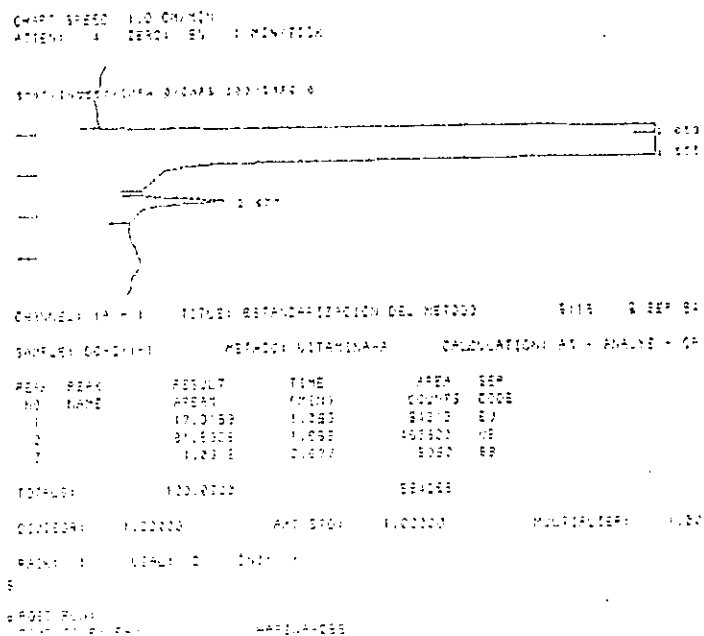


Figura 1. Cromatogramas de la solución patrón de retinol ($2.0 \mu\text{g/mL}$) y acetato ($2.5 \mu\text{g/mL}$) separados con la fase móvil **A.** 100% metanol **B.** metanol:agua (97:3, v/v). Flujo: 1mL/min , detector UV (325 nm), 0.005 UA/mV , atenuación: 4, 1 cm/min . 1. Retinol 2. Acetato de retinol



A



B

Figura 2. Cromatogramas de la solución de desecho que contiene los compuestos que no fueron retenidos al pasar por el cartucho, resultante al cargar el cartucho Sep-pak con: A. 10 mL de muestra. B. 3 mL de muestra. La flecha indica el punto de elución del retinol.

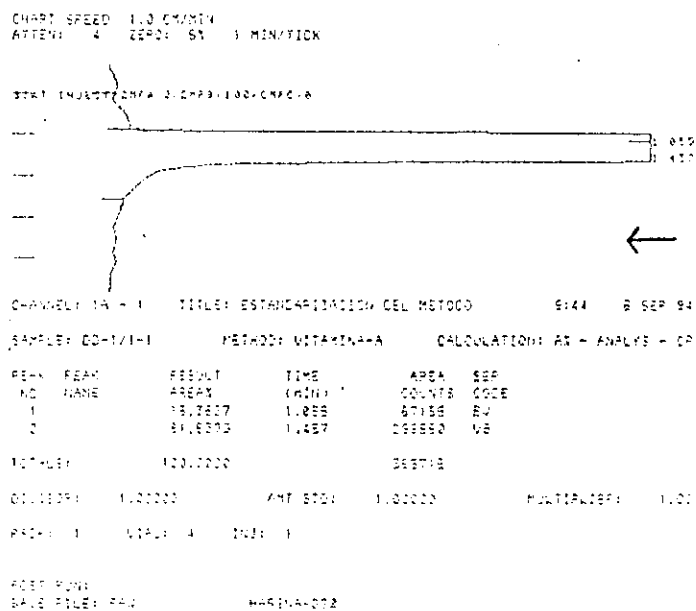


Figura 3. Cromatogramas de la solución de desecho, resultante al cargar el cartucho Sep-pak con 1.00 mL de muestra. La flecha indica el punto de elución del retinol.

