

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**VALIDACION DEL METODO DE CUANTIFICACION DE VITAMINA A
(RETINOL) EN AZUCAR MORENO POR ESPECTROFOTOMETRIA
ULTRAVIOLETA / VISIBLE**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

NESTOR MANUEL LUNA VENTURA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL 2013

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS: QUIMICA AGRICOLA

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

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

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

DOCENTES DIRECTORES

Licda. María del Socorro Bercian

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

AGRADECIMIENTOS

A Dios sobre todas las cosas por guiarme, bendecirme e iluminarme siempre en toda mi carrera y permitirme obtener mi primer triunfo profesional.

A mis padres por el enorme esfuerzo, apoyo incondicional que he recibido y seguiré recibiendo siempre de ellos, por sus consejos por enseñarme el amor al prójimo y nunca olvidarme de los más necesitados y a seguir adelante ante cualquier adversidad. También a **mi familia** gracias por sus consejos, oraciones y estímulos.

A mis docentes directores Licda. María Bercian y Licda. Ivonne Arévalo de Márquez por transmitirme todos sus conocimientos, por su apoyo, tiempo, sus observaciones y recomendaciones para el desarrollo de este trabajo de graduación que Dios las colme de muchas bendiciones.

A todos mis amigos que siempre han estado conmigo en todos los momentos buenos y malos, brindándome su apoyo, ayuda y una amistad que durara para siempre. Como también a **β** por ser una personita maravillosa en mi vida gracias por tu paciencia, apoyo y porque siempre has estado incondicionalmente a mi lado.

A grupo CASSA, ingenio Chaparrastique por permitirme haber desarrollado mi proceso de graduación y a mis amigos del laboratorio de fábrica por brindarme toda la ayuda para la ejecución del mismo. GRACIAS

Néstor Luna

DEDICATORIAS

A Dios y a mi virgencita por haberme llenado de sabiduría para culminar mi éxito y por colocarme grandes personas en mi vida que han sido de gran bendición.

A mis padres Manuel de Jesús Luna y Marina Lourdes de Luna quien con todo sus esfuerzos y empeño han llenado mi vida de amor, ejemplo, valentía y por quien este triunfo fue posible, los amo.

A mis hermanos Henry, Toñito, Jessica y Roció por el apoyo y llenar mi vida de alegría, buenos momentos y amor los quiero.

A mi familia por llevarme en sus oraciones, por darme su apoyo incondicional y llenarme de muchos consejos y brindarme todo su cariño.

A mis amigos y compañeros todos los que estuvieron siempre a mi lado, sepan que siempre los tendré presente en mi corazón gracias por todo su apoyo, cariño y amistad.

Néstor Luna

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xx
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	25
3.1 Generalidades del azúcar	25
3.2 Tipos de azúcar y sus usos	25
3.3 Etapas del proceso productivo	25
3.3.1 Transporte de la materia prima al ingenio azucarero	26
3.3.2 Recepción, selección y control de calidad de la materia prima	26
3.3.3 Molienda	26
3.3.4 Clarificación	27
3.3.5 Evaporación	28
3.3.6 Cristalización	28
3.3.7 Separación o centrifugado	29
3.3.8 Secado, fortificación y enfriado	29
3.3.9 Pesado y almacenaje	29
3.3.10 Empacado	29

3.4 Fortificación del azúcar	29
3.4.1 Método de determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada	32
3.5 Validación de métodos analíticos	33
3.5.1 Protocolo de validación	34
3.5.2 Parámetros de desempeño	36
3.5.3 Informe de validación	40
3.5.4 Establecimientos de las condiciones y del alcance de la Validación	40

Capítulo IV

4.0 Diseño Metodológico	46
4.1 Tipo de estudio	46
4.2 Investigación bibliográfica	46
4.3 Investigación de campo	47
4.3.1 Universo	47
4.3.2 Muestra	47
4.4 Muestreo	47
4.5 Parte experimental	48
4.5.1 Procedimiento analítico	48
4.6 Protocolo de validación	52
4.7 Evaluación de los parámetros de desempeño del método	52
4.7.1 Exactitud	52
4.7.2 Precisión del método	55
4.7.3 Linealidad	57
4.7.4 Limite de cuantificación	63
4.7.5 Intervalo / Rango	64

Capítulo V

5.0 Resultados y Discusión de Resultados	66
--	----

Capítulo VI

6.0 Conclusiones	119
------------------	-----

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones	122
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Esquematación del proceso de fabricación del azúcar
2. Resultados analíticos y estadísticos de los parámetros de desempeño
3. Graficas de linealidad del método y del sistema
4. Certificado de análisis del estándar Dry Vitamina A Palmitate 250 MS CWD
5. Certificado de calibración de equipos utilizados durante la validación
6. Parámetros de desempeño a aplicar para cada caso del proceso de validación dado por el CONACYT
7. Clasificación, criterios de precisión y exactitud en función de la concentración de analito
8. Tabla de t Student
9. Ley de fortificación del azúcar con vitamina A
10. Normativa salvadoreña de fortificación del azúcar

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° Pág.
1. Composición de la premezcla de vitamina A para la fortificación del azúcar para una cantidad de 1 kg	31
2. Objetivos de la validación según el tipo de procedimiento de Ensayo	41
3. Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba: Métodos Normalizados Modificados o no Normalizados	43
4. Parámetros de la ecuación de palmitato de retinol con valores específicos según el INCAP	51
5. Resultados de exactitud	114
6. Resultados de precisión	115
7. Resultados de linealidad del método y sistema	116
8. Resultados de límite de cuantificación	117
9. Resultados de intervalo / rango	117
10. Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba: Métodos Normalizados	160
11. Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba: Métodos Desarrollados / Internos	162

12. Clasificación en función a la concentración del analito	165
13. Concentración del analito vrs Precisión	165
14. Porcentaje de recuperación de analito a distintas concentraciones	166

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° Pág.
1. Campana de gauss para la distribución de 2 colas del estudio de veracidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible	91
2. Esquematización del proceso de fabricación del azúcar	129
3. Grafico de la curva de calibración para la linealidad del método	151
4. Grafico de la curva de calibración para la linealidad del sistema	151

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pág.
1. Procedimientos para la determinación de los parámetros de desempeño y criterios de aceptación	78
2. Resultados del porcentaje de recobro para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible	84
3. Resultados de la veracidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible	88
4. Resultados de la veracidad del método a través del estudio probabilístico de t Student suponiendo varianzas desiguales para dos muestras	88
5. Resultados de repetibilidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible	93
6. Resultados de precisión intermedia del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible	97
7. Resultados de la linealidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible	102

8. Resultados de la linealidad del sistema para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible 107

9. Resultados del límite de cuantificación para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible 111

ABREVIATURAS

Abs:	Absorbancia
AOAC:	Organización Americana de Químicos Analíticos
CASSA:	Compañía Azucarera Salvadoreña
cm:	Centímetros
CONACYT:	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CO₂:	Dióxido de carbono
CWD:	Siglas en inglés Dispersable en agua fría
CWS:	Siglas en inglés soluble en agua fría
DVA:	Deficiencia de vitamina A
gSt:	Gramos de estándar
Hi:	Hipótesis de investigación o alternativa
Ho:	Hipótesis nula
ICUMSA:	Siglas en inglés Comisión Internacional para la Unificación de Métodos de Análisis de Azúcar
INCAP:	Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
ISO:	Organización Internacional de Estandarización
mg/dl:	Miligramos por decilitros
mg/g:	Miligramos por gramo
mg /Kg:	Miligramos por kilogramos
mg/mL:	Miligramos por mililitros
MINSAL:	Ministerio de Salud

mL:	Mililitros
nm:	Nanómetros
ppb:	Partes por billón
ppm:	Partes por millón
p/v:	Peso sobre volumen
RPM:	Revoluciones por minuto
SNC:	Sistema Nacional de Calidad
UI:	Unidades internacionales
UNICEF:	Siglas en inglés Fondo Internacional de Emergencia de Naciones Unidas para la Infancia
USAID:	Siglas en inglés Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional
°C:	Grados Celsius
µg/mL:	Microgramos por mililitros

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objeto la validación del método de cuantificación de vitamina A (retinol) en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible. La muestra utilizada fue específica y puntual ya que se trabajo con el azúcar moreno producido únicamente en el Ingenio Chaparrastique.

Se llevo a cabo todo lo que establece la guía de validación de métodos analíticos dada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y se aplico el método de análisis establecido por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP); los ensayos analíticos fueron realizados en el laboratorio de fabrica del Ingenio Chaparrastique de la ciudad de San Miguel. Se elaboró el protocolo de validación respectivo del método de estudio, donde se documentó las responsabilidades, método analítico, instrumentos, parámetros de desempeño con sus procedimientos y criterios de aceptación finalizando con la redacción del informe de validación.

