

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



EVALUACION DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO DEL METODO
ANALITICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)
PARA DETERMINAR ACIDO FOLICO EN YOGURT

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

SONIA MARYSOL RODRIGUEZ SERRANO

CLAUDIA MARICELA ULLOA GONZALEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA DE QUIMICA Y FARMACIA

MARZO 2010

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

**ASESORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS, COSMETICOS Y VETERINARIOS**

MSc. Rocio Ruano de Sandoval

**ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: TOXICOLOGIA Y QUIMICA
LEGAL**

Licda. María Luisa Ortiz de López

DOCENTE DIRECTORA

Licda. Nancy Zuleima González

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por ser nuestro soporte, fortaleza, por su protección y provisión; gracias por estar a nuestro lado en los momentos difíciles así como en los felices.

A nuestros padres, por sus esfuerzos, por la confianza que han depositado en nosotras y por ese gran amor con el que nos han acompañado a lo largo de nuestras vidas y sobretodo en el transcurso de nuestra carrera universitaria.

Agradecemos el apoyo del Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de El Salvador.

Agradecemos de forma muy especial a nuestra docente directora Licda. Nancy Zuleyma González, por tomar este reto y llevarnos hasta el final, gracias por su dedicación, sabiduría, paciencia, cariño y tiempo. Que Dios derrame abundantes bendiciones en su vida y en su familia.

A nuestro jurado: Lic. Odette Rauda, MSc. Rocío Rauda, Lic. María Luisa Ortiz, por sus sabios consejos y apoyo.

Nuestro agradecimiento finalmente a todas esas vocaciones representadas en los maestros y docentes que nos acompañaron en este camino académico, que Dios bendiga sus vidas y sus dedicaciones.

Marysol Rodríguez y Claudia Ulloa

DEDICATORIA

A Dios misericordioso que, tomó a bien fijar sus ojos en ésta su sierva, desde la eternidad y desde entonces no me ha abandonado, ni por un instante, porque ha sido mi fortaleza, mi refugio y consuelo, la fuente de mi alegría y de mi amor, sobretodo mi amigo, y mi Dios; el único por el cual puedo concluir esta etapa de mi vida y ver hacia delante con ojos de esperanza y llenos de ilusiones.

A mi amada Madre, la Santísima y siempre Virgen María, por llevarme a los pies de Jesús, por todas esas veces que limpiaste mis lágrimas y me consolaste, por tu valiosa intercesión y por tu amor.

A mis amadísimos padres, por ser esos hermosos instrumentos que Dios ha dispuesto en mi vida para guiarme, por ese precioso amor que me brindan y por ser mi ejemplo de vida; sin el esfuerzo, los consejos, la ayuda, la confianza y paciencia de mis padres este sueño no se habría podido cumplir. Que Dios les bendiga abundantemente y les retribuya todo lo que han hecho por mí.

A mis amadísimas hermanas, por sus bellos consejos, por ayudarme, por estar siempre a mi lado y ser amigas incondicionales que le dan luz a mi vida. Porque son sal y luz en mi vida! Que Dios bendiga su caminar con abundantes gracias.

A mi amado Andrés, por pintar en mi vida nuevos paisajes, por la alegría y el amor que has venido a entregar, como un pedacito de cielo en la tierra, que Dios te haga crecer en su gracia, cada vez más y más.

A mi docente directora, por sus palabras de aliento cuando más las necesitaba, por acompañarnos en este reto con paciencia y dedicación; y a mi compañera de tesis por su paciencia, apoyo y por perseverar junto a mí. Dios bendiga sus vidas abundantemente.

Sonia Marysol Rodríguez Serrano.

DEDICATORIA

Doy gracias a DIOS, por haberme permitido llegar a esta etapa de mi camino, gracias por tu amor, provisión, sabiduría y fortaleza, en los momentos más difíciles de mi vida, se que sin ti, no hubiera podido llegar al final.

A Mi Madre: Rosibel González Ulloa, por tu amor, paciencia, apoyo y por tantos sacrificios que hiciste por mí, para dejarme la más preciada herencia, un futuro mejor (una carrera), gracias, te amo y jamás olvidare todo lo que has hecho, para que me realice profesionalmente, no tengo con que pagarte y solo le pido a Dios que te bendiga y te de mucha felicidad, gracias de todo corazón.

A Mis Abuelas: María Mercedes González y Orbelina Ulloa. Por su amor y cuidados que han tenido conmigo, gracias por ser un gran apoyo para mi madre y para mí, por estar siempre a mi lado, que DIOS las bendiga.

A Mis Hermanos: Carolina González y Germán Franco, por su amor, comprensión, por darme su apoyo y su amistad, que DIOS los bendiga a ustedes y a mis amados sobrinos, gracias.

Gracias Don German Franco, por ser un padre para mí. A mi abuelo Gilberto por todo lo que has hecho por mí. Les agradezco a ambos

A Mis Amigos: Miriam, Mayra, Cecia, Rafael y Esaú por ser las mejores amigos,

gracias por estar ahí en los momentos más duros y felices de mi vida, por darme ánimos, palabras de aliento, amor y apoyo.

A Ti Adonay no me queda más que decirte gracias.

A Mi Compañera de tesis, por tu paciencia, apoyo y comprensión.

Claudia Ulloa.

INDICE

	Páginas
Resumen	
CAPITULO I	
1.0 Introducción	xvi
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos	19
CAPITULO III	
3.0 Marco Teórico	21
3.1 Validación de un método analítico	21
3.2 Tipos de validación	21
3.3 Desarrollo de la validación de métodos	22
3.4 Muestreo / tratamiento de la muestra	23
3.5 Prescripciones previas	24
3.6 Parámetros a determinar	24
3.7 Evaluación de los parámetros	26
3.8 Registros	39
3.9 Obtención de la validación de métodos	40

3.10 Acido Fólico: Definición e Importancia.	42
3.11 Absorción y Metabolismo	44
3.12 Excreción del ácido fólico	45
3.13 Funciones del ácido fólico	46
3.14 Fuentes de ácido fólico	47
3.15 Deficiencia de ácido fólico	48
3.16 Toxicidad: Consecuencias de la ingesta excesiva de ácido fólico	50
3.17 Qué es el folato	51
3.18 Patologías a causa de la deficiencia de ácido fólico, que más daño producen al ser humano.	53
3.19 Otros factores de riesgo que predisponen al producto para que desarrolle esta malformación	60
3.20 Anemia megaloblástica	61
3.21 Funciones específicas del ácido fólico para determinados cambios y patologías en el organismo.	63
3.22 Metodologías para determinación de ácido fólico	66

CAPITULO IV

4.0 Diseño metodológico	70
4.1 Tipo de estudio	70

4.2 Investigación Bibliográfica	70
4.3 Investigación de campo	70
4.4 Parte experimental	71
CAPITULO V	
5.0 Resultados e interpretación de resultados	77
CAPITULO VI	
6.0 Conclusiones	103
CAPITULO VII	
7.0 Recomendaciones	106
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Espina bífida
2. Espina bífida oculta
3. Espina bífida abierta
4. Meningocele y lipomeningocele
5. Mielomeningocele
6. Anencefalia
7. Anemia megaloblástica
8. Cuadro de marcas de yogurt utilizadas para evaluar el método
9. Materiales, equipo y reactivos
10. Datos crudos de las soluciones estándar
11. Datos crudos de muestras de yogurt
12. Carta de entrega de resultados al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
13. Método alternativo para determinar ácido fólico en otros alimentos por HPLC-UV

RESUMEN

La fortificación con ácido fólico a bebidas lácteas fermentadas (yogurt) constituye una excelente fuente de esta vitamina para las madres gestantes y reduce los defectos del tubo neural en los fetos. En El Salvador no se cuenta con un método que permita realizar análisis para determinar la presencia de dicha vitamina en el yogurt así como en los demás alimentos de marcas que rotulan su fortificación. Por esta razón el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de El Salvador, solicitó a la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador colaborar en la investigación de un método alternativo directo para la determinación de ácido fólico, para posteriormente efectuar su desarrollo y validación. Por lo tanto esta investigación, realizada durante ocho meses; fue orientada a evaluar tres parámetros de desempeño, como son: precisión del sistema, linealidad del sistema y exactitud del método analítico por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector UV con arreglo de diodos para determinar ácido fólico en yogurt, además de comprobar si el método podría o no ser implementado por el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, Laboratorio Central 'Dr. Max Bloch' del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) de El Salvador, para que a futuro se logre controlar y comprobar el contenido de dicho micronutriente adicionado a los yogurt de las marcas que rotulan su fortificación.

Sin embargo, los resultados obtenidos de la evaluación de dos parámetros de desempeño (exactitud del método, precisión del sistema) por el método

cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector UV con arreglo de diodos, para determinar ácido fólico en yogurt, se encuentran fuera de los criterios de aceptación, descritos en la bibliografía oficial para métodos cromatográficos; no es factible de implementar por parte del Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” de dicho Ministerio; se recomienda seguir en la búsqueda de métodos alternos para determinar ácido fólico en alimentos con el fin contribuir con el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en la verificación de la fortificación de ácido fólico en los alimentos que así lo rotulen.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

Actualmente existen muchos métodos para determinar y cuantificar el ácido fólico el cual fue de gran interés en el trabajo de investigación, no sólo por ser una vitamina fundamental para llevar a cabo todas las funciones del organismo; sino además, porque es importante conocer si la cantidad de ácido fólico que se encuentra en los alimentos y para nuestro interés en el yogurt como un producto lácteo que participa en la dieta alimenticia diaria, es la necesaria requerida en dicha dieta; y así poder garantizar que la población salvadoreña consuma adecuadamente dicho micronutriente.

Basándose en esta información y teniendo en cuenta que en el país no existe actualmente un método para cuantificar las cantidades de ácido fólico, y cuando se requiere (por parte de las industrias productoras), las muestras son enviadas al extranjero para su análisis; la presente investigación tiene el propósito de evaluar los parámetros de desempeño útiles en la validación de un método que permita cuantificar y determinar ácido fólico en yogurt (como una fuente de ácido fólico de origen animal), utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector UV con arreglo de diodos como un método que pudiera ser fácilmente implementado por el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

La realización de esta investigación se cumplió en un tiempo aproximado de ocho meses, a partir del mes de agosto de 2008; utilizando muestras de yogurt en presentaciones de líquidas y semisólidas de diferentes marcas que se

comercializan en El Salvador, específicamente en el Centro Comercial Las Cascadas. Las muestras de yogurt fueron sometidas a una marcha analítica para ser analizadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector UV con arreglo de diodos para determinar ácido fólico, los resultados emitidos de este análisis permitieron evaluar tres parámetros de desempeño: precisión del sistema, exactitud del método y linealidad del sistema.

La evaluación se llevo a cabo haciendo uso de la Guía Eurachem y la Guía de Validación de Métodos Analíticos, concluyéndose que el método analítico utilizado (HPLC) no es factible de implementar para determinar ácido fólico en yogurt, pero es recomendable seguir en la búsqueda de otros métodos que contribuyan a que el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, pueda verificar la fortificación de ácido fólico en alimentos.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar parámetros de desempeño del método analítico por Cromatografía Líquida de alta Precisión (HPLC) para determinar Acido fólico en yogurt.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Investigar bibliográficamente los métodos que actualmente se utilizan para la determinación de Acido fólico en yogurt

2.2.2 Seleccionar el método analítico más factible para poder ser aplicado en el país, por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

2.2.3 Realizar los parámetros de desempeño (Precisión, Exactitud, Linealidad) requerido en la validación del método seleccionado

2.2.4 Presentar los resultados obtenidos de la investigación realizada al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Validación de un método analítico ^(4,5)

Validación se puede definir como una confirmación mediante el examen y la aparición de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización específica prevista. Partiendo de ello, se puede decir que, la validación de un método de ensayo establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos, es decir, es el proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden modificar esas características y hasta qué punto.

3.2 Tipos de Validación ⁽⁷⁾

- **Validación Retrospectiva:** es el establecimiento de evidencia documentada de que un sistema hace lo que se pretende que debe hacer en base a la revisión y análisis de información histórica.
- **Validación Prospectiva:** es el establecimiento de la evidencia documentada de que un sistema hace lo que se pretende que deben hacer en relación a un protocolo previamente planeado.
- **Validación Concurrente:** es el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está

previsto basado en resultados obtenidos paralelamente durante la distribución del producto que involucra al proceso en cuestión.

- **Validación Esbelta:** estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados que consideran en su estudio la identificación de atributos críticos de calidad.

- **Revalidación:** la introducción de un cambio que pueda afectar la idoneidad del Método Analítico establecido por la Validación, podrá exigir una nueva Validación.

3.3 Desarrollo de la validación de métodos ⁽⁵⁾

Consideraciones Generales:

- Determine qué método se desea validar. Asegúrese de considerar aspectos como equipo calibrado, operador entrenado para desarrollar la validación y no aumentar el error del método.
- Para llevar a cabo la validación de métodos se deberá considerar los siguientes pasos:
 - a) Definir a la propiedad / característica que será medida.
 - b) Seleccionar el equipo, reactivos, personal, procedimiento o método a validar, materiales de referencia, métodos de referencia previamente validados si es posible

- c) Llevar a cabo pruebas que apliquen: relevancia, estabilidad, precisión, R&R, exactitud, robustez u otras que se considere importantes. Si se va a validar contra un método previamente validado, entonces, se deben preparar pares de muestras identificadas para poder comparar los dos métodos.
- d) Determinar si el método es adecuado para medir la propiedad o requisito especificado en base a los resultados obtenidos en c. Si se ha validado contra un método previamente validado, entonces se debe comparar los resultados adecuadamente para determinar si existe equivalencia de métodos.
- Como parte de un proceso de validación es esencial que el laboratorio describa el procedimiento de ensayo a utilizar de manera que:
 - a) Asegure la correcta realización del ensayo y su repetibilidad.
 - b) Establezca los límites de aplicación, objetivos y modo de realización

3.4 Muestreo / Tratamiento de muestras ⁽⁵⁾

En caso necesario se indicarán las alícuotas a tomar, su número y sistema de preparación, teniendo en cuenta en este caso las diferencias existentes en la preparación de las muestras que contengan diferentes matrices incluidas en el alcance del método. Dentro de este capítulo se pueden incluir, cuando sea pertinente, las indicaciones relativas al almacenamiento (conservación, tiempo de acondicionamiento, etc.).

3.5 Prescripciones previas ⁽⁵⁾

Condiciones ambientales: indicar, cuando sea necesario, las condiciones ambientales requeridas por la muestra, por el procedimiento de ensayo y por los equipos, para asegurar la repetibilidad del ensayo.

Requisitos previos: incluye preparación de aparatos (ej.: tiempo previo de calentamiento), requisitos de calibración o verificación de los equipos antes de realizar ensayos (pudiendo hacer referencia a un procedimiento independiente que describa estas actividades) etc.

3.6 Parámetros de desempeño

Parámetros de desempeño: son las características de validación que necesitan ser evaluadas ^(6,10). Para demostrar que un método es adecuado para la aplicación que se pretende es preciso determinar mediante estudios de laboratorio sus características de funcionamiento (parámetros), que pueden incluir ⁽⁵⁾:

Exactitud (como Sesgo)	Rugosidad (Robustez)
Especificidad	Selectividad
Linealidad	Identidad
Sensibilidad	Ámbito (rango) lineal
Recuperación	
Precisión (reproducibilidad, repetitividad)	LDC (Límite de Cuantificación)
LDD (Límite de Detección)	

Los parámetros que es preciso determinar difieren según el alcance del método de ensayo a validar (5).

Los tipos de ensayo a considerar serán los siguientes (5):

Métodos de identificación

Determinación cuantitativa de un componente

Determinación cualitativa de un componente

En la tabla siguiente se definen los parámetros a considerar para cada tipo de ensayo (5):

TABLA NO. 1 PARÁMETROS A CONSIDERAR PARA CADA TIPO DE ENSAYO

TIPO DE MÉTODO	PARÁMETRO
Identificación	Identidad Selectividad / Especificidad
Determinación cuantitativa de un componente.	Precisión
	Exactitud
	Linealidad
	Ámbito lineal
	Incertidumbre
	Sensibilidad
	Recuperación
	Rugosidad (Robustez)
	Límite de cuantificación
	Selectividad / Especificidad
Determinación cualitativa	Selectividad / Especificidad Límite de Detección

3.7 Evaluación de los Parámetros ⁽⁵⁾

Se exponen a continuación la definición y algunas posibles pautas para evaluar los parámetros indicados en el apartado anterior

3.7.1 Exactitud ⁽⁵⁾

Se le llama exactitud al grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.

El término “exactitud” cuando se aplica a un conjunto de resultados de mediciones implica la combinación de los componentes aleatorios y de un error sistemático común o de un componente del sesgo.

- a) Analizar: Blanco de reactivos y material de referencia utilizando el método a validar.

Nº veces: 7- 10

Calcular:

- Valor promedio del blanco se resta del valor medio del analito del material de referencia.
- Comparar con el valor real o con el aceptado del material de referencia.
- Da una medida del sesgo del método

Comentarios: Sujeto a la incertidumbre de que el blanco sea un blanco verdadero y a la caracterización del material de referencia.

b) Analizar: Blanco de reactivos y el material de referencia/prueba utilizando el método a validar y un método independiente (preferiblemente un método principal).

Nº veces: 7- 10

Calcular:

- Valor promedio del blanco se resta del valor medio del analito del material de referencia/ prueba.
- Comparar con mediciones similares obtenidas usando el método independiente/ principal.
- Da una medida del sesgo del método con respecto al método independiente / principal.

Comentarios

El método independiente puede tener sesgos propios, por lo que no es una medida absoluta de la exactitud. Idealmente, el método principal no tiene sesgos por lo que es una mejor medida de la exactitud.

3.7.2 PRECISIÓN COMO REPETIVIDAD Y COMO REPRODUCIBILIDAD ⁽⁵⁾

Precisión es el grado de concordancia entre resultados de mediciones repetidas, obtenidas en forma independiente bajo condiciones establecidas.

Se debe considerar que:

1. La precisión depende sólo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado.

2. La medida de la precisión se expresa en términos de imprecisión y se calcula como la desviación estándar de los resultados de las mediciones. Una menor precisión se refleja por una mayor desviación estándar.

3. Resultados de ensayo independientes significan resultados obtenidos sin la influencia de un resultado precedente del mismo material o similar. Las medidas de precisión cuantificadas dependen de una manera crítica de las condiciones estipuladas. Las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad son un conjunto particular de las condiciones extremas estipuladas.

a) Analizar: Estándares, materiales de referencia o blancos de muestras fortificados a varias concentraciones a través del rango de trabajo.

Condiciones: El mismo analista, equipo, laboratorio, en un período corto

N° veces: 7 – 10

Calcular: Determinar la desviación estándar (s) a cada concentración

Comentarios: Determina desviación estándar de repetitividad a cada concentración

b) Analizar: Estándares, materiales de referencia o blancos de muestras fortificados a varias concentraciones a través del rango de trabajo.

Condiciones: Diferentes analistas, equipo, el mismo laboratorio, en un período prolongado.

N° veces: 7 – 10

Calcular: Determinar la desviación estándar (s) a cada concentración.

Comentarios: Determina la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorial a cada concentración.

c) Analizar: Estándares, materiales de referencia o blancos de muestras fortificados a varias concentraciones a través del rango de trabajo.

Condiciones: Diferentes analistas, equipo, diferentes laboratorios, en un período prolongado.

N° veces: 7 – 10

Calcular: Determinar la desviación estándar (s) a cada concentración.

Comentarios: Este literal determina la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorial a cada concentración. Requiere estudio colaborativo.

3.7.3 LÍMITE DE DETECCIÓN (LDD) PARA MEDICIONES CUANTITATIVAS ⁽⁵⁾

Cuando se habla de límite de detección se refiere a la menor concentración / cantidad de algún componente de interés que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Por convención se acepta que este límite de detección es igual a: $LOD = 3\sigma_0$, donde σ_0 es la desviación estándar estimada al mínimo nivel de medición.

Analizar:

- a) Blancos medidos de manera independiente una vez cada uno o
- b) Blancos independientes fortificados a la concentración más baja aceptable medidos una vez cada uno

N° veces: 10

Calcular: *Desviación Estándar de la muestra "s"* de a) muestra de valores del blanco, o b) muestra de valores fortificados.

Expresar LDD como la concentración de analito correspondiente al

1) *Valor promedio del blanco* +3s ó

2) $0 + 3s$.

Comentario: Este procedimiento supone que una señal mayor a 3s puede deberse solamente al blanco en muchísimo menos de un 1% de las veces, y debe provenir posiblemente de algo más, como el mesurando. El método a) es útil solamente cuando las mediciones del blanco dan una desviación estándar distinta de cero. Conseguir un verdadero blanco puede ser difícil.

Analizar:

- c) Blancos independientes fortificados a la menor concentración aceptable medidos una vez cada uno.

Nº veces: 10

Calcular: *Desviación Estándar de la muestra "s"* de los valores del blanco fortificado.

Expresar LDD como la concentración del analito correspondiente al valor promedio del blanco + 4.65s (Esto deriva de la prueba de hipótesis).

Comentarios: La menor "concentración aceptable" se toma como la concentración más baja para la que se puede obtener un grado aceptable de incertidumbre. Se asume como una práctica normal evaluar la muestra y el

blanco de forma separada hacer correcciones para el blanco restando: concentración del analito correspondiente a la señal de la muestra menos la concentración del analito correspondiente a la señal del blanco. Si las mediciones se hacen bajo condiciones de repetibilidad, estas también darán una medida de la precisión como repetibilidad.

3.7.4 LÍMITE DE DETECCIÓN (LDD) PARA MEDICIONES CUALITATIVAS ⁽⁵⁾

Analizar: Blancos fortificados (spiked samples) con el analito a diferentes niveles de concentración dentro de un rango especificado. Es necesario réplicas independientes en cada nivel de concentración. Estas mediciones deben ser aleatorias.

N° veces: 10

Calcular: Deberá construirse una curva de porcentaje de respuestas positivas (o negativas) vrs. concentración, de la cual será posible determinar, por inspección, el punto límite donde la concentración deja de ser confiable.

3.7.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LDC) ⁽⁵⁾

Límite de cuantificación es el límite mínimo o la cantidad mínima de sustancia que deberá estar presente antes que un método se considere capaz de entregar resultados cuantitativos. En otras palabras es, la concentración mínima

que puede determinarse con un nivel aceptable de desviación estándar relativa (RSD) del 10%.

Por convención IUPAC, define que este límite de cuantificación es igual a:

$LOQ = 10\sigma_0$, donde σ_0 es la desviación estándar estimada al mínimo nivel de medición.

Analizar: Blancos independientes medidos una sola vez.

Nº veces: 10

Calcular: Desviación Estándar de la muestra “s” de los valores de los blancos.

Expresar el LDC como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco más cualquiera de los siguientes:

- i) 5s
- ii) 6s
- iii) 10s

Comentarios: Obtener un blanco verdadero puede ser difícil.

- a) Analizar: Enriquecer alícuotas de un blanco con 3 ó más concentraciones del analito cercanas al LDD.

Nº veces: 7-10

Calcular: Calcular la Desviación Estándar “s” del valor del analito a cada concentración. Graficar s vrs *concentración* y asignar un valor al LDC por inspección.

- b) Analizar: Medir muestras independientes al menos a 3 niveles de concentración.

Nº veces: 10

Calcular: Expresar el LDC como la menor concentración del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de incertidumbre.

Comentarios: Normalmente el LDC forma parte del estudio para determinar el rango de trabajo. Este no debe determinarse por extrapolación debajo de la menor concentración de los blancos fortificados. Si las mediciones se hacen bajo condiciones de repetibilidad, una medida de la precisión como tal puede obtenerse a esas concentraciones.

3.7.6 RANGO LINEAL Y DE TRABAJO ⁽⁵⁾

a) Analizar: Blanco más materiales de referencia o blancos fortificados a varias concentraciones. Se necesitan al menos 6 concentraciones además del blanco.

Nº veces: 1

Calcular: Graficar la respuesta de la medición (eje y) contra la concentración del mesurando (eje x). Realizar un examen visual para identificar aproximadamente el rango lineal y los límites inferior y superior del rango de trabajo. Luego continuar con literal b).

Comentarios: Idealmente las diferentes concentraciones deben ser preparadas independientemente y no a partir de alícuotas de la misma solución madre. Esto confirmará de manera visual de que el rango de trabajo es lineal o no.

b) Cont.

Calcular: el coeficiente de regresión. Calcular y graficar los residuos (diferencias entre el valor real y el predicho por la línea recta, para cada valor de x). Una distribución aleatoria alrededor de la línea recta confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican una no linealidad. Pasar luego al literal c).

Comentarios: Esta etapa es necesaria para probar el rango de trabajo, cuando se supone lineal y cuando se pretende utilizar calibración con un punto único. No es recomendable eliminar valores anómalos que difieren del valor promedio del material de referencia. Se recomienda utilizar en este caso, la Prueba Q de Dixon:

$$Q = \frac{\text{Valor sospechoso} - \text{Valor más cercano}}{\text{Valor más grande} - \text{Valor más pequeño}}$$

Los valores críticos de Q para P=0.05 y P =0.01 se encuentran en la tabla mostrada al final de esta tabla. Si el valor de Q calculado supera el valor crítico, se rechaza el valor sospechoso. En la tabla siguiente se definen los valores críticos de Q (P=0.05):

TABLA NO.2: VALORES CRÍTICOS DE Q (P=0.05)

Tamaño de muestra	Valor crítico
4	0.831
5	0.717
6	0.621
7	0.570
8	0.524
9	0.492
10	0.464

c) Analizar: Igual que para LDC ya explicado en el literal (b)

N° veces: 3

Calcular: Como se calculó el LDC, descrito en literal b).

Efectivamente, el LDC define el extremo inferior del rango de trabajo.

3.7.7 RECUPERACIÓN ⁽⁵⁾

Es la fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada o adicionada) previa al análisis que es determinada efectivamente por el método.

a) Analizar: Blancos de matriz o muestras no fortificadas y fortificadas con el analito de interés en el rango de concentraciones especificado.

N° veces: 6

Calcular: Determinar la recuperación del analito a varias concentraciones.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

Donde:

C_1 = Concentración determinada en la muestra fortificada.

C_2 = Concentración determinada en la muestra no fortificada.

C_3 = Concentración de la fortificación

Comentarios: Las muestras fortificadas deben compararse con la misma muestra no fortificada para evaluar la recuperación neta de la fortificación. Las recuperaciones de muestras fortificadas o blancos de una matriz serán usualmente mejores que las de muestras reales, en las que el analito está más firmemente retenido.

b) Analizar: Materiales de referencia certificados (CRM)

N° veces: 1

Calcular: Determinar recuperación del analito con relación al valor certificado. Dependiendo de cómo se produjo y se caracterizó el CRM, puede ser posible obtener recuperaciones > 100 %.

3.7.8 IDENTIDAD, SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD ⁽⁵⁾

Se conoce como identidad/ selectividad / especificidad al grado por el cual un método puede determinar un analito particular dentro de una mezcla compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla.

a) Analizar: Analizar las muestras y los materiales de referencia por el método en validación y otros métodos independientes.

N° veces: 1

Calcular: Usar los resultados de las técnicas confirmatorias para evaluar la habilidad del método para confirmar la identidad del analito y su habilidad para medir el analito aisladamente en presencia de otras interferencias.

Comentarios: Decidir cuánta evidencia se requiere razonablemente para dar suficiente credibilidad.

- b) Analizar: muestras que contengan varios posibles interferentes en presencia del analito de interés.

Nº veces: 1

Calcular: Examinar el efecto de las interferencias – la presencia del interferente aumenta, disminuye la detección o cuantificación del mensurando.

Comentarios: Si la detección o cuantificación es inhibida por los interferentes, se requerirá un desarrollo posterior del método.

3.7.9 ROBUSTEZ ⁽⁵⁾

Es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en parámetros de método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante uso normal.

- a) Analizar: Identificar las variables que pudieran tener un efecto significativo en el desempeño del método. Establecer experimentos (analizar materiales de referencia, muestras de composición conocida o materiales de referencia certificados) para controlar el efecto en la exactitud y precisión del cambio sistemático de variables.

Nº veces: Analizar c/serie de condiciones experimentales una vez.

En caso de querer evaluar 2 o más, se deberá utilizar el Diseño Factorial.

Calcular: Determinar el efecto sobre la media de cada cambio de condición.

Clasificar las variables identificando la que causa el mayor efecto en el desempeño del método

Comentarios: Se recomienda diseñar un control de calidad para controlar las variables críticas. Concentrarse en estas variables para un mejoramiento del método.

3.7.10 RELEVANCIA ⁽⁵⁾

Es la propiedad que establece si el método es capaz de medir la característica de interés.

- a) Analizar: Establecer cuál es la propiedad o característica de interés que se va a medir. Seleccionar muestras tanto en buen estado como en mal estado.

Nº veces: Por fines estadísticos se recomienda un número de veces entre 7 y 10.

Calcular: Verificar que la prueba distingue de manera consistente un tipo de muestra de otra, por medio de una estadística básica apropiada.

3.7.11 ESTABILIDAD ⁽⁵⁾

En lenguaje estadístico, es la propiedad de que un proceso este bajo control. Es decir, sólo existen patrones aleatorios de los errores en las pruebas y el

promedio así como la desviación estándar de estos errores son constantes en el tiempo.

Seleccionar un material de referencia o una muestra de análisis y su característica a analizar.

a) Analizar: Llevar a cabo las mediciones durante varios días en períodos adecuados, según el material o la muestra y las condiciones del laboratorio.

Nº veces: 1

Calcular: Graficar las mediciones y determinar si el proceso es estable o si se observan patrones aleatorios en el gráfico.

Comentarios: Se recomienda iniciar con mediciones diarias por lo menos durante 15 días, y luego realizarlas en períodos más espaciados hasta que ocurra un cambio significativo en los valores obtenidos.

3.8 REGISTROS ⁽⁵⁾

- Todos los registros generados durante el proceso de validación se mantendrán adecuadamente identificados y conservados.
- En dichos registros se documentarán los datos obtenidos durante cada una de las fases del proceso de validación (patrones, materiales de referencia, equipos, cálculos, aproximaciones, tratamiento estadístico, bibliografía, etc.) con toda la información necesaria para permitir la revisión del proceso y repetirlo, si fuese necesario, en las mismas

condiciones. Se indicarán, asimismo, todos los posibles problemas o anomalías surgidos.

- En los registros o en otro documento se indicarán claramente los valores finales obtenidos así como la evidencia de su aceptación o rechazo por el responsable técnico.

3.9 Obtención de la Validación de métodos ⁽⁵⁾

- La validación de métodos se logra si las propiedades de exactitud, estabilidad, R&R, precisión, y relevancia son aceptables al compararse contra un método validado, contra valores de referencia o contra valores especificados en una norma. La validación se registrará formalmente mediante un reporte técnico.

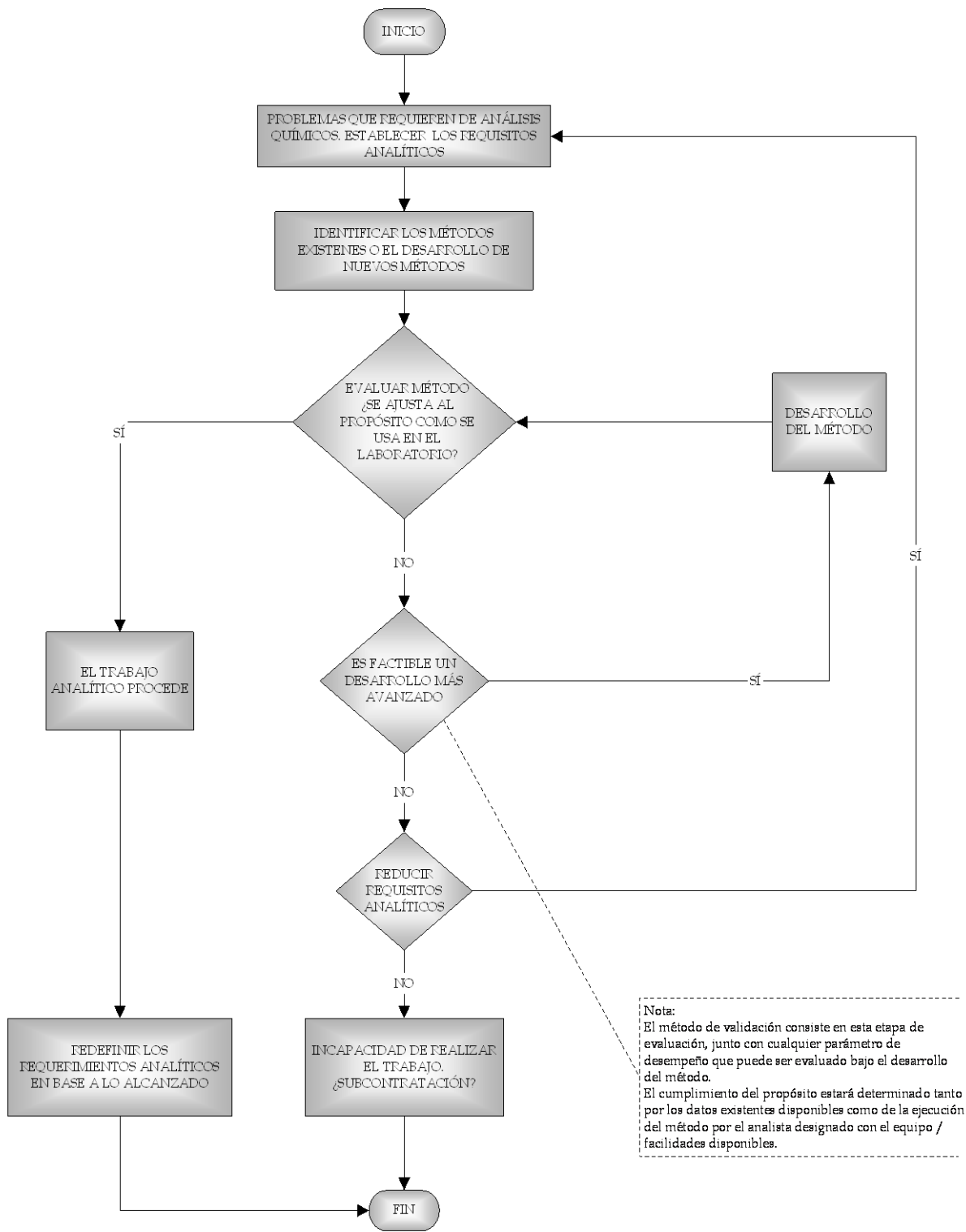


FIGURA No.1: DESARROLLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO (5)

3.10 Acido Fólico: Definición e Importancia (1).

Descubierta en los años 40, el ácido fólico es considerado como una vitamina hidrosoluble que pertenece al complejo B. El nombre de esta vitamina proviene de la palabra latina *folium*, hoja. Fue aislada por primera vez de hojas de espinaca, que ahora se sabe que contienen cantidades muy pequeñas respecto de otras fuentes alimentarias. En diversos laboratorios se habían aislado varios factores en apariencia no relacionados antes de advertir que tenían en común el mismo compuesto madre, ácido pteroil-L-glutámico: factor U (un factor del crecimiento del pollo), vitamina M (un factor para monos), vitamina B₁₂ (un factor antianemia del pollo), factores hepáticos y de la levadura *Lactobacillus casei* (factores de crecimiento bacteriano) y otros. El ácido fólico (pteroil glutámico) puro fue cristalizado en 1945 como molécula triple que contenía un compuesto de pteridina, una molécula de ácido benzoico y un residuo de ácido glutámico.