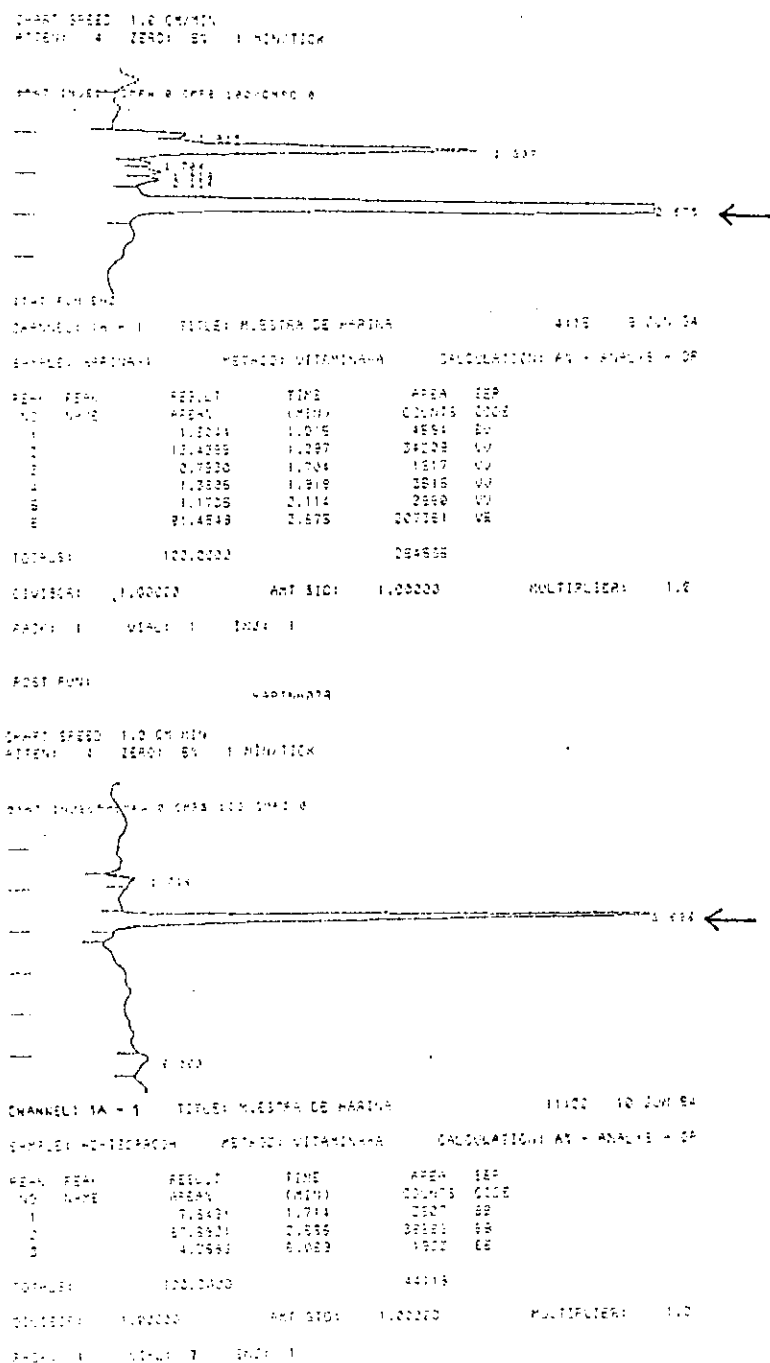


Figura 4. Comparación de los cromatogramas obtenidos de una muestra de harina analizada con el método descrito en el anexo B. **A.** Tratamiento 1: Cartucho sin lavar con solvente, retinol eluido con isopropanol. **B.** Tratamiento 2: cartucho lavado con la solución de acetonitrilo:agua (20:80 v/v). La flecha indica el punto de elución del retinol.

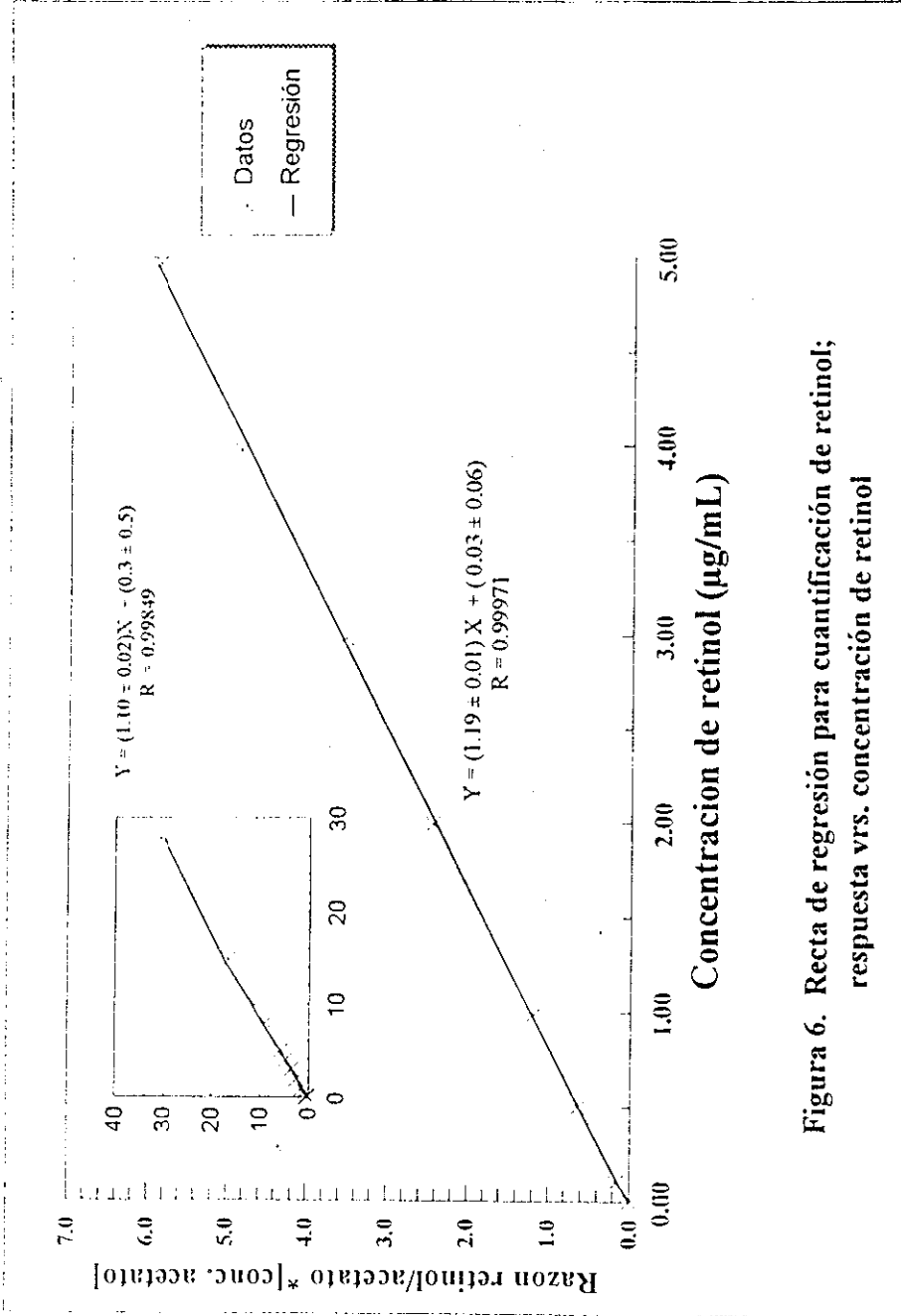
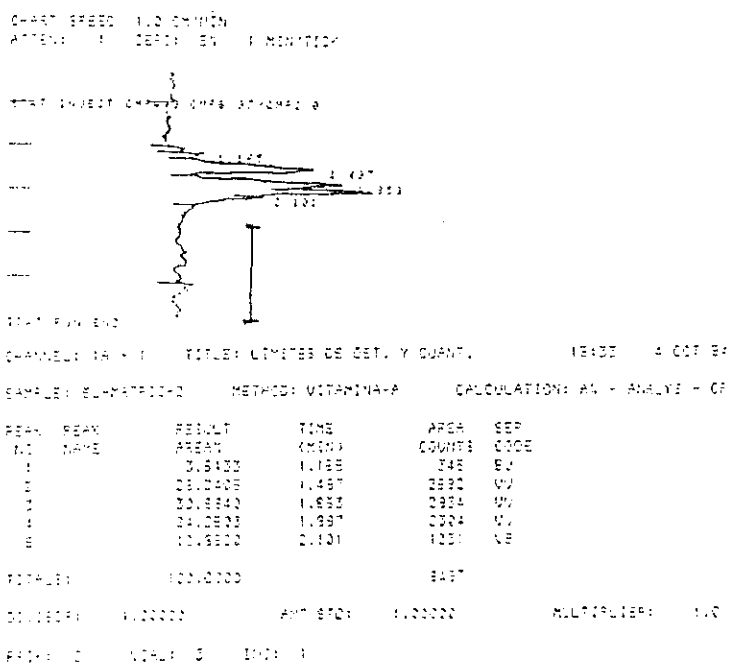
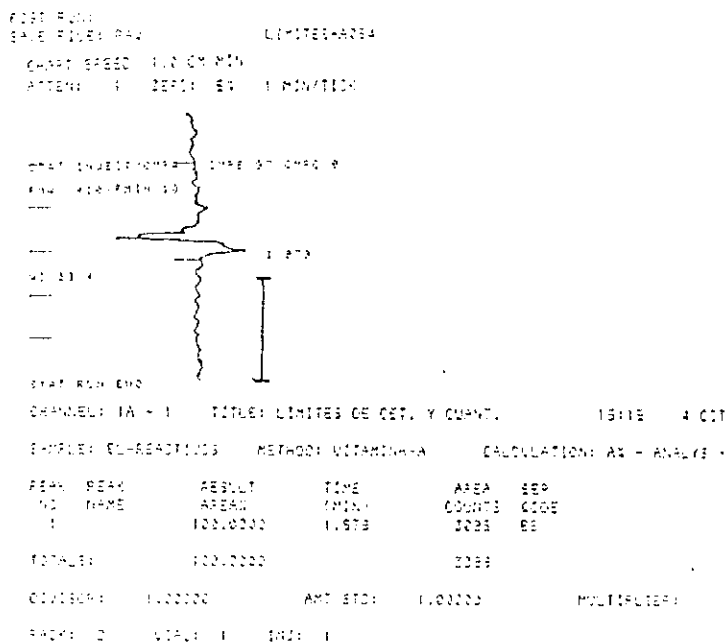