Los parámetros de desempeño empleados en la realización de esta validación para métodos normalizados modificados fueron: exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, linealidad del método y del sistema, límite de cuantificación e intervalo (rango). Para cada uno de estos parámetros se muestra el cumplimiento aplicando sus respectivos criterios de aceptación, obteniendo los siguientes resultados: una exactitud con una porcentaje de recobro del 99.7%, la precisión en términos de repetibilidad con un CV 4.25 % y para la precisión intermedia de 3.8 %, linealidad del método con un coeficiente de determinación de 0.999 y un $CV_{y/x}$ 2.05% y para el sistema coeficiente de determinación de 0.9995, limite de cuantificación a partir de 0.345 ppm y finalizando con un intervalo que comprende de 0.345 ppm a 25 ppm.

Basándose en los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros de desempeño aplicado el método de estudio denominado cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible, es confiable y seguro para su utilización por lo que puede emplearse tanto en los laboratorios de ingenios azucareros como también para fines didácticos ya que el método demostró ser lineal, exacto y preciso.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

La fortificación de alimentos básicos, como el azúcar ha sido un método para evitar o disminuir la deficiencia de nutrientes como la vitamina A en la población de El Salvador y por ello se requiere la presencia de las cantidades requeridas y exigidas por el ente regulador que es el Ministerio de Salud.

Para el monitoreo de las concentraciones de vitamina A en el azúcar es necesario la implementación de métodos de análisis confiables, para esto se requiere la utilización de metodologías validadas que demuestren su confiabilidad para reportar datos certeros. La validación de un método analítico es un procedimiento para establecer por medio de estudios experimentales el cumplimiento de cada uno de los parámetros de desempeño aplicando el método de estudio y demuestre alto grado de confiabilidad.

En la presente investigación se realizó la validación del método de cuantificación de vitamina A en forma de retinol por espectrofotometría ultravioleta / visible en azúcar moreno. En el cual es producido únicamente en el Ingenio Chaparrastique de Compañía Azucarera Salvadoreña (CASSA), y fue necesario validar el método para azúcar moreno porque solamente se contaba con la metodología establecida por el INCAP para azúcar blanco, validando así el cambio de matriz de la muestra del método analítico y poderlo emplear con mayor confiabilidad.

El proceso de validación se realizó conforme a lo que establece la guía de validación de métodos analíticos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT); iniciando con el protocolo de validación, continuando con la realización experimental de cada uno de los parámetros de desempeño y finalizando con el respectivo informe de validación del método de estudio. Los análisis experimentales se realizaron en el laboratorio de fábrica del Ingenio Chaparrastique, en el que se aplicó el método oficial dado por el Instituto de

Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) durante los meses comprendidos de julio a noviembre de 2012. Periodo en el cual se obtuvo experimentalmente el cumplimiento de los parámetros de desempeño de dicho método.

Para la realización de la validación se seleccionaron los parámetros de desempeños que aplicaban y establece la guía de validación del CONACYT para métodos modificados normalizados o no normalizados, los cuales son: Exactitud, Repetibilidad, Precisión Intermedia, Linealidad del sistema y método, Limite de cuantificación e intervalo (rango). Mediante el método validado se aplicara con mayor confiabilidad para el monitoreo de las concentraciones de vitamina A en azúcar moreno, brindando así un producto alimenticio fortificado con las cantidades requeridas y exigidas por la legislación de nuestro país para el consumo de la población salvadoreña.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el método de cuantificación de vitamina A (Retinol) en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1** Desarrollar un protocolo de validación para la cuantificación de vitamina A en azúcar moreno.
- 2.2.2** Realizar los procedimientos de los parámetros de desempeño aplicando el método de estudio.
- 2.2.3** Interpretar los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño en el estudio de acuerdo a la normativa empleada.
- 2.2.4** Elaborar el informe de validación según los resultados obtenidos.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3 MARCO TEORICO

3.1 Generalidades del azúcar⁽²⁷⁾

El azúcar es un sólido, cristalizado, constituido esencialmente por cristales sueltos de sacarosa, obtenidos a partir de *Saccharum officinarum L* (caña de azúcar) o de la *Beta vulgaris L* (remolacha azucarera) mediante procedimientos industriales apropiados. La caña de azúcar contiene entre 8 y 15% de sacarosa; carbohidrato de origen natural compuesto por carbono, oxígeno e hidrógeno.

3.2 Tipos de azúcar y sus usos.⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

Los tipos de azúcares en el mercado son: refino, blanco y moreno los cuales se identifican por su grado de pureza y color siendo el refino el de mayor pureza y moreno el de menor pureza, en el caso del color el moreno el de mayor color y el refino el de menor color. Los azúcares blancos son alimentos muy puros con más del 99% de sacarosa mientras que los azúcares crudos o moreno poseen un contenido menor de sacarosa (> 94%) pues conservan aún parte de la miel a partir de la cual fueron fabricados. Entre sus usos para consumo humano directo están como edulcorante en bebidas y alimentos; para uso industrial como edulcorante en embotelladoras y materia prima en la elaboración de boquitas, panaderías y confiterías.

3.3 Etapas del proceso productivo⁽⁷⁾ (ver anexo N°1)

La caña de azúcar ha sido sin lugar a dudas uno de los productos de mayor importancia para el desarrollo comercial en el continente americano y europeo. El azúcar se consume en todo el mundo, puesto que es una de las principales fuentes de calorías en las dietas de todos los países y se puede obtener principalmente a partir de la caña de azúcar y la remolacha azucarera. Para su obtención se requiere de un largo proceso, desde que la semilla de caña

germina hasta que el azúcar se comercializa nacional e internacionalmente. A continuación se describe el proceso de transformación de la caña de azúcar.

3.3.1 TRANSPORTE DE LA MATERIA PRIMA AL INGENIO AZUCARERO₍₇₎

El corte de la caña, se realiza manual o mecánicamente, utilizando parámetros de calidad que disminuyen los porcentajes de materia extraña. Una vez cortada la caña se transporta a la fábrica en camiones procurando el menor tiempo de permanencia antes de llegar a la fábrica o Ingenio.

3.3.2 RECEPCIÓN, SELECCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA₍₇₎

La caña que llega del campo se muestrea para determinar las características de calidad las cuales son el contenido de sacarosa, fibra y nivel de impurezas, se recibe la caña clasificada y se realiza la prueba de rendimiento de sacarosa, mediante la selección aleatoria de una muestra de la fibra de caña, la cual es pesada y extraída para su análisis en el muestrario del laboratorio para determinar el rendimiento de sacarosa por tonelada de la caña. Luego de examinada, se conduce a los patios donde se almacena temporalmente o se dispone directamente en las mesas de descarga de caña, para dirigirla a una banda conductora que alimenta las picadoras, las cuales, son unos ejes colocados sobre los conductores accionados por turbinas, provistos de cuchillas giratorias que cortan los tallos y los convierten en astillas, dándoles un tamaño uniforme para facilitar así la extracción del jugo en los molinos.

3.3.3 MOLIENDA₍₇₎

Después de haberse disminuido el tallo de la caña es recibida en los molinos que contienen cuatro masas de rodamiento cada uno, cada molino está equipado con una turbina de alta presión. En el recorrido de la caña por el molino se agrega agua, generalmente caliente, o jugo diluido para extraer al máximo la sacarosa que contiene el material fibroso (bagazo). El proceso de

extracción con agua es llamado maceración y con jugo se llama imbibición. Una vez extraído el jugo se tamiza para eliminar el bagazo y el bagacillo, los cuales se conducen a una bagacera para que sequen y luego se van a las calderas como combustible, para la generación de vapor y energía eléctrica para que la maquinaria siga funcionando.

3.3.4 CLARIFICACIÓN₍₇₎

El jugo obtenido, es filtrado, iniciando la primera etapa de calentamiento que facilita la sedimentación de sólidos insolubles y separándolos del jugo claro que queda en la parte superior del clarificador, posteriormente, este se extrae de la molienda, se pesa en básculas con celdas de carga para saber la cantidad de jugo sacaroso que entra en la fábrica. El jugo obtenido en la etapa de molienda es de carácter ácido (pH aproximado 5.2), éste se trata con lechada de cal (CaOH_2), la cual eleva el pH con el objetivo de minimizar las posibles pérdidas de sacarosa. El pH ideal es de 8 a 8.5, lo cual nos da un jugo brillante, con volumen de cachaza aumenta la temperatura entre el jugo mixto y clarificado y se evita la destrucción de la glucosa. Para una buena clarificación se necesita que la cantidad de cal sea correcta ya que esto puede variar la calidad de los jugos que se obtienen. La cal también ayuda a precipitar impurezas orgánicas o inorgánicas que vienen en el jugo y para aumentar o acelerar su poder coagulante, se eleva la temperatura del jugo encalado mediante un sistema de tubos calentadores, la temperatura de calentamiento varía entre 90 y 114.4°C, por lo general se calienta a la temperatura de ebullición o ligeramente más, la temperatura ideal está entre 94 y 99°C.

En la clarificación del jugo por sedimentación, los sólidos no azúcares se precipitan en forma de lodo llamado cachaza, el jugo claro queda en la parte superior del tanque; el jugo sobrante se envía al campo para el mejoramiento de los suelos pobres en materia orgánica.