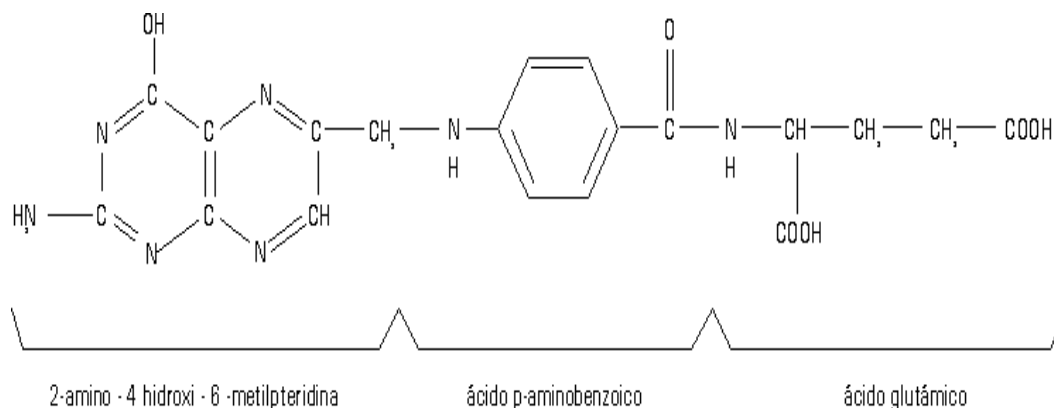


FIGURA No.2: ESTRUCTURA DEL ACIDO FÓLICO

En 1972, la Unión Internacional del Comité de Ciencias Nutricionales sobre nomenclatura decidió que se debía emplear el término folacina para describir el nombre genérico del ácido fólico: ácido pteroil-L-monoglutámico. De todos modos, la USP continua denominándolo ácido fólico, y en la práctica médica y bioquímica suele hacerse lo mismo (1).

El ácido fólico es una sustancia cristalina amarilla, (debido a que el núcleo pteridilo tiene relación con la xantopterina, un miembro de la serie pterínica de pigmentos amarillos naturales), poco soluble en agua pero soluble en álcali diluido. Es destruido fácilmente por ebullición en solución ácida, pero es relativamente estable para la elaboración y el almacenamiento en preparados farmacéuticos. El compuesto tiene absorción característica en la zona ultravioleta del espectro, con absorción máxima en longitudes de onda de 257, 282 y 367nm. Se oxida fácilmente y se convierte en un producto de degradación que da viva fluorescencia verde cuando se ve a la luz ultravioleta. Es insoluble en agua, alcohol y en los disolventes orgánicos usuales. Se disuelve con facilidad en soluciones diluidas de hidróxidos y carbonatos alcalinos, y es moderadamente soluble en ácido clorhídrico o sulfúrico diluidos y calientes. Se disuelve en cualquiera de estos ácidos y forma soluciones amarillas muy pálidas.

Esta vitamina es fundamental para llevar a cabo todas las funciones de nuestro organismo. Su gran importancia radica en que el ácido fólico es esencial a nivel celular para sintetizar ADN (ácido desoxirribonucleico), que trasmite los

caracteres genéticos, y para sintetizar también ARN (ácido ribonucleico), necesario para formar las proteínas y tejido del cuerpo y otros procesos celulares. Por lo tanto la presencia de ácido fólico en nuestro organismo es indispensable para la correcta división y duplicación celular.

Los folatos funcionan en conjunto con la vitamina B12 y la vitamina C en la utilización de las proteínas. Es importante señalar que el ácido fólico es básico para la formación del grupo hemo (parte de la hemoglobina que contiene el hierro), por eso está relacionado con la formación de glóbulos rojos.

El ácido fólico también brinda beneficios al aparato cardiovascular, al sistema nervioso, y a la formación neurológica fetal entre otros. Dada su gran importancia para el ser humano, muchos de los alimentos que hoy consumimos llevan ácido fólico adicionado.

3.11 Absorción y Metabolismo ⁽¹²⁾

El folato se encuentra abundantemente en los alimentos, por lo general en forma de poliglutamatos; y existe una gran variedad de alimentos fuentes de dicho micronutriente, por lo cual es fácil obtener un suministro adecuado del mismo, a través de la dieta.

Solo los monoglutamatos se absorben por el intestino delgado. El ácido fólico, que suele presentarse en la forma de poliglutamato en los alimentos, se descompone a la forma de monoglutamato por la folil conjugasa del páncreas y la conjugasa de la mucosa de la pared intestinal.

Tanto en su forma de monoglutamato como de poliglutamato, el ácido fólico se absorbe por transporte activo mediado por portadores, principalmente en el yeyuno, pero la vitamina también se absorbe por difusión pasiva sensible al pH. La biodisponibilidad del folato en una dieta típica es casi la mitad de la del ácido fólico cristalino. Durante la absorción o después de la misma, el ácido monoglutámico se cambia a ácido metiltetrahidrofólico y se almacena.

No se ha determinado la cantidad exacta de folato de los alimentos que se absorbe, pero se supone que se aprovecha todo el ácido fólico libre y una buena parte de los poliglutamatos. En presencia del adenosín difosfato (NAD) el ácido fólico se reduce a ácido tetrahidrofólico (THFA), que se une con una unidad de carbono para formar ácido formiltetrahidrofólico ó factor citrovoro que es mucho más estable. Se almacenan 10 mg de ácido fólico en hígado.

Una deficiencia de Vitamina B12 puede ocasionar deficiencia de ácido fólico, al producir atrapamiento de la forma metabólicamente inactiva 5- metil tetrahidrofolato.

3.12 Excreción del ácido fólico ⁽¹²⁾

Una vez que el sistema gastrointestinal absorbe el ácido fólico, es llevado por vía sanguínea hacia los tejidos; se almacena principalmente en el hígado, y su excreción se realiza a través de la orina y las heces fecales.

La excreción diaria de esta vitamina se hace en un promedio de 40 microgramos por la orina y de 400 por las heces, aunque esta última fracción es fundamentalmente de origen bacteriano intestinal.

Tabla N° 3: Dosis diaria necesaria de Acido Fólico ⁽¹²⁾

Edad	Hombres $\mu\text{g}/\text{día}$	Mujeres $\mu\text{g}/\text{día}$
(1 a 3) años	150	
(4 a 8) años	200	
(9 a 13) años	300	
(14 a 18) años	400	
19 años y mas	400	
Embarazo		600
Lactancia		500

3.13 Funciones del ácido fólico (vitamina B9) ⁽¹¹⁾

- Actúa como coenzima en el proceso de transferencia de grupos monocarbonados.
- Interviene en la síntesis de purinas y pirimidinas, por ello participa en el metabolismo del ADN, ARN y proteínas.
- Es necesario para la formación del células sanguíneas, más concretamente de glóbulos rojos.
- Reduce el riesgo de aparición de defectos del tubo neural del feto como lo son la espina bífida y la anencefalia.
- Disminuye la ocurrencia de enfermedades cardiovasculares.

- Previene algunos tipos de cáncer.
- Ayuda a aumentar el apetito.
- Estimula la formación de ácidos digestivos.

3.14 Fuentes de ácido fólico ⁽¹¹⁾

- Fuentes de origen animal: Se encuentra presente en niveles muy bajos en el reino animal. Lo encontramos en el hígado de ternera y pollo, en la leche y sus derivados.
- Fuentes de origen vegetal: El reino vegetal es rico en esta vitamina. Las mayores concentraciones las encontramos en: Legumbres (lentejas), cereales integrales y sus derivados, vegetales de hoja verde (espinacas, coles, lechugas, espárragos), el germen de trigo, y las frutas (melón, bananas, plátanos, naranjas y aguacate entre otros.)
- Suplementos: Los comprimidos de ácido fólico deben tomarse siempre bajo supervisión médica y en situaciones donde el médico lo indique.

Con la manipulación de los alimentos, se puede llegar a perder o destruir más de la mitad del contenido natural de ácido fólico. Se destruye con las cocciones prolongadas en abundante agua, con el recalentamiento de las comidas y también con el almacenamiento de los alimentos a temperatura ambiente. Entonces siempre convendrá comer crudos todos aquellos alimentos que así lo permitan, cocción breve (al vapor) y guardarlos en la nevera.

En la siguiente tabla se menciona la cantidad de microgramos (mcg) de vitamina B9 o ácido fólico presente en una porción de alimentos.

Tabla N° 4: Microgramos de Acido Fólico Presente en Alimentos ⁽¹¹⁾

Alimento	Porción	ácido fólico (µg)
Cereales (cocidos), copos de maíz	1 taza	222
Hígado de vaca, cocido	85 g	185
Espinaca, cocida, hervida, sin sal	1 taza (180 g)	263
Habas , blancas, enlatadas	1 taza	170
Espárragos, hervidos	8 (120 g)	160
Arroz, blanco, grano largo común, cocido	1taza (190 g)	153
Espinaca, cruda	1 taza (30 g)	60
Lechuga romana	1 taza	75
Lentejas, hervidas sin sal	1 taza (200 g)	358
Coles o repollitos de brucas, cocidos	1 taza (150 g)	94
Aguacate en rodajas	½ taza	45
Semillas de soja, verde, hervida	1 taza (180 g)	200
Banana	1 taza (120 g)	24
Naranjas	1 taza (40 g)	39
Melón, cantaloupe, rocío de miel	1 taza (160 g)	35

3.15 Deficiencia de ácido fólico ⁽¹¹⁾

La deficiencia de ácido fólico se puede manifestar a través de los siguientes síntomas:

- Bajo peso, falta de apetito
- Debilidad, palidez, fatiga
- Náuseas
- Diarreas
- Mal humor, depresión
- Inflamación y llagas linguales, úlceras bucales
- Taquicardias
- Cabello cano (canas).

La mejor manera de satisfacer las necesidades diarias de esta vitamina es a través de una dieta balanceada y equilibrada que incluya a todos los grupos de alimentos, pero sin embargo existen situaciones donde pueden llegar a necesitarse suplementos de ácido fólico, como en:

- Mujeres en edad fértil, embarazadas o en lactancia: Una cantidad adecuada de este es fundamental para mujeres de edad fértil, ya que previene defectos del tubo neural del feto, entre ellos la espina bífida y anencefalia. Todas aquellas mujeres que toman suplementos de ácido fólico antes de la concepción reducen en un 50% los riesgos de defectos neurológicos en el futuro bebé.
- Ancianos y personas mayores: A partir de los 65 años de edad la capacidad de absorción de vitaminas está claramente disminuida.
- Personas fumadoras: El consumo de tabaco entorpece la absorción y disponibilidad de las vitaminas del complejo B.
- Personas alcohólicas: El alcohol disminuye y dificulta la absorción de vitaminas.
- Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, etc.: Enfermedades con evacuaciones frecuentes y diarreicas, evitan una buena absorción de esta vitamina.
- Uso continuado de ciertos fármacos: Como pueden ser anticonceptivos orales, antiinflamatorios, sedantes, somníferos, etc.
- Existen ciertos medicamentos que interfieren en el metabolismo del folato disminuyendo su absorción. Entre ellos se destacan:

- a) Antiinflamatorios no esteroides (AINES): Como aspirina o ibuprofeno en dosis diarias altas
- b) Anticonvulsivantes/antiepilépticos: Como fenitoína y fenobarbital
- c) Hipolipemiantes: Aquellos que disminuyen los niveles de colesterol como colestiramina y colestipol
- d) Metrotexato: Usado para el tratamiento de artritis reumatoidea, psoriasis y ciertos tipos de cáncer
- e) Antihiper glucemiantes: Como buformina, fenformina y metformina
- f) Anticonceptivos orales
- g) Diuréticos: Como triamterene usado en hipertensión arterial
- h) Antibióticos: Como trimetrofina y pirimetamina.

La toma de suplementos ante todas estas circunstancias nombradas anteriormente, debe estar siempre supervisada por un profesional de la salud.

3.16 Toxicidad: Consecuencias de la ingesta excesiva de ácido fólico ⁽¹¹⁾

El riesgo de toxicidad con la ingesta de ácido fólico proveniente de alimentos así como de suplementos es bajo. Al ser una vitamina hidrosoluble, toda ingesta en exceso se elimina a través de la orina. Igualmente existe evidencia que ciertos pacientes que toman medicamentos anticonvulsionantes pueden experimentar convulsiones ante altos niveles de ácido fólico.

Como referencia se han establecido niveles de ingesta máximas tolerables para prevenir el riesgo de toxicidad con vitamina B9 o ácido fólico. Los efectos adversos se incrementan a ingestas mayores al nivel máximo tolerable.

Una ingesta mayor a la máxima establecida puede traer síntomas de deficiencia de vitamina B12 (degeneración nerviosa y enmascaramiento de anemias) debido a la interacción presente entre ellos.

Tabla Nº 5: Cantidad de Acido Fólico Tolerable ⁽¹¹⁾

Ingesta máxima tolerable		
Edad	Hombres $\mu\text{g}/\text{día}$ microgramos/día	Mujeres $\mu\text{g}/\text{día}$ microgramos/día
(1 a 3) años	300	300
(4 a 8) años	400	400
(9 a 13) años	600	600
(14 a 18) años	800	800
(19) años y mas	1000	1000
Embarazo		800-1000
Lactancia		800-1000

3.17 Qué es el folato ⁽¹³⁾

El folato forma parte del grupo de vitaminas del complejo B: la vitamina B-9 Folacina. Las vitaminas son compuestos necesarios para el mantenimiento de la actividad biológica normal. No son producidas por el organismo y éste, en

condiciones normales, las toma de los alimentos que las contienen. El folato se considera un nutriente esencial para los seres humanos y se encuentra en su forma natural en ciertos alimentos como: vegetales de hojas verde oscuro (espinaca, acelga, berros), cítricos cereales, cacahuates, hígado de pollo, brócoli, granos, frutas.

Diferencia entre ácido fólico y folato ⁽¹³⁾

El ácido fólico y el folato son diferentes palabras para la misma vitamina. La mayor diferencia entre el ácido fólico y el folato es que el ácido fólico es usado más fácilmente por el cuerpo que el folato.

Acción del ácido fólico en el desarrollo normal del tubo neural ⁽¹³⁾

El ácido fólico colabora en las funciones de las células y en el crecimiento de los tejidos. El ácido fólico trabaja junto con la vitamina B 12 y la vitamina C para ayudar al cuerpo a digerir y utilizar las proteínas y sintetizar las proteínas nuevas cuando se necesiten. Es necesario en la producción de glóbulos rojos y en la síntesis del ADN (que controla los factores hereditarios y se utiliza para guiar a la célula en sus actividades diarias). El ácido fólico también colabora con la función celular y en el crecimiento de los tejidos. Si no hay suficiente ADN, no hay crecimiento celular (formación de células nuevas, por lo cual no se termina de cerrar el tubo neural). En el inicio del embarazo, las demandas de este

importante nutriente, están en su apogeo, por consiguiente los requerimientos de folato de la madre aumentan rápidamente en este período.

Momento en que es necesario iniciar la ingesta de ácido fólico para prevenir defectos congénitos ⁽¹³⁾

La cantidad y el momento de tomar esta vitamina son vitales para su eficacia. La suplementación con ácido fólico debe iniciarse antes de estar embarazada para que el organismo regule ciertos procesos que son necesarios para la prevención de defectos congénitos. La mitad de los embarazos no son planeados y los defectos congénitos de la espina dorsal y el cerebro comienzan antes, de darse cuenta que hay un embarazo. Si no se inicia la suplementación con ácido fólico, antes del embarazo no se podrá proteger al bebé durante estas etapas tempranas del desarrollo. Si se da el embarazo sin haber comenzado la suplementación con ácido fólico, debe iniciarse lo antes posible.

3.18 Patologías a causa de la deficiencia de ácido fólico, que más daño producen al ser humano ⁽¹⁴⁾

Espina bífida (ver anexo N° 1)

La espina bífida es una malformación congénita del tubo neural, que se caracteriza porque uno o varios arcos vertebrales posteriores no han fusionado correctamente durante la gestación y la médula espinal queda sin protección ósea. La principal causa de la espina bífida es la deficiencia de ácido fólico en

la madre durante los meses previos al embarazo y en las tres semanas siguientes, aunque existe un 5% de los casos cuya causa es desconocida. También se piensa que la espina bífida tiene un componente hereditario, aunque lo que se heredaría sería la dificultad de la madre para procesar el ácido fólico.

Básicamente existen dos tipos de espina bífida, la espina bífida oculta y la espina bífida abierta o quística.

Espina bífida oculta (ver anexo N° 2) ⁽¹⁴⁾

Aparece un pequeño defecto o abertura en una o más vértebras. Algunas tienen un lipoma, hoyuelo, vellosoidad localizada, mancha oscura o una protuberancia sobre la zona afectada.

La médula espinal y los nervios no están alterados. Muchas personas con espina bífida oculta no saben que la tienen, o sus síntomas no aparecen hasta edades avanzadas.

Estos síntomas pueden ser de tres tipos:

- Neurológicos: Debilidad en las extremidades inferiores, atrofia de una pierna o pie, escasa sensibilidad o alteración de los reflejos.
- Genito-urinarios: Incontinencia de orina o heces o retención de orina.
- Ortopédicos: Deformidad de los pies o diferencias de tamaño.

Espina bífida abierta o quística (ver anexo N° 3) (14)

Es el tipo más grave, la lesión suele apreciarse claramente como un abultamiento, en forma de quiste, en la zona de la espalda afectada. Se distinguen varios tipos:

Meningocele y lipomeningocele (ver anexo N° 4) (14)

Son las formas menos frecuentes. Una o más vértebras presentan una abertura de la que asoma un quiste lleno de líquido cefalorraquídeo que contiene parte de las meninges pero no los nervios espinales. Sus secuelas son menos graves, tanto en las funciones locomotoras como urinarias.

Mielomeningocele (ver anexo N° 5) (14)

Es la variante más grave y más frecuente. El quiste contiene tanto las membranas como las raíces nerviosas de la médula espinal y a menudo la médula en sí. Ocasionalmente la médula espinal y los nervios quedan al descubierto. Es necesario cerrar quirúrgicamente la abertura en cuanto el bebé nazca para evitar una infección.

Consecuencias (14)

En general, cuanto más alta se encuentre la vértebra o vértebras afectadas, más graves serán las consecuencias. Dichas consecuencias pueden incluir:

- Hidrocefalia: Es la acumulación excesiva de líquido cefalorraquídeo (LCR) en el cerebro. La acumulación excesiva de LCR ocasiona una presión potencialmente perjudicial en los tejidos del cerebro.

Otros trastornos neurológicos ligados normalmente a la hidrocefalia:

- Malformación de Chiari o de Arnold-Chiari: la porción caudal del cerebelo y a veces, del tronco cerebral, que se encuentran situados por debajo del foramen magno.

- Siringomielia: formación o acumulación de LCR dentro del cordón medular.

- Dificultades de visualización, memoria, concentración.

- Alteraciones del aparato locomotor:

- Debilidad muscular o parálisis, deformidades y disminución o pérdida de la sensibilidad por debajo de la lesión.

Trastornos del sistema genito-urinario:

- Alteraciones del control urinario e intestinal que pueden dar lugar a una incontinencia vesical y/o fecal o por el contrario una retención de uno o ambos tipos. Son frecuentes las infecciones urinarias por un deficiente vaciamiento vesical, por lo que deben recurrir en muchos casos a sondaje vesical intermitente.

Otras secuelas físicas que pueden darse ⁽¹⁴⁾

- Pubertad precoz

- Criptorquídea (testículos mal descendidos)

- Obesidad por escasa movilidad
- Alergia a materiales de látex, por la exposición a éste material en las frecuentes hospitalizaciones y/o intervenciones quirúrgicas

Causas y factores de riesgo (14)

Habitualmente la espina bífida proviene de la unión de una predisposición genética y factores ambientales. Entre las causas ambientales podemos señalar:

- El 95% de los casos se debe a un déficit de folatos en la madre en los momentos previos o inmediatamente posteriores a producirse el embarazo.
- Tratamiento materno con fármacos: ácido valproico (anticonvulsionante), etetrinato (tratamiento para la psoriasis y el acné), carbamazepina (tratamiento psiquiátrico) y medicamentos hormonales.
- Déficit de vitaminas en la madre, especialmente ácido fólico (B9) y B12.
- Causa genética. Las madres que ya han tenido un hijo con espina bífida tienen más riesgo de que también aparezca en los siguientes hijos.
- Gripe materna en el primer trimestre del embarazo.

Otros factores de riesgo (14)

- Edad materna: madres adolescentes o de más de 35 años.
- Antecedentes de aborto anterior.
- Orden del nacimiento (los primogénitos tienen un riesgo más alto).

Prevención (14)

La prevención de los defectos del tubo neural es muy fácil en los embarazos planeados. Estas alteraciones aparecen en las tres primeras semanas de gestación, cuando muchas mujeres aún no son conscientes de estar embarazadas.

Por ello la prevención debe realizarse antes del embarazo. Esta prevención primaria debe hacerse dentro del control preconcepcional del embarazo e irá dirigida a:

- Evitar la ingesta de tóxicos y fármacos teratógenos en el período periconcepcional.
- Dieta equilibrada.
- Aporte de folatos desde el período preconcepcional, al menos tres meses antes de la concepción y hasta doce semanas de la gestación.

Tres de cada cuatro malformaciones congénitas del tubo neural podrían evitarse si la madre toma un suplemento de ácido fólico desde 3 a 6 meses antes de producirse el embarazo y durante los tres primeros meses del mismo, ya que es el momento en que el tubo neural se forma.

Todas las mujeres que deseen quedar embarazadas deberían tomar un suplemento de 0,4 mg de ácido fólico al día y hasta 4 mg/día aquellas con especial riesgo de tener un hijo con defecto del tubo neural.

Anencefalia (ver anexo N° 6) (15)

La anencefalia es un defecto del tubo neural que ocurre cuando el extremo encefálico (la cabeza) del tubo neural no logra cerrarse, generalmente entre el 23º y el 26º día del embarazo, dando como resultado la ausencia de una parte importante del cerebro, el cráneo y del cuero cabelludo. Los niños con este trastorno nacen sin la parte anterior del cerebro-la parte más grande del mismo que es responsable del pensamiento y la coordinación. El tejido cerebral restante a menudo se encuentra expuesto, es decir, no está recubierto de hueso o piel.

Los niños que nacen con anencefalia generalmente son ciegos, sordos, inconscientes e insensibles al dolor. Aunque algunos pacientes con anencefalia pueden nacer con un tallo cerebral rudimentario, la carencia de un cerebro operativo elimina permanentemente la posibilidad de recobrar el sentido. Pueden ocurrir acciones reflejas como la respiración y respuestas a sonidos o al tacto.

Esta condición es uno de los trastornos más comunes del sistema nervioso central fetal. Anualmente, entre mil y 2 mil bebés estadounidenses nacen con anencefalia. El trastorno afecta a las niñas más a menudo que a los varones. Se desconocen las causas de la anencefalia. Aunque se cree que la dieta de la madre y la ingestión de vitaminas pueden desempeñar un papel importante, los científicos afirman que existen muchos otros factores relacionados.

No existe cura o tratamiento estándar para la anencefalia y el pronóstico para los individuos afectados es pobre. La mayoría de los pacientes no sobreviven la infancia. Si el niño no nace muerto, por lo general fallece algunas horas o días después del nacimiento. La anencefalia se puede diagnosticar a menudo antes de nacimiento a través de una prueba de ultrasonido.

Estudios recientes han demostrado que la incorporación del ácido fólico en la dieta de mujeres en edad de gestación puede reducir significativamente la incidencia en los defectos del tubo neural. Por lo tanto, se recomienda que todas las mujeres en edad de gestación consuman 0,4 miligramos de ácido fólico diariamente.

3.19 Otros factores de riesgo que predisponen al feto para que desarrolle esta malformación son ⁽¹⁵⁾:

- La diabetes de la madre puede provocar la anencefalia en el feto.
- La presencia de algún cuadro que provocó fiebre al comienzo del embarazo.
- La costumbre de algunas personas de ir a los saunas estando embarazadas sobre todo en el primer trimestre.
- La hipertermia, el aumento de la temperatura, tanto interna como externa de la mujer, todo esto en los primeros meses de embarazo.

No es nada más el que no consuma ácido fólico, o el que padezca fiebre en los primeros meses, tienen que ver la predisposición genética o familiar para que se presenten este tipo de defectos, pero también pueden desarrollarse por factores externos como sustancias muy tóxicas, en el agua o en el aire.

3.20 Anemia Megaloblástica (ver anexo N° 7)

Definición ⁽¹⁹⁾

Es un trastorno sanguíneo caracterizado por anemia, con glóbulos rojos que son más grandes de lo normal, y es una afección que usualmente resulta de una deficiencia de ácido fólico o de vitamina B-12.

Causas, incidencia y factores de riesgo ⁽¹⁹⁾

Las deficiencias de vitamina B-12 y ácido fólico son las causas más comunes de la anemia megaloblástica. Otras causas son leucemia, mielofibrosis, mieloma múltiple, ciertos trastornos hereditarios, medicamentos que afectan la síntesis del ADN como los fármacos para quimioterapia y el consumo excesivo de alcohol, entre otras. Los factores de riesgo están relacionados con las causas.

Síntomas ⁽¹⁹⁾

Pérdida del apetito, diarrea, hormigueo y entumecimiento de manos y pies, palidez de la piel, cansancio, dolores de cabeza, úlceras en la boca y en la lengua, cambio en el color de la piel.

Signos y exámenes ⁽¹⁹⁾

La evaluación del funcionamiento del sistema nervioso puede mostrar reflejos anormales, disminución del sentido de posición y del sentido de vibración si la anemia está relacionada con deficiencia de vitamina B-12.

Los exámenes abarcan:

- Conteo sanguíneo completo que muestra anemia con glóbulos rojos grandes
- Examen de médula ósea
- Nivel de B12 en suero
- Examen de Schilling que puede identificar una absorción insuficiente como la causa de la deficiencia de vitamina B12
- Folato en suero

Tratamiento ⁽¹⁹⁾

El objetivo del tratamiento es descubrir la causa de la anemia y éste depende de la causa. Las anemias relacionadas con deficiencias vitamínicas se abordan por separado.

Prevención ⁽¹⁹⁾

El consumo adecuado de vitamina B-12 y ácido fólico es beneficioso

Anemia por déficit de ácido fólico ⁽¹⁶⁾

La anemia puede surgir debido a numerosas causas, pero una gran parte de todas las anemias se produce por la falta de algún elemento esencial para la formación de los hematíes, como son el hierro, o ciertas vitaminas como la vitamina B12 y el ácido fólico.

Las vitaminas en general son elementos indispensables para que se lleven a cabo en el organismo multitud de procesos metabólicos básicos que dan como resultado la obtención de energía o la síntesis de proteínas y/o ácidos nucleídos (ADN y ARN de las células).

El ácido fólico es una vitamina con un papel clave en la síntesis de ADN (material del núcleo celular que contiene los genes). Cuando existe una carencia seria de esta vitamina, se deteriora la capacidad de síntesis de ADN de las células de nuestro organismo, capacidad que en principio es esencial para que exista multiplicación celular. Así pues, la carencia de vitamina conlleva una ralentización de la producción de células tanto más acusada cuanto más proliferación celular exista en el tejido del que se trate. Tejidos con gran proliferación son la médula ósea en donde se están formando continuamente los glóbulos rojos, los leucocitos y las plaquetas, y otros como la piel.

El déficit de ácido fólico acarrea por tanto anemia (escasez de glóbulos rojos), y en ocasiones leucopenia (escasez de glóbulos blancos) y trombocitopenia (Déficit de plaquetas).

También pueden darse lesiones en la piel y las mucosas en general.

3.21 Funciones específicas del ácido fólico para determinados cambios y patologías en el organismo ⁽¹⁶⁾

- Embarazo ⁽¹⁶⁾:

Durante el embarazo hay un aumento de los requerimientos de ácido fólico debido al incremento en la multiplicación celular que involucra el crecimiento del útero, la formación de la placenta, la expansión del volumen de eritrocitos o glóbulos rojos y el crecimiento del feto.

Hay evidencias claras de que el consumo adecuado de ácido fólico en la dieta antes de la concepción y durante los primeros meses del embarazo puede disminuir el riesgo de malformaciones congénitas en el feto, entre las que se encuentra la espina bífida. El tubo neural es una estructura que se forma en el embrión y que dará lugar al cerebro y a la médula espinal. En los casos de espina bífida, el proceso de formación del tubo neural falla. Éste no se cierra correctamente, por lo que pueden darse defectos tanto en la médula espinal como en las vértebras. Existen diferentes grados de lesión y en los más severos la médula espinal sobresale por la espalda del bebé. Esta malformación puede provocar varios grados de parálisis y pérdida de sensibilidad en las extremidades inferiores, así como complicaciones en las funciones intestinales y urinarias.

El origen de estas malformaciones se encuentra, por lo general, bien en una predisposición genética, o bien en que la mujer presenta una carencia de ácido fólico.

Es por tanto de gran importancia que las mujeres embarazadas ingieran cantidades adecuadas de ácido fólico o vitamina B9 antes de que se produzca el embarazo y hasta aproximadamente el tercer mes de gestación. De hecho, los ginecólogos prescriben de forma sistemática suplementos de B9, antes y durante el primer trimestre de embarazo para reducir el riesgo de alteraciones.

Fertilidad ⁽¹⁶⁾

El folato es necesario para la fertilidad tanto en hombres como mujeres. En los hombres, contribuye a la espermatogénesis. En las mujeres, por otra parte contribuye a la maduración del ovocito, implantación, en adición a los efectos generales del ácido fólico sobre el embarazo. Por ende, es necesario recibir suficientes cantidades a través de la dieta para evitar la infertilidad.

Enfermedad Cardíaca ⁽¹⁶⁾

Hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente cerebrovascular, vascular periférico, enfermedad venosa tromboembólica y coronaria. El tratamiento de la hiperhomocistinemia varía con base en la causa, pero generalmente involucra suplemento vitamínico con ácido fólico, piridoxina, y vitamina B12. El ácido fólico y la vitamina B12 bajan los niveles de homocisteína en un 25 a 50% en individuos normales y en pacientes con hiperhomocistinemia. Las dosis mínimas requeridas de ácido fólico y piridoxina para el tratamiento son inciertas. Las actualmente utilizadas son de 1 mg/día de ácido fólico, 25 mg/día piridoxina, y 0.5 mg/día de vitamina B12.

Cuando el ácido fólico se encuentra en grandes cantidades en la sangre el nivel de la homocisteína es más bajo.

3.22 Metodologías para la determinación de ácido fólico (7).

- **Métodos microbiológicos** basados en la incapacidad de algunas bacterias de sintetizar estas sustancias, siendo imprescindibles para su desarrollo. El principio en el que se basan, pues, es conceptualmente simple: a mayor concentración de vitamina en el alimento, mayor capacidad de crecimiento microbiano. Por ello, el empleo de estos microorganismos no solo nos puede dar una idea de la concentración de vitamina, sino de todas las formas activas, incluyendo las pro-vitaminas.

- **La Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)** es una de las metodologías más utilizadas para la determinación de ácido fólico, siendo fiable y rápida ya que permite analizar varios tipos de folatos.

La cromatografía es una técnica de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos en una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada fase estacionaria, que se encuentra inmovilizada en una columna y la otra, llamada fase móvil, la cual se desplaza sobre la fase estacionaria.

De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es el que tiene el mayor campo de aplicabilidad y por ello, ocupa una posición dominante. La técnica ha mejorado considerablemente desde sus principios., actualmente se dispone de cromatógrafos que reúnen alrededor de una columna optimizada

y miniaturizada (para poder separar micro cantidades de muestras) todo un conjunto de accesorios destinados a asegurar la repetibilidad de las experiencias sucesivas por el perfecto control de los diferentes parámetros de separación.

Los componentes básicos de un sistema para el Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) son:

- Depósitos para la fase móvil (disolventes)
- Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- Sistema de inyección de muestras
- Columna cromatográfica
- Termóstatos para las columnas
- Detectores
- Sistema para el tratamiento de datos y registrador

Los disolventes más usados en Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), son agua, soluciones tampón acuosas (Buffer) y solventes orgánicos como el metanol.

La separación efectuada se conserva en un registro individual llamado cromatograma. Un cromatograma es una imagen que traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la

columna. Este gráfico se obtiene gracias a un detector situado a la salida de la columna.

La columna es el corazón de la cromatografía ya que es allí donde se efectúa la separación, la selección del tipo de columna depende de la solubilidad de la muestra, el peso molecular y la estructura de los compuestos.

La columna es un tubo estrecho que contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión.

Las columnas son de alto costo y se degradan con facilidad por eso se protege la entrada de la columna con otra más corta llamada pre-columna la cual retiene por adsorción la impurezas de forma irreversible.

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad.

Detectores más utilizados es el de absorbancia ultravioleta. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbancia se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLIGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO.