Figura 6. Recta de regresión para cuantificación de retinol; respuesta vs. concentración de retinol



A



B

Figura 7. Cromatogramas de: A.. una muestra de harina sin fortificar (blanco de matriz) y B. blanco de reactivos. Fase móvil: Metanol:agua (97:3), flujo:1 mL/min, detector:UV (325 nm), sensibilidad:0.005 ua/mV, atenuación 1. Las áreas marcadas corresponden al área donde aparece el retinol y acetato de retinol.

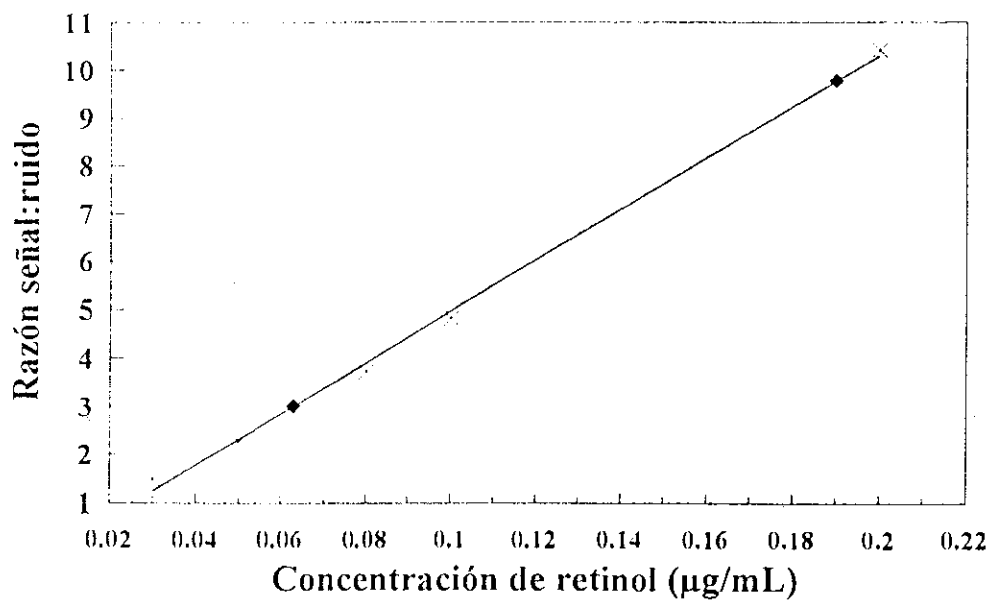


Figura 8. Límites de detección y cuantificación de retinol por el método HPLC.

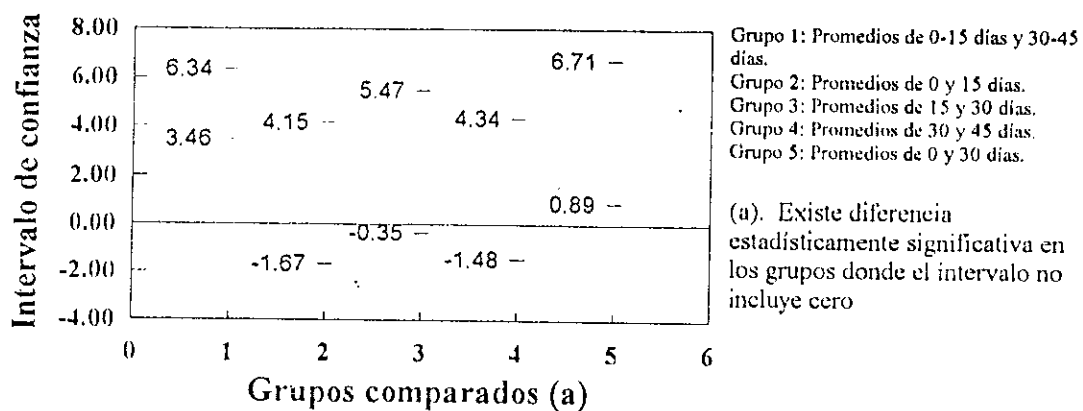
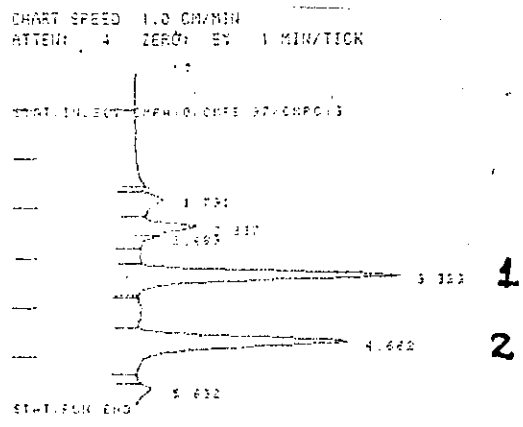