3.3.5 EVAPORACIÓN₍₇₎

En esta fase se extrae el agua, y el jugo se convierte en miel virgen, la cual pasa a los tanques de meladura, para ser purificada en los clarificadores antes de ser llevada a los tachos, el jugo procedente del sistema de clarificación se recibe en los evaporadores con un porcentaje de sólidos solubles entre 10 y 12% y se obtiene una meladura o jarabe con una concentración aproximada de sólidos solubles del 55 al 60 %.

Este proceso se da en evaporadores de múltiples efectos al vacío, que consisten en un conjunto de celdas de ebullición dispuestas en serie. El jugo entra primero en el pre-evaporador y se calienta hasta el punto de ebullición. Al comenzar a ebullición se generan vapores los cuales sirven para calentar el jugo en el siguiente efecto, logrando así el menor punto de ebullición en cada evaporador. Una vez que la muestra tiene el grado de evaporación requerido, por la parte inferior se abre una compuerta y se descarga el producto. La meladura es purificada en un clarificador

3.3.6 CRISTALIZACIÓN₍₇₎

Los tanques denominados tachos reciben las mieles y siguen en movimiento constante a temperatura alta, donde se solidifica y se cristaliza formando el grano de azúcar, estos aparatos se usan para procesar la meladura y mieles con el objeto de producir azúcar cristalizada mediante la aplicación de calor. El material resultante que contiene líquido (miel) y cristales (azúcar) se denomina masa cocida. Esta mezcla se conduce a un cristalizador, que es un tanque de agitación horizontal equipado con serpentines de enfriamiento. Aquí se deposita más sacarosa sobre los cristales ya formados, y se completa la cristalización. El trabajo de cristalización se lleva a cabo empleando el sistema de tres cocimientos para lograr la mayor concentración de sacarosa, en este proceso se define si la producción de azúcar va a ser cruda o blanca.

3.3.7 SEPARACIÓN O CENTRIFUGADO₍₇₎

En este proceso la miel, se separa del grano de azúcar cristalizado por medio de centrifugas. Las mieles desprendidas del grano se clasifican en miel de primera (azúcar cruda o mascabada), miel de segunda o sacarosa líquida y una purga de segunda o melaza, siendo éste el punto de separación de la melaza como subproducto, el azúcar crudo debe su color café claro al contenido de miel que aún tiene. Las melazas se emplean como una fuente de carbohidratos para el ganado, para ácido cítrico y otras fermentaciones.

3.3.8 SECADO, FORTIFICADO Y ENFRIADO₍₇₎

El azúcar húmedo se coloca en bandas y pasa a las secadoras, que son elevadores rotatorios donde el azúcar queda en contacto con el aire caliente que entra en contracorriente luego se pasa al proceso del fortificado con vitamina A. Para finalizar esta etapa pasa por los enfriadores rotatorios inclinados que llevan el aire frío en contracorriente, en donde se disminuye su temperatura, hasta aproximadamente 40 a 45°C.

3.3.9 PESADO Y ALMACENAJE₍₇₎

El azúcar es trasladada a las básculas en donde es pesada y así, las bodegas reciben el producto terminado, finalmente es almacenada por lotes de producción, para su posterior comercialización.

3.3.10 EMPACADO₍₇₎

Una vez el azúcar esté seco y frío, es empacado en sacos de diferentes presentaciones según las necesidades de los clientes nacionales e Internacionales.

3.4 FORTIFICACIÓN DEL AZÚCAR₍₄₎₍₉₎₍₁₉₎

El azúcar fue seleccionada en Centro América como el vehículo o alimento a ser fortificado con vitamina “A”, a partir de la primera implementación de un programa de fortificación desarrollado por Guillermo Arroyave en Guatemala

como una respuesta al déficit de vitamina A en la población ocasionando problemas en la salud ocular, en el sistema inmunológico y el sistemas óseo entre otros, en el cual fue el primer país del mundo según la UNICEF en desarrollar y llevar a cabo la ejecución del respectivo programa en todos los ingenios azucareros de ese país con el cual ya cuenta con una legislación respectiva de las cantidades de vitamina A en el azúcar que se comercializa en ese país.

Con respecto a nuestro país el programa de fortificación del azúcar con vitamina A, se ejecuto en la zafra 1994-1995 en todos los ingenios azucareros del país sin interrupción hasta la fecha, tomando como modelo al país de Guatemala también como respuesta a la problemática de la deficiencia de la vitamina A en la población, con el cual se realizo y se llevo a cabo el decreto legislativo que se denomina ley de fortificación del azúcar con vitamina A (anexo N°9) a partir de la normativa de fortificación que fue diseñada (ver anexo N°10) en el cual estipula las entidades responsables de vigilar la fortificación como comercialización y las respectivas cantidades que debe de contener toda el azúcar que se distribuye en nuestro país en la cual debe de ser de 15 mg de retinol para el consumo diario de la población.

El proceso de fortificación del azúcar se lleva a cabo en dos fases:

- Elaboración de la premezcla del fortificante:

Debido a que la cantidad de vitamina "A" que se agrega al azúcar es tan pequeña, primero se realiza un premezcla; esta facilita la disolución de dicha vitamina en una pequeña cantidad de azúcar. Luego se agrega al lote completo para la fortificación final, obteniendo de esta manera un producto más homogéneo. (Ver cuadro N°1)

Cuadro N°1: Composición de la premezcla de vitamina A para la fortificación del azúcar para una cantidad de 1kg. ⁽⁹⁾

COMPONENTE	GRAMOS	%(P/P)	mL.
Palmitato de Retinilo de tipo 250-cws*	220.0	22.0	-
Aceite de Maní (libre de Peróxidos)	16.5	1.65	18.13 **
Antioxidantes (Ronoxan A)	0.08	0.008	-
Azúcar	763.42	76.342	-
TOTAL	1000.00	100.00	-

*Miscible en agua 250,000 UI/g

** Gravedad específica del aceite 0.91 g/mL

La fortificación del azúcar: La premezcla preparada tiene una concentración elevada de vitamina "A" y no es apropiada para el consumo humano. La formulación también está diseñada para proporcionar un exceso teórico del 10%.

- Incorporación de la premezcla al azúcar

Esta premezcla deberá ser agregada al azúcar con una proporción adecuada para el consumo humano (1:1000), de manera que el producto contenga la cantidad seleccionada de 15 mg de retinol/kg de azúcar.

Los ingredientes que se utilizan para la premezcla de vitamina “A” son ⁽⁹⁾:

- **Palmitato de retinol:** es el compuesto fortificante de azúcar; se encuentra en un micro encapsulado dentro de una matriz de gelatina en combinación con antioxidantes (butil-hidroxi-anisol, BHA y butil-hidroxi-tolueno, BHT) y otras sustancias que los hacen hidrodispersable fabricado por Hoffman-La Roche y BASF. El prototipo de este compuesto conocido como 250-CWS contiene 250,000 UI de retinol/g (75 mg/g) de donde deriva el 250 de su nombre y las siglas CWS significan Cold Water Soluble (soluble en agua fría).
- **Antioxidante:** el prototipo utilizado es el Ronoxan-A, producido por Hoffman-La Roche que está compuesto por di- α -tocoferol (50 mg/g), palmitato de ascorbilo (2150 mg/g) y lecitina (700 mg/g). El propósito de esta sustancia es reducir la velocidad de oxidación del aceite vegetal que se utiliza en la preparación de la premezcla. Debe mantenerse refrigerado (temperatura menor a 10°C) en el envase original hasta por nueve meses. Una vez abierto el producto debe ser utilizado dentro de un mes.
- **Aceites vegetales:** como por ejemplo aceite de maní, de algodón, de coco entre otros este debe tener el contenido más bajo de peróxidos. El nivel máximo de peróxidos especificado es de 5 meq/Kg, lo que debe confirmarse previo a su uso.

3.4.1 Método de determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada. ⁽⁵⁾⁽¹¹⁾

Método oficial utilizado para la cuantificación de vitamina A en azúcar fortificada fue establecido por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Este es una modificación del método “Determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada”, INCAP-CA-100B-1, en el cual se usaban 20 g de muestra. En esta modificación de ha aumentado el

tamaño de la muestra de 20 g a 100 g, con el propósito de disminuir la influencia de la heterogeneidad de la distribución de vitamina A en el azúcar fortificada en el análisis.

La muestra de azúcar se disuelve en agua caliente para disolver la matriz del compuesto de vitamina A. Luego se realiza una dilución 1:1 con hidróxido de sodio 0.1N para posteriormente realizar la extracción del palmitato de retinol en hexano. La concentración de retinol es determinada por absorbancia a 325nm.

3.5 Validación de métodos analíticos₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₃₎

La implementación de métodos de análisis validados en un laboratorio de control de calidad es primordial para ser acreditado ya que es uno de los requisitos que exige la norma ISO/IEC 17025:2005 ⁽²¹⁾ en el que contempla todos los requisitos técnicos como de gestión que debe de cumplir todo laboratorio de control de calidad para ser acreditado.

Además las metodologías validadas dan un alto grado de confiabilidad del laboratorio hacia sus proveedores a través de los informes de calidad, en el cual se plasma los resultados de cada uno de los análisis realizados al producto de adquisición.