4.1 Tipo de estudio:

Experimental, debido a que los análisis requeridos para la evaluación de parámetros de desempeño para determinar ácido fólico en yogurt, se realizaron en los laboratorios de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, edificio Dr. Max Bloch, del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

Prospectivo, porque a partir de lo existente, propone algo que puede servir para obtener datos más exactos en análisis o investigaciones futuras.

4.2 Investigación bibliografía:

Las investigaciones realizadas, se encontró información en las siguientes bibliotecas:

- Biblioteca Central de la Universidad del El Salvador
- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Internet

4.3 Investigación de campo:

El universo, está constituido por las diferentes marcas de yogurt que se comercializan a nivel nacional, y específicamente en el Centro Comercial Las Cascadas, Antiguo Cuscatlán. En presentaciones de semisólido y líquido.

El tipo de muestreo que se realizó en este trabajo fue, dirigido y puntual.

Muestra, seis (6) marcas de yogurt (Ver anexo N° 8). Se compro de cada marca una presentación semisólida y/o una líquida, haciendo un total de ocho (8) muestras.

4.4 Parte experimental:

Materiales, equipo y reactivos. (Ver anexo N° 9)

Método ⁽⁹⁾.

Preparación de solución madre de ácido fólico.

Se preparo la solución madre cada día durante 10 días.

- 1) Pesar 10.0 mg de estándar de ácido fólico en un Beaker de 10 mL y disolverlo con 3.0 mL de buffer fosfato de sodio pH 6.
- 2) Transferir la solución a un frasco volumétrico de 10.0 mL y aforar con buffer acetato de sodio pH 6 (solución madre).

Preparación de las soluciones estándar.

La preparación de las soluciones estándar se realizo cada día durante 10 días.

-Solución estándar 1 (100 µg /mL): medir 1000 µL de solución madre con micropipeta y colocarlo en frasco volumétrico de 10 mL, aforar con buffer fosfato de sodio pH 6

-**Solución estándar 2 (70 µg /mL):** medir 700 µL de solución madre con micropipeta y colocarlo en frasco volumétrico de 10 mL, aforar con buffer fosfato de sodio pH 6

-**Solución estándar 3 (40 µg /mL):** medir 400 µL de solución madre con micropipeta y colocarlo en frasco volumétrico de 10 mL, aforar con buffer fosfato de sodio pH 6

-**Solución estándar 4 (10 µg /mL):** medir 100 µL de solución madre con micropipeta y colocarlo en frasco volumétrico de 10 mL, aforar con buffer fosfato de sodio pH 6

-**Solución estándar 5 (5 µg /mL):** medir 50 µL de solución madre con micropipeta y colocarlo en frasco volumétrico de 10 mL, aforar con buffer fosfato de sodio pH 6

-Transferir las soluciones a viales cromatográficos.

-Hacer la corrida del método cromatográfico en HPLC, a 290 nm, a temperatura de 18 °C.

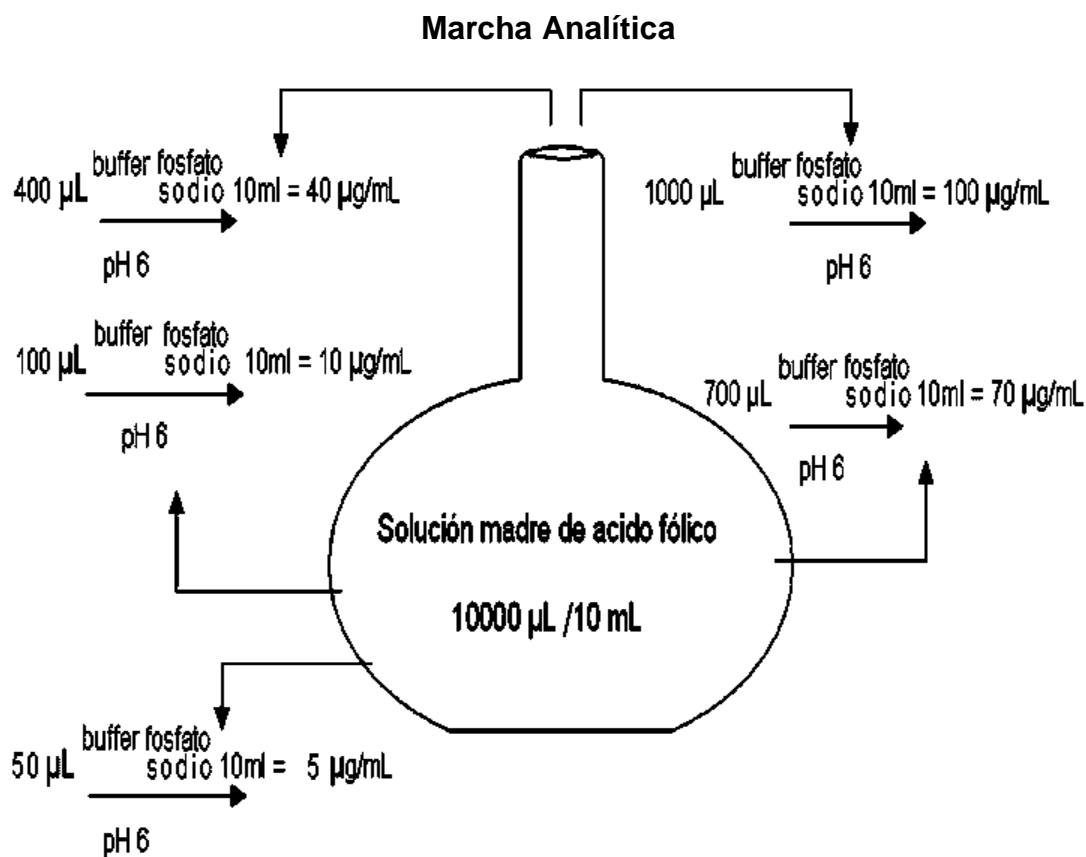


FIGURA No. 3: PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

De cada solución estándar se obtuvieron 10 respuestas cromatográficas que se utilizaron para evaluar dos parámetros de desempeño: precisión y linealidad del sistema y con la muestra de yogurt se evaluó la exactitud del método.

Preparación de la muestra (9).

Se realizó el procedimiento de la siguiente manera: utilizando el yogurt sin la adición de ácido fólico, yogurt adicionando una cantidad de ácido fólico (estándar medio de la curva de calibración); realizando pruebas al azar de las

diferentes muestras (ver anexo N°3), para determinar la exactitud del método (ver evaluación de parámetros en interpretación de resultados).

1. Pesar 1.0 g de muestra de yogurt en Beaker de 10 mL.
2. Adicionar 3.0 mL de hidróxido de potasio (KOH) 0.1M medido con pipeta repetidora o dispensador.
3. Colocar el Beaker en el agitador magnético por 10 minutos.
4. Adicionar 3.0 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 0.1 M y agitar.
5. Adicionar 350 µL (0.35mL) de ácido tricloroacético y agitar.
6. Transferir la muestra a un frasco volumétrico de 10 mL y aforar con buffer acetato de sodio (pH 6)
7. Centrifugar por 2 horas a 1800 rpm.
8. Filtrar con filtro de 0.45 µm
9. Colocar el filtrado en un vial cromatográfico.
10. Hacer la corrida del método cromatográfico en HPLC, a 290nm, a temperatura de 18 ° C.

Marcha Analítica (9)

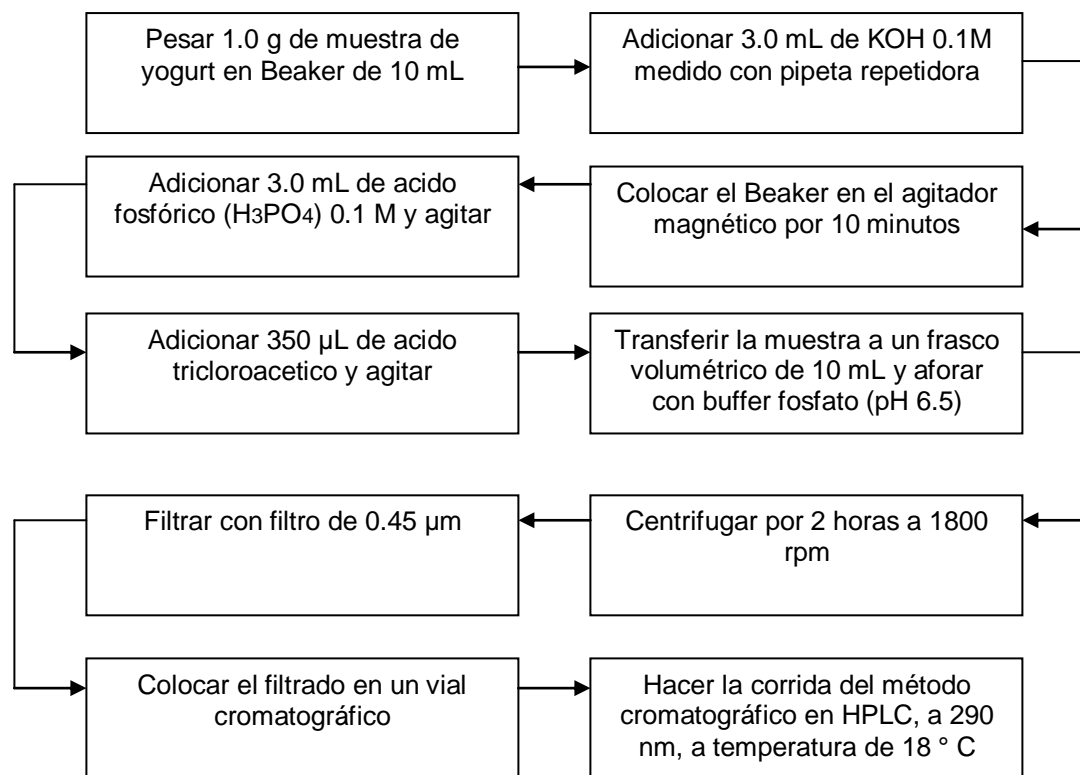


FIGURA No. 4: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Evaluación de parámetros de desempeño

Los resultados obtenidos al realizar las marchas anteriores, permitieron evaluar por medio de tres parámetros de desempeño: precisión y linealidad del sistema, y exactitud del método, la fiabilidad del método para ser utilizado en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, Laboratorio Central “Dr. Max Bloch”, del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

El análisis de estos de estos resultados se encuentra en el capítulo siguiente.

CAPITULO V

RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se dan a conocer los resultados obtenidos de los datos crudos por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) que se presentan en los anexos N°10 y N°11, derivados de realizar las marchas analíticas correspondientes a las soluciones estándares y a las muestras de yogurt que se presentan en el diseño metodológico; el desarrollo de estas marchas permitieron evaluar tres parámetros de desempeño: precisión del sistema y linealidad del sistema (obtenidas de las marchas de preparación de las soluciones estándares), y exactitud (obtenida de la marcha analítica de preparación de las muestras) del método analítico por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) para determinar ácido fólico en yogurt. Además se desglosa la forma de trabajo para cada parámetro de acuerdo a la Guía Eurachem y a la Guía de Validación de Métodos Analíticos ⁽⁸⁾ y se brinda el respectivo análisis de resultados obtenidos.

Cabe resaltar que el objetivo de trabajar los datos en base a dos guías: Guía Eurachem (ver marco teórico) y Guía de Validación de Métodos Analíticos ⁽⁸⁾, es comparar la forma de trabajo de ambas guías y sus correspondientes resultados, de tal manera de dejar constancia que la evaluación de parámetros de desempeño y la conclusión del análisis de resultados de la presente investigación ha sido estudiada, trabajada y verificada.

**PARAMETROS EVALUADOS AL SISTEMA PARA DETERMINAR ACIDO
FOLICO EN YOGURT (PRECISIÓN Y LINEALIDAD)**

Evaluación del parámetro de precisión del sistema para determinar ácido fólico en yogurt

De acuerdo a la guía Eurachem ^(4,5) se han evaluado materiales de referencia a diferentes concentraciones con 10 repeticiones para cada concentración (ver datos crudos en anexo 10), a las cuales se les determina la desviación estándar (S) para estimar la precisión con la que se obtienen los datos, es decir que tan alejados o que tan cercanos se presentan a la media poblacional.

La desviación estándar se calcula utilizando la siguiente fórmula ^(7,8):

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

En donde:

n = número de eventos, y

X = la concentración obtenida (µg/mL)

Sin embargo, el resultado se presenta como porcentaje, utilizando el coeficiente de variación (CV), que se obtiene de la siguiente manera:

$$CV = \frac{S}{\check{y}} \times 100$$

\check{y} = media aritmética de las concentraciones obtenidas (X)

$$\check{y} = \frac{\sum x}{n}$$

CUADRO No. 1: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACIÓN DE 5 µg /mL PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA EURACHEM)

Concentración añadida (µg /mL)	X = Concentración obtenida (µg /mL)	X ²	Y =Área	Media Arit.	S	CV (%)
5	5.01764	25.17671117	195.33313	4.95835	0.25365	5.12
5	4.74366	22.5023102	182.74220			
5	5.08906	25.89853168	202.90720			
5	4.56841	20.87036993	189.91656			
5	5.45834	29.79347556	223.36166			
5	4.64989	21.62147701	229.11426			
5	5.00695	25.0695483	220.81848			
5	5.05385	25.54139982	225.72330			
5	5.01448	25.14500967	224.99402			
5	4.98124	24.81275194	218.48068			
Σ	49.58352	246.4315853	2,113.39149			

Ejemplo de cálculos para los datos del cuadro No. 1:

Determinar media aritmética:

$$\check{y} = \frac{\sum x}{n}$$

En donde:

$$\sum x = 49.58352$$

n = 10 (eventos)

$$\text{Por lo tanto: } (49.58352/10) = 4.95835 = \check{y}$$

Calcular desviación estándar:

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

En donde:

$$n = 10 \text{ (eventos)}$$

$$\sum x^2 = 246.4315853$$

$$\sum x = 49.58352 \text{ y } (\sum x)^2 = 2458.52546$$

Por lo tanto:

$$S = \sqrt{\frac{10(246.4315853) - (49.58352)^2}{10(9)}}$$

$$S = \sqrt{0.0643377}$$

$$\mathbf{S = 0.25365}$$

Calcular coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

En donde:

$$S = 0.25365$$

$$\bar{y} = 4.95835$$

Por lo tanto:

$$CV = \frac{0.25365}{4.95835} \times 100$$

$$\mathbf{CV = 5.12}$$

De igual manera se realiza los cálculos para los cuadros N° 2, 3, 4 y 5

CUADRO No. 2: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACIÓN DE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA EURACHEM)

Concentración añadida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	X = Concentración obtenida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	X ²	Y =Área	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
10	9.31658	86.79866	392.88858	9.35017	0.74442	7.96
10	10.25658	105.19743	436.08609			
10	10.10553	102.12174	432.43640			
10	10.01886	100.37756	437.20688			
10	10.18741	103.78332	435.57352			
10	8.66571	75.09453	426.96780			
10	9.21557	84.92673	428.52957			
10	8.91742	79.52038	416.12976			
10	8.42684	71.01163	394.36087			
10	8.39122	70.41257	387.70667			
Σ	93.50172	879.24456	4,187.88614			

CUADRO No. 3: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACIÓN DE 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA EURACHEM)

Concentración añadida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	X = ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentración obtenida	X ²	Y =Área	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
40	40.34924	1628.06117	1818.98022	39.85470	1.05214	2.64
40	41.17695	1695.54121	1857.01733			
40	40.95473	1677.28991	1843.94470			
40	40.41062	1633.01821	1816.09778			
40	40.55892	1645.02599	1798.46130			
40	39.25627	1541.05473	1934.12024			
40	40.06565	1605.25631	1951.09363			
40	39.14436	1532.28092	1905.78870			
40	37.92306	1438.15848	1858.35706			
40	38.70723	1498.24965	1,892.19153			
Σ	398.54703	15893.93659	18,676.05249			

CUADRO No. 4: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACIÓN DE 70 µg /mL PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA EURACHEM)

Concentración añadida (µg /mL)	X = Concentración obtenida (µg /mL)	X ²	Y =Área	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
70	70.24128	4933.83742	3192.65527	67.92320	1.00538	1.48
70	68.64615	4712.29391	3119.35181			
70	68.55209	4699.38904	3106.66431			
70	67.41711	4545.06672	3041.39697			
70	67.68887	4581.78312	3015.88794			
70	68.05868	4631.98392	3353.17358			
70	67.23841	4521.00378	3292.16870			
70	67.32032	4532.02548	3294.37036			
70	67.21357	4517.66399	3306.86841			
70	66.85547	4469.65387	3,289.09692			
Σ	679.23195	46144.70126	32,011.63427			

CUADRO No. 5: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACIÓN DE 100 µg /mL PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA EURACHEM)

Concentración añadida (µg /mL)	X = Concentración obtenida (µg /mL)	X ²	Y =Área	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
100	100.18152	10036.33695	4568.54541	100.59789	1.25108	1.24
100	99.90481	9980.97106	4555.82910			
100	99.84593	9969.20974	4538.51709			
100	99.77473	9954.99675	4509.47998			
100	100.96886	10194.71069	4509.29102			
100	102.02297	10408.68641	5026.54492			
100	100.7463	10149.81696	4945.90576			
100	98.35321	9673.35392	4857.70801			
100	101.58705	10319.92873	5012.71240			
100	102.59352	10525.43035	5,062.66016			
Σ	1005.9789	101213.44155	47587.19385			

CUADRO No. 6: RESUMEN DE LAS DESVIACIONES ESTÁNDARES Y SUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIACIÓN (CV)

CONCENTRACION ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
5	4.95835	0.25365	5.12
10	9.35017	0.74442	7.96
40	39.8547	1.05214	2.64
70	67.9232	1.00538	1.48
100	100.59789	1.25108	1.24
PROMEDIO	44.53686	0.861334	1.93(CV del promedio)

El cuadro N°6 muestra el resumen de las desviaciones estándares y sus respectivos coeficientes de variación (CV) resultantes de trabajar estadísticamente los datos crudos (ver anexo 10 y cuadros N° 1, 2, 3, 4 y 5); para poder evaluar el parámetro de precisión, de acuerdo a la guía Eurachem.

La guía de validación de métodos analíticos dice que la precisión (variabilidad) de un procedimiento analítico por lo general es expresada como desviación estándar (S), varianza (S^2) o coeficiente de variación (CV) de una serie de mediciones, en donde CV debe ser menor o igual que 1.5% ($CV \leq 1.5$). Y debería ser evaluada usando el mínimo de 9 determinaciones (3 concentraciones con 3 repeticiones cada una) ó mínimo de 6 determinaciones en el nivel de 100%, para este estudio se realizaron las seis (6) determinaciones a las diferentes concentraciones (5, 10, 40, 70 y 100) $\mu\text{g} / \text{mL}$. Y para conocer el valor de la desviación estándar y el coeficiente de variación, los cálculos se hacen de la misma manera explicada para el cuadro No.1.

CUADRO No. 7: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACION DE 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS ⁽⁸⁾)

Concentración añadida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	X = Concentración obtenida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Y =Área	Y ²	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
5	5.01764	195.33313	38155.03168	203.89584	18.61226	9.13
5	4.74366	182.74220	33394.71166			
5	5.45834	223.36166	49890.43116			
5	4.56841	189.91656	36068.29976			
5	5.08906	202.90720	41171.33181			
5	4.64989	229.11426	52493.34414			
Σ	29.52700	1223.37501	251173.15020			

CUADRO No. 8: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACION DE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS)

Concentración añadida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	X = Concentración obtenida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Y =Área	Y ²	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
10	9.31658	392.88858	154361.4363	426.859878	17.048574	3.99
10	10.25658	436.08609	190171.0779			
10	10.10553	432.43640	187001.24004			
10	10.01886	437.20688	191149.8559			
10	10.18741	435.57352	189724.2913			
10	8.66571	426.96780	182301.50224			
Σ	58.55067	2561.15927	1094709.404			

CUADRO No. 9: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACION DE 40 µg /mL PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS)

Concentración añadida (µg /mL)	X= Concentración obtenida (µg /mL)	Y =Área	Y ²	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
40	40.34924	1818.98022	3308689.041	1844.77026	48.50948	2.63
40	41.17695	1857.01733	3448513.364			
40	40.95473	1843.94470	3400132.057			
40	40.41062	1816.09778	3298211.147			
40	40.55892	1798.46130	3234463.048			
40	39.25627	1934.12024	3740821.103			
Σ	242.70673	11068.6216	20430829.76			

CUADRO No. 10: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACION DE 70 µg /mL PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS)

Concentración añadida (µg /mL)	X = Concentración obtenida (µg /mL)	Y =Área	Y ²	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
70	68.05868	4631.98392	3353.17358	3288.05554	52.446876	1.60
70	67.23841	4521.00378	3292.16870			
70	67.32032	4532.02548	3294.37036			
70	67.21357	4517.66399	3306.86841			
70	66.85547	4469.65387	3,289.09692			
70	70.24128	4933.83742	3192.65527			
Σ	406.92773	27606.16846	19728.33324			

CUADRO No. 11: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS A LA CONCENTRACION DE 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA (DE ACUERDO A LA GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS)

Concentración añadida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	X= Concentración obtenida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Y =Área	Y ²	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
100	100.18152	10036.3369	4568.54541	4589.8951	133.37418	2.91
100	99.90481	9980.97106	4555.82910			
100	99.84593	9969.20974	4538.51709			
100	99.77473	9954.99675	4509.47998			
100	100.96886	10194.7107	4509.29102			
100	98.35321	9673.35392	4857.70801			
Σ	599.02906	59809.5791	27539.3706			

CUADRO No. 12: RESUMEN DE LAS DESVIACIONES ESTÁNDARES Y SUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIACIÓN (CV)

CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MEDIA ARIT.	S	CV (%)
5	203.89584	18.61226	9.13
10	426.859878	17.048574	3.99
40	1844.77026	48.50948	2.63
70	3288.05554	52.446876	1.60
100	4589.8951	133.37418	2.91
Promedio	2070.69532	53.998275	2.61(CV del promedio)

El cuadro N°12 muestra el resumen de las desviaciones estándares y sus respectivos coeficientes de variación (CV) resultantes de trabajar

estadísticamente los datos crudos (ver anexo N° 10 y cuadros N° 7, 8, 9, 10 y 11); para poder evaluar el parámetro de precisión, de acuerdo a la guía de validación de métodos analíticos.

El siguiente cuadro presenta el promedio de los resultados de los coeficientes de variación y el coeficiente de variación resultante (ver cuadros N° 6 y 12), para conocer la precisión del sistema tomando en cuenta los consejos claves de referencia para determinar dicho parámetro de desempeño del método proporcionados por la guía Eurachem ^(4,5) y la guía de Validación de Métodos Analíticos ⁽⁸⁾.

CUADRO N° 13: EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO ^(4,5,8)

EVALUACION DE PARAMETRO	RESULTADOS	CRITERIO DE ACEPTACION ⁽⁸⁾	DICTAMEN
DE ACUERDO A LA GUÍA EURACHEM			
MEDIA ARITMETICA	44.54	---	---
DESVIACION ESTANDAR (S)	0.86	---	---
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	1.93 %	$CV \leq 1.5\%$	NO CUMPLE
DE ACUERDO A LA GUÍA DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS			
MEDIA ARITMETICA	2070.69532	---	---
DESVIACION ESTANDAR (S)	53.998275	---	---
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	2.61 %	$CV \leq 1.5\%$	NO CUMPLE

Los resultados muestran que el parámetro de precisión evaluado para el sistema no cumple, debido a que la concordancia de las mediciones varían de tal manera que el coeficiente de variación es mayor que 1.5 %, es decir que caen fuera del rango de valores en el cual sería razonable esperar que ocurrieran; esto sucede ya sea utilizando el método que sugiere la guía Eurachem como la guía de validación de métodos analíticos.

Evaluación del parámetro de linealidad del sistema para determinar ácido fólico (4, 5,8)

La linealidad expresa diferencias de la precisión en los diferentes puntos de un rango dado. Y debe evaluarse por inspección visual del gráfico, señal vs concentración de analito, y por métodos estadísticos apropiados, tomando en cuenta la regresión lineal, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, intercepto (b), pendiente (m), intervalo de confianza de la pendiente. Requiere de un mínimo de 5 niveles de concentración.

El siguiente cuadro contiene los resultados que han sido recolectados de los datos crudos de las concentraciones de 5, 10, 40, 70 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con tres replicas para cada concentración.

CUADRO No. 14: LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA ACIDO FOLICO

	X ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	X ²	Y	Y ²	XY	CV (%)
1	5.01764	25.17671117	195.33313	38155.032	980.1113264	7.00
2	5.08906	25.89853168	202.9072	41171.332	1032.606915	
3	5.45834	29.79347556	223.36166	49890.431	1219.183883	
4	9.31658	86.7986629	392.88858	154361.436	3660.377887	5.66
5	10.10553	102.1217366	432.4364	187001.240	4369.999013	
6	10.18741	103.7833225	435.57352	189724.291	4437.366033	
7	40.34924	1628.061169	1818.98022	3308689.041	73394.46945	1.25
8	40.95473	1677.289909	1843.9447	3400132.057	75518.25732	
9	40.55892	1645.025992	1798.4613	3234463.048	72943.64799	
10	70.24128	4933.837416	3192.65527	10193047.673	224256.1928	2.85
11	68.55209	4699.389043	3106.66431	9651363.135	212968.3314	
12	67.68887	4581.783122	3015.88794	9095580.067	204142.0467	
13	100.18152	10036.33695	4568.54541	20871607.163	457683.8234	0.65
14	99.84593	9969.209738	4538.51709	20598137.376	453152.4597	
15	100.96886	10194.71069	4509.29102	20333705.503	455297.9737	
Σ	674.51600	49739.21647	30275.44775	101347028.825	2245056.847	3.48

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACION	COEFICIENTE DE DETERMINACION	DESVIACION ESTANDAR (%)	INTERVALO DE CONFIANZA IC (β_1)	
45.53	-29.025	0.9999	0.9998	1695.3756	46.05	45.01

Las fórmulas estadísticas que se emplean para conocer la linealidad de un sistema son las siguientes:

Pendiente

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de eventos (concentración – respuesta del analito)

Ordenada al Origen o Intercepto

$$b = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right) \right]^{1/2}}}$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b \pm t_{0.975, n-2} S_b$$

$$S_b = S_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy + b_0 \sum y}{n - 2}}$$

Ejemplos de cálculos (usando los datos del cuadro No.14):

Pendiente

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$m = \frac{15 (2245056.847) - (674.51600) (30275.44775)}{15 (49739.21647) - (674.51600)^2}$$

$$m = \frac{13254578.79}{291116.4128}$$

$$\mathbf{m = 45.53}$$

Ordenada al Origen o Intercepto

$$b = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

$$b = \frac{(30275.44775) - (45.53) (674.51600)}{15}$$

$$b = \frac{-435.3781396}{15}$$

$$\mathbf{b = -29.025}$$

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right) \right]}}$$

$$r = \frac{(2245056.847) - \frac{(674.51600)(30275.44775)}{15}}{\sqrt{\left[\left((49739.21647) - \frac{(674.51600)^2}{15} \right) \left(101347028.825 - \frac{(30275.44775)^2}{15} \right) \right]}}$$

$$r = \frac{883638.586}{\sqrt{\left[\left((49739.21647) - \frac{(674.51600)^2}{15} \right) \left(101347028.825 - \frac{(30275.44775)^2}{15} \right) \right]}}$$

$$r = \frac{883638.586}{\sqrt{(19407.76085)(40240179.7)}}$$

$$r = \frac{883638.586}{\sqrt{(19407.76085)(40240179.7)}}$$

$$r = 0.9999$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{\left[\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n} \right]^2}{\left[\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right) \right]}$$

$$r^2 = \frac{\left[(2245056.847) - \frac{(674.51600)(30275.44775)}{15} \right]^2}{\left[\left((49739.21647) - \frac{(674.51600)^2}{15} \right) \left(101347028.825 - \frac{(30275.44775)^2}{15} \right) \right]}$$

$$r^2 = \frac{(883638.5973)^2}{(19408.30046)(402401797)}$$

$$r^2 = \frac{780817170600}{780993498200}$$

$$r^2 = \mathbf{0.9998}$$

El siguiente cuadro representa el resumen de los datos requeridos para determinar la tendencia de la pendiente para el parámetro de linealidad, (ver cuadro N° 14), dicho cuadro es comparable a la respuesta lineal que se observa en la figura N°3

CUADRO N° 15: LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO

EVALUACION DE PARAMETRO	RESULTADOS	CRITERIO DE ACEPTACION (8)	DICTAMEN
PENDIENTE	45.53	---	---
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	3.48	---	---
COEFICIENTE DE CORRELACION	0.9999	$r \geq 0.99$	CUMPLE
COEFICIENTE DE DETERMINACION	0.9998	$r^2 \geq 0.98$	CUMPLE
INTERVALO DE CONFIANZA IC (β_1)	46.05	no debe incluir el cero	CUMPLE
	45.01		

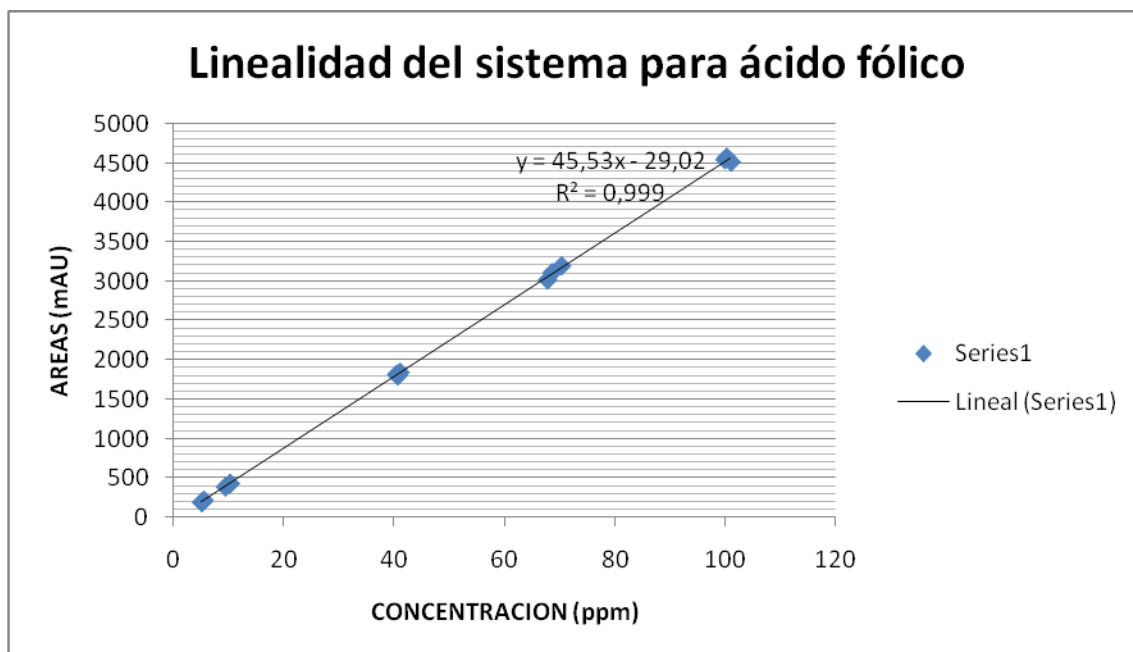


FIGURA No. 5: GRAFICA DE LA TENDENCIA DE LA PENDIENTE PARA EL PARAMETRO DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA DETERMINAR ACIDO FOLICO

De acuerdo a los datos del cuadro N°15 y la grafica de la figura N°3, la linealidad del sistema muestra que la medición obtenida es proporcional a la concentración del analito, ya que el coeficiente de correlación es mayor a 0.99% y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98% conforme a los criterios de aceptación, lo que expresa que es un método de cuantificación adecuado.

**PARAMETRO EVALUADO AL METODO PARA DETERMINAR ACIDO
FOLICO EN YOGURT (EXACTITUD)**

Evaluación del parámetro de exactitud del método para determinar ácido fólico en yogurt (4,5)

Para la evaluación de este parámetro se trabajo con 10 muestras de yogurt sin la adición de ácido fólico, y 3 muestras de yogurt con adición de ácido fólico, tomando el estándar medio de la curva de calibración, como material de referencia (ver resultados en anexo N°11 “Datos crudos de muestras de yogurt”). De acuerdo a la guía Eurachem para conocer la exactitud del método, se calcula el valor medio de los resultados de las muestras que contienen el material de referencia y el valor medio de los resultados de las muestras sin adición de ácido fólico; al valor medio del analito del material de referencia, se le resta el valor medio del blanco. Luego se compara con el valor real (es decir, con el valor adicionado correspondiente al estándar medio de la curva de calibración = 40 µg /mL).

Para obtener el valor medio se utiliza la siguiente fórmula:

$$\check{Y} = \frac{\sum X}{n}$$

En donde:

n = número de eventos

X = la concentración obtenida (µg /mL)

\check{Y} = media aritmética de las concentraciones obtenidas

CUADRO N° 16: MUESTRAS DE YOGURT SEMISÓLIDO SIN ADICIÓN DE ÁCIDO FÓLICO

CODIGO	NOMBRE	RESULTADO
YM1	Yogurt semisólido 1	0.000
YM2	Yogurt semisólido 2	0.000
YM3	Yogurt semisólido 3	0.000
YM4	Yogurt semisólido 4	0.000
YM5	Yogurt semisólido 5	0.000

CUADRO N° 17: MUESTRAS DE YOGURT LIQUIDO SIN ADICIÓN DE ÁCIDO FÓLICO

CODIGO	NOMBRE	RESULTADO
YL1	Yogurt líquido 1	0.000
YL 2	Yogurt líquido 2	0.000
YL 3	Yogurt líquido 3	0.000
YL 4	Yogurt líquido 4	0.000
YL 5	Yogurt líquido 5	0.000

CUADRO N° 18: MUESTRAS DE YOGURT CON ADICIÓN DE ÁCIDO FÓLICO A UNA CONCENTRACIÓN DE 40 µg /mL

CODIGO	NOMBRE	RESULTADO	
		CONCENTRACION (µg /mL)	AREA
MY1	Primer muestra de yogurt con adición de ácido fólico a una concentración de 40 µg /mL	0.0	--
MY2	Segunda muestra de yogurt con adición de ácido fólico a una concentración de 40 µg /mL	6.896	337.69534
MY3	Tercer muestra de yogurt con adición de ácido fólico a una concentración de 40 µg /mL	5.632	241.02213
Valor medio de la concentración		4,176	

Al restar el valor medio del analito del material de referencia al valor medio del blanco ($4.17635 - 0.000 = 4.17635$) se observa que el valor del blanco no modifica el valor medio del analito del material de referencia, por lo que se observa que la matriz sin analito no interfiere en el análisis de las muestras de yogurt con adición de ácido fólico. Sin embargo, al comparar el valor real (es decir, el valor adicionado correspondiente al estándar medio de la curva de calibración = 40 µg /mL) con el valor medio de los resultados obtenido de las concentraciones de ácido fólico en muestra de yogurt (4,176 µg /mL) y tomando

en cuenta que la exactitud se expresa como el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado, es conveniente concluir que el parámetro de exactitud del método para determinar ácido fólico en yogurt no cumple con las expectativas establecidas, pues los resultados expresan una evidente diferencia en lo que se esperaba obtener y lo que se obtuvo en el análisis de las muestras de yogurt.