Figura 9. Intervalos de confianza para la comparación de medias de retinol en las galletas durante su vida de anaquel, según Scheffé



CHANNEL: 1A - 1 TITLE: MUESTRAS DE HARINA Y GALLETA 10:37 26 APR 95
SAMPLE: 191-2521-1 METHOD: VITAMINA-A CALCULATION: AX - ANALYS - GP

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		4.0091	1.791	2020	6U
2		8.1216	2.327	3831	6U
3		1.7576	3.469	890	16
4		41.9309	3.323	20197	6B
5		40.9150	4.622	19978	6B
6		3.8880	5.622	1234	6B
TOTALS:		100.0000		49110	

CONVSR: 1.00000 INT STD: 1.00000 MULTIPLIER: 1.00000
PACK: 3 VIAL: 12 INJ: 1

POST RUN:
SAVE FILE: RAW MUESTRA-A124

Figura 10. Cromatograma de una muestra de galleta nutricionalmente mejorada. 1. Retinol. 2. Acetato de retinol.

ANEXOS

ANEXO A

Formulación de la galleta nutricionalmente mejorada³

Ingredientes	Porcentaje	Peso (g/galleta)
Harina de trigo suave	24.51	6.95
Harina fortificada (Maisoy)	24.51	6.95
Azúcar	29.41	8.35
Manteca	19.61	5.56
Polvo de hornear	1.47	0.42
Sal	0.49	0.14
Total	100.0	28.37

PREPARACIÓN DE LA GALLETA NUTRICIONALMENTE MEJORADA

1. Poner la masa de soya en la artesa limpia.
2. Pesar el azúcar y tomar aproximadamente una tercera parte del azúcar pesada y mezclarla durante 8 a 15 minutos con la masa de soya.
3. Pesar la manteca y la sal y mezclarla con el resto del azúcar, hasta que dé el punto de cremado (la mezcla debe estar fina).
4. A este cremado, se agregan los saborizantes en la cantidad deseada. Se mezclan durante unos 5 minutos.
5. Se agrega agua y se mezclan el cremado con la mezcla de masa de soya y azúcar, durante aproximadamente 10 minutos.
6. Se pesa la harina de trigo cernida, la harina de maíz y el polvo de hornear y se mezclan.

7. Se agrega la mezcla de harina de trigo, harina de maíz y polvo de hornear, a la pasta de manteca, azúcar, sal y saborizantes y se mezcla por 20 minutos. La masa de la galleta debe quedar pareja, despegar bien y tener cuerpo.
8. Si la masa queda muy quebradiza y dura, agregar poco a poco más agua, hasta que la pasta quede moldeable, con cuerpo; cuidando de no excederse de agua para que la pasta no quede muy suave.
9. Se calienta el horno para poder hornear las galletas a una temperatura entre 160°C y 175°C.
10. Se pone una cantidad de la masa de galleta sobre la tabla de figurado y se extiende con el bolillo. La masa debe quedar pareja, a la altura de las guías, y llenar todo el espacio que queda entre las guías.
11. Se cortan las galletas con el molde. Se pesa una galleta de cada corte, que debe pesar un poco más de una onza (aproximadamente 34 ó 35 gramos). Si pesa menos de 35 gramos, las guías no están a la altura que deben, y se tendrán que arreglar.
12. Se hornean las galletas por 20 minutos. Deben quedar bien horneadas, tostadas, no crudas ni quemadas.
13. Las galletas se dejan enfriar durante 20 a 30 minutos en las latas.

UNA GALLETA HORNEADA Y FRIA DEBE PESAR NO MENOS DE UNA
ONZA

ANEXO B

DETERMINACION POR HPLC DE RETINOL EN MAISOY Y GALLETA

NUTRICIONALMENTE MEJORADA⁵

Referencias

- Dueker S., Lunetta J., Jones A.D. y Clifford, A. (1993) Solid-Phase Extraction Protocol for Isolating Retinol-d₃ and Retinol from Plasma for Parallel Processing for Epidemiological Studies. *Clin. Chem.* 39:2315-2322.
- Egberg D., Heroff J. y Potter R. (1977) Determination of all-trans and 13-cis Vitamin A in Food Products by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 25:1127-1132.
- Helrich K. (Ed.) (1990) *Official Methods of Analysis.* Association of Official Analytical Chemists, New York, 1298 p.

Principio

Este método es muy selectivo y preciso, que no requiere de blancos ni de la irradiación de los extractos que contienen retinol. La muestra se saponifica con hidróxido de potasio en etanol con dos propósitos: (a) liberar el retinol de la matriz gelatinosa de la microcápsula, y (b) hidrolizar el retinol de sus ésteres. La solución se neutraliza y luego se pasa por una resina hidrofóbica (C₁₈) en un cartucho Sep-Pak, en el que se separan sustancias hidrofílicas acompañantes mediante lavados con acetonitrilo y agua destilada. Finalmente, se eluye el retinol con 2-propanol absoluto. El retinol se separa por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizándose una fase estacionaria apolar (C₁₈) y metanol al 97% como fase móvil. El retinol se detecta con un detector ultravioleta a 325 nm, y su concentración se determina usando acetato de retinol como estándar interno.

⁵ Método desarrollado por M. Guamuch para harinas y galletas fortificadas.

Puntos críticos y precauciones

Es preferible separar y determinar la cantidad de retinol libre en vez de su palmitato, ya que el sistema de HPLC utilizado tiene mayor resolución, sensibilidad, precisión y rapidez con el primero.

El método aquí descrito ha sido validado para harinas y galletas fortificadas con vitamina A; sin embargo, éste puede ser utilizado para el análisis de otros alimentos, con los consiguientes ajustes y validación.