La validación de un método de análisis requiere la realización experimental de los diversos parámetros de desempeño los cuales son:

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad / Selectividad
- Limite de detección
- Limite de cuantificación
- Linealidad
- Intervalo / Rango

- Robustez

La validación de métodos analíticos consta de 3 etapas de desarrollo que son: la realización de un protocolo de validación, el desarrollo experimental de cada parámetro de desempeño contemplados en el protocolo y la presentación del informe de validación donde se plasman todos los resultados obtenidos, el tratamiento estadístico, criterios de aceptación y las respectivas firmas de analistas y responsables de autorizar la validación.

3.5.1 Protocolo de validación₍₁₀₎₍₁₂₎

Para la realización de la validación de un método analítico es necesario llevar a cabo un protocolo de validación, este es un documento mas específico, conciso y claro que se detalla todo lo que se va a realizar debe evidenciar un objetivo, definición del sistema a validar, identificación de los parámetros, diseño del plan experimental y criterios de aceptación y además debe ir con su respectiva fecha y firmado por los analistas responsables de la validación como los responsables de la aprobación.

Un protocolo de validación puede contener la siguiente estructura:

- a) Código de identificación: El cual permite la identificación del número de versión del protocolo.
- b) Objetivos: Los cuales deben incluir si es una primera evaluación o es una reevaluación, además de puntualizar que se pretende lograr con el protocolo a que producto.
- c) Alcance: Depende de la entidad a evaluar, si es un proceso, equipo o sistema.
- d) Responsables: Nombres y firmas de las personas involucradas en el proceso de la validación como analistas, auxiliares y analista de calidad quien autoriza la validación.

- e)** Parámetros a estudiar: Los parámetros de desempeño a estudiar se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.
- f)** Muestras: Se definirán los tipos de muestras, identificación, preservación (si aplica) tratamiento previo, almacenamiento previo al análisis (si aplica), disposición final es decir todas las características y precauciones que se deben de tener con la muestra.
- g)** Equipos involucrados en la validación: Identificar los equipos implicados en el proceso de validación (pHmetros, balanzas, cromatógrafos, etc.), y documentar que están convenientemente calificados y calibrados, referenciando estos datos en el informe de validación.
- h)** Descripción del método analítico: Debe describirse el método tal cual será puesto en el uso rutinario, detallando todos los elementos abajo mencionado, y haciendo énfasis en puntos críticos de la metodología, condiciones instrumentales y número de repeticiones, verificación de idoneidad de las condiciones operatorias definidas, fórmulas para el cálculo de resultados y su tratamiento estadístico si es necesario, bibliografía y referencias.
 - Reactivos
 - Estándares
 - Materiales
 - Instrumentación
 - Condiciones ambientales
 - Medidas de seguridad para el uso de reactivos
 - Preparación de reactivos
 - Preparación de estándares
 - Preparación de la muestra
 - Procedimiento
 - Cálculos

- i) Procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar: Aquí se describen los parámetros de desempeño que se llevaran a cabo, como se hará la determinación de cada parámetro y que se reportara para la evaluación final.
- j) Criterios de aceptación: Aquí se fijan los criterios que deben cumplir los parámetros de desempeño que se probaran o realizaran en el estudio, estos deben de ser manifestados a lo largo de toda la validación y cualquier cambio en estos debe ser justificado.
- k) Referencias: Bibliografía consultada para la realización del protocolo y del método de análisis que se desea validar.

3.5.2 Parámetros de desempeño

Son características de validación que necesitan ser evaluadas aplicándolas al método, equipo o sistema en estudio y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de Cuantificación, linealidad, intervalo y robustez.

Nota: Las formulas de cada uno de los parámetros de desempeño se encuentran en el capítulo V

a) **Exactitud**₍₂₎₍₁₀₎₍₂₃₎

Es la proximidad entre resultados de la prueba, obtenidos mediante dicho método y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo, entre más pequeña es dicha diferencia la exactitud es mejor. En el cual se debe de evaluar experimentalmente un mínimo de tres niveles de concentración, cada uno por triplicado realizando así nueve determinaciones en total reportando el resultado como porcentaje de recobro.

b) Precisión₍₂₎₍₁₀₎₍₂₃₎

Es la cercanía o grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión se puede expresar matemáticamente con tres variables; la desviación estándar σ , estimada analíticamente por S o comúnmente como porcentaje de coeficiente de variación (%CV). En el presente estudio se utilizara como porcentaje de coeficiente de variación (%CV).

La precisión es medida mediante los siguientes niveles: la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

REPETIBILIDAD: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, entre otros.) en un mismo laboratorio.

PRECISION INTERMEDIA: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, entre otros.) y en un mismo laboratorio.

REPRODUCIBILIDAD: Estudia la variabilidad método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

c) Selectividad /Especificidad₍₂₎₍₁₀₎₍₂₃₎

La selectividad se define como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compararse utilizando otros procedimientos analíticos complementarios. Otras

autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC-I) han preferido el término selectividad reservando especificidad para procedimientos que resulten completamente selectivos. Para las pruebas que se indican a continuación, la definición anterior tiene las siguientes consecuencias:

- Pruebas de identificación: garantiza la identidad del analito.
- Pruebas de Pureza: garantiza que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analito.
- Valoraciones: proporcionan un resultado exacto, que permitan una declaración exacta del contenido o potencia del contenido en una muestra.

d) Limite de detección₍₂₎₍₁₀₎₍₂₃₎

El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. El límite de detección es una característica de las pruebas de límite, que simplemente comprueban que la cantidad del analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón, entre otras).

e) Limite de cuantificación₍₂₎₍₁₀₎₍₂₃₎

Corresponde a la mínima concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonable en las condiciones de operación, en este caso generalmente se mide la señal de fondo relación señal/ruido, efectuando mediciones repetidas sobre un blanco.

f) Linealidad₍₂₎₍₁₀₎₍₂₃₎

La linealidad en un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por

medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestras en un intervalo dado. La linealidad es obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta, ya sea lineal o no.

La linealidad puede ser aplicada de dos maneras:

- Linealidad del sistema: Capacidad del sistema de medición para proporcionar una indicación que tenga una relación lineal con una magnitud determinada distinta de una magnitud de influencia.
- Linealidad del método: habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

g) Intervalo o rango₍₂₎₍₁₀₎₍₂₃₎

Se define como intervalo la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y la linealidad del método descrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de las pruebas (por ejemplo %, ppm, mg/mL, µg/mL) obtenidos mediante el método analítico.

h) Robustez₍₂₎₍₁₀₎₍₂₃₎

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros enumerados en la documentación del procedimiento, y a la vez da una idea de su aptitud durante su uso normal. Si existe alguna variación esta deberá ser documentada como referencia futura.

Es evidente que un método debe ser “robusto” (reproducibile) frente a cambios de analistas o instrumentos, pero no necesariamente debe serlo frente a todos los cambios que se estudien.

La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico es decir durante la realización del método y no necesariamente durante la validación porque se puede validar al final un método poco robusto obteniendo resultados erróneos que es lo que no se desea. Se recomienda plantear al final del método las precauciones que se deben de tener en cuenta para que el método sea más flexible y se obtengan excelentes resultados.

3.5.3 Informe de validación₍₁₀₎₍₁₂₎

Es el documento donde se presenta la evidencia documentada que demuestra que el equipo, proceso o método de análisis cumple con las características predeterminadas de calidad y que suministra alto grado de confiabilidad en el cual debe de abarcar los siguientes datos: título, resultados, análisis de resultados, cuadro comparativo con criterios de aceptación y conclusiones.

3.5.4 Establecimiento de la condiciones y del alcance de la validación₍₁₀₎

El laboratorio responsable del análisis o ensayo debe definir las condiciones y el alcance de la validación de acuerdo a lo definido por la guía del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a su caso en particular.

- Establecimiento del alcance de la validación

Se diferencian tres casos, en los que la dificultad de la validación aumenta del primero al tercero:

- I. Se trata de un método de ensayo estandarizado y normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en la norma/procedimiento.
- II. Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado o cuando se use un método proporcionado por el proveedor de un equipo o sistema analítico. Ejemplos: un método de extracción diferente o la aplicación del

método en una matriz diferente a la indicada, aplicación del método en rangos distintos trabajo.

- III. Se trata de un método de ensayo desarrollado en el laboratorio y que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos.

La validación en los casos descritos en el numeral 3.5.4 tiene objetivos distintos como lo establece el CONACYT en el cuadro siguiente (ver cuadro N°2).