**CUADRO RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS TRES
PARAMETROS DE DESEMPEÑO PARA DETERMINAR ACIDO FOLICO EN
YOGURT**

CUADRO N° 19: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS TRES PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

PARÁMETRO A EVALUAR	DICTAMEN	COMENTARIO
Precisión del sistema	No cumple con especificaciones	El sistema no tiene precisión, ya que la concordancia de las mediciones varían de tal manera que el coeficiente de variación es mayor que 1.5 %, es decir que caen fuera del rango de valores en el cual sería razonable esperar que ocurrieran
Linealidad del sistema	Cumple con especificaciones	El sistema tiene linealidad ya que la medición obtenida del área es proporcional a la concentración del analito, en la grafica. Y estadísticamente $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$, por lo tanto es un método de cuantificación adecuado.
Exactitud del método	No cumple con especificaciones	El método no es exacto, debido a que los resultados muestran que no existe un grado de concordancia entre los valores obtenidos y los valores establecidos para el método.

**PRESENTACION DE ANALISIS DE RESULTADOS OBTENIDOS AL
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL**

Luego de trabajar las marchas analíticas de las muestras de yogurt y las soluciones estándares para determinar ácido fólico en yogurt utilizando cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) con el objetivo de evaluar los parámetros de desempeño de precisión del sistema, exactitud del método y linealidad del sistema, se realizó el análisis de los resultados obtenidos de dichas marchas, que se presentan al inicio de este capítulo, con la finalidad de concluir sobre la fiabilidad del método para ser implementado en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de El Salvador.

Posteriormente, a pesar que el método no pudo ser implementado en las instalaciones del mencionado laboratorio, debido a que fueron otros proyectos los que tomaron prioridad para el interés del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y que los resultados obtenidos no cumplieron con la expectativas de precisión del sistema y exactitud del método; se realizó la entrega del documento: “Interpretación de resultados generados para la evaluación de parámetros de desempeño del método analítico por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para determinar ácido fólico en yogurt, dirigida al ministerio de salud pública y asistencia social”, para hacer constancia de ello se presenta una carta en el anexo N°12 dirigida a la persona

responsable del Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social; cumpliendo de esta manera el último objetivo específico propuesto en el presente trabajo “presentar los resultados obtenidos de la investigación realizada al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS)”.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Al realizar una evaluación de los parámetros de desempeño en un método analítico, se conoce su importancia, ya que permite al analista estimar si el método cumple con el propósito esperado y si es factible, antes de pretender validar.
2. La precisión del sistema no cumple con los resultados esperados de acuerdo a las especificaciones descritas en las guías Eurachem ^(4,5) y Validación de Métodos Analíticos ⁽⁸⁾, debido a que la concordancia de las mediciones varían de tal manera que el coeficiente de variación es mayor que 1.5 %, es decir que caen fuera del rango de valores en el cual sería razonable esperar que ocurrieran
3. Sí es posible obtener resultados que muestren una tendencia lineal en el sistema, y esto se puede observar notablemente en las graficas de linealidad del sistema que muestra que la medición obtenida es proporcional a la concentración del analito.
4. Tomando en cuenta que la exactitud del método se expresa como el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado, es razonable concluir que el método no tiene exactitud, es decir los resultados obtenidos en las concentraciones de las muestras de yogurt, revelan no tener un grado de concordancia con el valor de referencia aceptado

5. El método analítico utilizado (HPLC), no es factible de implementar para determinar ácido fólico en yogurt por parte del laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, debido a que los resultados obtenidos de la evaluación de dos parámetros de desempeño (precisión del sistema, exactitud del método), se encuentran fuera de los criterios de aceptación, descrito en la bibliografía oficial para métodos cromatográficos, que fueron de valiosa aportación en la realización del presente trabajo ^(4,8).
6. La evaluación de parámetros de desempeño del método analítico por cromatografía líquida de alta presión aplicado para determinar ácido fólico en yogurt, no cumplió, debido que al realizar los análisis para evaluar los parámetros de precisión del sistema y exactitud del método, los resultados obtenidos demostraron estadísticamente que los datos se encuentran fuera de especificaciones.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Tener cuidado de almacenar correctamente la muestra, según corresponda, de tal manera que se conserve su integridad e identidad, ya que este es uno de los aspectos influyentes en el adecuado desempeño de cualquier método.
2. Contar con equipos que se encuentren debidamente calibrados, para garantizar la calidad de los resultados del trabajo que se realiza.
3. Asegurar que existan procedimientos bien definidos, en el laboratorio donde se desarrolle los análisis, como: procedimientos estándar de operación, metodología de validación establecida, protocolo y reportes de calificación, para una mejor obtención de resultados.
4. Garantizar que cualquier cambio que se desee realizar durante el desarrollo de un método analítico para su posterior validación, debe ser acorde a las especificaciones establecidas por el método.
5. Promover que en futuras investigaciones sobre el tema, sea utilizado otro método de extracción de la muestra: como extracción por ultrasonido; ya que, según estudios permite una recuperación del ácido fólico a partir del yogurt.
6. Seguir en la búsqueda de métodos para determinar ácido fólico en alimentos y en la implementación de estos, con el fin de contribuir a que

el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social verifique la fortificación de ácido fólico en los alimentos que así lo rotulen.

7. Realizar una evaluación de parámetros de desempeño a otros métodos alternos en la determinar ácido fólico en otros alimentos, como los que se proponen en el anexo No.12 : “Procedimiento para determinar ácido fólico en harina de trigo método UV-HPLC” y “Procedimiento para determinar ácido fólico en pre mezclas de vitaminas para harina de trigo método UV-HPLC”

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso R. Gennaro, Farmacia de Remington. Tomo 2, 19^a Edición. Madrid, España. Editorial Medica Panamericana, 1998. Pág. 1691.
2. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, Principios de análisis instrumental, quinta edición en español España, Me Graw Hill, p. 786-793
3. EURACHEM/CITAC Guide "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements" Second Edition, LGC Ud. United Kingdom.
4. Guía EURACHEM "Métodos Analíticos adecuados a sus propósito, guía de validación de métodos y temas relacionados. 2^a Edición en español, México, 2005
5. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, laboratorio de Control de Calidad de alimentos y aguas, Procedimientos para la validación de métodos. El Salvador, 2005.
6. Reglamento técnico centroamericano RTCA 11.01.35: 06. Productos farmacéuticos. Validación de Métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los Medicamentos.
7. Rivas Alas, María Elena; Rodríguez Romero Silvia Adalia. Validación del Método analítico por cromatografía de alta presión (HPLC) de un jarabe mulltivitaminico con ciproheptadina. Universidad de El Salvador, trabajo de graduación para optar por el titulo de Licenciatura en Química y Farmacia. 2007. Pág. 26, 31-33, 37-40.

8. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia
Departamento de análisis químico e instrumental, Cátedra de Control de
Calidad de productos farmacéuticos humanos y veterinarios II. Validación
Métodos Analíticos, agosto 13-20, 2007.
9. Vega Romero, C.; Camargo, J. Ramón. Determinación por Cromatografía
líquida (HPLC) el contenido de ácido fólico y hierro en una bebida láctea
fermentada tipo yogurt enriquecida a partir de materias primas naturales.
Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, julio-diciembre, año
2007/vol. 5, número 002. Universidad de Pamplona, Bucaramanga,
Colombia. Pp. 42-48. Que se puede encontrar en internet, ingresando al
siguiente sitio:
10. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=90350204>
11. <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
12. <http://www.zonadiet.com/nutricion/folico.htm>
13. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0001-60022003000100002
&script=sci_arttext](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0001-60022003000100002&script=sci_arttext)
14. http://www.esalud.gob.mx/wb2/eMex/eMex_Importancia_del_Acido_Folico?page=1
15. http://es.wikipedia.org/wiki/Espina_b%C3%ADfida
16. <http://es.wikipedia.org/wiki/Anencefalia>
17. <http://www.netdoctor.es/XML/verArticuloMenu.jsp?XML=000074>

18. http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/complementos_dieteticos/2005/05/25/142266.php
19. <http://drguillermopage.blogspot.com/2008/04/el-cido-flico-protege-contra-anomalias.html>
20. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000567.htm>
21. http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-711.02-063.pdf
22. http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/03/PRT-711.02-042%20V%200%20AF%20PREMIX.pdf

ANEXOS

ANEXO N° 1
ESPINA BIFIDA

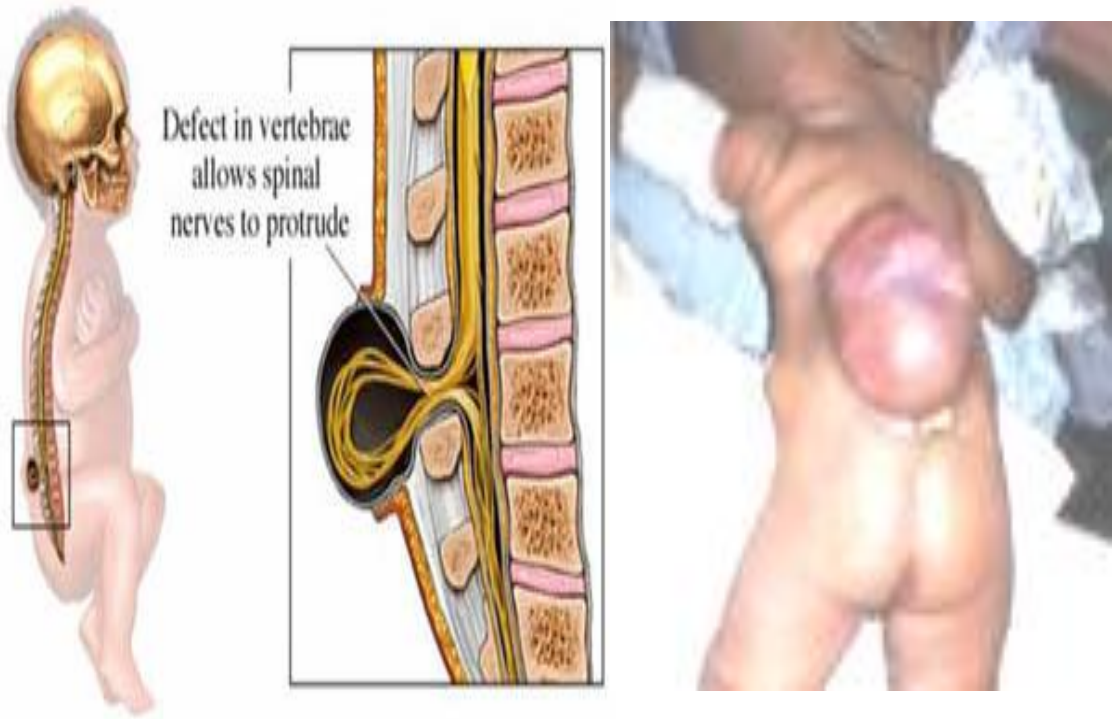


Figura No 6 Espina Bífida.

ANEXO N° 2
ESPINA BIFIDA OCULTA



Figura No. 7 Espina bífida oculta

ANEXO Nº 3

ESPINA BÍFIDA ABIERTA O QUÍSTICA

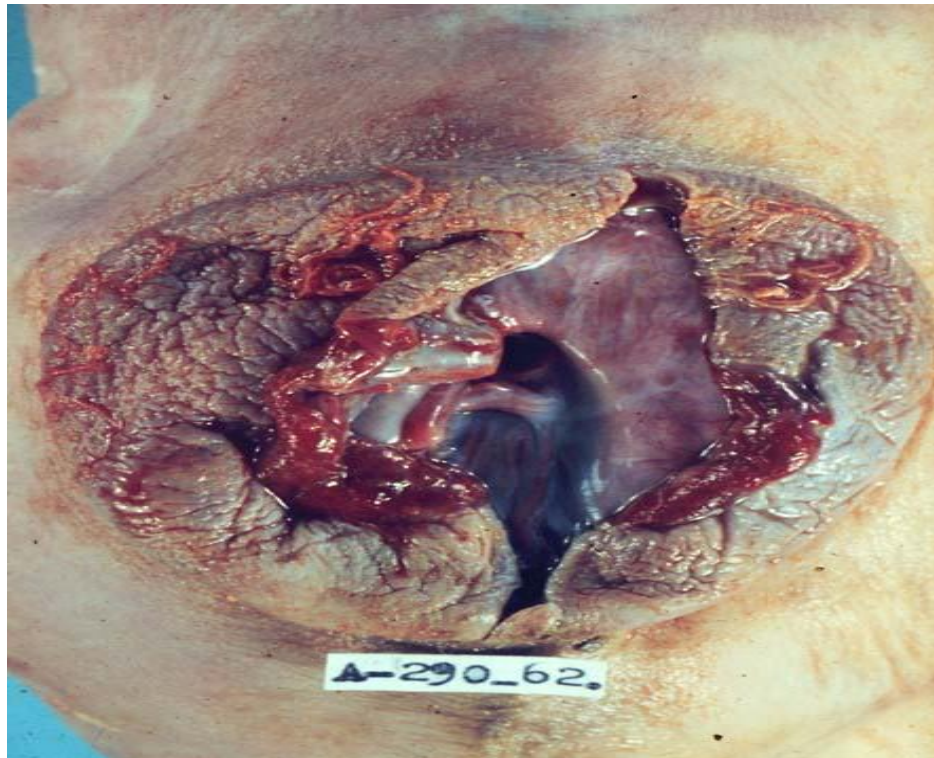


Figura No. 8 Espina bífida abierta o quística

ANEXO N° 4

MENINGOCELE Y LIPOMENINGOCELE



Figura No. 9 Meningocele



Figura No. 10 Lipomeningocele

ANEXO Nº 5
MIELOMENINGOCELE



Figura No. 11 Mielomeningocele

ANEXO N° 6
ANENCEFALIA



Figura No. 12 Anencefalia

ANEXO N° 7

ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

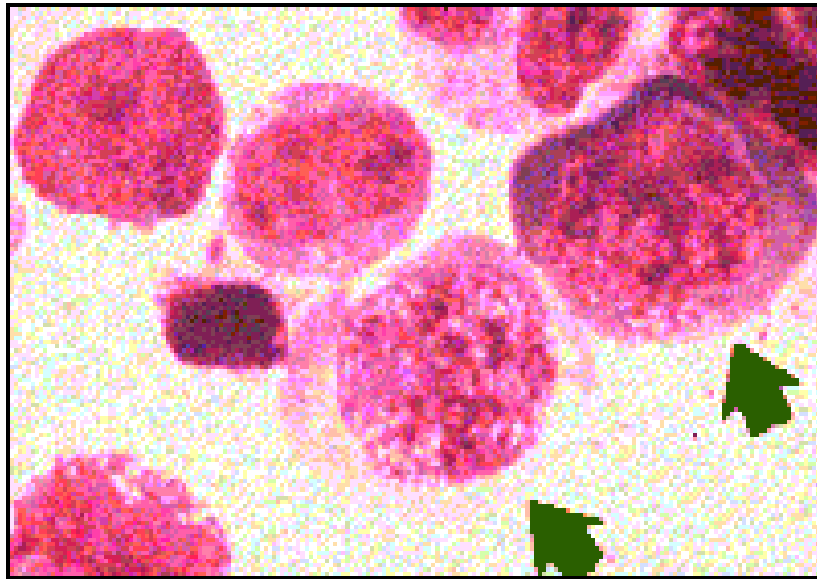


Figura No. 13 Anemia megaloblástica

ANEXO N° 8

**CUADRO DE MARCAS DE YOGURT UTILIZADAS PARA EVALUAR
EL MÉTODO**

CUADRO DE MARCAS DE YOGURT UTILIZADAS

CUADRO N°20 MARCAS DE YOGURT UTILIZADAS PARA EVALUAR EL MÉTODO

MARCA DE YOGURT	PRESENTACION		ROTULAN ACIDO FÓLICO		
	SEMISÓLIDA	LÍQUIDA	SI	NO	CANTIDAD
YOGURT YES (LACTOSA)	150 g	200 mL	-	X	
YOGURT IN LINE DELIGURT (DOS PINOS)	-	200 mL	X	-	29 µg (cantidad por porción)
YOGURT (DOS PINOS)	150 g	-	-	X	
YOPLAIT (SIGMA ALIMENTOS)	125 g	235 g	-	X	
YOGURT LAIT (SULI)	170 g	-	-	X	
YOGURT GAYMONT'S	170 g	-	-	X	

Las marcas que se utilizaron para realizar los análisis se muestran en el cuadro N°20, de las cuales solo una rotula ácido fólico (ver presentación en figuras N°14 Y 15).



Figura N° 14 Presentación del yogurt que rotula ácido fólico

INFORMACIÓN NUTRICIONAL / NUTRITION FACTS	
Tamaño de Porción / Serving Size	200 ml
Porciones por Envase / Servings per Container	1
Cantidad por Porción / Amount per Serving	% RDI* / % DV†
Energía / Energy	278 kJ (66 kcal)
Grasa / Fat	0,22 g
Carbohidratos / Carbohydrates	10 g
Fibra dietética / Fiber	2,4 g
Proteína / Protein	6 g
Vitaminas y Minerales / Vitamins and Minerals	
Vitamina A / Vitamin A	138 µg
Ácido Fólico / Folic acid	29 µg
Calcio / Calcium	226 mg

*Porcentaje de la Recomendación Dietética Diaria según FAO/WHO (Codex Alimentarius)
 †Percentage of Daily Recommended Intake by FAO/WHO (Codex Alimentarius)

Figura N°15 Rotulación de yogurt que contiene ácido fólico

ANEXO N° 9

MATERIALES, EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIALES, EQUIPO Y REACTIVOS

Materiales o cristalería.

- Beaker de 10 mL
- Beaker de 25 mL
- Frasco volumétrico de 10.0 mL
- Agitador de vidrio
- Cilindro graduado de 5 mL
- Cilindro graduado de 10 mL
- Cilindro graduado de 25 ML
- Micropipeta ajustable de (100 a 1000) μ L
- Micropipeta ajustable de (40 a 200) μ L
- Embudo de vidrio

Equipo.

Cromatógrafo líquido de alta eficiencia con: bomba cuaternaria, columna C8 (150 mm, 4.6 mm, 0.5 μ m a temperatura ambiente (18 C), la fase móvil utilizada es: acetonitrilo: Buffer acetato pH 3.5 en una relación 10:90 hasta 24:76 en 9 minutos con un flujo de 0.5 mL/min. con detector UV de arreglo de diodos.

Centrifugadora

Agitador magnético

Balanza analítica.

Filtros de 0.45 µm

Magnetos.

Reactivos Calidad HPLC.

-Acetonitrilo (HPLC)

-Hidróxido de sodio (ACS)

-Hidróxido de potasio 0.1M

-Acido fosfórico 0.1 M

-Fosfato de sodio monobásico (ACS)

-Acido tricloroacético. (ACS)

-Estándar de ácido fólico. (Pureza 98%)

-Acetato de sodio (ACS)

-Acido clorhídrico (ACS)

- Agua desionizada (calidad HPLC)

- Buffer fosfato pH 3.5

ANEXO N ° 10

DATOS CRUDOS DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR

PRIMER CORRIDA CROMATOGRAFICA DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR

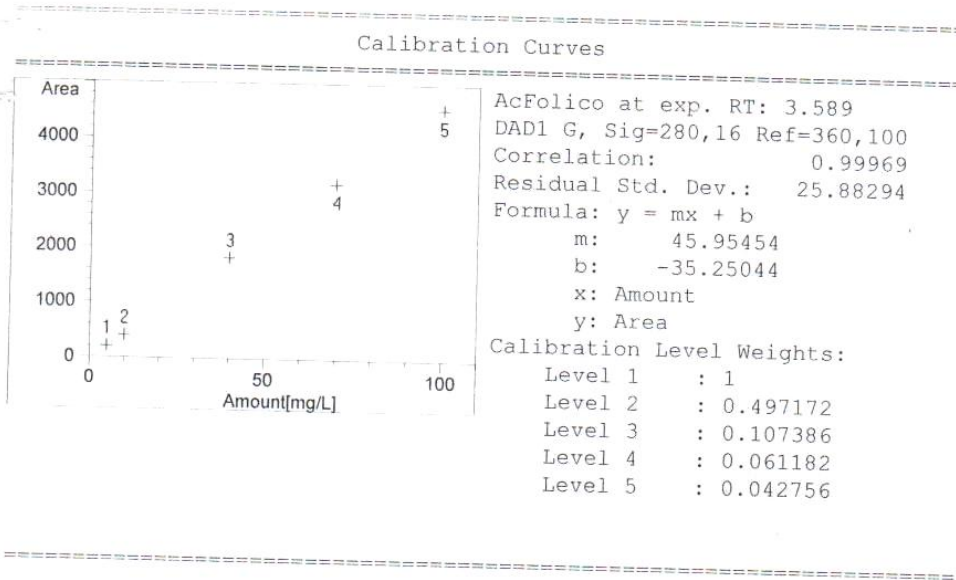
Tabla de calibración de la primer corrida cromatográfica

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

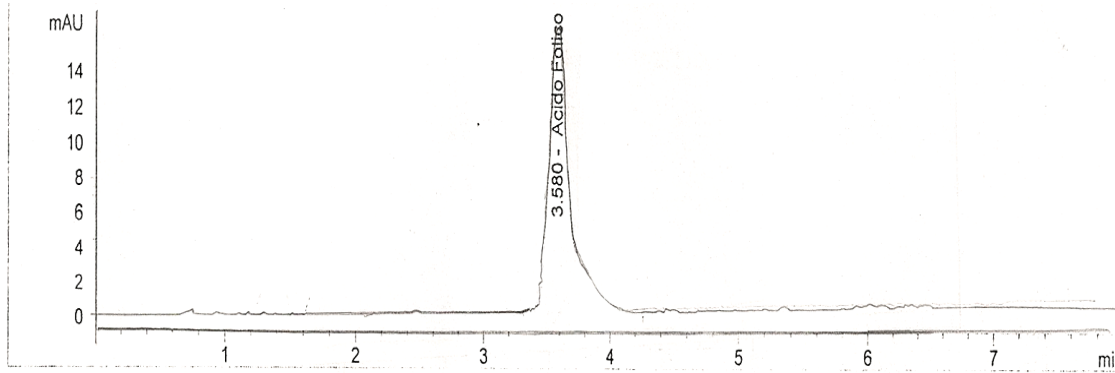
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.589	1	5.00000	195.33313	2.55973e-2	AcFolico
	2	10.00000	392.88858	2.54525e-2	
	3	40.00000	1818.98022	2.19903e-2	
	4	70.00000	3192.65527	2.19253e-2	
	5	100.00000	4568.54541	2.18888e-2	

Peak Sum Table

Curva de calibración de la primer corrida cromatográfica



Espectro y lectura obtenida de la primera corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

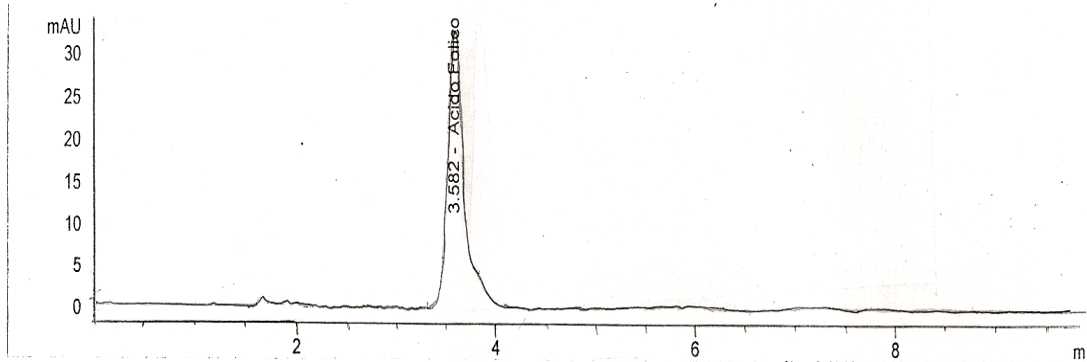
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.580	VV	195.33313	2.56876e-2	5.01764		Acido Folico

Totals : 5.01764

=====
*** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la primera corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

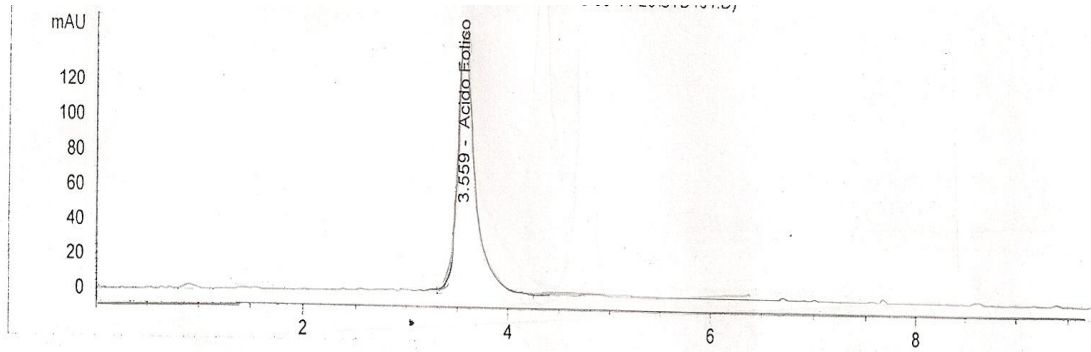
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.582	VV	392.88858	2.37130e-2	9.31658		Acido Folico

Totals : 9.31658

=====
*** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la primera corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

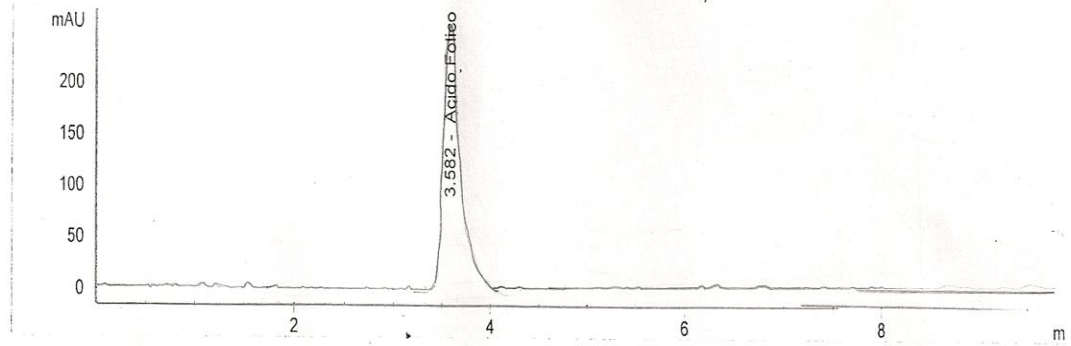
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.559	VV	1818.98022	2.21823e-2	40.34924		Acido Folico

Totals : 40.34924

=====
*** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la primera corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

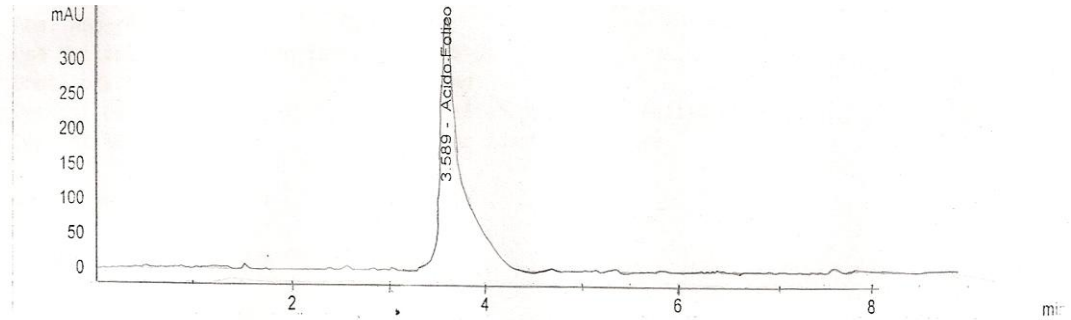
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.582	VV	3192.65527	2.20009e-2	70.24128		Acido Folico

Totals : 70.24128

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la primera corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.589	VV	4568.54541	2.19285e-2	100.18152		Acido Folico

Totals : 100.18152

=====
 *** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas

Concentración (ppm)	Áreas
5,01764	195,33313
9,31658	392,88858
40,34924	1818,98022
70,24128	3192,65527
100,18152	4568,54541

**SEGUNDA CORRIDA CROMATOGRAFICA DE LAS SOLUCIONES
ESTANDAR**

Tabla de calibración de la segunda corrida cromatográfica

----- (ending previous bracket)

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

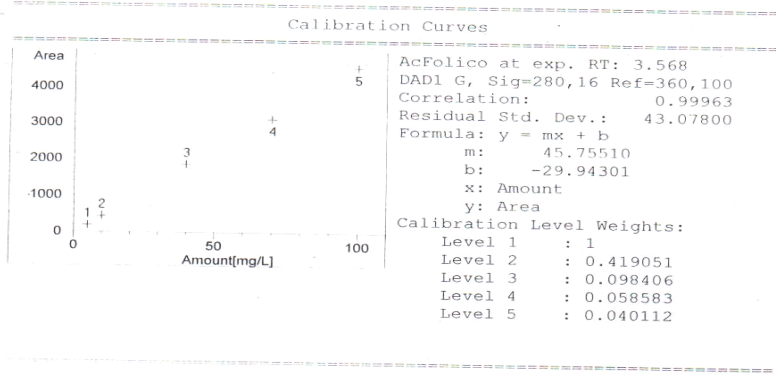
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.568	1 1	5.00000	182.74220	2.73609e-2	AcFolico
	2	10.00000	436.08609	2.29313e-2	
	3	40.00000	1857.01733	2.15399e-2	
	4	70.00000	3119.35181	2.24406e-2	
	5	100.00000	4555.82910	2.19499e-2	

=====

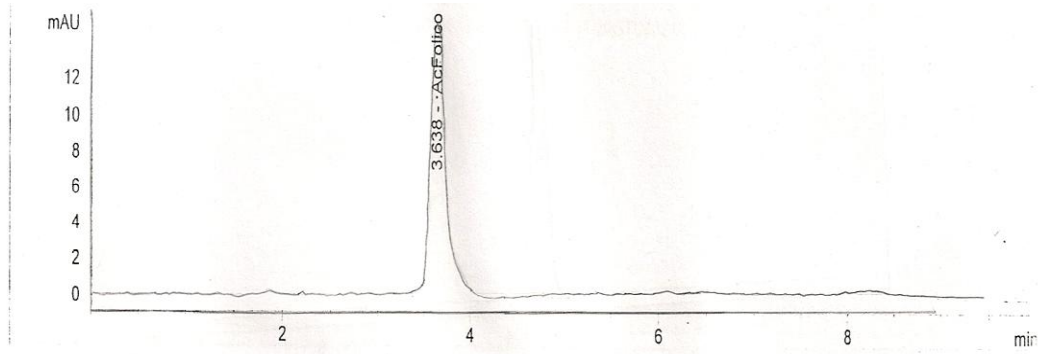
Peak Sum Table

=====

Curva de calibración de la segunda corrida cromatográfica



Espectro y lectura obtenida de la segunda corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

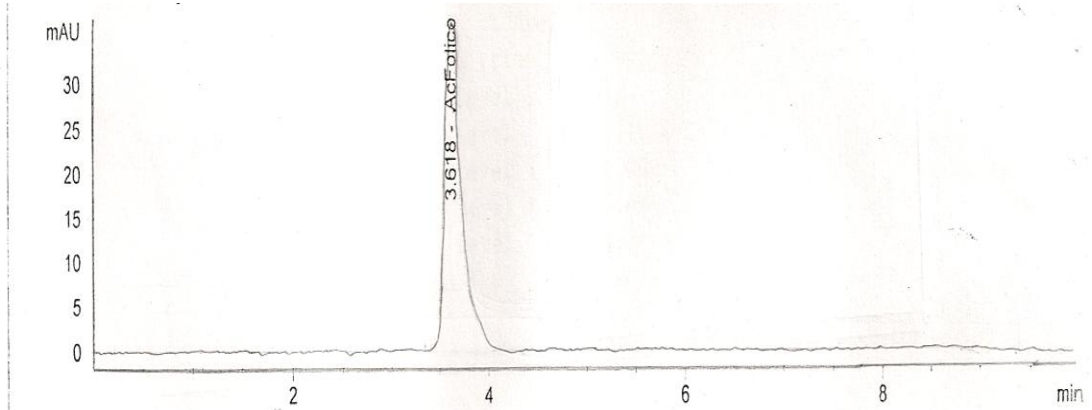
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.638	VV	182.74220	2.59582e-2	4.74366		AcFolico

Totals : 4.74366

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la segunda corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

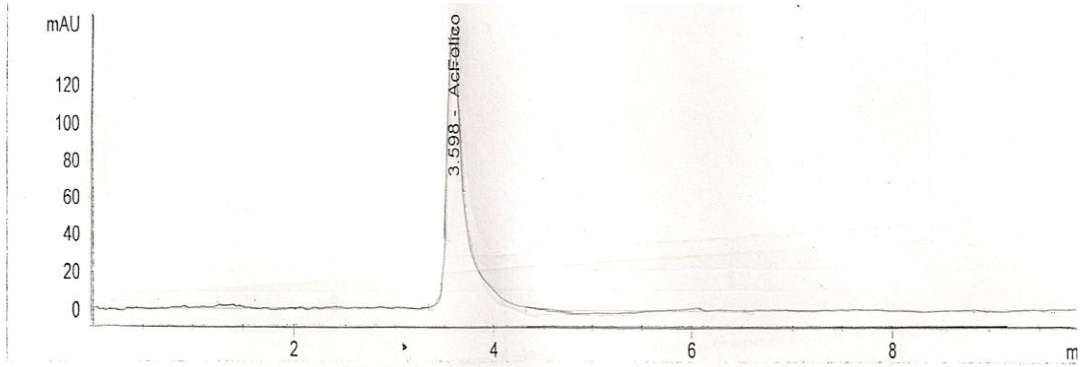
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.618	VV	436.08609	2.35196e-2	10.25658		AcFolico

Totals : 10.25658

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la segunda corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

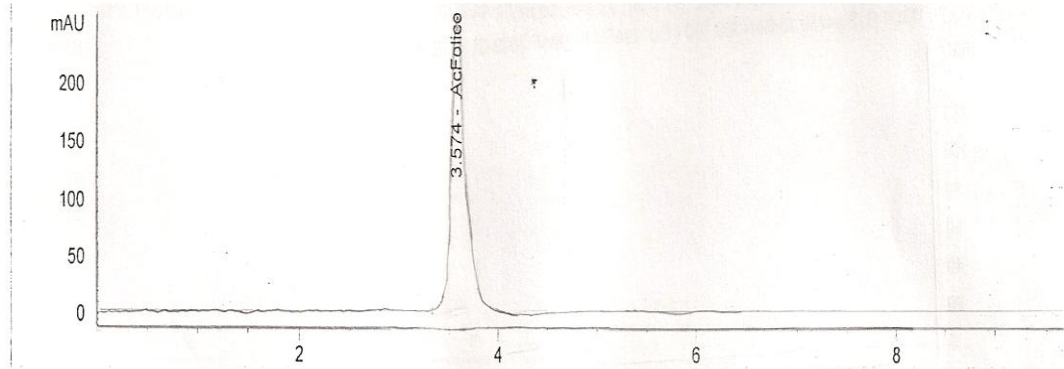
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.598	VV	1857.01733	2.21737e-2	41.17695		AcFolico

Totals : 41.17695

=====
*** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la segunda corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

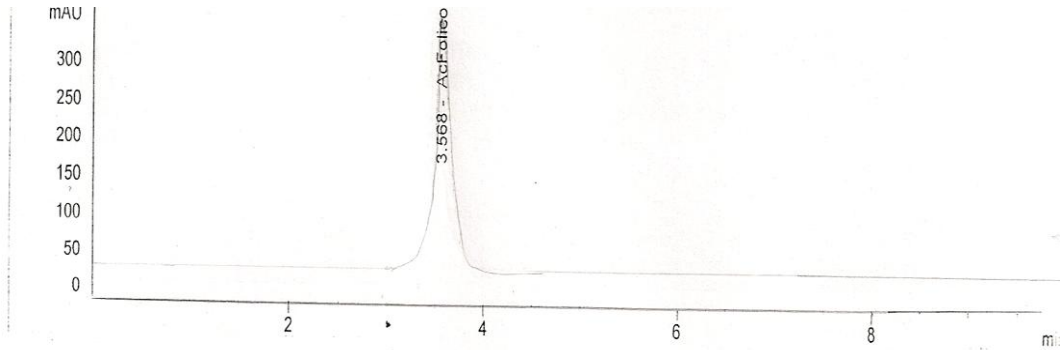
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.574	VV	3119.35181	2.20065e-2	68.64615		AcFolico

Totals : 68.64615

=====
*** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la segunda corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.568	VV	4555.82910	2.19290e-2	99.90481		AcFolico

Totals : 99.90481

=====
 *** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la segunda corrida.