De acuerdo a la experiencia con este método en el laboratorio de los autores, si la variabilidad entre los duplicados de una misma solución es tal que estos se apartan de su promedio en más del 2%, se rechazan los resultados y se repiten las lecturas. Los resultados de dos submuestras de la misma muestra pesadas independientemente no deben apartarse de su promedio en más de 10% en las harinas y de 7% en las galletas; en caso contrario el análisis de la muestra se repite completamente.

Equipo

Baño de agua (90°C)

Cartucho Sep-Pak Vac/ICC C₁₈, (Millipore, Producto 23590).

Columna Micropak SP-18-5 de 150 x 4 (D.I) mm (Varian 03-912042-42)

Cromatógrafo líquido, por ejemplo Cromatógrafo Varian 5500 con detector UV, que incluye: Autosampler Vista 9090, Interfase Varian IIM-A, Computadora DS-650, impresora HP Thinkjet

Espectrofotómetro UV/Vis, por ejemplo Varian DMS-100S o Perkin Elmer Lambda 3B

Sistema de filtración Millipore con membrana de 0.45 µm

Sistema de vacío múltiple de 16 posiciones. (Millipore, Waters Chromatography. Parte No. 54755 Cat. No. 54829).

Materiales

Balones volumétricos de 10, 25, 100 y 1000 mL

Balones de fondo plano 24/40 de 250 mL

Celdas de cuarzo para espectrofotómetro

Condensador de reflujo

Embudos

Pipetas volumétricas

Probetas de 10 y 50 mL

Tubos de ensayo de 20 mL

Tubos de vidrio de 20 mL con tapón esmerilado

Varillas de vidrio

Vasos de precipitar (beaker) de 30, 150, 250 y 600 mL
Espátulas de pesada
Bulbos para aspiración con pipetas Pasteur y pipetas serológicas
Jeringa para inyección en el equipo de HPLC
Papel pH (1-14)
Tela negra

Reactivos

Acetonitrilo-20% v/v: En un balón volumétrico de 100 mL, diluya 20 mL de acetonitrilo (CH_3CN), pureza=99.9% PM=41.05, $d=0.786$ g/mL, por ejemplo J.T. Baker, Art. 9017) con agua bidestilada. **Prepare esta solución cada vez que se utiliza; descarte el residuo.**

Acido acético glacial-0.4 g/mL en acetonitrilo: En un vaso de precipitar de 600 mL agregue aproximadamente 200 mL de acetonitrilo. Mida 191 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH), pureza=99.8%, PM=60.05 g/mol, $d=1.05$ g/mL, por ejemplo Merck. Art. 2500) y agréuelos al acetonitrilo. Agite vigorosamente y complete 500 mL con acetonitrilo.

Acido ascórbico-0.1 g/mL: Pese exactamente 2.5 g de ácido ascórbico p.a. ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), PM=176.13, por ejemplo Fisher Scientific, Art. A-61), disuelva y afore con agua bidestilada en un balón volumétrico de 25 mL. **Prepare cada vez que se utiliza; descarte el residuo.**

Etanol Absoluto p.a. ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), pureza=99.8%, PM=46.07, $d=0.79$ g/mL, por ejemplo Merck Art. 983).

Hidróxido de Potasio-50% p/v: Pese 100 gramos de hidróxido de potasio (KOH), pureza=85.0%, PM=56.11, por ejemplo Merck. Art. 5033) y agregue 100 mL de agua bidestilada. Agite vigorosamente, y lleve a un volumen de 200 mL con agua bidestilada. Almacene en frasco de polietileno.

Metanol Grado HPLC (CH_3OH), pureza=100% PM=32.04, $d=0.79$ g/mL, por ejemplo J.T. Baker Art. 9093).

2-Propanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), pureza=100.0%, PM=60.10, $d=0.78$ g/mL; por ejemplo J.T. Baker Art. 9084).

Estándar interno de acetato de retinol:

Solución "madre" ($\approx 500 \mu\text{g/mL}$): En un vaso de precipitar de 10 mL pese 0.056 g de acetato de retinol de la más alta pureza (PM=328.5, por ejemplo Sigma Art. R-3513, pureza $\approx 90\%$) y disuelva con etanol absoluto. Transfiera a un balón volumétrico de 100 mL. Lave el vaso de precipitar con varias porciones de etanol absoluto, y transfiera los lavados al balón. Agregue aproximadamente 0.002 g de BHT (2,6-bis-(t-butil)-4-hidroxi-tolueno, por ejemplo Sigma Art. B-1378). Afore a 100 mL con etanol absoluto. Guarde la solución en congelación (-20°C) dentro de un frasco de vidrio oscuro con tapón de rosca. La concentración de esta solución se estima por cálculo a partir de la concentración de la solución "nieta".

Solución "hija" ($\approx 100 \mu\text{g/mL}$): En un balón volumétrico de 25 mL diluya 5 mL de la solución "madre" a 25 mL con etanol absoluto. Guárdela como indicado para la solución madre y estime la concentración de retinol a partir de la concentración de la solución nieta. El día de su uso, póngala en refrigeración.

Solución "nieta" ($\approx 5 \mu\text{g/mL}$): En un balón volumétrico de 50 mL, diluya 2.5 mL de la solución "hija" a 50 mL con etanol absoluto. Guárdela refrigerada.

Determine la concentración real de acetato de retinol en la solución "nieta" como sigue:

-Lea en triplicado la absorbancia de la solución "nieta" de acetato de retinol a 325 nm en el espectrofotómetro. Ajuste el cero del instrumento con etanol absoluto.

-Divida el valor promedio de la absorbancia entre 0.155^6 . El resultado obtenido es la concentración real en $\mu\text{g/mL}$ de la solución "nieta". El nivel de retinol de las soluciones "hija" y "madre" puede obtenerse multiplicando ese valor por 20 y 100, respectivamente.

-Esta solución se prepara cada vez previamente a su uso.

⁶ Este valor es el coeficiente de absortividad ($\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mL}$) del acetato de retinol en etanol absoluto a 325 nm.