Cuadro N°2: Objetivos de la validación según el tipo de procedimiento de ensayos. ⁽¹⁰⁾

Método de ensayo	Objetivos de la Validación
Caso 1: método Normalizado	Comprobación de que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente. (ver anexo N°6)
Caso 2: modificación de un método normalizado o no normalizado	Comprobación de que la modificación introducida en el método original no afecta la capacidad del laboratorio para proporcionar resultados confiables. Ejemplos: Cambio del método de extracción, otra matriz, cambios en el pH. Demostrar que el método proporcionado por el fabricante es capaz de dar resultados confiables para el fin propuesto. (ver anexo N°6)
Caso 3: método Desarrollado / interno.	Comprobación de que el método cumple con las características necesarias para dar resultados confiables para el fin propuesto. (ver anexo N°6)

Para la presente investigación se aplica el caso 2; modificación de un método normalizado o no normalizado, ya que partimos de un método normalizado dado por el INCAP en la cual modificamos la matriz de la muestra y se realizaran todos los parámetros de desempeño que aplican y establece la guía de validación del CONACYT para el mismo. Ver cuadro N°3

Para la selección de los parámetros de desempeño que aplican para los demás casos ver anexo N°6

Cuadro N°3: Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba: Métodos Normalizados Modificados o No Modificados⁽⁹⁾

Métodos Normalizados Modificados o No Normalizados				
Parámetros	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios**	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas**	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/ Especificidad	Sí	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del Sistema	No	Sí	Si	+
Linealidad del Método	No	Sí	Sí	+
Rango	No	Sí	Sí	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión Intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	+	No	No	No
Límite de Cuantificación	No	+	Sí	+
Robustez	+	+	+	+

- **+**: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis o de las modificaciones que se le hagan al método.
- **++**: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

- *: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (ejemplo: disolución, liberación de analito, etc.) el método usado para la cuantificación (cuando aplique) se validará de acuerdo a columnas 2 ó 3.
- ** Ver Anexo 7.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio

El estudio que se realizó fue de tipo experimental, transversal y prospectivo.

Experimental porque se realizaron los ensayos de los análisis respectivos de la muestra de azúcar moreno en el laboratorio de fabrica del Ingenio Chaparrastique; **transversal**, debido a que la investigación se realizo en un tiempo determinado, comprendido entre julio-noviembre del año 2012, en el cual se intereso estudiar el problema en el presente momento que se realizo la investigación y **prospectivo** ya que a medida que se desarrollo la validación del método se cumplió con cada objetivo del estudio planteado, y además servirá la aplicación del método en el laboratorio para asegurar un mejor resultado y tener un alto grado de confiabilidad, y también como inducción en cátedras universitarias relacionada a análisis de alimentos.

4.2 Investigación bibliográfica

Para la elaboración del presente trabajo se realizo una revisión bibliográfica en:

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca del laboratorio de fabrica del Ingenio Chaparrastique
- Internet

4.3 Investigación de Campo

Universo y Muestra

4.3.1 El universo de la investigación es todo el azúcar a granel sin fortificar que se produce en el Ingenio Chaparrastique y que es almacenada en las bodegas N°1 de los ingenios Chaparrastique y Central Izalco.

4.3.2 La muestra fue extraída de la bodega N°1 del ingenio Chaparrastique.

4.4 Muestreo⁽⁶⁾

El procedimiento de muestreo interno que se utilizó es el establecido por la Comisión Internacional para la Unificación de los Métodos de Análisis de Azúcar (siglas en inglés ICUMSA) en cual especifica lo siguiente:

- Para azúcar a granel

El muestreo puede ser estático, como en el caso de vagones cargados, o en movimientos, es decir durante operaciones de llenado o vaciado.

En este caso se aplicó el muestreo estático que procede de la siguiente manera:

Las muestras primarias deben de ser extraídas en varias porciones, a lo largo de toda la altura del contenedor mediante el empleo de un muestreador cilíndrico. Este es un tubo largo, con el fondo cerrado y provisto de una serie de ranuras longitudinales que permiten la entrada del azúcar en varias profundidades. Las posiciones de muestreo deben ser distribuidas uniformemente sobre el área del contenedor. Para contenedores de forma normal rectangular es apropiado tomar cuatro muestras cerca de las esquinas y una en el medio. La cantidad de muestra compuesta para el desarrollo del análisis será de 10 kilogramos de azúcar a granel sin fortificar.

4.5 Parte experimental

Los análisis se realizaron en el laboratorio de fábrica del Ingenio Chaparrastique, el cual proporcionó todos los reactivos, materiales y equipos necesarios para la realización de la validación del método.

El método que se utilizó para la respectiva validación es el establecido por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) que consiste en la determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada. El cual es un método normalizado específicamente para azúcar blanco, aplicando lo que establece la guía de validación del CONACYT que cuando hay un método analítico normalizado y se efectúa un cambio ya sea en el procedimiento del método, la muestra o entre otros, pasa a ser un método normalizado modificado para el cual debe de realizarse la validación respectiva para el cambio efectuado. En este caso es el cambio de la matriz de la muestra de azúcar blanco a azúcar moreno.

Los análisis se realizaron con estándar de palmitato de retinol (ver anexo N°4), a concentraciones que serán especificadas en el procedimiento de cada uno de los parámetros de desempeño que se desarrollaron.

4.5.1 Procedimiento analítico₍₄₎₍₁₁₎

Cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible:

1. Homogenizar la muestra de azúcar crudo fortificado mezclándola varias veces.
2. En un beaker de 250 mL pesar 100 g de azúcar, registrando el peso exacto a centésimos de gramo y disuelva con aproximadamente 100 mL de agua destilada caliente a 85°C. Agitar hasta que todo el azúcar se disuelva completamente.

3. Preparar un blanco de reactivos solamente con agua destilada caliente y llevándola a través de los mismos pasos del procedimiento que la muestra.
4. Enfriar las soluciones, asegurándose que estén cubiertas con papel aluminio o utilizando cristalería color ámbar en un ambiente oscuro o luz amarilla.
5. Transferir cuantitativamente a un balón volumétrico color ámbar de 250.0 mL. Lavar varias veces el beaker con pequeñas porciones de agua destilada y transfiera los lavados al balón. Aforar a 250.0 mL con agua destilada y homogenizar.
6. Transferir 5.0 mL de la solución preparada de la muestra a dos tubo de ensayo de 20 mL (con tapón esmerilado o de rosca).
7. Agregar 5.0 mL de hidróxido de sodio 0.1 N a cada tubo y mezcle en un agitador tipo Vortex por 30 segundos.
8. En otros dos tubos de ensayo de 20 mL (con tapón esmerilado o de rosca), coloque 2.0 mL de la solución obtenida de cada tubo del paso (g). Agregar 2-3 gotas de fenolftaleína 1% p/v, agregue 3.0 mL de etanol absoluto a cada tubo. Mezcle en agitador tipo Vortex por 5 segundos.
9. Medir 3.0 mL de hexano con una pipeta volumétrica y luego agregar cuidadosamente a cada uno de los tubos del paso (h). Cierre cada tubo inmediatamente y agite vigorosamente en el agitador Vortex por 1 minuto, para asegurar la extracción completa del retinol. Destape ligeramente los tubos para aliviar la presión de gas, la fase acuosa es de color fucsia mientras que la fase orgánica es incolora.
10. Nota: realizar por duplicado la extracción con hexano a partir de la muestra patrón del balón volumétrico de 250.0 mL.
11. Ajustar a cero de absorbancia el espectrofotómetro con hexano. A mayor brevedad posible transfiera la solución de hexano a una celda de espectrofotómetro de 1cm de paso de luz con una pipeta Pasteur. Lea la absorbancia del blanco y de la muestra a 325 nm.

12. CALCULO

- Restar la absorbancia del blanco de reactivos de la absorbancia de la muestra.
- La concentración de retinol en las muestras de azúcar se calcula según la ecuación siguiente:

$$\text{Palmitato de retinol (mg/kg)} = \frac{\text{Abs}_{\text{corregida}}}{\epsilon} \times \frac{\text{Vh}}{\text{Vaz}} \times \frac{\text{VI}}{\text{P}} \times \frac{\text{D}}{\text{R}}$$

En donde:

- Absorbancia corregida = $\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$
- Absorbancia del blanco debería ser menor de 0.050.
- Parámetros de la ecuación ver cuadro N° 4

CUADRO Nº 4: Parámetros de la ecuación de palmitato de retinol con valores específicos según el INCAP.⁽⁴⁾

PARAMETRO	EXPLICACION	VALOR
ϵ	Coefficiente de absorptividad del palmitato de retinol en hexano($\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mL}$)	0.092
Vh	Volumen de la fase orgánica(mL)	3.0
Vaz	Volumen de la alícuota analizada de la solución de azúcar (mL)	2.0
VI	Volumen inicial de la muestra(mL)	250.0
P	Peso de la muestra(g)	Según lo pesado
R	Recuperación	0.905
D	Dilución(5/10)	2

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

La ecuación anterior se simplifica a:

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

En donde:

- Absorbancia corregida = $\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$
- Absorbancia del blanco debería de ser menor de 0.050.
- P: el peso de la muestra

4.6 Protocolo de validación

Se realizó en base a los parámetros de desempeño que aplicaba para la validación del método de estudio, donde se documentó todos los puntos que debe de contener un protocolo, el procedimiento de análisis, equipos, analistas entre otros y además también los procedimientos para la realización de los parámetros de desempeño, para después pasar a la realización experimental de cada uno de ellos y proceder a la redacción del informe de validación. (Ver capítulo V)

A continuación se presenta la realización de cada parámetro de desempeño establecido en el protocolo de validación:

4.7 Evaluación de los parámetros de desempeño del método

4.7.1 Exactitud₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

La exactitud del método se desarrolló analizando tres niveles de concentraciones de azúcar fortificado con el estándar palmitato de retinol, con concentraciones de 10 ppm, 15 ppm y 20 ppm, cada uno de estos por triplicado, realizando así nueve determinaciones en total, calculando el porcentaje de recobro y además se realizó un estudio de distribución de t student con una concentración de muestra de 15 ppm analizándola por diez veces en preparaciones independientes.