Concentración (ppm)	Areas
4,74366	182,7422
10,25658	436,08609
41,17695	1857,01733
68,64615	3119,35181
99,90481	4555,8291

**TERCERA CORRIDA CROMATOGRAFICA DE LAS SOLUCIONES
ESTANDAR**

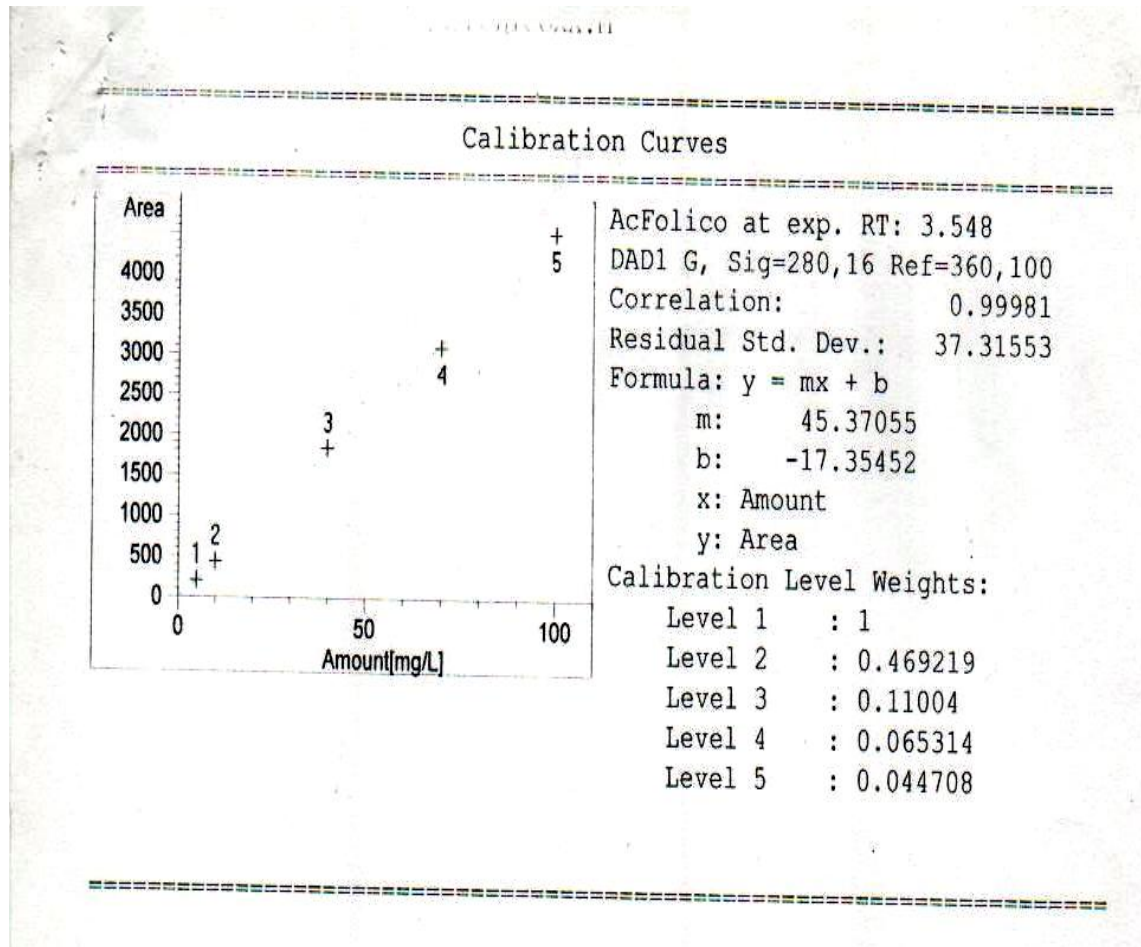
Tabla de calibración de la tercera corrida cromatográfica

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

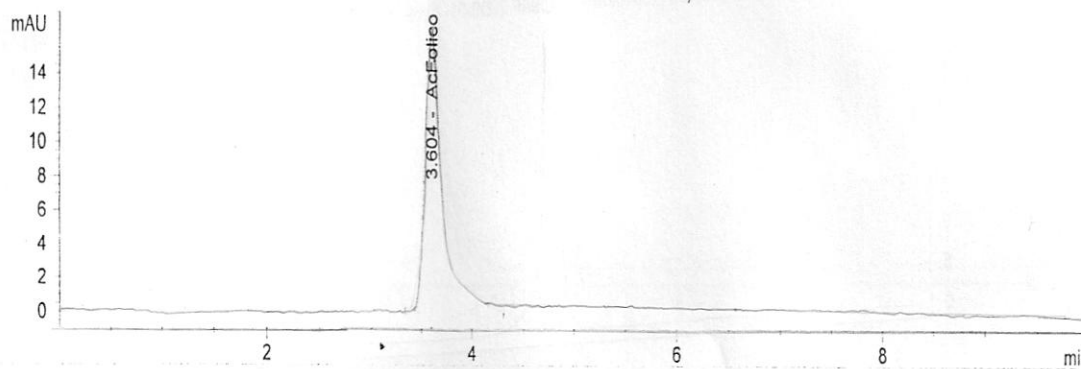
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.548	1	5.00000	202.90720	2.46418e-2	AcFolico
	2	10.00000	432.43640	2.31248e-2	
	3	40.00000	1843.94470	2.16926e-2	
	4	70.00000	3106.66431	2.25322e-2	
	5	100.00000	4538.51709	2.20336e-2	

=====
Peak Sum Table
=====

Curva de calibración de la tercera corrida cromatográfica



Espectro y lectura obtenida de la tercera corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

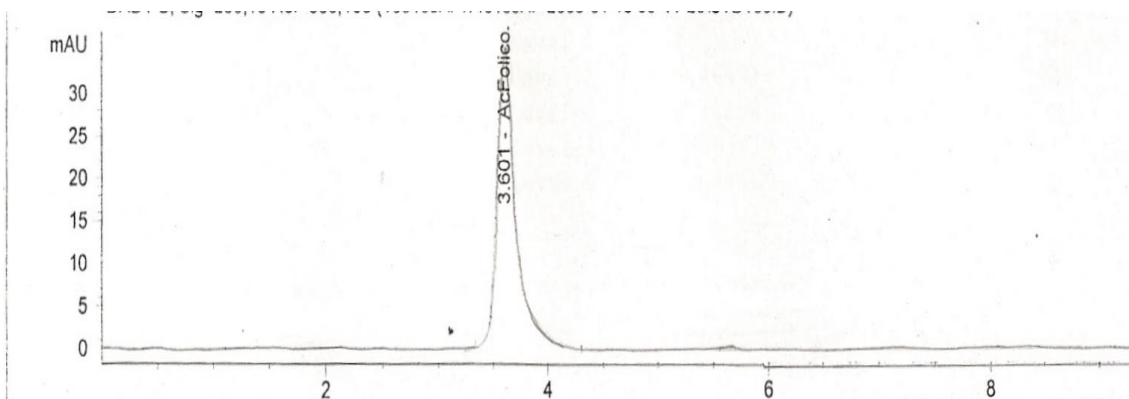
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.604	VV	202.90720	2.50807e-2	5.08906		AcFolico

Totals : 5.08906

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la tercera corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

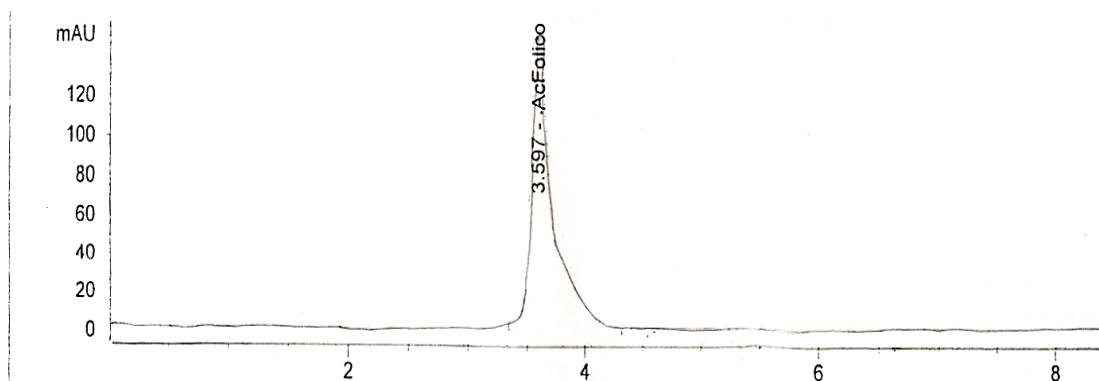
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.601	VV	432.43640	2.33688e-2	10.10553		AcFolico

Totals : 10.10553

=====
*** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la tercera corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

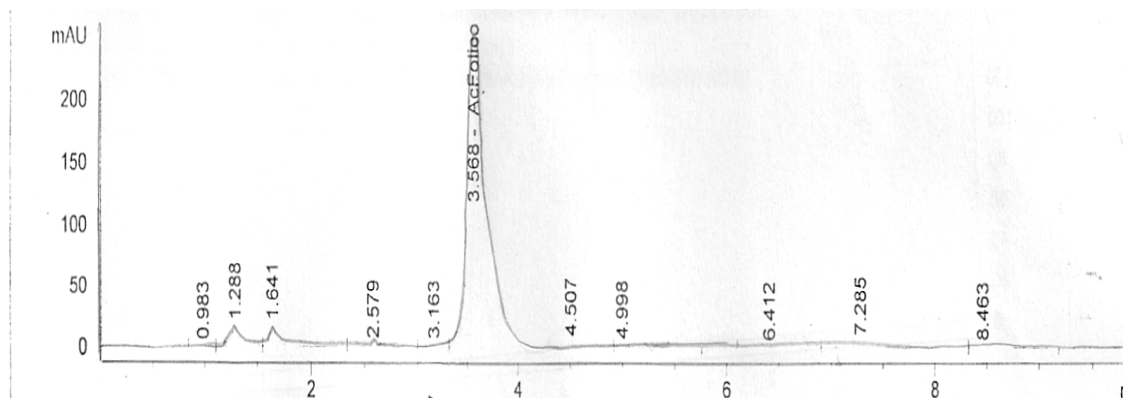
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.597	VV	1843.94470	2.22104e-2	40.95473		AcFolico

Totals : 40.95473

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la tercera corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

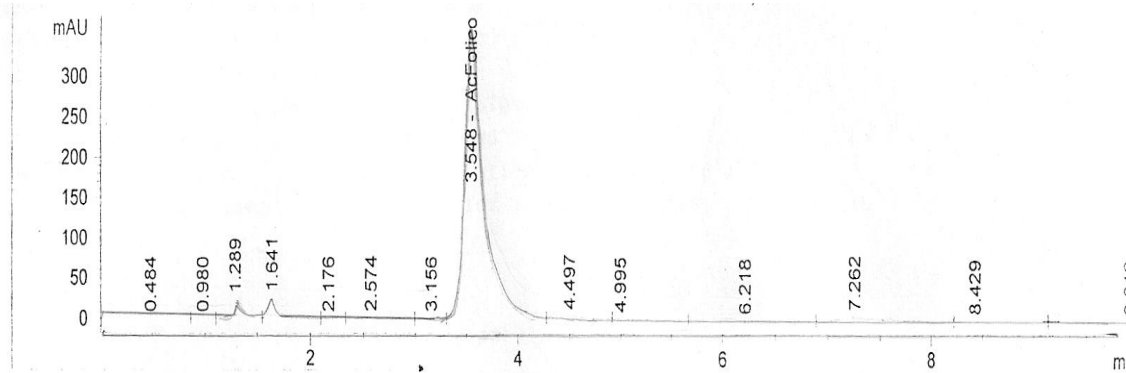
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.568	VV	3106.66431	2.20661e-2	68.55209		AcFolico

Totals : 68.55209

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la tercera corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp Name
3.548	VV	4538.51709	2.19997e-2	99.84593	AcFolico

Totals : 99.84593

=====
 *** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la tercera corrida.

Concentración (ppm)	Áreas
5,08906	202,9072
10,10553	432,4364
40,95473	1843,9447
68,55209	3106,66431
99,84593	4538,51709

**CUARTA CORRIDA CROMATOGRÁFICA DE LAS SOLUCIONES
ESTANDAR**

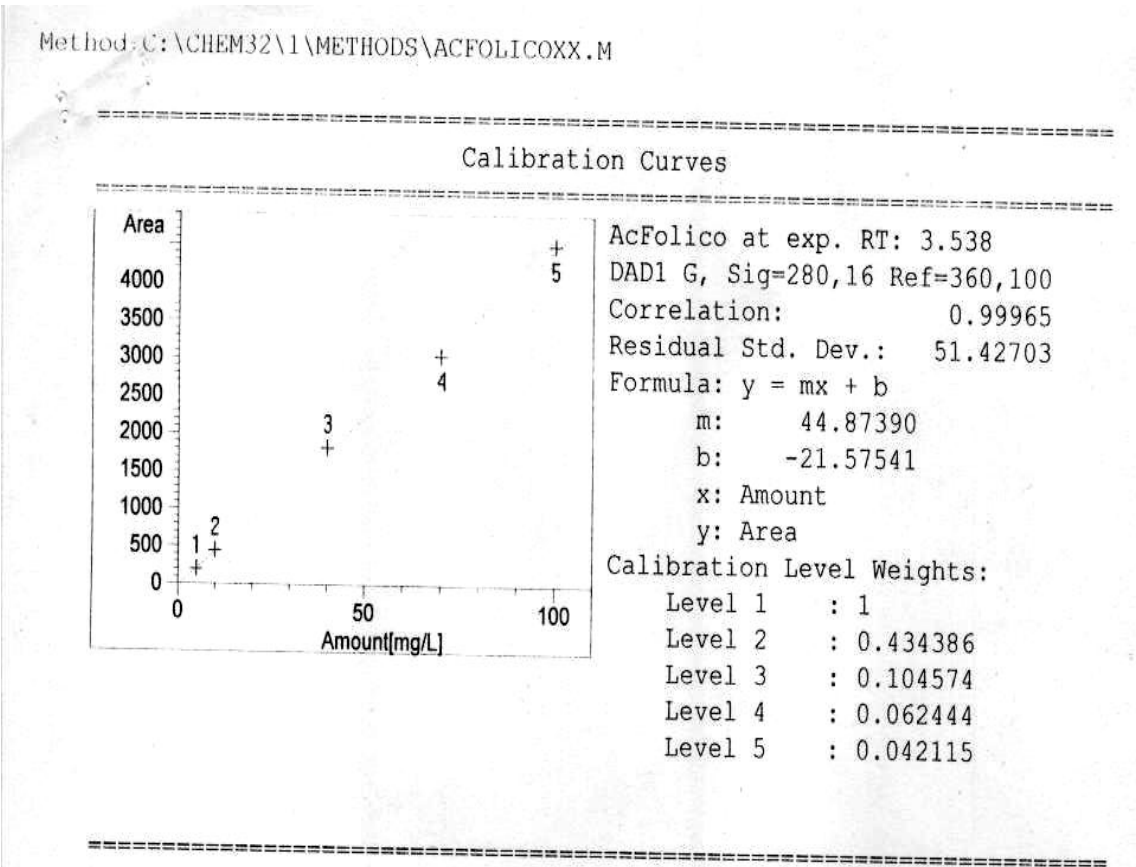
Tabla de calibración de la cuarta corrida cromatográfica

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

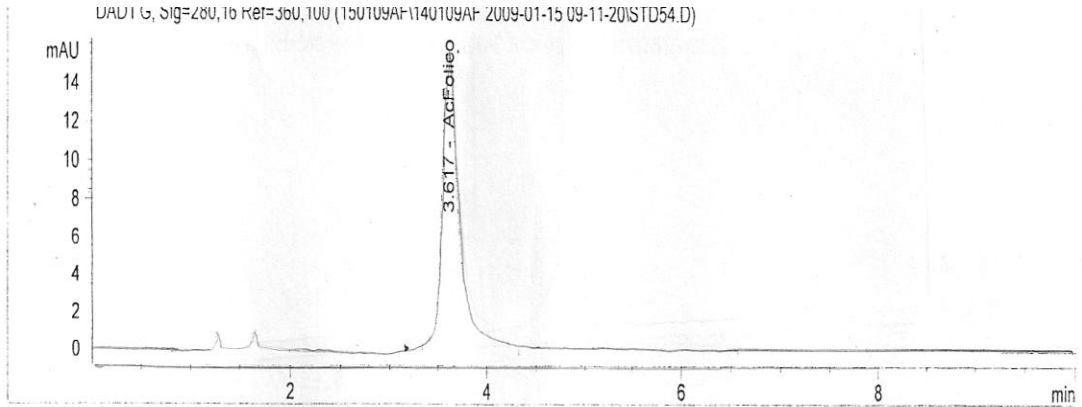
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.538	1 1	5.00000	189.91656	2.63274e-2	AcFolico
	2	10.00000	437.20688	2.28725e-2	
	3	40.00000	1816.09778	2.20252e-2	
	4	70.00000	3041.39697	2.30157e-2	
	5	100.00000	4509.47998	2.21755e-2	

=====
 Peak Sum Table
 =====

Curva de calibración de la cuarta corrida cromatográfica



Espectro y lectura obtenida de la cuarta corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

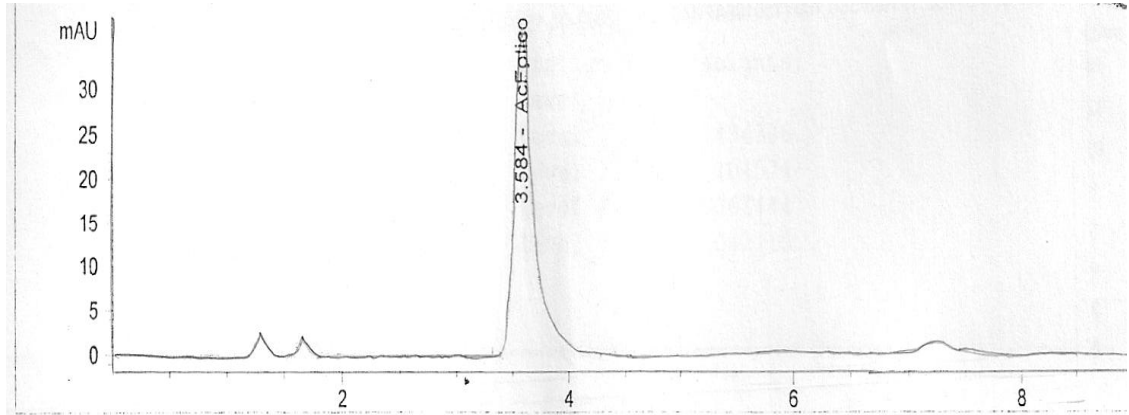
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.617	VV	189.91656	2.40548e-2	4.56841		AcFolico

Totals : 4.56841

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la cuarta corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

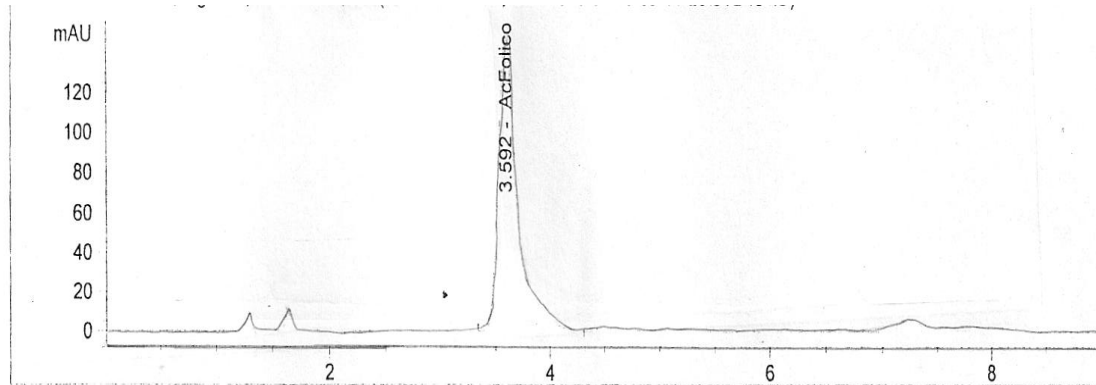
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.584	VV	437.20688	2.29156e-2	10.01886		AcFolico

Totals : 10.01886

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la cuarta corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

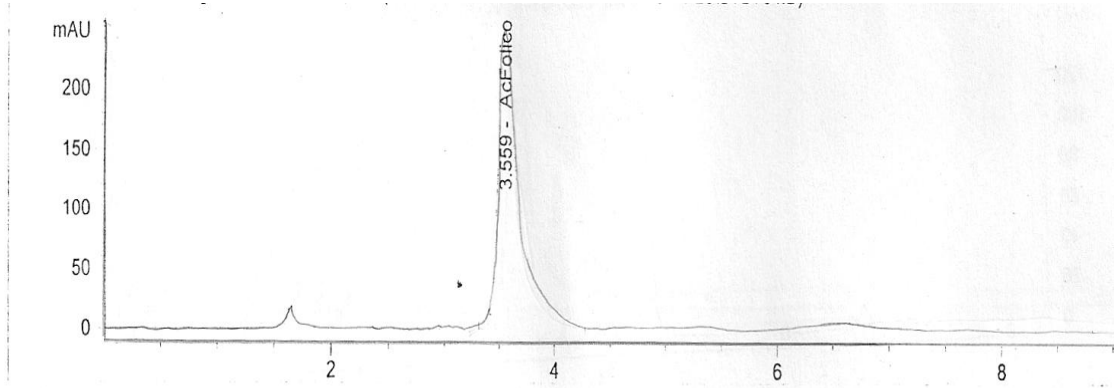
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.592	VV	1816.09778	2.22513e-2	40.41062		AcFolico

Totals : 40.41062

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la cuarta corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

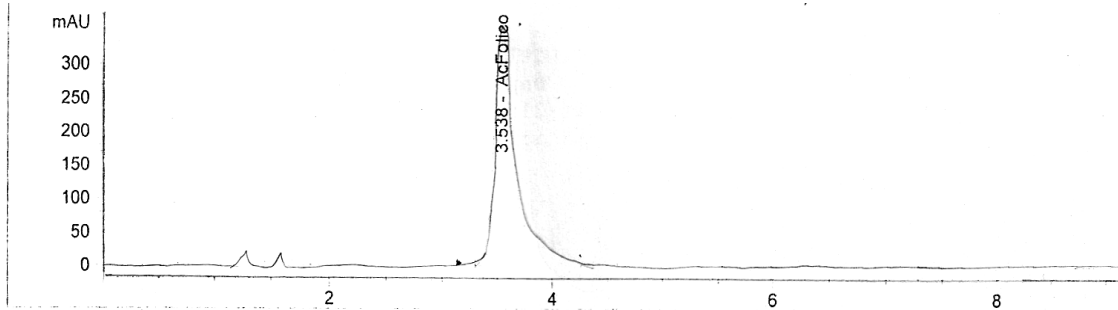
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.559	VV	3041.39697	2.21665e-2	67.41711		AcFolico

Totals : 67.41711

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la cuarta corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



External Standard Report (Sample Amount is 0!)

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.538	VV	4509.47998	2.21256e-2	99.77473		AcFolico
Totals :				99.77473		

*** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la cuarta corrida.

Concentración (ppm)	Áreas
4,56841	189,91656
10,01886	437,20688
40,41062	1816,09778
67,41711	3041,39697
99,77473	4509,47998

QUINTA CORRIDA CROMATOGRAFICA DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR

Tabla de calibración de la quinta corrida cromatográfica

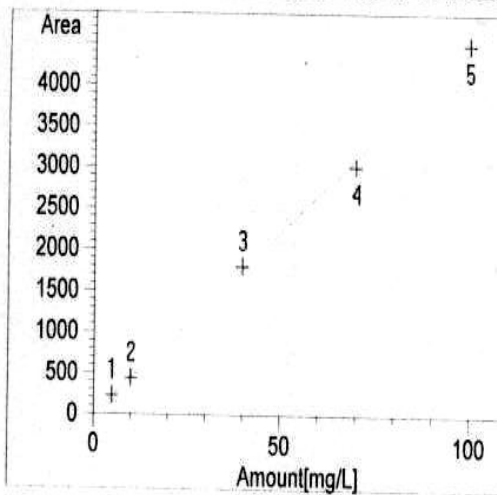
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.515	1	1	5.00000	223.36166	2.23852e-2
		2	10.00000	435.57352	2.29582e-2
		3	40.00000	1798.46130	2.22412e-2
		4	70.00000	3015.88794	2.32104e-2
		5	100.00000	4509.29102	2.21764e-2

Peak Sum Table

Curva de calibración de la quinta corrida cromatográfica

Calibration Curves



AcFolico at exp. RT: 3.515
 DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100
 Correlation: 0.99971
 Residual Std. Dev.: 59.00422

Formula: $y = mx + b$

m: 44.38002

b: -1.44622

x: Amount

y: Area

Calibration Level Weights:

Level 1 : 1

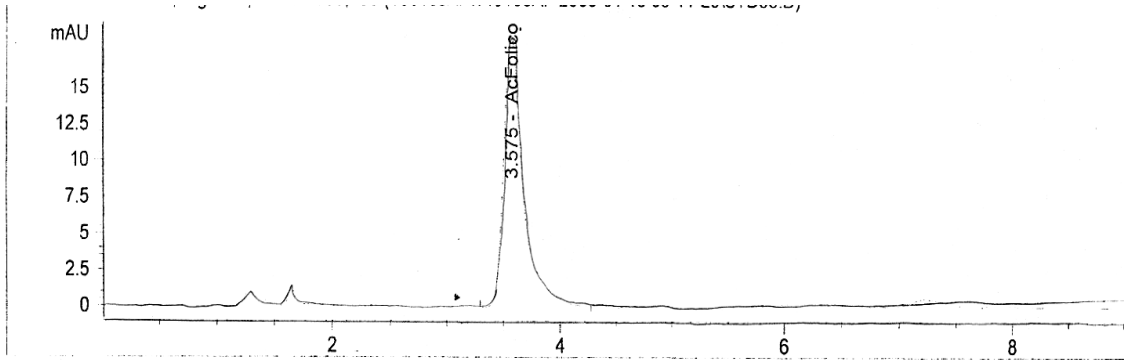
Level 2 : 0.512799

Level 3 : 0.124196

Level 4 : 0.074062

Level 5 : 0.049534

Espectro y lectura obtenida de la quinta corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

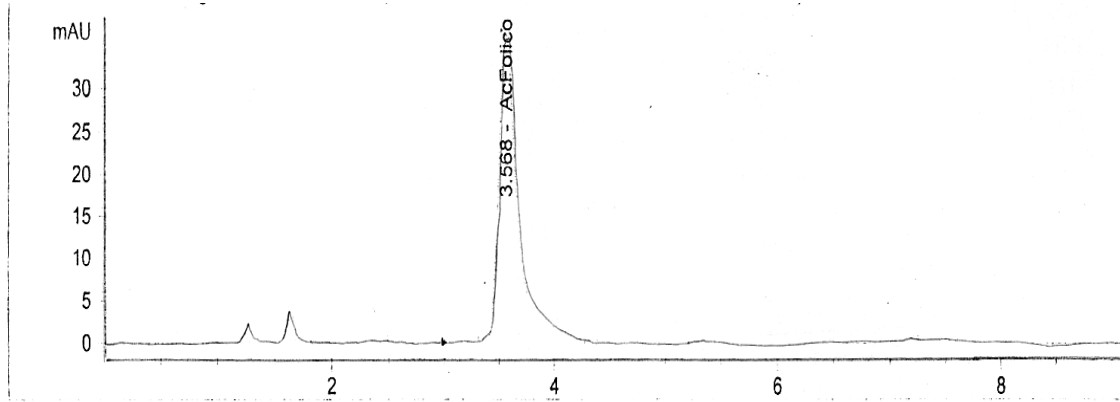
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.575	VV	223.36166	2.44372e-2	5.45834		AcFolico

Totals : 5.45834

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la quinta corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

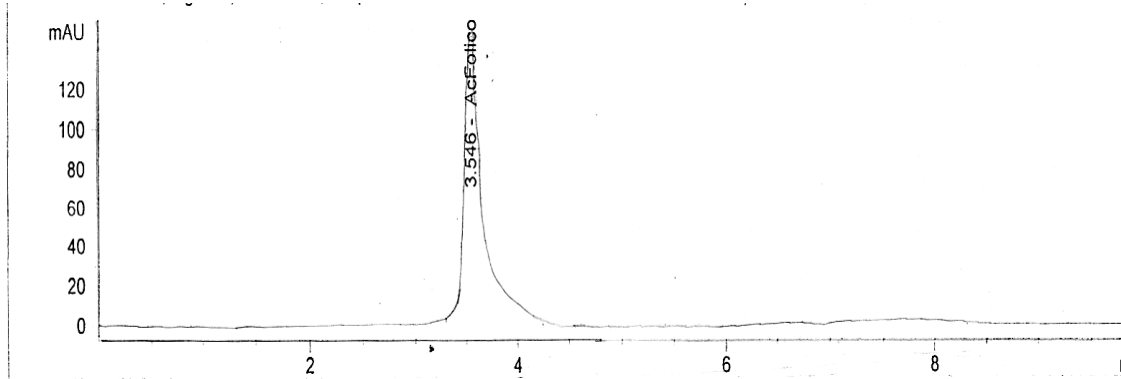
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.568	VV	435.57352	2.33885e-2	10.18741		AcFolico

Totals : 10.18741

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la quinta corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

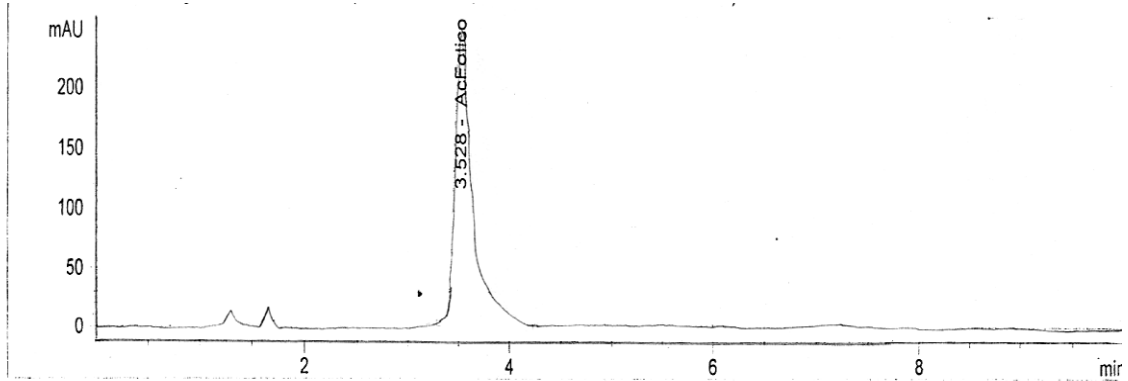
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.546	VV	1798.46130	2.25520e-2	40.55892		AcFolico

Totals : 40.55892

=====
*** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la quinta corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

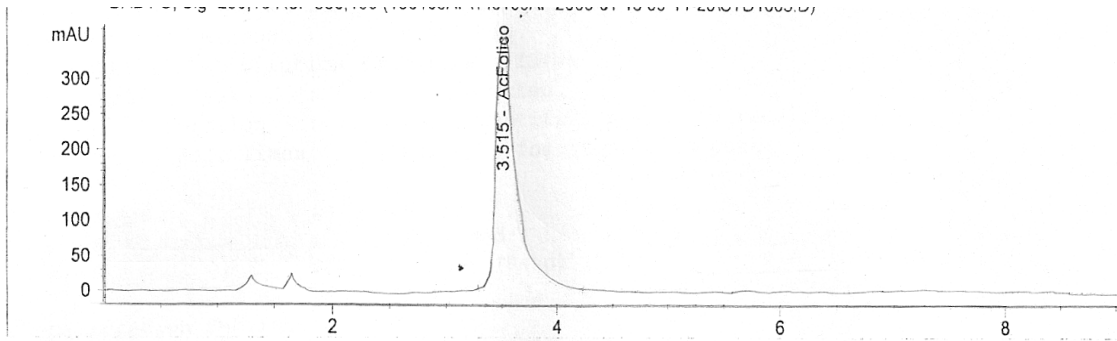
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.528	VV	3015.88794	2.24441e-2	67.68887		AcFolico

Totals : 67.68887

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la quinta corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.515	VV	4509.29102	2.23913e-2	100.96886		AcFolico

Totals : 100.96886

=====
 *** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la quinta corrida.