Soluciones patrón de retinol:

Solución "madre" ($\approx 500 \mu\text{g/mL}$): En un vaso de precipitar de 10 mL pese 0.071 g de retinol de la más alta pureza ($\text{PM}=286.5$, por ejemplo Sigma Art. R-7632, pureza $\approx 70\%$) y disuelva con etanol absoluto. Transfiera a un balón volumétrico de 100 mL. Lave el vaso de precipitar con varias porciones de etanol absoluto, y transfiera los residuos al balón. Agregue aproximadamente 0.002 g de BHT. Afore a 100 mL con etanol absoluto. Guarde la solución en congelación dentro de un frasco de vidrio oscuro con tapón de rosca. La concentración de esta solución se estima por cálculo a partir de la concentración de la solución "nieta".

Solución "hija" ($\approx 10 \mu\text{g/mL}$): En un balón volumétrico de 25 mL diluya 0.5 mL de la solución "madre" a 25 mL con etanol absoluto. Guárdela como se indica para la solución "madre" y estime la concentración de retinol a partir de la concentración de la solución nieta.

Solución "nieta" ($\approx 5 \mu\text{g/mL}$): En un balón volumétrico de 10 mL, diluya 5 mL de la solución "hija" a 10 mL con etanol absoluto.

Determine la concentración real de retinol de las soluciones de retinol como sigue:

-Lea en triplicado la absorbancia de la solución "nieta" de retinol- $5 \mu\text{g/mL}$ a 325 nm en el espectrofotómetro. Ajuste el cero del instrumento con etanol absoluto.

-Divida el valor promedio de la absorbancia entre 0.1835⁷. El resultado obtenido es la concentración real en $\mu\text{g/mL}$ de esta solución "nieta". Calcule la concentración de las otras soluciones "nietas", dividiendo el valor obtenido entre los respectivos factores de dilución. El nivel de retinol de las soluciones "hija" y "madre" en $\mu\text{g/mL}$ puede obtenerse multiplicando el nivel de la primera solución "nieta" por 2 y 100, respectivamente.

⁷ Este valor es el coeficiente de absortividad ($\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mL}$) del retinol en etanol absoluto a 325 nm.

Procedimiento

Obtención de la curva de calibración:

1. En balones volumétricos de 10 mL, diluya con etanol absoluto la solución "hija" para obtener por lo menos 6 soluciones de retinol de diferente concentración dentro del intervalo de 0 a 5 $\mu\text{g/mL}$, y ponga 4.0 mL de la solución "nieta" de acetato de retinol ($\approx 5 \mu\text{g/mL}$). Guarde las soluciones "nietas" refrigeradas. Lleve a volumen con etanol absoluto. Las soluciones "nietas" se preparan cada vez previamente a su uso.
2. Trace una gráfica de las concentraciones finales de retinol (x) *versus* el producto de la concentración final de acetato de retinol por la razón de las áreas de los picos de elución del retinol sobre el del acetato de retinol (y). Calcule la ecuación de la línea de regresión con los valores obtenidos; ésta le servirá para calcular los niveles de retinol en las soluciones finales de las muestras.

- Se recomienda calcular esta línea de regresión cada quince días para confirmar que las condiciones analíticas permanecen invariables. Una curva típica es la siguiente:

$$Y = 1.19X + 0.03$$

En donde:

$$Y = [\text{Ac.retinol}] \times (\text{Area picos retinol/acetato de retinol})$$

$$X = \text{Concentración de retinol } (\mu\text{g/mL})$$

B. Saponificación:

1. Triture y homogenice las muestras.
2. En un balón de fondo plano (24/40) de 250 mL ponga 2.0 g de muestra. Agregue 40 mL de etanol absoluto, 10 mL de la solución de hidróxido de potasio-50% p/v y 2 mL de la solución de ácido ascórbico-0.1 g/mL.

3. Coloque el balón en un baño de agua a 90°C con un condensador de reflujo. Refluje por 30 minutos y luego enfríe.
4. Neutralice la muestra con la solución de ácido acético/acetonitrilo, midiendo el pH con papel indicador, hasta llevar a 7. Se requieren aproximadamente 12 mL de la solución neutralizante.
5. Agregue 1.25 mL de la solución "hija" de acetato de retinol a cada una de las muestras y los controles.
6. Transfiera el contenido completo a un balón volumétrico de 100 mL y afore con agua bidestilada.

C. Extracción:

1. En un tubo para centrifuga ponga 10 mL de la suspensión de la muestra.
2. Centrifugue a 2,500 rpm por 5 minutos para muestras de harina y 10 minutos para muestras de galleta.
3. Coloque los cartuchos Sep-Pak en el sistema para vacío y acondiciónelos pasándoles 2 mL de acetonitrilo y luego 2 mL de agua bidestilada.
4. Pase 2 mL del sobrenadante de la etapa (2) por el cartucho con un flujo lento.
5. Lave con 2 mL de la solución de acetonitrilo-20%. Deje pasar aire durante aproximadamente 30 segundos para sacar cualquier residuo de solvente.
6. Eluya el retinol con 1 mL de 2-propanol absoluto. Reciba el eluato en tubos de ensayo con tapón de rosca.
7. Lave el cartucho Sep-Pak con 2 mL de agua bidestilada y luego con 2 mL de 2-propanol absoluto para poder reutilizarlo.

D. Cromatografía:

1. Filtre la muestra eluída con un filtro de membrana de 0.45 μm ; recoja el filtrado en un vial de 2 mL y tape con su septum.

2. Con una jeringa, tome la cantidad apropiada de muestra de acuerdo a la capacidad del equipo e inyéctela al sistema de HPLC bajo las condiciones analíticas especificadas. Un ejemplo es el siguiente:

Fase móvil	Metanol:agua (97:3 v/v)
Flujo	1 mL/min
Detector	UV a 325 nm con sensibilidad de 0.005 ua/mV
Atenuación integrador	4
Velocidad del papel	1 cm/min
Volumen de inyección	10 μ L
Tiempo de elución	Retinol: 3.5 min Acetato de retinol: 4.8 min

Cálculos

La concentración de retinol (X) de las soluciones de las muestras analizadas en el equipo de HPLC se calcula utilizando directamente la curva de calibración. Nótese que hay que multiplicar la razones de las áreas del pico del retinol sobre el pico de su estándar interno de acetato de retinol, por 1/10 de la concentración exacta de la solución "hija" de acetato de retinol empleada en el ensayo. Seguidamente, la concentración de retinol en las muestras se calcula según la ecuación siguiente:

$$\text{Retinol } (\mu\text{g/g}) = \frac{X \times V_e \times VI}{V_{sp} \times p \times R}$$