Procedimiento:

a) Se preparó una mezcla de palmitato de retinol mas azúcar a una concentración de 10 ppm de vitamina A, a partir del estándar de palmitato de retinol el cual contiene 277000 UI de vitamina A realizando los respectivos cálculos:

El palmitato de retinol según el certificado de análisis rotula 277000 UI de vitamina A (ver anexo N°4), para convertir estas unidades internacionales a microgramos se realiza de la siguiente conversión:

$$277000 \text{ UI} \times \frac{1 \mu\text{g vitamina A}}{3.33 \text{ UI}} = 83183.18 \mu\text{g vitamina A/g St}$$

Planteamiento para determinar la cantidad de estándar a adicionar por gramo de azúcar moreno para una concentración de 10 ppm.

83183.18 μg vitamina A ----- 1 g estándar

10 μg vitamina A ----- X

$$X = 0.000120 \text{ g estándar / g de muestra}$$

Determinación de estándar para adicionar a 100 gramos de muestra de azúcar moreno:

0.000120 g estándar ----- 1 g de muestra

X ----- 100 g de muestra

$$X = 0.012 \text{ g de estándar para una concentración de 10 ppm}$$

Posteriormente se pesó los 0.012 g de palmitato de retinol en balanza analítica y se le agregó a una cantidad de 99.988 g de azúcar moreno y se mezcló por varios minutos.

Así posteriormente se realizaron los cálculos similares a lo anterior para las demás concentraciones de 15 ppm y 20 ppm que se utilizaron para el respectivo análisis.

El estudio de distribución t student se hizo analizando 10 muestras de azúcar crudo fortificado con vitamina A, a una concentración de 15 ppm en preparaciones independientes pero iguales a lo que se refiere el cálculo de adición del estándar el palmitato de retinol, con respecto a los del análisis del porcentaje de recobro.

- b) Se realizó a cada una de estas soluciones el tratamiento de la muestra según el procedimiento para la cuantificación de vitamina A por espectrofotometría ultravioleta / visible. Ver 4.5.1
- c) Se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 325 nm.
- d) Se calculó la cantidad de vitamina A, a través de la ecuación de la curva de calibración, el porcentaje de recobro y el contraste “t” utilizando las formulas siguientes:

Ecuación de la curva de calibración

$$\hat{y} = bx + a$$

Porcentaje de recobro (2)(10)(12)(20)

$$\%R = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} \times 100$$

Media (2)(10)(12)(20)

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

Desviación estándar (2)(10)(12)(20)

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

%Coeficiente de variación (2)(10)(12)(20)

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

Varianza (2)(10)(12)(20)

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Estadístico t (2)(10)(12)(20)

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

4.7.2 Precisión del método (2)(10)(12)(20)– **Repetibilidad y Precisión Intermedia**

Se realizó con la preparación de azúcar fortificada con el estándar correspondiente a 15 ppm de vitamina A, esta se analizó diez veces en replicas independientes de la muestra, manteniendo las condiciones de: día, analista, materiales y equipos. La determinación de la repetibilidad del método se realizó con el cálculo del porcentaje de coeficiente de variación de las respuestas obtenidas.

Procedimiento:

- a) Se preparó una mezcla de azúcar crudo con palmitato de retinol a una concentración de 15 µg/g de vitamina A (15 ppm) a partir del estándar de palmitato de retinol el cual contiene 277000 UI de vitamina A realizando los respectivos cálculos:

El palmitato de retinol según el certificado de análisis rotula 277000 UI de vitamina A (ver anexo N°4), para convertir estas unidades internacionales a microgramos se realiza de la siguiente conversión:

$$277000 \text{ UI} \times \frac{1 \mu\text{g vitamina A}}{3.33 \text{ UI}} = 83183.18 \mu\text{g vitamina A/g St}$$

Planteamiento para determinar la cantidad de estándar a adicionar por gramo de azúcar moreno para una concentración de 15 ppm.

$$\begin{array}{r} 83183.18 \mu\text{g vitamina A} \text{ ----- } 1 \text{ g estándar} \\ 15 \mu\text{g vitamina A} \text{ ----- } X \\ X = 0.000180 \text{ g estándar / g de muestra} \end{array}$$

Determinación de estándar para adicionar a 100 gramos de muestra de azúcar moreno:

$$\begin{array}{r} 0.000180 \text{ g estándar} \text{ ----- } 1 \text{ g de muestra} \\ X \text{ ----- } 100 \text{ g de muestra} \\ X = 0.018 \text{ g de estándar para una concentración de 15 ppm} \end{array}$$

Posteriormente se pesó los 0.018 g de palmitato de retinol en balanza analítica y se le agrego a una cantidad de 99.982 g de azúcar moreno y se mezcló por varios minutos, luego se continuo pesando hasta obtener la cantidad necesaria para realizar los respectivos análisis de repetibilidad y precisión intermedia.

- b)** Se realizó a cada una de estas concentraciones el tratamiento de la muestra según el procedimiento para cuantificación de vitamina A por espectrofotometría ultravioleta / visible. Ver 4.5.1
- c)** Se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 325nm.
- d)** Se calculó la cantidad de vitamina A y el porcentaje de coeficiente de variación utilizando las formulas siguientes:

Retinol ₍₄₎

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

Desviación estándar ₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

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

%Coeficiente de variación ₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

4.7.3 Linealidad– **Linealidad del método** ₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

Se hizo analizando la muestra con 5 concentraciones diferentes de vitamina A (5, 10, 15, 20 y 25 ppm) y analizándolas por triplicado, de esta manera se pudo elaborar la curva de calibración concentración vrs absorbancia. Se calculó la cantidad de vitamina A con la ecuación de la curva de calibración, el valor de la pendiente, la ordenada al origen, coeficiente de determinación, intervalo de confianza de la pendiente, intervalo de confianza para la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión.

Procedimiento:

a) Se preparó una solución de palmitato de retinol a una concentración de 5 ppm de vitamina A, a partir del estándar de palmitato de retinol el cual contiene 277000 UI de vitamina A realizando los respectivos cálculos:

El palmitato de retinol según el certificado de análisis rotula 277000 UI de vitamina A (ver anexo N°4), para convertir estas unidades internacionales a microgramos se realiza de la siguiente conversión:

$$277000 \text{ UI} \times \frac{1 \mu\text{g vitamina A}}{3.33 \text{ UI}} = 83183.18 \mu\text{g vitamina A/g St}$$

Planteamiento para determinar la cantidad de estándar a adicionar por gramo de azúcar moreno para una concentración de 5 ppm.

$$\begin{array}{l} 83183.18 \mu\text{g vitamina A} \text{ ----- } 1 \text{ g estándar} \\ 5 \mu\text{g vitamina A} \text{ ----- } X \\ X = 0.000060 \text{ g estándar / g de muestra} \end{array}$$

Determinación de estándar para adicionar a 100 gramos de muestra de azúcar moreno:

$$\begin{array}{l} 0.000060 \text{ g estándar} \text{ ----- } 1 \text{ g de muestra} \\ X \text{ ----- } 100 \text{ g de muestra} \\ X = 0.0060 \text{ g de estándar para una concentración de 5 ppm} \end{array}$$

Posteriormente se pesó los 0.0060 g de palmitato de retinol en balanza analítica y se le agregó a una cantidad de 99.994 g de azúcar moreno y se mezcló por varios minutos.

Así posteriormente se realizaron los cálculos similares a lo anterior para las demás concentraciones de 10,15, 20 y 25 $\mu\text{g/g}$ ó ppm que se utilizaron para el respectivo análisis.

- b)** Se realizó a cada una de estas soluciones el tratamiento de la muestra según el procedimiento para la cuantificación de vitamina A por espectrofotometría ultravioleta / visible. Ver 4.5.1

- c) Se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 325nm.
- d) Se calculó la cantidad de vitamina A con la ecuación de la curva de calibración, la pendiente, ordenada al origen, coeficiente de determinación, intervalo de confianza de la pendiente, intervalo de confianza para la ordenada al origen y coeficiente de variación de regresión utilizando las formulas siguientes:

Ecuación de la curva de calibración

$$\hat{y} = bx + a$$

Pendiente (2)(10)(12)(20)

$$b = \frac{\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})}{\sum(x - \bar{X})^2}$$

Ordenada al origen (2)(10)(12)(20)

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

Coeficiente de determinación (2)(10)(12)(20)

$$r^2 = \frac{[\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})]^2}{[\sum(x - \bar{X})^2][\sum(y - \bar{Y})^2]}$$

Intervalo de confianza de la pendiente (2)(10)(12)(20)

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

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

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

Intervalo de confianza de la ordenada del origen (2)(10)(12)(20)

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (x - \bar{X})^2}}$$

$$IC_{(a)} = a \pm t_{0.975, n-2} S_a$$

Coefficiente de variación de regresión (2)(10)(12)(20)

$$\%CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{Y}} \times 100$$

– Linealidad del sistema (2)(10)(12)(20)

Se hizo analizando la muestra con 5 concentraciones diferentes de vitamina A (5, 10, 15, 20 y 25 ppm) y analizándolas por triplicado, de esta manera se pudo elaborar la curva de calibración concentración vrs absorbancia. Se calculó la cantidad de vitamina A con la ecuación de la curva de calibración, el valor de la pendiente, coeficiente de determinación e intervalo de confianza de la pendiente.