Concentración (ppm)	Áreas
5,45834	223,36166
10,18741	435,57352
40,55892	1798,4613
67,68887	3015,88794
100,96886	4509,29102

SEXTA CORRIDA CROMATOGRAFICA DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR

Tabla de calibración de la sexta corrida cromatográfica

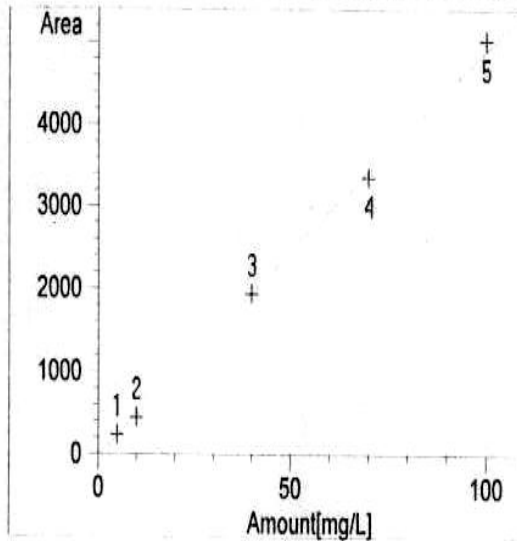
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.697	1	5.00000	226.74982	2.20507e-2	AcFolico
	2	10.00000	439.98141	2.27282e-2	
	3	40.00000	1934.12024	2.06812e-2	
	4	70.00000	3353.17358	2.08757e-2	
	5	100.00000	5026.54492	1.98944e-2	

Peak Sum Table

Curva de calibración de la sexta corrida cromatográfica

Calibration Curves



AcFolico at exp. RT: 3.697

DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

Correlation: 0.99955

Residual Std. Dev.: 72.68200

Formula: $y = mx + b$

m: 49.35366

b: -26.29273

x: Amount

y: Area

Calibration Level Weights:

Level 1 : 1

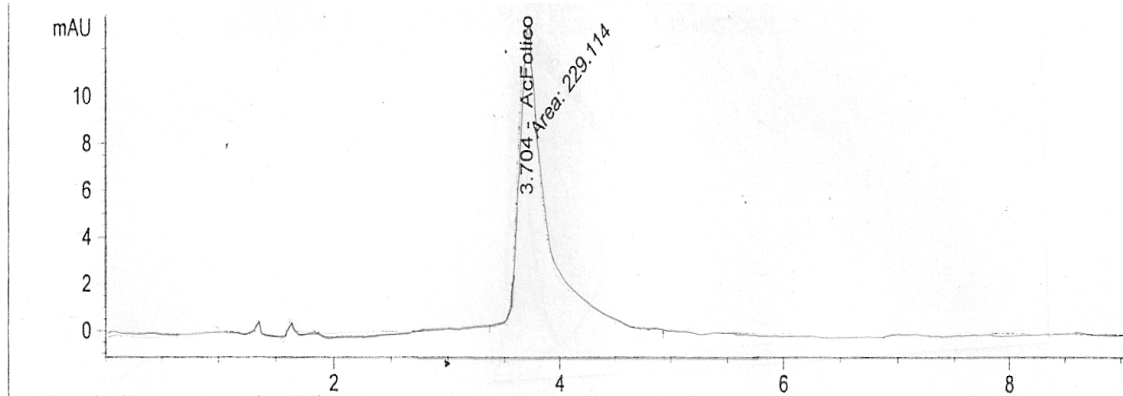
Level 2 : 0.515362

Level 3 : 0.117237

Level 4 : 0.067622

Level 5 : 0.04511

Espectro y lectura obtenida de la sexta corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

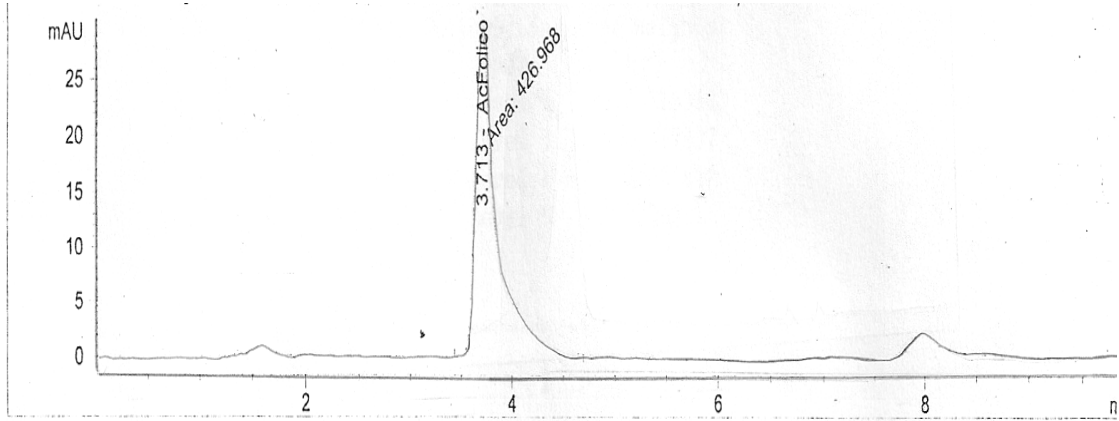
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.704	MM	229.11426	2.02951e-2	4.64989		AcFolico

Totals : 4.64989

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la sexta corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

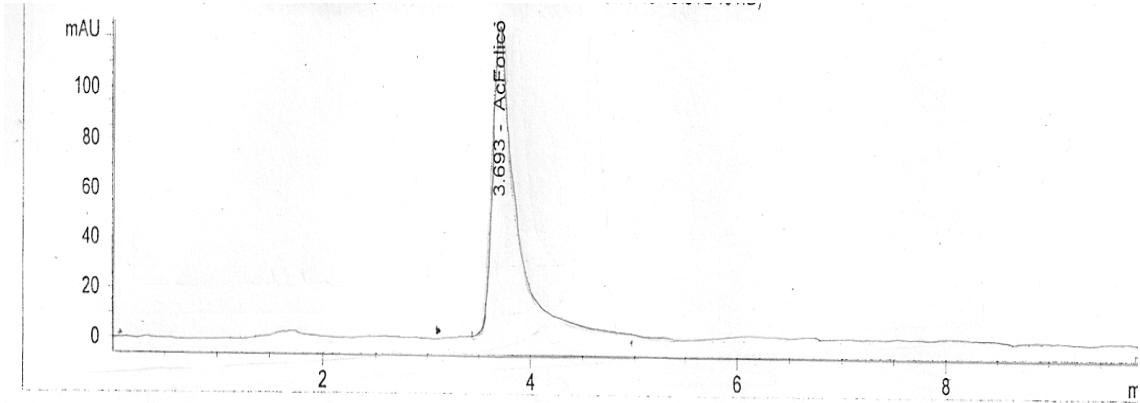
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.713	MM	426.96780	2.02959e-2	8.66571		AcFolico

Totals : 8.66571

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la sexta corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

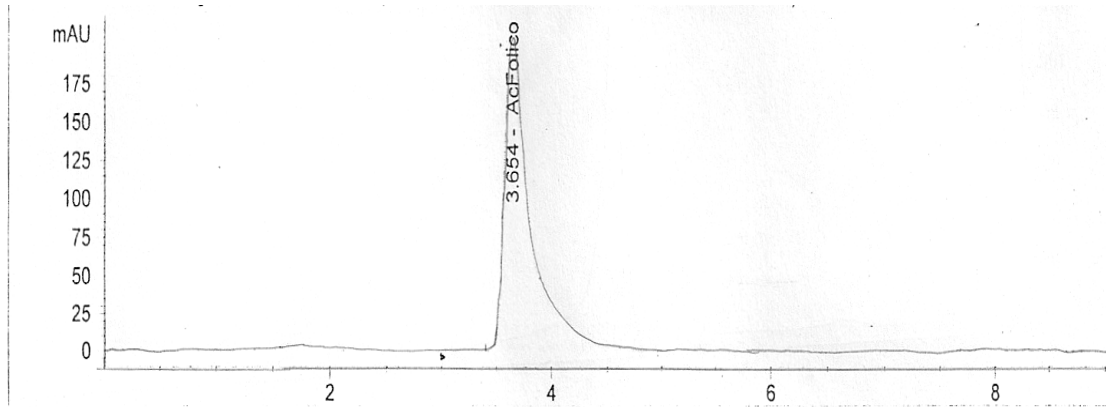
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.693	VV	1934.12024	2.02967e-2	39.25627		AcFolico

Totals : 39.25627

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la sexta corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

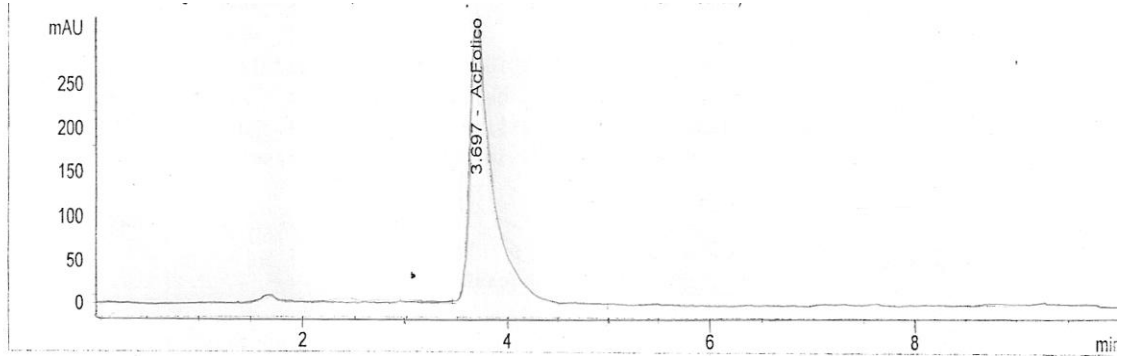
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.654	VV	3353.17358	2.02968e-2	68.05868		AcFolico

Totals : 68.05868

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la sexta corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.697	VV	5026.54492	2.02968e-2	102.02297		AcFolico

Totals : 102.02297

=====
 *** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la sexta corrida.

Concentración (ppm)	Áreas
4,64989	229,11426
8,66571	426,9678
39,25627	1934,12024
68,05868	3353,17358
102,02297	5026,54492

**SEPTIMA CORRIDA CROMATOGRAFICA DE LAS SOLUCIONES
ESTANDAR**

Tabla de calibración de la séptima corrida cromatográfica

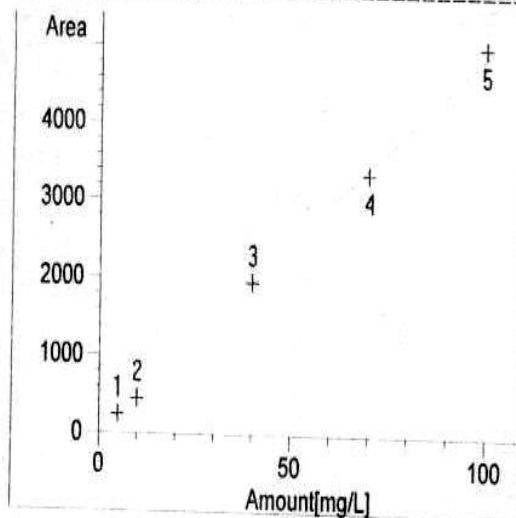
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.620	1	5.00000	233.35890	2.14262e-2	AcFolico
	2	10.00000	436.29965	2.29200e-2	
	3	40.00000	1943.55273	2.05809e-2	
	4	70.00000	3342.71313	2.09411e-2	
	5	100.00000	5024.68896	1.99017e-2	

Peak Sum Table

Curva de calibración de la séptima corrida cromatográfica

Calibration Curves



AcFolico at exp. RT: 3.620

DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

Correlation: 0.99947

Residual Std. Dev.: 76.03923

Formula: $y = mx + b$

m: 49.28249

b: -23.34289

x: Amount

y: Area

Calibration Level Weights:

Level 1 : 1

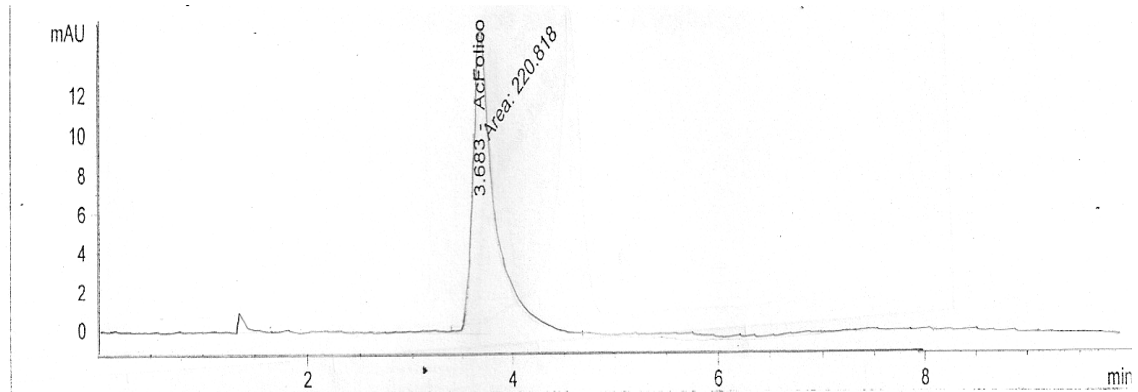
Level 2 : 0.534859

Level 3 : 0.120068

Level 4 : 0.069811

Level 5 : 0.046442

Espectro y lectura obtenida de la séptima corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

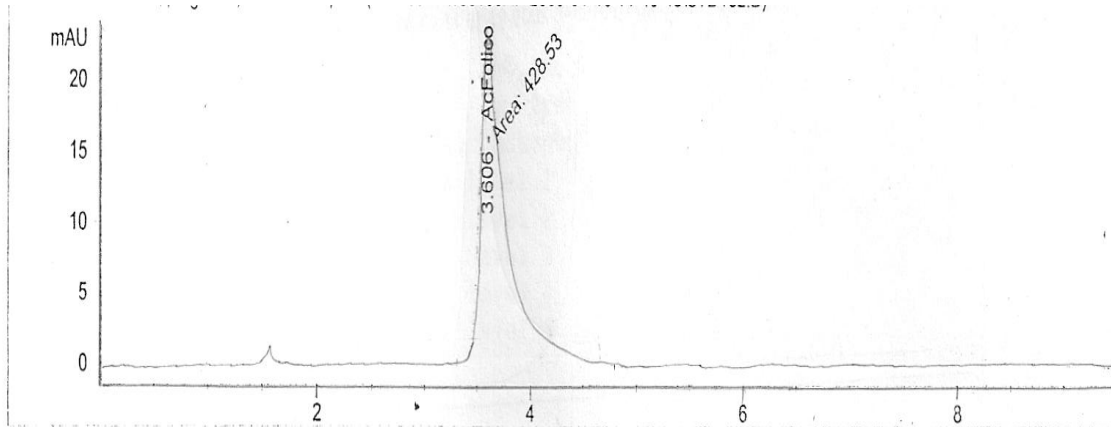
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.683	MM	220.81848	2.26745e-2	5.00695		AcFolico

Totals : 5.00695

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la séptima corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

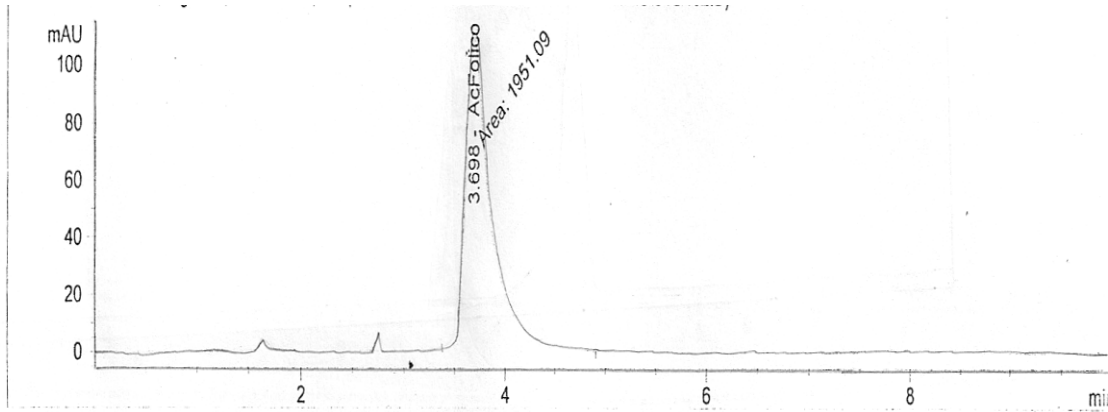
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.606	MM	428.52957	2.15051e-2	9.21557		AcFolico

Totals : 9.21557

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la séptima corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

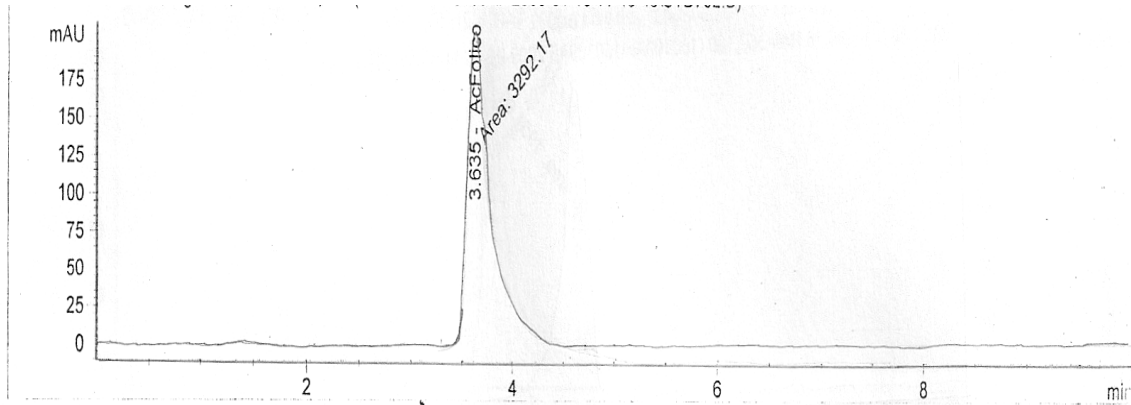
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.698	MM	1951.09363	2.05350e-2	40.06565		AcFolico

Totals : 40.06565

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la séptima corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

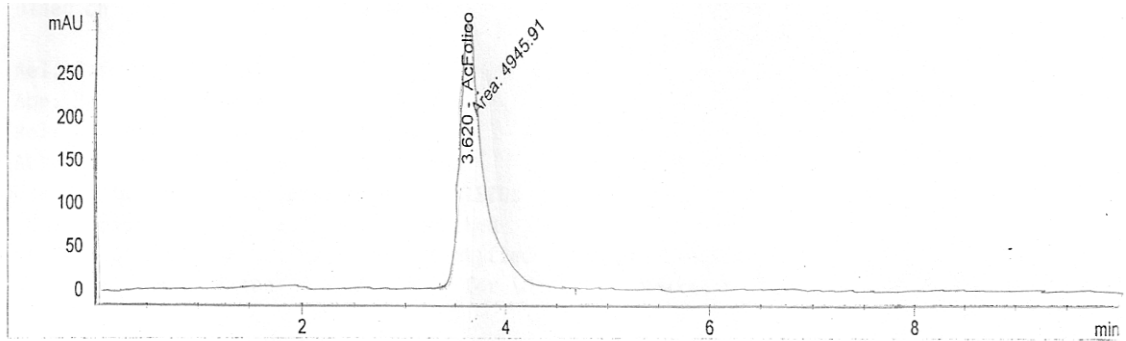
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.635	MM	3292.16870	2.04237e-2	67.23841		AcFolico

Totals : 67.23841

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la séptima corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.620	MM	4945.90576	2.03696e-2	100.74630		AcFolico

Totals : 100.74630

=====
 *** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la séptima corrida.

Concentración (ppm)	Áreas
5,00695	220,81848
9,21557	428,52957
40,06565	1951,09363
67,23841	3292,1687
100,7463	4945,90576

**OCTAVA CORRIDA CROMATOGRÁFICA DE LAS SOLUCIONES
ESTANDAR**

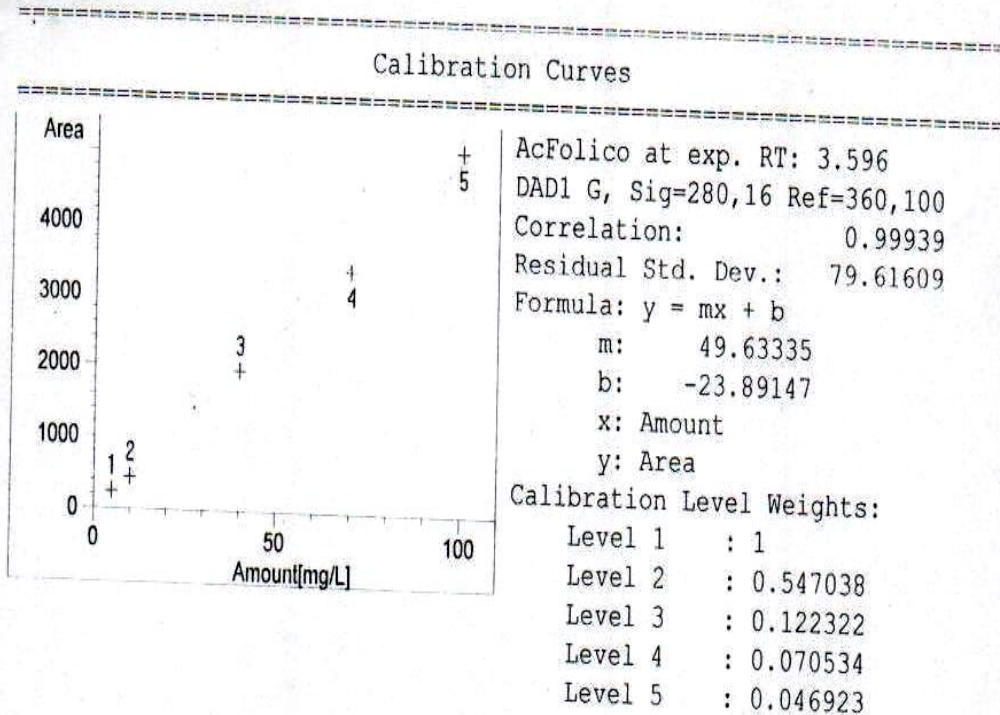
Tabla de calibración de la octava corrida cromatográfica

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

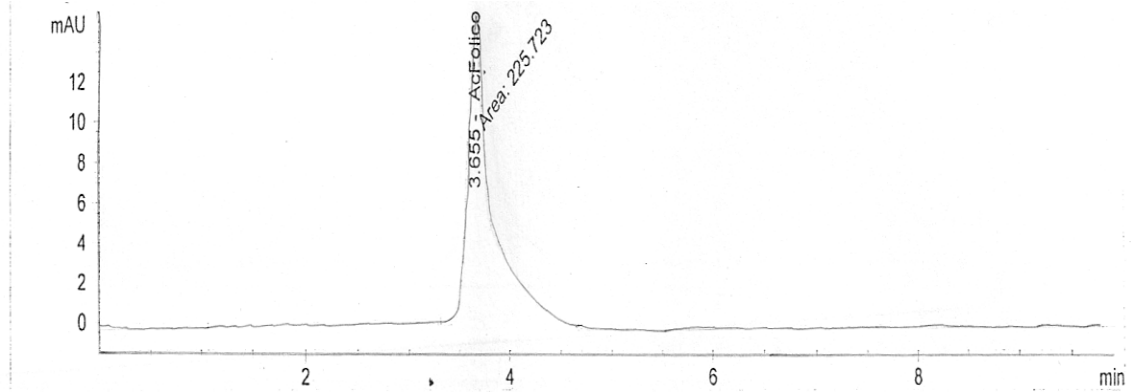
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.596	1	5.00000	237.85152	2.10215e-2	AcFolico
	2	10.00000	434.79907	2.29991e-2	
	3	40.00000	1944.46448	2.05712e-2	
	4	70.00000	3372.16479	2.07582e-2	
	5	100.00000	5068.93115	1.97280e-2	

Peak Sum Table

Curva de calibración de la octava corrida cromatográfica



Espectro y lectura obtenida de la octava corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

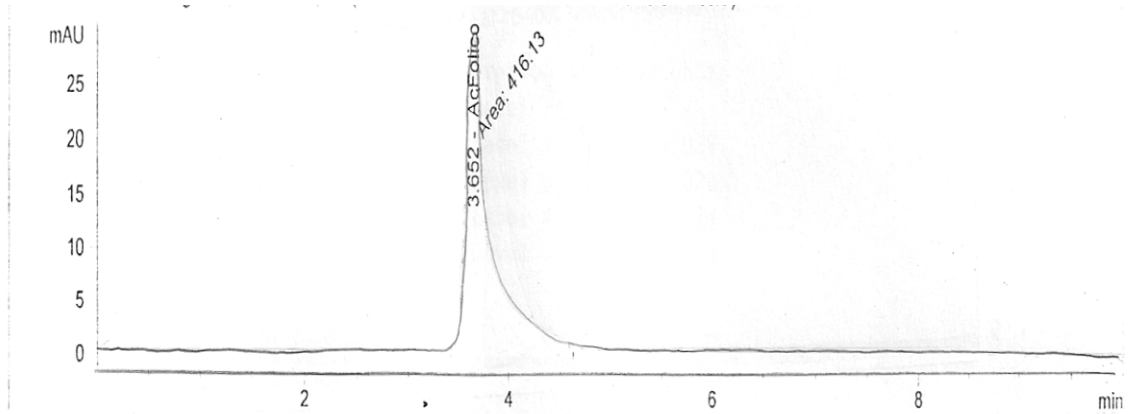
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.655	MM	225.72330	2.23896e-2	5.05385		AcFolico

Totals : 5.05385

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la octava corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 :
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

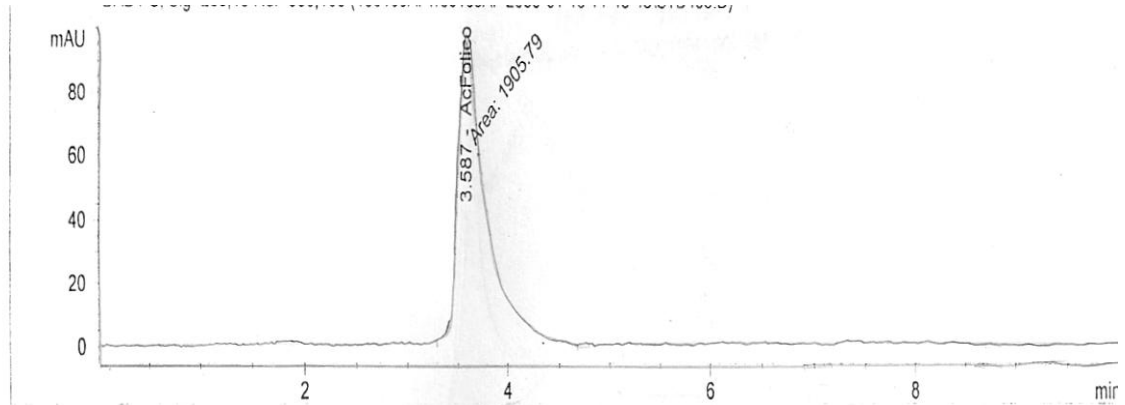
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.652	MM	416.12976	2.14294e-2	8.91742		AcFolico

Totals : 8.91742

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la octava corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

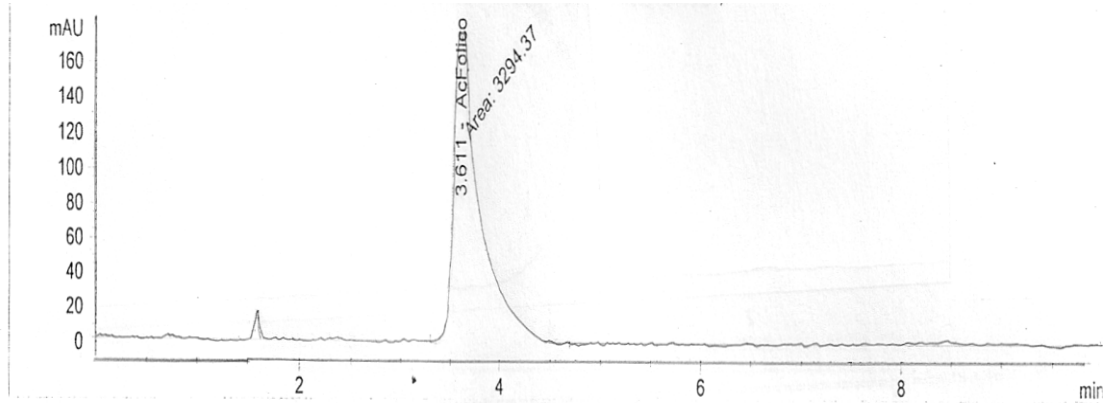
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.587	MM	1905.78870	2.05397e-2	39.14436		AcFolico

Totals : 39.14436

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la octava corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

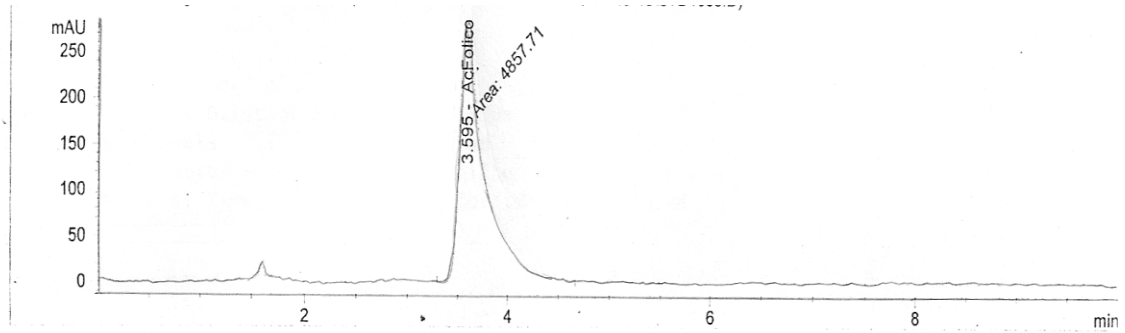
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.611	MM	3294.37036	2.04350e-2	67.32032		AcFolico

Totals : 67.32032

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la octava corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



External Standard Report (Sample Amount is 0!)