La ecuación anterior se simplifica a:

Harina:

$$\text{Retinol } (\mu\text{g/g}) = X \times 28.77$$

Galleta:

$$\text{Retinol } (\mu\text{g/g}) = X \times 26.82$$

Los parámetros de la ecuación son los siguientes:

PARAMETRO	EXPLICACION	HARINA	GALLETA
X	= Concentración de retinol de la solución de la muestra inyectada en el HPLC, calculada con la curva de calibración ($\mu\text{g/mL}$)	?	?
Ve	= Volumen de la solución eluída (mL)	1	1
V _{sp}	= Volumen pasado por el cartucho Sep-Pak (mL)	2	2
VI	= Volumen inicial de la muestra (mL)	100	100
p	= Peso de la muestra (g)	2	2
R	= Recuperación	0.869	0.932

ANEXO C

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE LA GALLETA

El porcentaje de humedad se determinó en las muestras molidas, para lo cual se pesaron 2 g. Se calentó la muestra en un horno a 90°C por 3 1/2 horas. La pérdida de peso de la muestra tras este proceso se considera como la humedad de la misma.

El valor de la humedad de la muestra se calcula según la ecuación presentada abajo, y se expresa como un porcentaje del peso total de la muestra.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso de muestra} - \text{peso de muestra seca}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

ANEXO D

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE PALMITATO DE RETINOL EN AZUCAR FORTIFICADA⁸

Referencias

Arroyave G. y Funes C. de (1974) Enriquecimiento de Azúcar con Vitamina A. Método para la Determinación Cuantitativa de Retinol en Azúcar Blanca de Mesa. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 24:147-153.

Principio

Este método es una adaptación simplificada del método usado por el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) del Ministerio de Salud de Guatemala (Campos y Canahuí)⁹, que se basa en el propuesto por Arroyave y Funes (1974). El procedimiento como está descrito utiliza 5-10 veces menos cantidad de reactivos que el original. Tiene una exactitud y recuperación semejantes, y su precisión, aunque un poco menor, es muy satisfactoria (< 3%). Consiste en la extracción del palmitato de retinol en n-hexano. La concentración de retinol es determinada por su absorbancia a 325 nm. El método usualmente no requiere la destrucción del retinol por irradiación con luz ultravioleta, porque la absorbancia a 325 nm del extracto orgánico es debida esencialmente al retinol presente en el azúcar.

⁸ Revisado por E. Morales, T. Ramos, G. Pirir y O. Dary.

⁹ Campos M. de y Canahuí E. Método Rápido para la Determinación de Palmitato de Vitamina A en Azúcar. Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM), Ministerio de Salud Pública de Guatemala. Documento de uso interno.

Puntos críticos y precauciones

Se recomienda el uso de tela negra para cubrir los tubos o balones que contienen retinol. Una vez que el palmitato de retinol se ha extraído en la fase orgánica, el análisis no debe interrumpirse. Además, debe trabajarse rápidamente para evitar la evaporación de los solventes y la consiguiente concentración de las soluciones. Se requieren campanas de extracción y, si el laboratorio está localizado en zonas cálidas, el uso de aparatos de aire acondicionado. Se recomienda usar bulbos especiales para succionar solventes.

El método usualmente no requiere la corrección de la absorbancia por una segunda lectura después de la destrucción del retinol por luz ultravioleta, lo cual es una ventaja ya que la irradiación tiende a elevar la temperatura de los solventes, lo que conlleva riesgo de explosión. Sin embargo, es preciso preparar un blanco experimental con azúcar sin fortificar de la misma procedencia que el azúcar fortificada. Este blanco debería dar una absorbancia menor a 0.050.

De acuerdo a la experiencia con este método en el laboratorio de los autores, si la variabilidad entre las réplicas extraídas de una misma solución de azúcar es tal que éstas se apartan de su promedio en más del 5%, se rechazan los resultados y se repiten las lecturas.

Equipo

Agitador tipo Vortex
Baño de Agua (50-60°C)
Espectrofotómetro UV/Vis, por ejemplo VARIAN DMS-100S o Perkin Elmer
Lambda 3B

Materiales

Balones volumétricos o probetas de 100 mL
Celdas para espectrofotómetro (preferiblemente de cuarzo)
Erlenmeyer de 250 mL con tapón esmerilado
Pipetas graduadas serológicas
Pipetas volumétricas
Pipetas Pasteur
Probeta de 5-10 mL
Tubo de ensayo de 20 mL, con tapón esmerilado o de rosca

Varillas de vidrio
Vasos de precipitar (beaker) de 200-250 mL
Bulbos de aspiración para pipetas Pasteur y pipetas serológicas
Espátulas de pesada
Tela negra

Reactivos,

- Etanol absoluto p.a. (C_2H_5OH), pureza=99.8%, PM=46.07, $d=0.79$ g/mL, por ejemplo Merck Art. 983).
- n-Hexano p.a. (C_6H_{14}) PM=86.18, $d=0.66$ g/mL, por ejemplo Merck Art.4367)

Procedimiento

1. Homogenice la muestra mezclándola varias veces.
2. Pese aproximadamente 20 g de azúcar, registrando el peso exacto a centésimos de gramo, y disuelva con 60-80 mL de agua destilada a 50-60°C en un vaso de precipitar de 200-250 mL. Mezcle con una varilla de vidrio para disolver completamente. Prepare un blanco de reactivos solamente con agua destilada y llevándolo a través de los mismos pasos del procedimiento que las muestras.
3. Incube en baño de agua a 50-60°C por 15 min. Deje en reposo a temperatura ambiente hasta que las soluciones se enfríen.
4. Transfiera cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL. Lave varias veces el vaso de precipitar con pequeñas porciones de agua destilada y transfiera los lavados al balón. Afore a 100 mL con agua destilada. Mezcle.
5. Transfiera 4 mL de la solución preparada en el paso (4) a cada uno de tres tubos de vidrio de 20 mL (con tapón esmerilado o de rosca) con el propósito de analizar cada solución por triplicado.
6. Agregue 4 mL de etanol absoluto a cada tubo. Mezcle en agitador tipo Vortex por 5 segundos.