Procedimiento:

- a) Se preparó una solución de palmitato de retinol en etanol absoluto a una concentración de 100 µg/mL de vitamina A (100 ppm) a partir del estándar de palmitato de retinol, el cual contiene 277000 UI de vitamina A realizando los respectivos cálculos:

El palmitato de retinol según el certificado de análisis rotula 277000 UI de vitamina A (ver anexo N°4), para convertir estas unidades internacionales a microgramos se realiza de la siguiente conversión:

$$277000 \text{ UI} \times \frac{1 \mu\text{g vitamina A}}{3.33 \text{ UI}} = 83183.18 \mu\text{g vitamina A/g St}$$

Planteamiento para determinar la cantidad de estándar para una concentración de 100 ppm.

$$\begin{array}{l} 83183.18 \mu\text{g vitamina A} \text{ ----- } 1 \text{ g estándar} \\ 100 \mu\text{g vitamina A} \quad \text{-----} \quad X \\ X = 0.0012 \text{ g estándar / mL} \end{array}$$

Determinación de la cantidad de estándar para un volumen de 250 mL de etanol absoluto:

$$\begin{array}{l} 0.0012 \text{ g estándar} \text{ ----- } 1 \text{ mL de etanol} \\ X \quad \text{-----} \quad 250 \text{ mL de etanol} \\ X = 0.30 \text{ g de estándar para una concentración de } 100 \mu\text{g/mL} \end{array}$$

- b)** Posteriormente se pesó los 0.30 g de palmitato de retinol en balanza analítica y se disolvió en 50 mL de etanol absoluto, se transfirió a un balón volumétrico de 250 mL, realizando lavados de etanol al beaker y adicionándolos al mismo balón, se homogenizó por 16 horas con agitación magnética a 60 RPM y se aforó.
- c)** Luego se realizaron los cálculos para hacer diluciones a partir de la solución madre para obtener las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g/mL}$ ó ppm que se utilizaron para el respectivo análisis.

Planteamiento de cálculo para obtener una solución de palmitato de retinol a una concentración de 25 ppm para un balón de 50 mL a partir de 100 ppm que es la solución madre.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Datos:

$$C1 = 100 \text{ ppm}$$

$$V1 = x$$

$$C2 = 25 \text{ ppm}$$

$$V2 = 50 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{C2V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{(25 \text{ ppm})(50 \text{ mL})}{100 \text{ ppm}} = 12.5 \text{ mL}$$

Se tomó una alícuota de 12.5 mL de la solución madre de 100 ppm con pipeta volumétrica y se transfirió un balón de 50 mL, se aforó con etanol absoluto para obtener una concentración de 25 ppm. Posteriormente se realizaron los cálculos similares como el anterior para las concentraciones de 5, 10, 15, y 20 ppm.

- e) Se hicieron las lecturas directas de cada una de las soluciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 325nm, llevando a cero de absorbancia con alcohol absoluto.
- f) Se calculó la cantidad de vitamina A con la ecuación de la curva de calibración, la pendiente, coeficiente de determinación e intervalo de confianza de la pendiente.

Ecuación de la curva de calibración

$$\hat{y} = bx + a$$

Pendiente (2)(10)(12)(20)

$$b = \frac{\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})}{\sum(x - \bar{X})^2}$$

Coefficiente de determinación (2)(10)(12)(20)

$$r^2 = \frac{[\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})]^2}{[\sum(x - \bar{X})^2][\sum(y - \bar{Y})^2]}$$

Intervalo de confianza de la pendiente (2)(10)(12)(20)

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

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

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

4.7.4 Limite de cuantificación (2)(10)(12)(20)

Para el desarrollo de este procedimiento se analizaron diez blancos de la muestra. Luego se calculó la media, la desviación estándar de los blancos de las respuestas obtenidas, la pendiente que es la obtenida mediante la linealidad del método, además se utilizó una constante para límite de cuantificación que es diez y al final el respectivo límite se calculó mediante una fórmula matemática.

Procedimiento:

- a) Se prepararon diez blancos de la muestra es decir azúcar crudo sin fortificar.
- b) Se realizó a cada uno de los blancos el tratamiento de la muestra según el procedimiento para la cuantificación de vitamina A por espectrofotometría ultravioleta /vis. Ver 4.5.1
- c) Se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 325nm.

- d) Se calculó la desviación estándar de los blancos y el límite de cuantificación utilizando las formulas siguientes:

Desviación estándar ₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

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

Límite de cuantificación ₍₁₀₎

$$LC = K \times S_{\text{blanco}} \times b$$

Donde:

LC: límite de cuantificación

K: constante para límite de cuantificación que es de diez (10)

S_{blanco} : desviación estándar de la respuesta de los diez blancos

b: pendiente de la recta de calibración de la linealidad del método

4.7.5 Intervalo /Rango ₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎

Este parámetro se estableció mediante el valor máximo cuantificable obtenido mediante la linealidad del método y el valor mínimo cuantificable obtenido en el límite de cuantificación, tomando en cuenta que este rango este dentro de lo establecido por la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.20.01:03 Azúcar. Especificaciones (ver anexo N° 10)

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se elaboró un estudio de validación para la determinación cuantitativa de vitamina A por espectrofotometría ultravioleta /visible en azúcar moreno, donde se puede observar el desarrollo y cumplimiento de los parámetros de desempeño detallados en el protocolo de validación, obteniendo resultados los cuales se realizaron e interpretaron en cada parámetro de estudio valiéndose de técnicas estadísticas y el uso de Microsoft Office Excel 2007 para el tratamiento estadístico y establecer al final el cumplimiento de cada uno de los parámetros de desempeños estudiados.

Se desarrollaron los procedimientos de operación de los parámetros de desempeño: exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, linealidad del método y sistema, límite de cuantificación e intervalo (rango); aplicando a cada uno de estos el método de estudio, y evaluados con sus respectivos criterios de aceptación por medio de técnicas estadísticas analíticas. ⁽⁹⁾

A continuación se presenta el desarrollo del proceso de validación del método de estudio el cual está comprendido por el protocolo de validación, la realización experimental de cada parámetro de desempeño aplicándolos al método de estudio y el respectivo informe de validación.

5.1 Protocolo de validación

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA EL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA A (RETINOL) EN AZÚCAR MORENO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA / VISIBLE. (PV-AZCE-01)		
Elaboro: Br. Néstor Manuel Luna	Superviso: Licda. Ivonne Arévalo	Autorizo: Licda. María Bercian
10/ENE/2013	21/ENE/22013	27/ENE/2013
Firma/Fecha Analista	Firma/Fecha Supervisora UES	Firma/Fecha Jefe de laboratorio de fabrica

1. OBJETIVO

Asegurar que el método analítico de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible sea confiable, a través de los parámetros de desempeño respectivos para su validación brindando evidencia objetiva de su cumplimiento.

2. ALCANCE

La validación del método se efectuara a partir del mínimo rango cuantificable que se establecerá atreves del límite de cuantificación hasta 25 ppm (mg/kg) de vitamina A.

3. RESPONSABILIDADES

Analista: Br. Néstor Manuel Luna Ventura

Jefe de laboratorio: Licda. María del Socorro Bercian

Supervisor: Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

4. PARAMETROS DE DESEMPEÑO A ESTUDIAR

Debido a que se trata de un método normalizado modificado, los parámetros a evaluar son:

- a) Exactitud
- b) Repetibilidad
- c) Precisión intermedia
- d) Linealidad del método

- e) Linealidad del sistema
- f) Limite de cuantificación
- g) Intervalo/Rango

5. MUESTRA

La muestra corresponde a azúcar crudo sin fortificar con vitamina A en el cual se tomara a través de un método interno de muestreo estático según la Comisión Internacional para la Unificación de los Métodos de Análisis de Azúcar (siglas en ingles ICUMSA) de la bodega N°1 del Ingenio Chaparrastique.

6. EQUIPOS INVOLUCRADOS EN LA VALIDACION

- Balanza Analítica METTLER TOLEDO AB204-5
- Balanza semianalítica METTLER TOLEDO PL3002
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible SHIMADZU UV MINI 1240
- Shaker THERMO SCIENTIFIC 4310
- Agitador Vortex MIXER VM2000
- Baño María STOMAS SCIENTIFIC TS6WN

Ver anexo N°5 los certificados de calibración de los equipos utilizados en la validación.