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.595	MM	4857.70801	2.02468e-2	98.35321		AcFolico

Totals : 98.35321

*** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la octava corrida.

Concentración (ppm)	Áreas
5.05385	225.7233
8.91742	416.12976
39.14436	1905.7887
67.32032	3294.37036
98.35321	4857.70801

**NOVENA CORRIDA CROMATOGRÁFICA DE LAS SOLUCIONES
ESTANDAR**

Tabla de calibración de la novena corrida cromatográfica

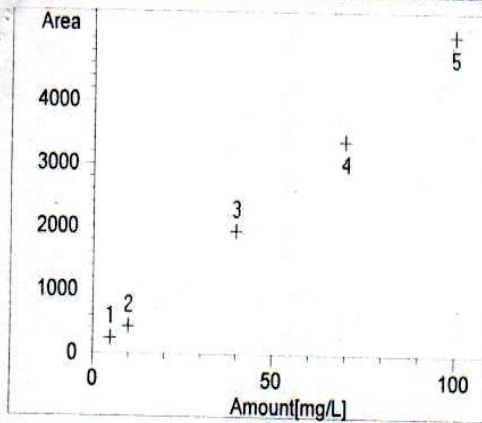
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.639	1	5.00000	236.28473	2.11609e-2	AcFolico
	2	10.00000	420.41299	2.37861e-2	
	3	40.00000	1941.69165	2.06006e-2	
	4	70.00000	3375.57397	2.07372e-2	
	5	100.00000	5060.91895	1.97593e-2	

Peak Sum Table

Curva de calibración de la novena corrida cromatográfica

Calibration Curves



AcFolico at exp. RT: 3.639
 DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100
 Correlation: 0.99925
 Residual Std. Dev.: 78.27401

Formula: $y = mx + b$

m: 49.62674

b: -28.72222

x: Amount

y: Area

Calibration Level Weights:

Level 1 : 1

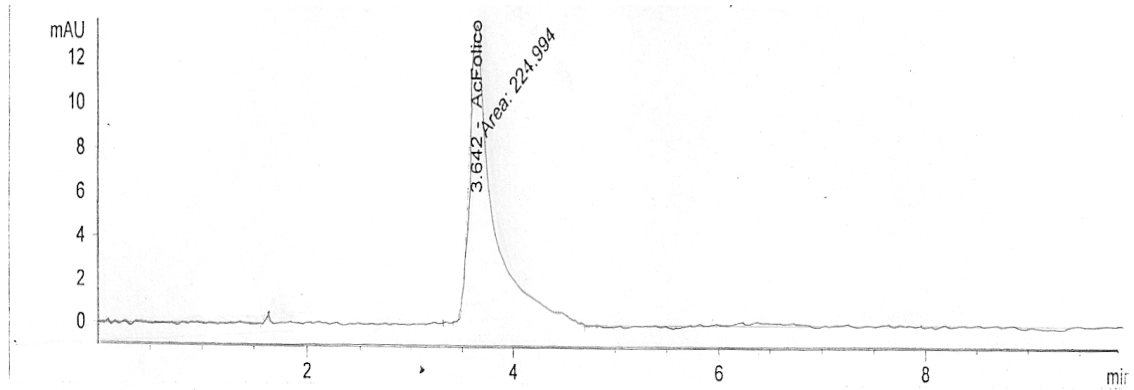
Level 2 : 0.56203

Level 3 : 0.12169

Level 4 : 0.069998

Level 5 : 0.046688

Espectro y lectura obtenida de la novena corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

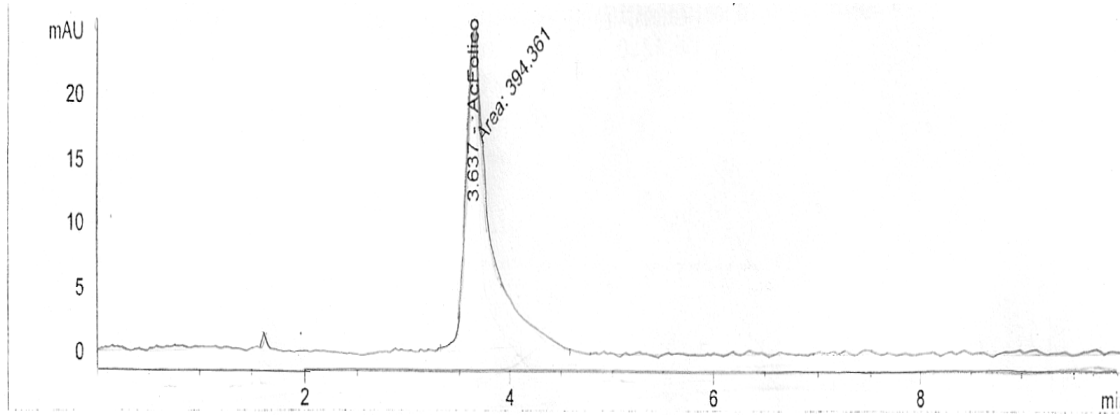
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.642	MM	224.99402	2.22872e-2	5.01448		AcFolico

Totals : 5.01448

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la novena corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

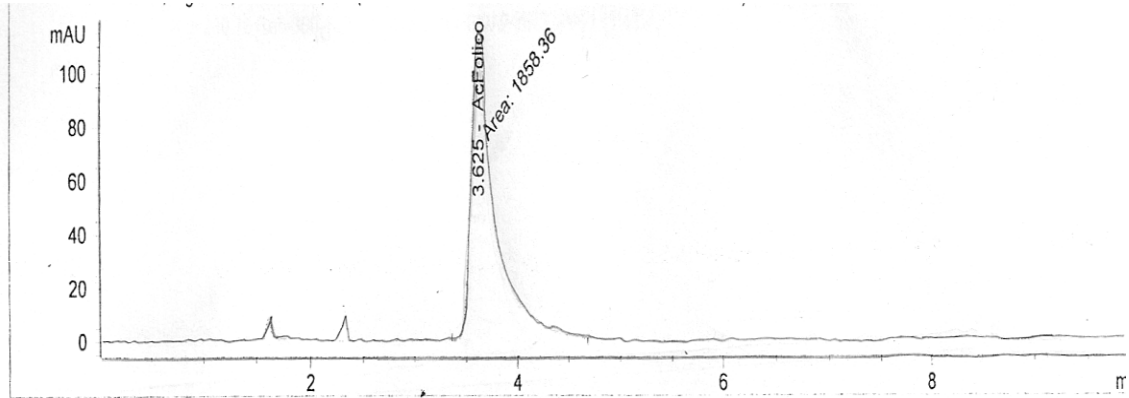
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.637	MM	394.36087	2.13683e-2	8.42684		AcFolico

Totals : 8.42684

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la novena corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 :
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

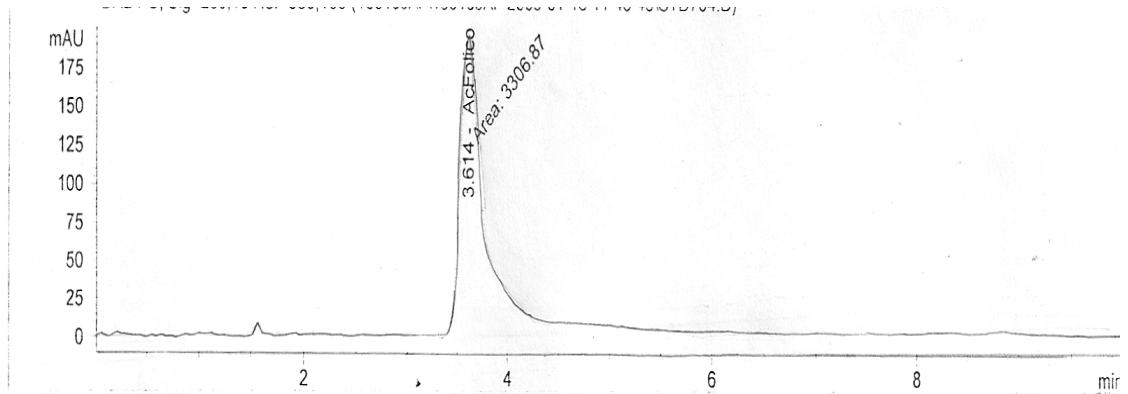
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.625	MM	1858.35706	2.04068e-2	37.92306		AcFolico

Totals : 37.92306

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la novena corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

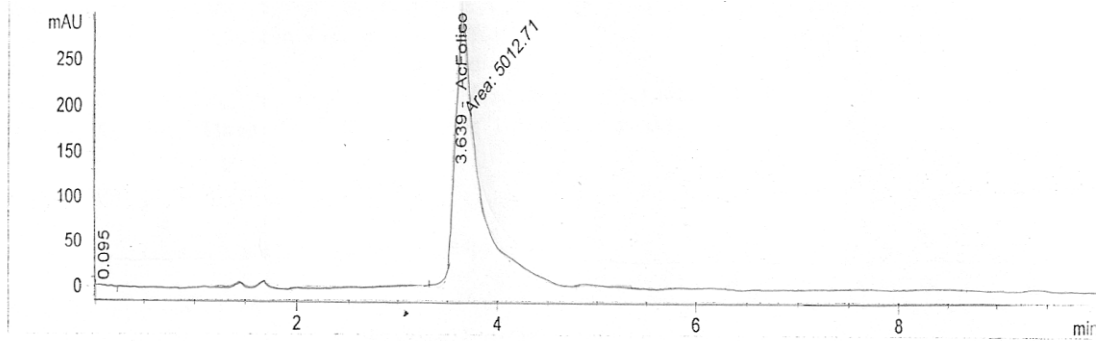
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp Name
3.614	MM	3306.86841	2.03254e-2	67.21357	AcFolico

Totals : 67.21357

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la novena corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.639	MM	5012.71240	2.02659e-2	101.58705		AcFolico

Totals : 101.58705

=====
 *** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la novena corrida.

Concentración (ppm)	Areas
5.01448	224.99402
8.42684	394.36087
37.92306	1858.35706
67.21357	3306.86841
101.58705	5012.7124

DECIMA CORRIDA CROMATOGRAFICA DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR

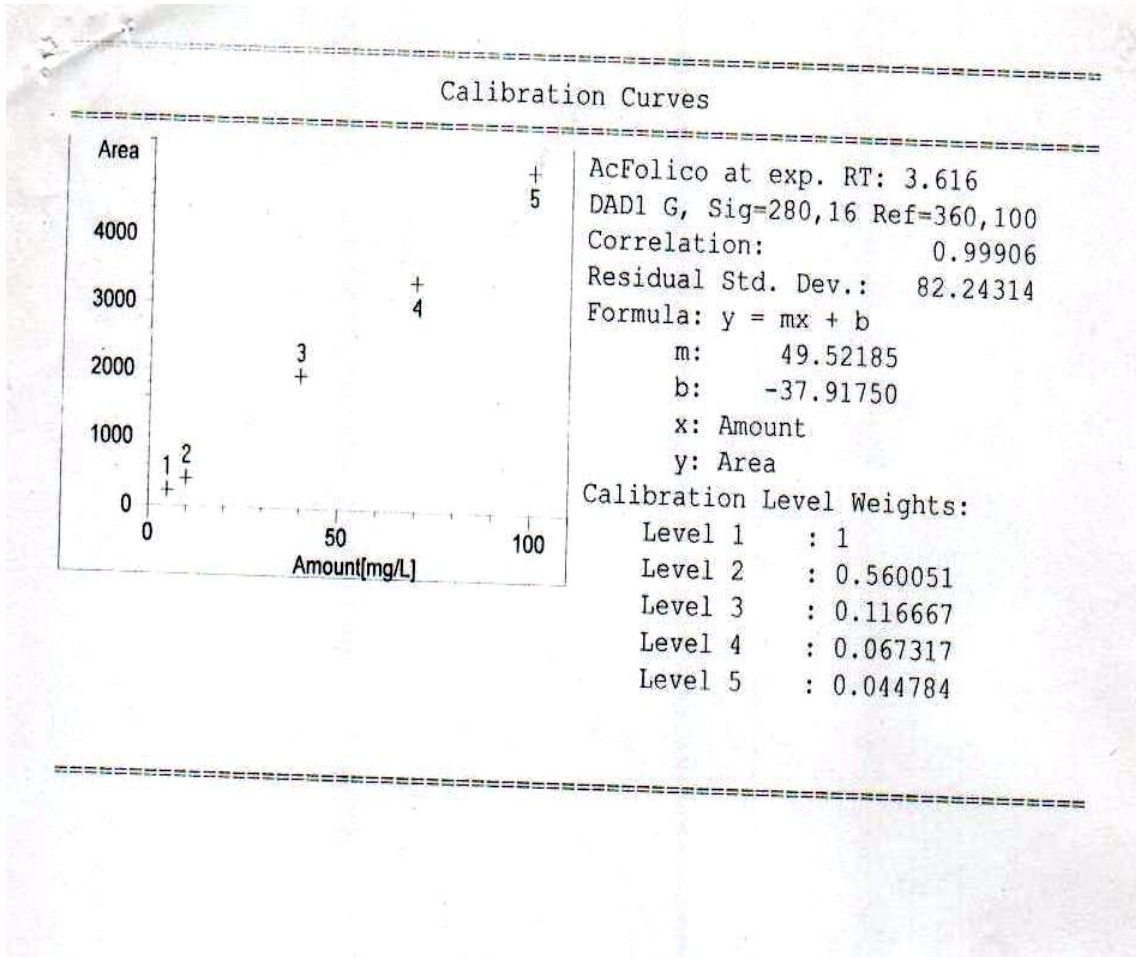
Tabla de calibración de la decima corrida cromatográfica

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

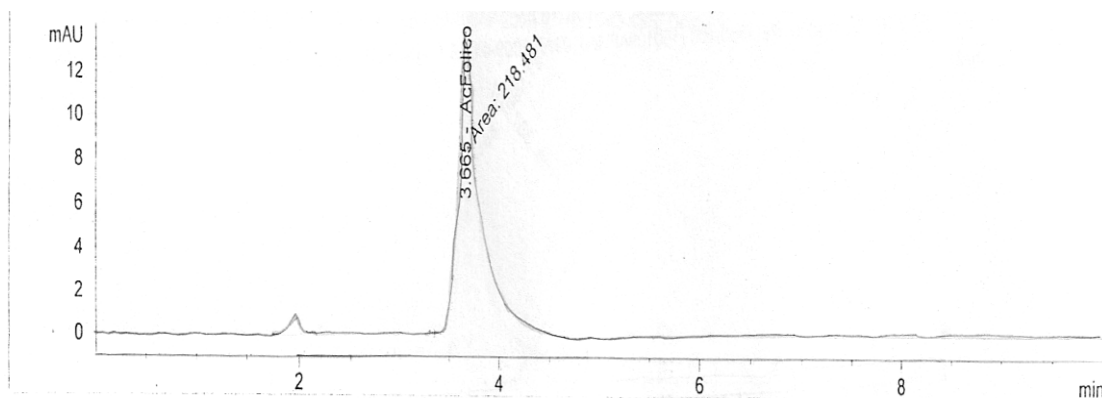
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.616	1	5.00000	225.96017	2.21278e-2	AcFolico
	2	10.00000	403.46375	2.47854e-2	
	3	40.00000	1936.80286	2.06526e-2	
	4	70.00000	3356.64990	2.08541e-2	
	5	100.00000	5045.56299	1.98194e-2	

Peak Sum Table

Curva de calibración de la decima corrida cromatográfica



Espectro y lectura obtenida de la decima corrida realizada a una solución estándar de concentración 5 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

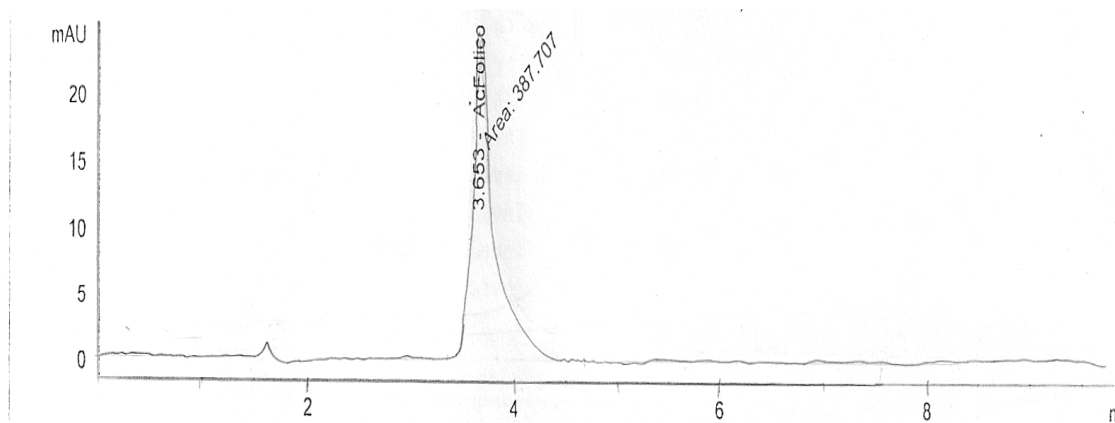
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.665	MM	218.48068	2.27995e-2	4.98124		AcFolico

Totals : 4.98124

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la decima corrida realizada a una solución estándar de concentración 10 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

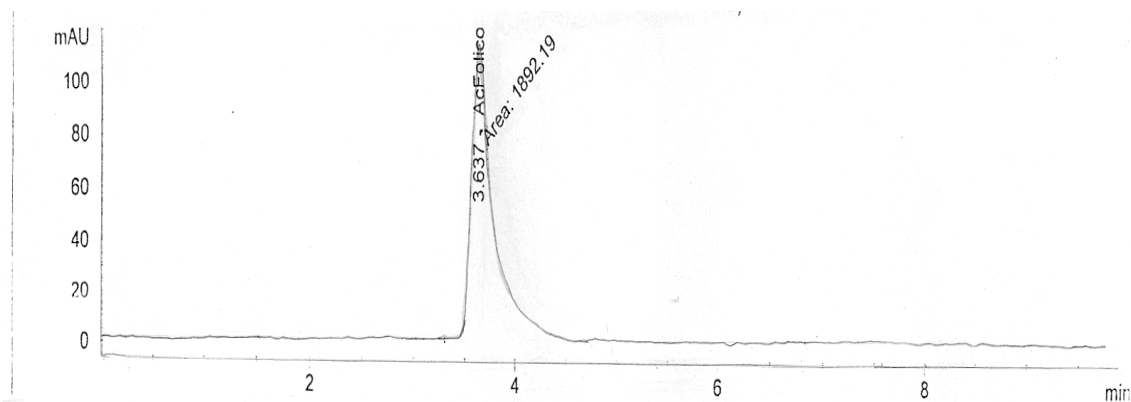
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.653	MM	387.70667	2.16432e-2	8.39122		AcFolico

Totals : 8.39122

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la decima corrida realizada a una solución estándar de concentración 40 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 :
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

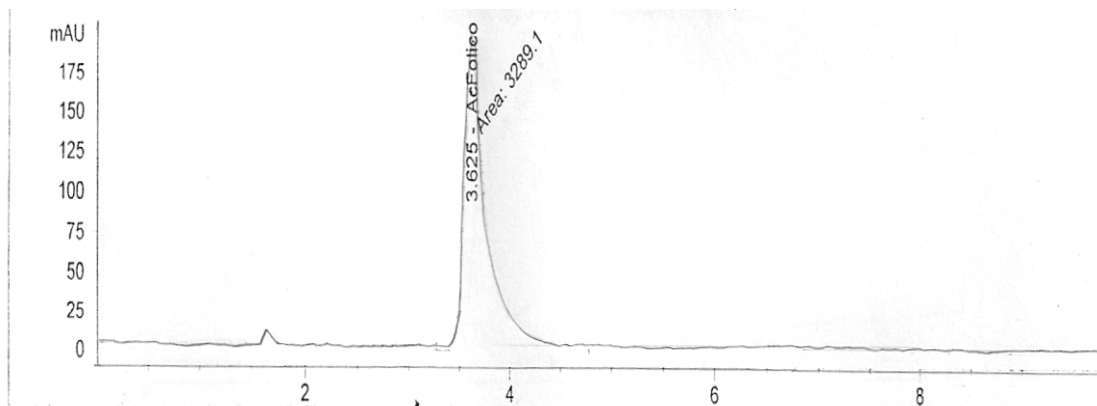
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.637	MM	1892.19153	2.04563e-2	38.70723		AcFolico

Totals : 38.70723

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la decima corrida realizada a una solución estándar de concentración 70 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

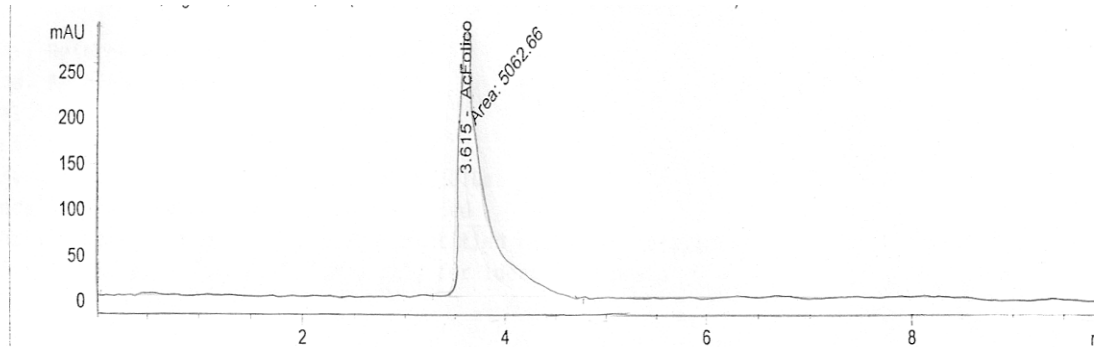
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.625	MM	3289.09692	2.03264e-2	66.85547		AcFolico

Totals : 66.85547

=====
 *** End of Report ***

Espectro y lectura obtenida de la decima corrida realizada a una solución estándar de concentración 100 ppm



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.615	MM	5062.66016	2.02647e-2	102.59352		AcFolico

Totals : 102.59352

=====
 *** End of Report ***

Cuadro resumen de las lecturas obtenidas de la decima corrida.

Concentración (ppm)	Áreas
4.98124	218.48
8.39122	387.71
38.70723	1,892.19
66.85547	3,289.10
102.59352	5,062.66

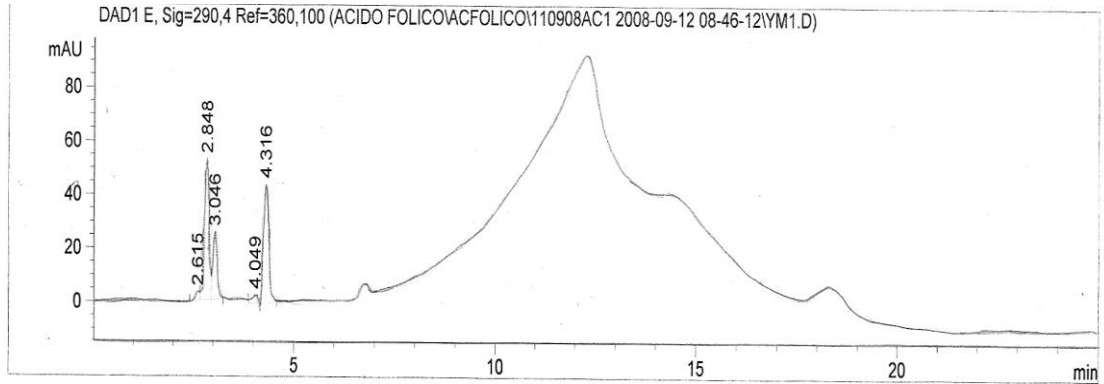
ANEXO N° 11

DATOS CRUDOS DE MUESTRAS DE YOGURT

MUESTRAS DE YOGURT SEMISOLIDO

CODIGO	NOMBRE	RESULTADO
YM1	Yogurt semisólido para curva de calibración en matriz 1	Sin lectura
YM2	Yogurt semisólido para curva de calibración en matriz 2	Sin lectura
YM3	Yogurt semisólido para curva de calibración en matriz 3	Sin lectura
YM4	Yogurt semisólido para curva de calibración en matriz 4	Sin lectura
YM5	Yogurt semisólido para curva de calibración en matriz 5	Sin lectura

**Espectro y lectura obtenida del primer análisis cromatográfico de yogurt
semisólido para curva de calibración en matriz**



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

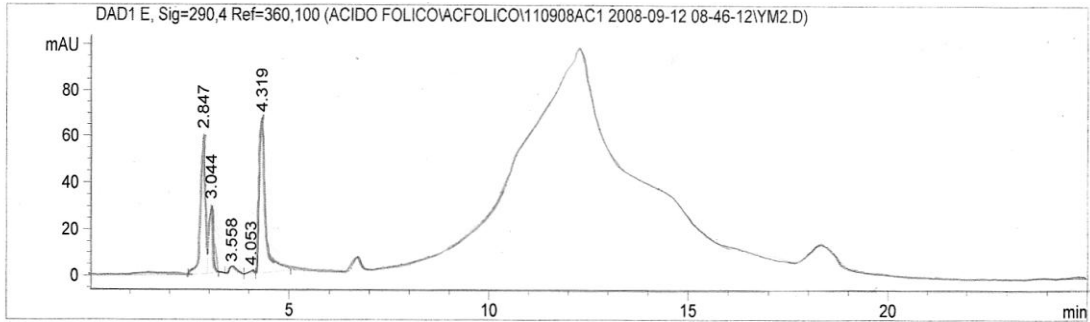
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

Totals : 0.00000

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

**Espectro y lectura obtenida del segundo análisis cromatográfico de yogurt
semisólido para curva de calibración en matriz**



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

Totals : 0.00000

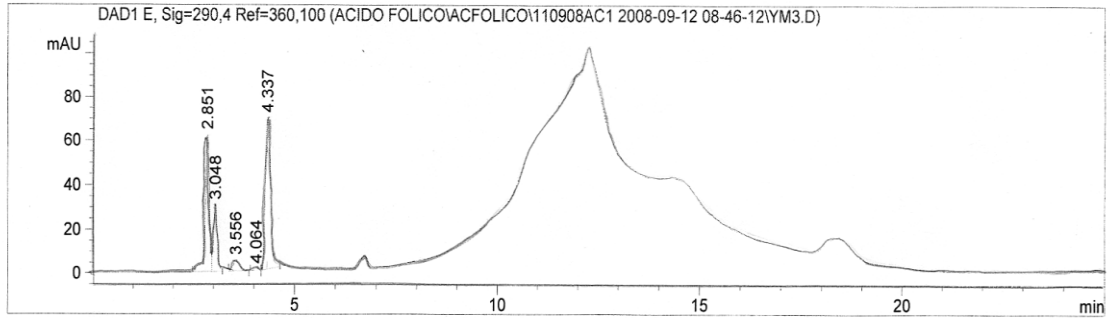
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 10/12/2008 10:28:24 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

**Espectro y lectura obtenida del tercer análisis cromatográfico de yogurt
semisólido para curva de calibración en matriz**



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

Totals : 0.00000

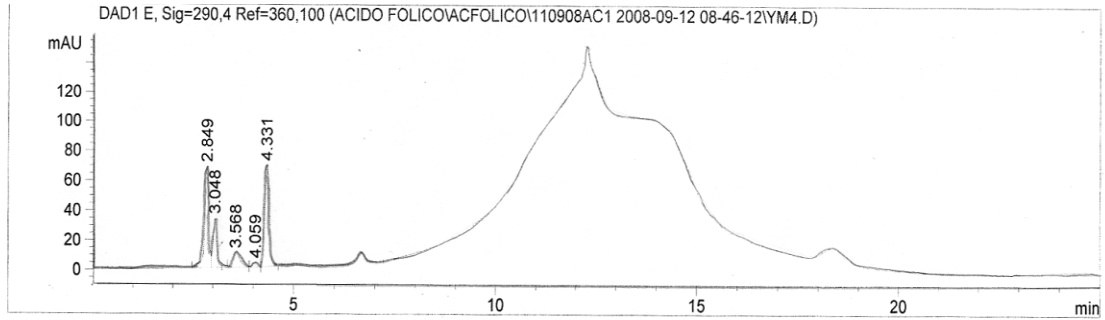
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 10/12/2008 10:28:24 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Espectro y lectura obtenida del cuarto análisis cromatográfico de yogurt semisólido para curva de calibración en matriz



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

Totals : 0.00000

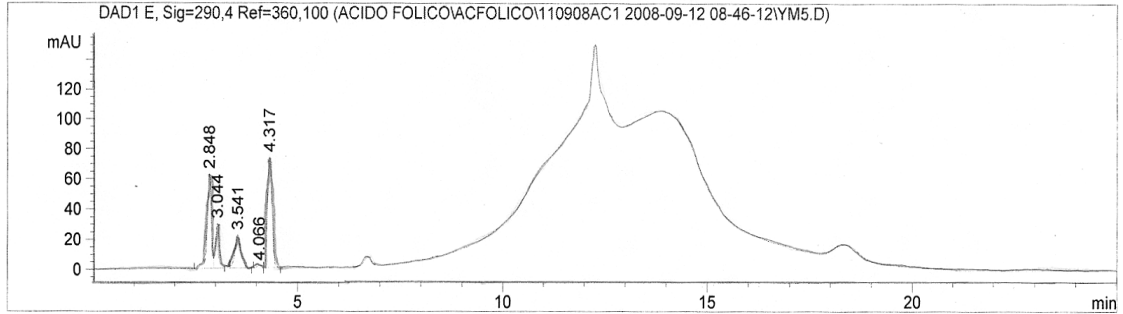
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 10/12/2008 10:28:24 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

**Espectro y lectura obtenida del quinto análisis cromatográfico de yogurt
semisólido para curva de calibración en matriz**



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

Totals : 0.00000

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
Area Percent Report
=====

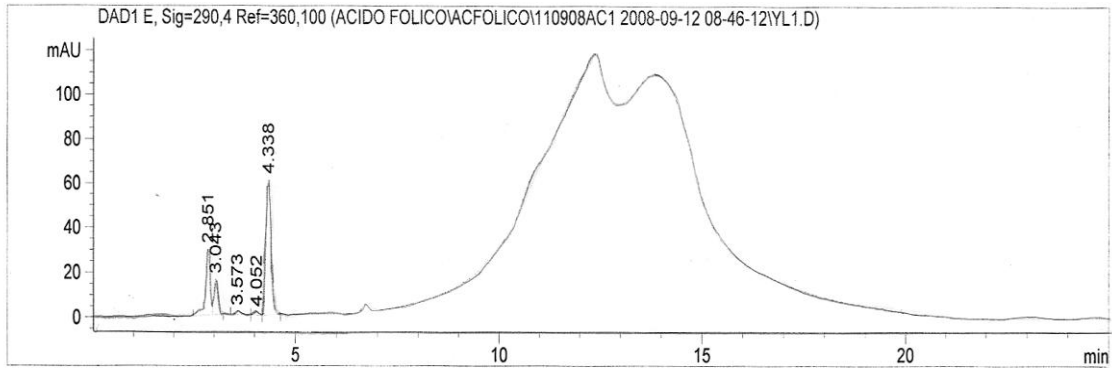
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 10/12/2008 10:28:24 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

MUESTRAS DE YOGURT SEMISOLIDO

CODIGO	NOMBRE	RESULTADO
YL1	Yogurt líquido para curva de calibración en matriz 1	Sin lectura
YL 2	Yogurt líquido para curva de calibración en matriz 2	Sin lectura
YL 3	Yogurt líquido para curva de calibración en matriz 3	Sin lectura
YL 4	Yogurt líquido para curva de calibración en matriz 4	Sin lectura
YL 5	Yogurt líquido para curva de calibración en matriz 5	Sin lectura

Espectro y lectura obtenida del primer análisis cromatográfico de yogurt

Líquido para curva de calibración en matriz



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

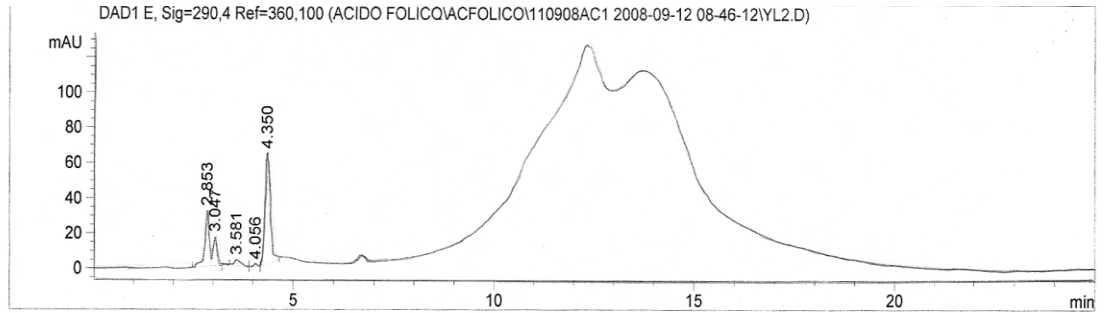
Totals : 0.00000

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found
=====

Espectro y lectura obtenida del segunda análisis cromatográfico de yogurt

Líquido para curva de calibración en matriz



=====
 External Standard Report (Sample Amount is 0!)
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico
Totals :				0.00000		

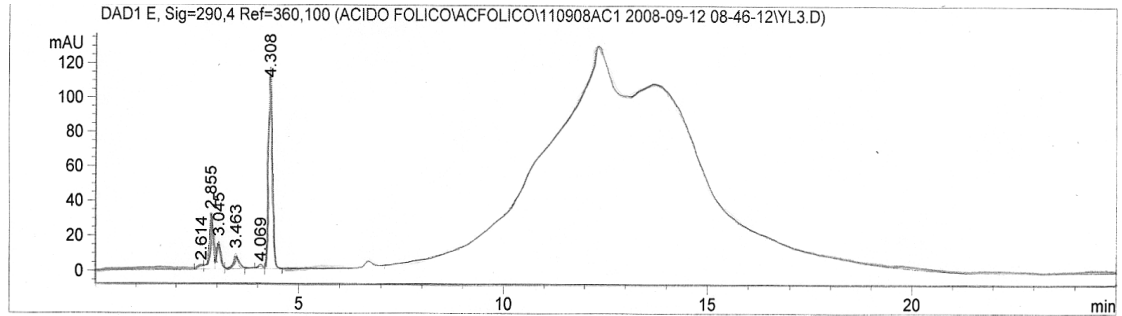
1 Warnings or Errors :
 Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 10/12/2008 10:28:24 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Espectro y lectura obtenida del tercer análisis cromatográfico de yogurt

Líquido para curva de calibración en matriz



External Standard Report (Sample Amount is 0!)

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

Totals : 0.00000

1 Warnings or Errors :

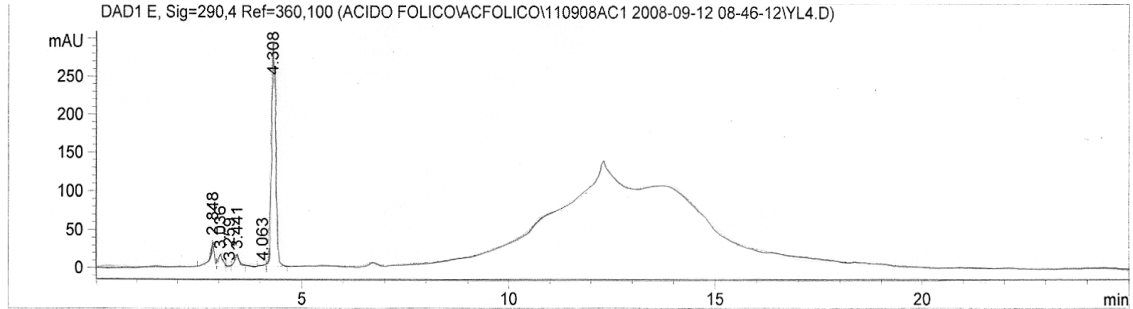
Warning : Calibrated compound(s) not found

Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 10/12/2008 10:28:24 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Espectro y lectura obtenida del cuarto análisis cromatográfico de yogurt

Líquido para curva de calibración en matriz



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal

Multiplier : 1.0000

Dilution : 1.0000

Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

Totals : 0.00000

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal

Calib. Data Modified : 10/12/2008 10:28:24 a.m.