7. Mida 5 mL de n-hexano en una probeta de 5 ó 10 mL y luego agregue cuidadosamente esa cantidad a cada uno de los tubos del paso (6). Tape cada tubo inmediatamente y agite con suficiente intensidad en el agitador tipo Vortex por 30 segundos, para asegurar la extracción completa del retinol. Destape ligeramente los tubos para aliviar la presión de los gases.
8. Agregue 10 gotas de etanol absoluto en cada uno de los tubos para facilitar la separación de fases. La fase orgánica es la superior.
9. A la mayor brevedad posible, transfiera con una pipeta Pasteur la solución de n-hexano a una celda de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz, y lea su absorbancia a 325 nm. Ajuste continuamente el cero del instrumento con n-hexano. Si no se dispone de un espectrofotómetro con luz ultravioleta, puede leerse en un espectrofotómetro de luz visible que alcance longitudes de onda inferiores a 350 nm, aunque en este caso la sensibilidad del método se reduce.

Cálculos

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

$$P. \text{ de retinol } (\mu\text{g/g}) = \frac{Abs_{\text{corregida}}}{\epsilon} \times \frac{V_h}{V_{az}} \times \frac{VI}{p} \times \frac{FC_{lon}}{R} \times FC_{esp}$$

Para expresar los resultados como retinol no esterificado, se multiplica por la relación de pesos moleculares retinol/palmitato de retinol ($286.46/524.84 = 0.546$)

La ecuación anterior se simplifica a:

$$Retinol (\mu\text{g/g}) = Abs_{\text{corregida}} \times \frac{741.84}{p} \times FC_{lon} \times FC_{esp}$$

Los parámetros de la ecuación son los siguientes:

PARAMETRO	EXPLICACION	VALOR
ϵ	= Coeficiente de absorptividad del palmitato de retinol en n-hexano ($\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mL}$) (El coeficiente de absorptividad del retinol libre en hexano es 0.1835)	0.0.975
Vh	= Volumen de la fase orgánica (mL)	5.0
Vaz	= Volumen de la alícuota analizada de la solución de azúcar (mL)	4.0
VI	= Volumen inicial de la muestra (mL)	100.0
p	= Peso de la muestra (g)	?
FC_{lon}	= Factor de corrección específico para la longitud de onda usada (ver Cuadro 3-1). Para 325 nm con luz UV	1.000
R	= Recuperación	0.905
FC_{esp}	= Factor de corrección del espectrofotómetro (ver Anexo 3-2). Idealmente	1.000

Variantes

En vez de n-hexano puede emplearse la mezcla de éteres: Eter de Petróleo:Eter Dietílico, 1:1 (v/v). Eter de petróleo p.a. (fracción 40-60°C, $d=0.65 \text{ g/mL}$, por ejemplo Merck Art. 1775). Eter dietílico p.a. ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$, pureza=99.5%, $\text{PM}=74.12$, $d=0.71 \text{ g/mL}$, por ejemplo Merck Art. 921). Esta mezcla se prepara solamente en cantidad necesaria para su uso inmediato. Guárdese en Erlenmeyer o frasco con tapón esmerilado. Esta mezcla tiene la ventaja tener mayor capacidad de extracción (96.5% contra 90.5%), aunque es más volátil. Con este solvente, el factor 741.84 de la ecuación simplificada debe reemplazarse por **707.25**, que ya considera la mayor capacidad de extracción de la mezcla de éteres.



ANEXO E

ECUACIONES PARA PRUEBAS ESTADISTICAS

1. Prueba de T de Student

Utilizada en la comparación de los valores de retinol antes y después del proceso de horneado de la galleta nutricionalmente mejorada.

Hipótesis nula (H_0): $\mu_d = \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alternativa (H_a): $\mu_d = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

$$t = \frac{\bar{d} - 0}{s_d \sqrt{n}}$$

donde d = promedio de la diferencia entre los valores de cada grupo.

s_d = desviación estándar de la diferencia entre los valores de cada grupo

n = número de valores en cada grupo. En este caso $n_1 = n_2$

Estadístico de prueba: t crítica (α) con g.l. = $n - 1$

Regla de decisión: Se rechaza si $t > t$ crítica α

(Mendenhall, 1986)

2. Análisis de Varianza para Diseño de Bloques al Azar

a. Comparación de Tratamientos:

Hipótesis nula (H_0): Las medias de los tratamientos son iguales.

Hipótesis alternativa (H_a): Uno o más pares de las medias son distintas.

b. Comparación de Bloques:

Hipótesis nula (H_0): Las medias de los bloques son iguales.

Hipótesis alternativa (H_a): Uno o más pares de las medias de los bloques son diferentes.

Fuente	Grados de libertad (g.l.)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	F
Bloques	b - 1	$\frac{\sum_{i=1}^b B_i^2}{p} - CM$	SCB/(b-1)	CMB/CME
Tratamientos	p - 1	$\frac{\sum_{j=1}^p T_j^2}{b} - CM$	SCT/(p-1)	CMT/CME
Error	n-b-p+1	SC Total - SCB - SCT	SCE/(n-b-p+1)	
Total	n - 1	$\sum_{i=1}^b \sum_{j=1}^p y_{ij}^2 - CM$		

$$CM = \frac{\left(\sum_{i=1}^b \sum_{j=1}^p y_{ij} \right)^2}{n}$$

<i>Estadístico de prueba:</i>	F crítica (α), donde F está basada en $v_1 = (p - 1)$ y $v_2 = (n - b - p + 1)$ grados de libertad.
<i>Regla de decisión:</i>	Rechazar la hipótesis nula si $F > F_\alpha$

(Mendenhall, 1986)

3. Método de Scheffé de comparaciones múltiples

Contraste: Diferencia entre dos medias, $\mu_i - \mu_r$, como también lo es la diferencia entre el promedio entre cualquier subgrupo de medias restado del promedio de cualquier otro grupo de medias.

Estimador de L:

$$\hat{L} = \sum c_j \bar{Y}_j$$

Varianza estimada:

$$s^2(\hat{L}) = CME \sum \frac{c_j^2}{n_j}$$

Intervalo de confianza para los contrastes (L):

$$\hat{L} - Ss(\hat{L}) \leq L \leq \hat{L} + Ss(\hat{L})$$

La diferencia entre dos medias o entre un grupo de medias, es estadísticamente significativa si el intervalo de confianza del contraste no incluye el valor de cero.

(Neter y Wasserman, 1974)