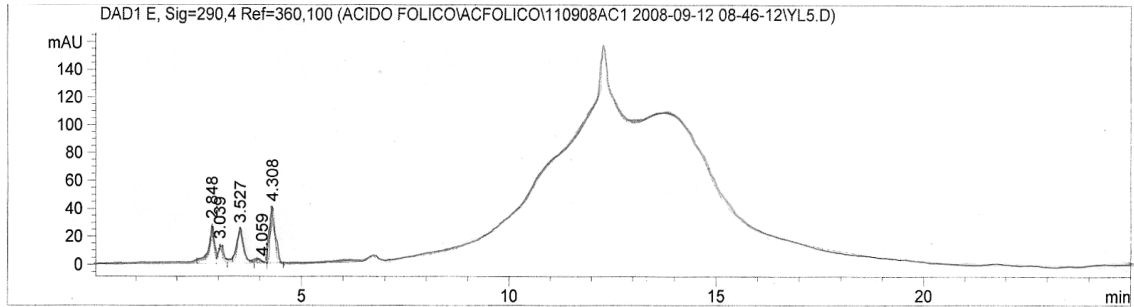
Multiplier : 1.0000

Dilution : 1.0000

Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Espectro y lectura obtenida del quinto análisis cromatográfico de yogurt

Líquido para curva de calibración en matriz



External Standard Report (Sample Amount is 0!)

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 H, Sig=220,30 Ref=400,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
9.826	-	-	-	-	-	Acido Folico

Totals : 0.00000

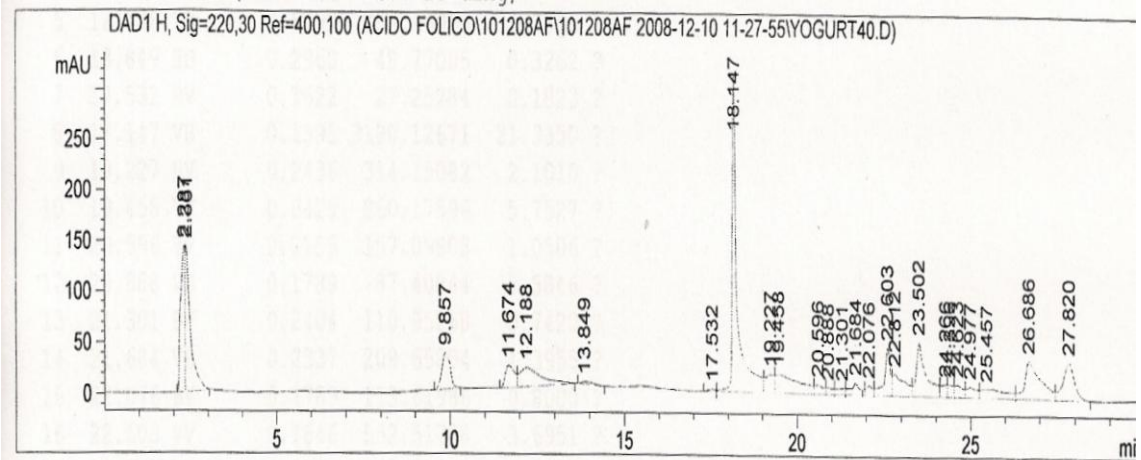
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 10/12/2008 10:28:24 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

**PRIMER MUESTRA DE YOGURT CON ADICION DE ACIDO FOLICO A UNA
CONCENTRACION DE 40ppm (MY1)**



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 G, Sig=283,16 Ref=360,100 not found

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
4.066	-	-	-	-	-	Acido folico

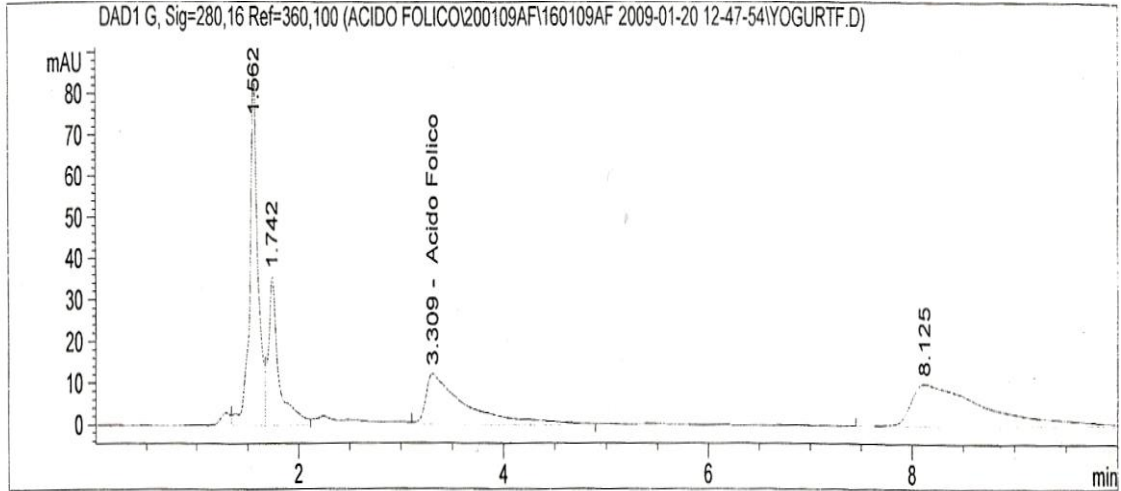
Totals : 0.00000

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
=====

**SEGUNDA MUESTRA DE YOGURT CON ADICION DE ACIDO FOLICO A
UNA CONCENTRACION DE 40ppm (MY2)**



External Standard Report (Sample Amount is 0!)

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

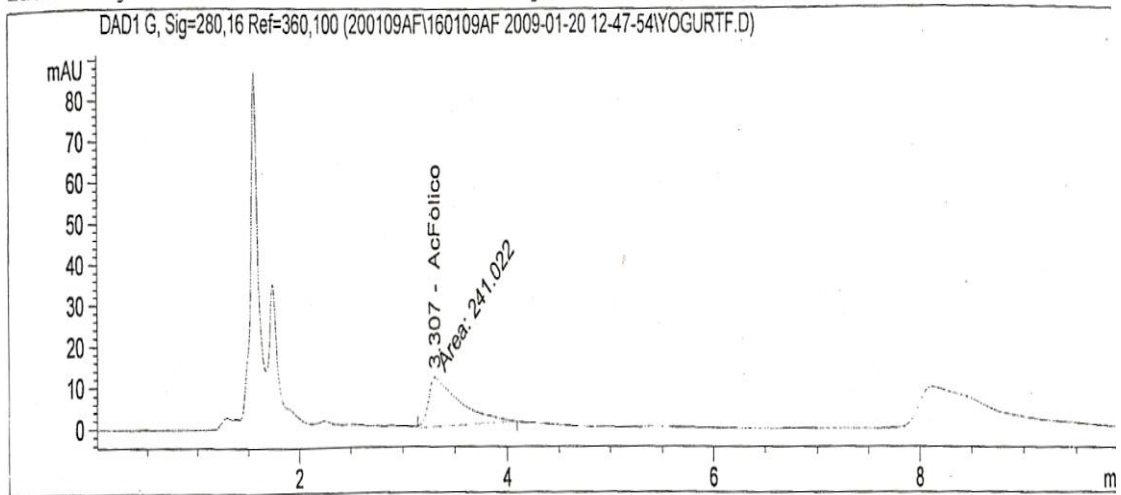
Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.309	VV	337.69534	2.04219e-2	6.89639		Acido Folico

Totals : 6.89639

*** End of Report ***

**TERCER MUESTRA DE YOGURT CON ADICION DE ACIDO FOLICO A UNA
CONCENTRACION DE 40ppm (MY3)**



=====
External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 G, Sig=280,16 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.307	MM	241.02213	2.33699e-2	5.63266		AcFolico

Totals : 5.63266

=====
*** End of Report ***

**MUESTRAS DE YOGURT CON ADICION DE ACIDO FOLICO A UNA
CONCENTRACION DE 40ppm**

CODIGO	NOMBRE	RESULTADO	
		CONCENTRACION	AREA
MY1	Primer muestra de yogurt con adición de ácido fólico a una concentración de 40ppm	0.0	--
MY2	Segunda muestra de yogurt con adición de ácido fólico a una concentración de 40ppm	6.89639	337.69534
MY3	Tercer muestra de yogurt con adición de ácido fólico a una concentración de 40ppm	5.63266	241.02213

ANEXO N ° 12

**CARTA PARA CERTIFICAR LA ENTREGA DE INTERPRETACIÓN DE
RESULTADOS DIRIGIDA AL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y
ASISTENCIA SOCIAL**

San Salvador, marzo de 2010

Licda. Reyna Jovel de Rodríguez

Presente

Por este medio le saludamos, deseándole éxitos y bendiciones en sus labores; y a la vez le manifestamos nuestros agradecimientos por su apoyo y colaboración en el trabajo de graduación para optar al grado de licenciatura de Química y Farmacia, titulado "Evaluación de parámetros de desempeño del método analítico por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para determinar ácido fólico en yogurt".

Juntamente, a pesar de no haberse podido implementar el método por cromatografía líquida de alta presión para determinar ácido fólico en yogurt en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas, Laboratorio Central "Dr. Max Bloch", del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de El Salvador; le hacemos entrega de los resultados generados para el trabajo y su correspondiente interpretación. Esperando sea de utilidad para futuros proyectos sobre el tema.

Atentamente;

Sonia Marysol Rodríguez Serrano

Claudia Maricela Ulloa González

*Recibido por:
Licda. Reyna Jovel
de Rodríguez*




ANEXO N ° 13

**METODOS ALTERNOS PARA DETERMINAR ACIDO FOLICO EN
OTROS ALIMENTOS POR HPLC-UV**

ANEXO N ° 13.1

PRIMER METODO ALTERNO PARA DETERMINAR ACIDO FOLICO

EN OTROS ALIMENTOS POR HPLC-UV ⁽²⁰⁾

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Fecha revisión: 09/01/2008
		Página 1 de 9

1. OBJETIVO

Determinar la concentración de ácido fólico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) harina de trigo enriquecida o no con ácido fólico.

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

El método es aplicable a muestras de harina de trigo enriquecida o no con ácido fólico recepcionadas en la Sección Química de Alimentos y Nutrición.

3. FUNDAMENTO

El análisis se basa en la extracción del ácido fólico de la muestra de harina de trigo con difosfato de potasio trihidratado 0.1M, purificación con SPE y posterior identificación y cuantificación del ácido fólico por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detector de longitud de onda variable UV a 280 nm. La concentración se calcula interpolando en una curva de calibración en base a la relación del área de su pico versus concentración.


4. REFERENCIAS

4.1. Elolo S Osseyi, Randy L Wehling, Julie A Albrecht. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. Journal of Chromatography A, 826 (1998) 235-240.

5. TERMINOLOGÍA

5.1. Ácido Fólico- La forma sintética y completamente oxidada de los folatos, un grupo de vitaminas solubles en agua que forman parte del grupo de vitaminas del complejo B.

5.2. SPE Extracción en fase Sólida de intercambio iónico (Strata SAX)

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
		Fecha revisión: 09/01/2008
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Página 2 de 9

6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

6.1 Materiales

- 6.1.1 Columna cromatográfica Synergi 4u MAX-RP80A (150 x 4.60mm)
(Phenomenex)
- 6.1.2 Jeringa Hamilton para HPLC de 50 uL o muestreador automático
- 6.1.3 Viales para HPLC de 1.5 mL de color ámbar con tapa y septa
- 6.1.4 Tubos de SPE (Strata SAX) (6mL)
- 6.1.5 Filtro Millipore para fase móvil (0.45 um x 47 mm)
- 6.1.6 Pipetas aforadas de 3, 4 y 5 mL (o pipeta automática)
- 6.1.7 Propipeta o auxiliador de pipetas
- 6.1.8 Micropipetas de capacidad 20, 200 y 1000 uL
- 6.1.9 Puntas de micropipeta
- 6.1.10 Matraces aforados de color ámbar de 100 mL
- 6.1.11 Matraces aforados de color ámbar de 10, 25, 100 y 250 mL
- 6.1.12 Vasos de precipitados de 50 mL
- 6.1.13 Frascos vidrio tapa rosca 1 L
- 6.1.14 Probeta de 250 mL
- 6.1.15 Tubos de centrifugación (50 mL)

6.1.16 Tubos de centrifugación (15 mL)

6.1.17 Gradillas para tubos

6.1.18 Embudos de vidrio

6.1.19 Piseta

6.1.20 Navecillas para pesar

6.1.21 Espátulas

6.1.22 Pipetas Pasteur

6.1.23 Etiquetas para tubos de ensayo

6.2 Equipos

6.2.1 Equipo HPLC con detector UV Longitud de onda variable a 280 nm

6.2.2 Campana extractora de solvente

6.2.3 Balanza analítica de 0.1 mg de resolución

6.2.4 Baño de ultrasonido

6.2.5 Centrífuga 3000 rpm Refrigerada a 4°C


6.2.6 Vortex

6.2.7 Bomba de filtración al vacío

6.2.8 Equipo de filtración al vacío

6.2.9 SPE Vacuum Manifold

6.2.10 Agitador (180 rpm/min)

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Fecha revisión: 09/01/2008
		Página 3 de 9

6.3 Reactivos

- 6.3.1 Estándar de ácido fólico (AF) (Sigma)
- 6.3.2 Dipotásio de fosfato trihidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) p.a
- 6.3.3 Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) p.a
- 6.3.4 Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) p.a
- 6.3.5 Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) p.a
- 6.3.6 Acetato de sodio (CH_3COONa) p.a
- 6.3.7 Disodio fosfato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) p.a
- 6.3.8 Hexano grado HPLC ($CH_3(CH_2)_4CH_3$) p.a
- 6.3.9 Metanol grado HPLC (MeOH)
- 6.3.10 Tetrabutilamonio Hidrógeno Sulfato ($C_{16}H_{36}N \cdot HSO_4$) p.a
- 6.3.11 Agua desionizada

6.4 Preparación de soluciones

6.4.1 Preparación de soluciones de trabajo

Solución de extracción:

- Pesar 2.2823 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$. p.a
- Aforar a 100 mL con agua desionizada y asegurar su disolución completa.

6.4.1.1. Solución de equilibrio:

- Pesar 1.7418 g de K_2HPO_4 + 0,05 g de $C_6H_8O_6$. p.a
- Aforar a 100 mL con agua desionizada y asegurar su disolución completa.

6.4.1.2. Solución de lavado:


- Pesar 0,34836 g de K_2HPO_4 . p.a
- Aforar a 100 mL de agua desionizada y asegurar su disolución completa.

6.4.1.1. Solución de elución:

- Pesar 0.820 g de CH_3COONa + 6.25 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 0.05 g de $C_6H_8O_6$.
- Aforar a 100 mL de agua desionizada y asegurar su disolución completa.

6.4.1.4. Preparación de la fase móvil:

- Buffer fosfato: Pesar 0.431 g de KH_2PO_4 + 0.501 g de K_2HPO_4 + 1.5273 g de $C_{16}H_{36}N \cdot HSO_4$
y aforar a un litro con agua desionizada.
- Filtrar la solución al vacío con un filtro Millipore de (0.45 μm x 47 mm) para solvente.

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Fecha revisión: 09/01/2008
		Página 4 de 9

- En un matraz de 1 litro agregar 230 mL de metanol grado HPLC y enrazar con buffer fosfato

Trabajar con metanol bajo campana extractora de gases. Proporción (23:77) (metanol: buffer fosfato de potasio acuoso).

- Guardar la solución en un frasco de vidrio con tapa rosca.

6.4.1.5. Preparación de la solución concentrada de ácido fólico (Concentración: 50 ug/mL):

- Pesar 0.0025 g de estándar de ácido fólico.

- Disolver en K_2HPO_4 0.1M en un matraz aforado de color ámbar de 50 mL y aforar con solución de extracción (7.1).

- Dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

- Poner alícuotas en tubos Eppendorf y guardar solución congelada a $-20^{\circ}C$, fuera del alcance de la luz. Duración máxima de 3 meses

6.4.2 Preparación de las soluciones estándares de la curva de calibración de ácido fólico:

6.4.2.1. Solución estándar de AF Concentración 50 ng/mL:

- Pipetear 25 uL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 25 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

6.4.2.2. Solución estándar de AF Concentración 100 ng/mL:


- Pipetear 50 uL de la solución concentrada 7 de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 25 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

6.4.2.3. Solución estándar de AF Concentración 200 ng/mL:

- Pipetear 100 uL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 25 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

6.4.2.4. Solución estándar de AF Concentración 400 ng/mL:

- Pipetear 200 uL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 25 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
		Fecha revisión: 09/01/2008
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Página 5 de 9

6.4.2.5. Solución estándar de AF Concentración 600 ng/mL:

- Pipetear 300 uL de la solución concentrada de 7 de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 25 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

6.4.2.6. Solución estándar de AF Concentración 800 ng/mL:

- Pipetear 400 uL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 25 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

7. DESARROLLO

El ingreso de la muestra para su análisis debe cumplir con el Instructivo de Aceptación o Rechazo de muestras IT 711-02-065.

Profesional del laboratorio es el encargado de realizar el análisis HPLC, realiza los cálculos e informa resultados.

Técnico del laboratorio efectúa el resto del procedimiento.

7.1 Extracción del AF de la harina de trigo

7.1.1 Pesar 2 g de la muestra de harina de trigo previamente homogeneizada y poner en un tubo de centrifugación de 50 mL, protegida de la luz durante todo el proceso.

7.1.2 Agregar 20 mL de solución de extracción ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1M) utilizando una pipeta aforada de 20 mL, agitando rápidamente para que no se formen grumos.

7.1.3 Someter la muestra a agitación en Rotabit a 180 (rpm/min) y ultrasonido por períodos alternativos de 10 minutos durante un período total de 1 hora.

7.1.4 Centrifugar a 3000 rpm durante 25 minutos a temperatura de 4°C.

7.1.5 Trasvasijar el sobrenadante cuidadosamente a tubos de 50 mL debidamente rotulados.


7.1.6 Agregar 20 mL de solución de extracción ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1M) al precipitado anterior y agitar con un vortex durante 30 segundos para su disolución.

7.1.7 Someter la muestra a las etapas 7.1.2 a 7.1.4 para su segunda extracción.

7.1.8 Reunir ambos extractos de la primera y segunda extracción.

7.1.9 Agitar y homogeneizar con un vortex durante 20 segundos.

NOTA: La muestra está en condiciones para su posterior purificación con SPE.

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Fecha revisión: 09/01/2008
		Página 6 de 9

7.2 Purificación de la muestra con SPE

Ambientación, equilibrio de la columna de extracción SPE Strata SAX

7.2.1 Colocar las columnas de SPE (Strata SAX) sobre el SPE Vacuum Manifold y los tubos

de 15 mL para la recolección de residuos.

7.2.2 Agregar a cada columna 3 mL de hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) y filtrar a una velocidad de \pm

0.6 mL/min.

7.2.3 Seguido de la filtración anterior, agregar a cada columna 3 mL de metanol (MeOH) y filtrar a una velocidad de \pm 0.6 mL/min.

7.2.4 Agregar a cada columna 5 mL de la solución de equilibrio (K_2HPO_4 0.1 M + AA 0.05%) y filtrar a una velocidad de \pm 0.6 mL/min.

7.3 Purificación de la muestra

7.3.1 Agregar a cada columna 4 mL del extracto de la muestra 8.1.10, y filtrar a una velocidad de \pm ,6 mL /min.

7.3.2 Lavar la columna con 4 mL de la solución de lavado (K_2HPO_4) y filtrar a

igual velocidad del punto anterior.

7.3.3 Eluir el extracto de la muestra, utilizando un nuevo tubo de recolección de 15 mL debidamente rotulado, con 4 mL de la s

7.3.4 Agitar y homogeneizar la muestra eluida y trasvasiar las muestras a viales HPLC de color ámbar.

7.3.5 La muestra está lista para su inyección y cromatografía.

7.4 Condiciones cromatográficas


7.4.1 Columna: Synergi 4u MAX-RP80A (150 x 4.60mm) (Phenomenex)

7.4.2 Temperatura de la columna: 25°C

7.4.3 Detector: UV, a 280 nm

7.4.4 Fase Móvil: Referir a punto 6.4.1.4.

7.4.5 Flujo: 1.0 mL/ minuto

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Fecha revisión: 09/01/2008
		Página 7 de 9

7.5 Determinación cromatográfica de ácido fólico

7.5.1 Curva de calibración de las soluciones estándares

7.5.1.1 Inyectar en triplicado 20 uL de cada uno las soluciones estándares entre 50-800 ng/mL.

7.5.1.2 Tiempo de corrida: 15 minutos.

7.5.1.3 Realizar la curva de calibración utilizando el método de cálculo con estándar externo integrado en el equipo.

7.5.2 Cuantificación de AF en muestras

7.5.2.1 Inyectar en duplicado 20 uL de la solución eluida del extracto de la muestra de harina de trigo.

7.5.2.2 Tiempo de corrida: 15 minutos.

7.6 Cálculo y expresión de resultados de ácido fólico

Ingresar al HPLC en método ácido fólico que contiene la curva de calibración obtenida de concentración (C) en ng/mL e interpolar la muestra para cuantificar el resultado del área vs concentración. Valor C (ng/mL).


$$\text{mg /Kg de ácido fólico} = \frac{C \text{ (ng/mL)} \times v}{a * 1000}$$

Donde: c = concentración en ng/mL obtenido por la interpolación en la curva de calibración de la muestra.

v = volumen de la muestra final (40 mL para la presente técnica)

a = masa de la muestra en gramos

Informar el resultado mg/Kg de ácido fólico con un decimal.

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Fecha revisión: 09/01/2008
		Página 8 de 9

Limite de detección: 0,14 ng/mL

Limite de cuantificación: 19 ng/mL

Control de Calidad

Se efectuarán controles sistemáticos y periódicos para comprobar la validez de los ensayos realizados con el método analítico recogido en este procedimiento.


a) Nivel I: Ensayos de intercomparación, utilización de materiales de referencia certificados y patrones de referencia certificados, según disponibilidad.

b) Nivel III. Durante el desarrollo de la serie de trabajo se incluye:

- Control de blanco al inicio de la corrida cromatográfica
- Control de estándar de concentración conocida
- Inyección del estándar como control por cada diez muestras inyectadas

8. REGISTROS

Identificación del registro	Almacenamiento	Protección	Recuperación	Tiempo retención y disposición
Libro de Registro de análisis Vitaminas RG- 711.00-037	En estante Laboratorio Nutrientes; Aditivos y Contaminantes	Acceso Técnicos y profesionales Laboratorio Nutrientes; Aditivos y Contaminantes	Papel	5 años
Archivador de Cromatogramas ácido fólico	En estante Laboratorio Nutrientes; Aditivos y Contaminantes	Acceso Técnicos y profesionales Laboratorio Nutrientes; Aditivos y Contaminantes	Papel	5 años
Base datos computacional de Lecturas ácido fólico	En computador del Laboratorio de Nutrientes, Aditivos y Contaminantes	Acceso a Técnico y Profesional Laboratorio	Papel	5 años

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN HARINA DE TRIGO Método UV-HPLC	Fecha emisión: 09/01/2008
		Revisión: 0
		Fecha revisión: 09/01/2008
Sección Química de Alimentos y Nutrición	PRT-711.02-063	Página 9 de 9

Identificación del registro	Almacenamiento	Protección	Recuperación	Tiempo retención y
Programa harinas		Nutrientes, Aditivos y Contaminantes		
Registro control de T° Congelador RG-711.00-041	En Estante del Laboratorio de Nutrientes, Aditivos y Contaminantes	Acceso a Técnico y Profesional Laboratorio de Nutrientes, Aditivos y Contaminantes	Papel	5 años
Registro preparación de soluciones de estándares puros RGG-700.00-034	En estante del Laboratorio de Nutrientes, Aditivos y Contaminantes	Acceso a Técnico y Profesional Laboratorio de Nutrientes, Aditivos y Contaminantes	Papel	5 años
Registro preparación de mezclas de soluciones estándares RGG-700.00-035	En estante del Laboratorio de Nutrientes, Aditivos y Contaminantes y Jefatura de sección	Acceso a Técnico y Profesional Laboratorio de Nutrientes, Aditivos y Contaminantes	Papel	5 años

9. TABLA DE MODIFICACIONES

Revisión N°	Pág. Modificada	Motivo del cambio	Fecha Aprobación


10. ANEXOS

No Aplica

ANEXO N ° 13.2

SEGUNDO METODO ALTERNO PARA DETERMINAR ACIDO FOLICO

EN OTROS ALIMENTOS POR HPLC-UV ⁽²¹⁾

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN PREMEZCLAS DE VITAMINAS PARA HARINA DE TRIGO Método – UV-HPLC	Fecha emisión:
		Revisión: 0
		Fecha revisión:
Sección Quím	PRT-711.02-042	Página 1 de 18

1. OBJETIVO

Determinar la concentración de ácido fólico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC).

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

El método es aplicable a muestras de premezclas de Vitaminas para harina de trigo enriquecida o no con ácido fólico.

3. FUNDAMENTO

El análisis se basa en la extracción del ácido fólico de la muestra de premezcla con difosfato de potasio trihidratado 0.1M y posterior identificación y cuantificación del ácido fólico por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detector de longitud de onda variable UV a 280 nm. La concentración se calcula interpolando en una curva de calibración en base a la relación del área de su pic versus concentración.

4. REFERENCIAS

4.1. Elolo S Osseyi, Randy L Wehling, Julie A Albrecht. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. Journal of Chromatography A, 826 (1998) 235-240.

5. TERMINOLOGÍA

5.1. Ácido Fólico- La forma sintética y completamente oxidada de los folatos, un grupo de vitaminas solubles en agua que forman parte del grupo de vitaminas del complejo B.

6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS


6.1 Materiales

- 6.1.1 Columna cromatográfica Synergi 4u MAX-RP80A (150 x 4.6mm)
(Phenomenex)
- 6.1.2 Embudos de vidrio
- 6.1.3 Espátulas
- 6.1.4 Etiquetas para tubos de ensayo
- 6.1.5 Frascos vidrio tapa rosca 1 L
- 6.1.6 Filtro Millipore para fase móvil (0.45 μ m x 47 mm)
- 6.1.7 Jeringa Hamilton para HPLC de 50 μ L o muestreador automático
- 6.1.8 Micropipetas de capacidad 20, 200 y 1000 μ L
- 6.1.9 Propipeta o auxiliador de pipetas

- 6.1.10 Puntas de micropipeta
- 6.1.11 Matraces aforados de color ámbar de 100 mL
- 6.1.12 Matraces aforados de color ámbar de 10, 25, 100 y 250 mL
- 6.1.13 Navecillas para pesar
- 6.1.14 Piseta
- 6.1.15 Pipetas Pasteur
- 6.1.16 Probeta de 250 mL
- 6.1.17 Vasos de precipitados de 50 mL
- 6.1.18 Viales para HPLC de 1.5 mL de color ámbar con tapa y septa

6.2 Equipos

- 6.2.1 Agitador (180 rpm/min)
- 6.2.2 Balanza analítica de 0.1 mg de resolución
- 6.2.3 Baño de ultrasonido
- 6.2.4 Bomba de filtración al vacío
- 6.2.5 Campana extractora de solvente
- 6.2.6 Centrifuga 5000 rpm/min
- 6.2.7 Equipo HPLC con detector UV Longitud de onda variable a 280 nm
- 6.2.8 Equipo de filtración al vacío
- 6.2.9 Vortex

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN PREMEZCLAS DE VITAMINAS PARA HARINA DE TRIGO Método – UV-HPLC	Fecha emisión:
		Revisión: 0
		Fecha revisión:
Sección Quím	PRT-711.02-042	Página 5 de 18

6.3 Reactivos

- 6.3.1 Agua desionizada
- 6.3.2 Dipotasio de fosfato trihidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) p.a
- 6.3.3 Estándar de ácido fólico (AF) (Sigma)
- 6.3.4 Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) p.a
- 6.3.5 Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) p.a
- 6.3.6 Metanol grado HPLC (MeOH)
- 6.3.7 Tetrabutilamonio Hidrógeno Sulfato ($C_{16}H_{36}N \cdot HSO_4$) p.a

6.4 Preparación de soluciones

6.4.1 Preparación de soluciones de trabajo

6.4.1.1 Solución de extracción:

- Pesar 2.2823 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$.
- Aforar a 100 mL con agua desionizada y asegurar su disolución completa.


6.4.1.2 Preparación de la fase móvil:

- Buffer fosfato: Pesar 0.431 g de KH_2PO_4 + 0.501 g de K_2HPO_4 + 1.5273 g de $C_{16}H_{36}N \cdot HSO_4$ y aforar a un litro con agua desionizada.

- Filtrar la solución al vacío con un filtro Millipore de (0.45 μ m x 47 mm) para solvente.
- En un matraz de 1 litro agregar 230 mL de metanol grado HPLC y enrazar con buffer fosfato Trabajar con metanol bajo campana extractora de gases. Proporción (23:77) (metanol: buffer fosfato de potasio acuoso).
- Guardar la solución en un frasco de vidrio con tapa rosca.

**6.4.1.3 Preparación de la solución concentrada de ácido fólico
(Concentración: 50 μ g/mL):**

- Pesar 0.0025 g de estándar de ácido fólico.
- Disolver en K_2HPO_4 0.1M en un matraz aforado de color ámbar de 50 mL y aforar con solución de extracción.
- Dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.
- Poner alícuotas en tubos Eppendorf y guardar solución congelada a $-20^{\circ}C$, fuera del alcance de la luz. Duración máxima de 3 meses

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN PREMEZCLAS DE VITAMINAS PARA HARINA DE TRIGO Método – UV-HPLC	Fecha emisión:
		Revisión: 0
		Fecha revisión:
Sección Quím	PRT-711.02-042	Página 7 de 13

6.4.2 Preparación de las soluciones estándares de la curva de calibración de ácido fólico:

6.4.2.1 Solución estándar de AF Concentración 3 ug/mL:

- Pipetear 600 uL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 10 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

6.4.2.2 Solución estándar de AF Concentración 6 ug/mL:

- Pipetear 1.2 mL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 10 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

6.4.2.3 Solución estándar de AF Concentración 12 ug/mL:

- Pipetear 2.4 mL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 10 mL.


- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

6.4.2.4. Solución estándar de AF Concentración 18 ug/mL:

- Pipetear 3.6 mL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 10 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

6.4.2.5. Solución estándar de AF Concentración 24 ug/mL:

- Pipetear 4.8 mL de la solución concentrada de AF 50 ug/ mL con una micropipeta a un matraz aforado de color ámbar de 10 mL.
- Aforar con agua desionizada agitar y luego dejar en el baño de ultrasonido durante 2 minutos.

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN PREMEZCLAS DE VITAMINAS PARA HARINA DE TRIGO Método – UV-HPLC	Fecha emisión:
		Revisión: 0
		Fecha revisión:
Sección Quím	PRT-711.02-042	Página 5 de 7

7. DESARROLLO

7.1 Extracción del AF de la premezcla

7.1.1 Pesar \pm 0.1 g de la muestra premezcla previamente homogeneizada y poner en un matraz ámbar de 100 mL protegido de la luz durante todo el proceso.

7.1.2 Aforar con la solución de extracción ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1M), agitando en todo momento para que no se formen grumos.

7.1.3 Someter la muestra a agitación en Rotabit a 180 (rpm/min) y ultrasonido por períodos alternativos de 10 minutos durante un período total de 1 hora.

7.1.4 Agitar y homogeneizar con un vortex durante 20 segundos.

7.1.5 Trasvasijar las muestras a viales HPLC de color ámbar con las pipetas pasteur.

7.1.6 La muestra está lista para su inyección y cromatografía.

7.2 Condiciones cromatográficas

7.2.1 Columna: Synergi 4u MAX-RP80A (150 x 4.60mm) (Phenomenex)

7.2.2 Temperatura de la columna: 25°C

7.2.3 Detector: UV a 280 nm

7.2.4 Fase Móvil: Referir a punto 7.5.

7.2.5 Flujo: 1.0 mL/ minuto

7.2.6 Tiempo de retención de AF aproximadamente entre 10.5 minutos y 12.0 minutos


7.3 Determinación cromatográfica de ácido fólico

7.3.1 Curva de calibración de las soluciones estándares

7.3.1.1 Inyectar en triplicado 20 uL de cada uno las soluciones estándares entre 3-24 ug/mL

7.3.1.2 Tiempo de corrida: 15 minutos

7.3.1.3 Realizar la curva de calibración utilizando el método de cálculo con estándar externo integrado en el equipo.

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN PREMEZCLAS DE VITAMINAS PARA HARINA DE TRIGO Método – UV-HPLC	Fecha emisión:
		Revisión: 0
		Fecha revisión:
Sección Quím	PRT-711.02-042	Página 6 de 7

7.3.2 Cuantificación de AF en muestras

Inyectar en duplicado 20 uL de la premezcla tratada con la solución de extracción. Tiempo de corrida: 15 minutos

7.4 Cálculo y expresión de resultados

Utilizar el integrador del equipo con el programa de cálculo de área con estándar externo y la tabla correspondiente que contiene la curva de calibración obtenida directamente de la concentración (C) en ug/mL.

$$\text{mg /Kg de ácido fólico} = \frac{C_{(\text{ug/mL})} \times V}{a}$$

Donde:

c = concentración en ug/mL obtenido por la interpolación en la curva de calibración de la muestra.

v = volumen de la muestra final (100 mL para la presente técnica)

a = masa de la muestra en gramos

Limite de detección: 6,25 ng/mL Limite de cuantificación: 8,8ng/mL

Informar mg/Kg de ácido fólico con un decimal

7.5 Control de Calidad

Se efectuarán controles sistemáticos y periódicos para comprobar la validez de los ensayos realizados con el método analítico recogido en este procedimiento.

a) Nivel I: Ensayos de intercomparación, utilización de materiales de referencia certificados y patrones de referencia certificados, según disponibilidad.

b) Nivel III. Durante el desarrollo de la serie de trabajo se incluye:

-Control de blanco al inicio de la corrida cromatográfica

-Control de estándar de concentración conocida

-Inyección del estándar como control por cada diez muestras inyectadas

8. REGISTROS

8.1. Registro de análisis de Vitaminas

8.2. Cromatogramas

9. ANEXOS

No Aplica