7. DESCRIPCION DEL METODO ANALITICO A VALIDAR

a) FUNDAMENTO

La muestra de azúcar se disuelve en agua caliente para disolver la matriz del compuesto de vitamina A. Luego se realiza una dilución 1:1 con hidróxido de sodio 0.1N para posteriormente realizar la extracción de palmitato de retinol en hexano. La concentración de retinol es determinada por absorbancia a 325nm.

b) PUNTOS CRÍTICOS Y PRECAUCIONES

Se recomienda el uso de tela negra para cubrir los tubos o balones que contienen retinol o utilizar cristalería color ámbar.

Este método no requiere de la incubación de la solución de azúcar, pero es crítico que el agua usada para disolver la muestra se encuentre a 85°C, para asegurar la completa disolución de la matriz del compuesto fortificante. Una vez que el palmitato de retinol se ha extraído en la fase orgánica, el análisis no debe interrumpirse. Además debe trabajarse rápidamente para evitar la evaporación de los solventes y la consiguiente concentración de las soluciones, se requieren campanas de extracción y si el laboratorio está localizado en zonas cálidas, el uso de aparatos de aire acondicionado. Se recomienda usar bulbos especiales para succionar solventes.

De acuerdo a la experiencia con este método en los laboratorios del INCAP, si la variabilidad entre las replicas extraídas de una misma solución de azúcar es tal que estas se aparten de su promedio en más del 5%, se rechazan los resultados y se repite la extracción.

c) ESTÁNDAR

Dry vitamina A palmitate 250 MS CWD (Ver anexo N°4)

d) MATERIALES

Nota: el material volumétrico a utilizar será de clase a.

- Agitador
- Balones volumétricos de 200.0, 250.0 y 500.0 mL
- Beaker de 50 y 250 mL
- Celda de cuarzo para espectrofotómetro de 1 cm
- Espátula de pesada
- Pipeta Pasteur
- Pipetas volumétricas de 2.0, 3.0, 5.0 y 8.0 mL
- Probeta de 100 ml
- Succionador de pipeta
- Tubos de ensayo de 20 mL, con tapón de rosca esmerilado o de rosca

e) REACTIVOS

- Etanol absoluto

- Fenolftaleína al 1%
- Hidróxido de sodio 0.1N
- n- Hexano

f) CONDICIONES AMBIENTALES

Todos los análisis de la validación se tienen que efectuar en las condiciones ambientales controladas como la temperatura y humedad del laboratorio que deben de ser adecuadas al método de análisis debido a que la vitamina A es susceptible a diversos factores que la pueden degradar.

g) MEDIDAS DE SEGURIDAD PARA LA PREPARACIÓN Y USO DE LOS REACTIVOS A UTILIZAR

- Utilizar el vestuario y equipo adecuado como gabacha, guantes de látex, mascarillas y lentes durante la preparación de los reactivos como para su uso.
- Aplicar todo lo que establece las buenas prácticas de laboratorio como las siguientes: no comer ni tomar bebidas dentro del laboratorio, no fumar, no utilizar celulares, utilizar zapatos cerrados, no utilizar reloj ni joyería entre otros.

h) PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Fenolftaleína 1% p/v

En un beaker de 50 mL pese exactamente 2.5 g de fenolftaleína y disuelva con aproximadamente 40 mL de etanol absoluto, transfiera la solución a un balón volumétrico de 250.0 mL, lave las paredes del beaker con pequeñas porciones de etanol adicionarlas al balón y llevar a marca de aforo con etanol absoluto.

Almacenamiento y expiración: Guardar en frasco oscuro en un lugar fresco, la solución es estable indefinidamente.

- Hidróxido de sodio 0.1N

En un beaker de plástico de 50 mL pesar 0.0125 g de hidróxido de sodio y disuelva con aproximadamente 40 mL de agua libre de CO₂, transfiera esta

solución a un balón volumétrico de 500.0 mL, lavar las paredes del beaker con pequeñas porciones de agua destilada libre de CO₂ adicionarlas al balón y aforar.

Almacenamiento y expiración: guardar en frascos de polietileno en un lugar fresco separado de ácidos, la solución es estable por aproximadamente 6 meses.

i) PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

Para la preparación de los estándares de vitamina A se inicio a partir del contenido de vitamina A en el palmitato de retinol según el certificado de análisis que rotula 277000 UI (ver anexo N^o4), para convertir estas unidades internacionales a microgramos se realiza de la siguiente conversión:

$$277000 \text{ UI} \times \frac{1 \mu\text{g vitamina A}}{3.33 \text{ UI}} = 83183.18 \mu\text{g vitamina A/g St}$$

Planteamiento para determinar la cantidad de estándar a adicionar por gramo de azúcar moreno para una concentración de 15 ppm.

83183.18 μg vitamina A ----- 1 g estándar

15 μg vitamina A ----- X

$$X = 0.000180 \text{ g estándar / g de muestra}$$

Determinación de estándar para adicionar a 100 gramos de muestra de azúcar moreno:

0.000180 g estándar ----- 1 g de muestra

X ----- 100 g de muestra

$$X = 0.018 \text{ g de estándar para una concentración de 15 ppm}$$

CONCENTRACIONES DE ESTÁNDAR PARA CADA UNO DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO:

– EXACTITUD

Para 10 ppm (67%): pesar 0.0120 g del estándar de vitamina A y agregarlo a 99.988 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

Para 15 ppm (100%): pesar 0.018 g del estándar de vitamina A y agregarlo a 99.982 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

Para 20 ppm (133%): pesar 0.024 g del estándar de vitamina A y agregarlos a 99.976 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

– REPETIBILIDAD Y PRECISION INTERMEDIA

Para 15 ppm (100%): pesar 0.018 g del estándar de vitamina A y agregarlo a 99.982 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

– LINEALIDAD DEL METODO

Para 5 ppm (33.33%): pesar 0.0060 g del estándar de vitamina A y agregarlo a 99.994 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

Para 10 ppm (67%): pesar 0.0120 g del estándar de vitamina A y agregarlo a 99.988 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

Para 15 ppm (100%): pesar 0.018 g del estándar de vitamina A y agregarlo a 99.982 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

Para 20 ppm (133%): pesar 0.024 g del estándar de vitamina A y agregarlos a 99.976 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

Para 25 ppm (166.66%): pesar 0.030 g del estándar de vitamina A y agregarlos a 99.970 g de azúcar moreno mezclándola varias veces.

– LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se preparo una solución de palmitato de retinol en etanol absoluto a una concentración de 100 µg/mL de vitamina A (100ppm) a partir del estándar de

palmitato de retinol, el cual contiene 277000 UI de vitamina A realizando los respectivos cálculos:

El palmitato de retinol según el certificado de análisis rotula 277000 UI de vitamina A (ver anexo N°4), para convertir estas unidades internacionales a microgramos se realiza de la siguiente conversión:

$$277000 \text{ UI} \times \frac{1 \mu\text{g vitamina A}}{3.33 \text{ UI}} = 83183.18 \mu\text{g vitamina A/g St}$$

Planteamiento para determinar la cantidad de estándar para una concentración de 100 ppm.

83183.18 μg vitamina A ----- 1 g estándar

100 μg vitamina A ----- X

$$X = 0.00120 \text{ g estándar / mL}$$

Determinación de la cantidad de estándar para un volumen de 250 mL de etanol absoluto:

0.00120 g estándar ----- 1 mL de etanol

X ----- 250 mL de etanol

$$X = 0.30 \text{ g de estándar para una concentración de } 100 \mu\text{g/mL}$$

A partir de esta solución madre se prepararon las siguientes muestras a través de diluciones:

Planteamiento de cálculo para obtener una solución de palmitato de retinol a una concentración de 25 ppm para un balón de 50 mL a partir de 100 ppm que es la solución madre.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Datos:

$$C_1 = 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = x$$

$$C_2 = 25 \text{ ppm}$$

$$V_2 = 50 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(25 \text{ ppm})(50 \text{ mL})}{100 \text{ ppm}} = 12.5 \text{ mL}$$

Se tomo una alícuota de 12.5 mL de la solución madre de 100 ppm con pipeta volumétrica y se transfirió un balón de 50 mL, se aforo con etanol absoluto para obtener una concentración de 25 ppm.

Para 5 ppm (33.33%): Pipetear 2.5 mL de la solución madre, transferirlo a un balón volumétrico de 50.0 mL y aforar con alcohol absoluto.

Para 10 ppm (67%): Pipetear 5.0 mL de la solución madre, transferirlo a un balón volumétrico de 50.0 mL y aforar con alcohol absoluto.

Para 15 ppm (100%): Pipetear 7.5 mL de la solución madre, transferirlo a un balón volumétrico de 50.0 mL y aforar con alcohol absoluto.

Para 20 ppm (133%): Pipetear 10.0 mL de la solución madre, transferirlo a un balón volumétrico de 50.0 mL y aforar con alcohol absoluto.

Para 25 ppm (166.66%): Pipetear 12.5 mL de la solución madre, transferirlo a un balón volumétrico de 50.0 mL y aforar con alcohol absoluto.

j) PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Homogenizar la muestra de azúcar crudo fortificado mezclándola varias veces.

2. En un beaker de 250 mL pesar 100 g de azúcar, registrando el peso exacto a centésimos de gramo y disuelva con aproximadamente 100 mL de agua destilada caliente a 85°C. Agitar hasta que todo el azúcar se disuelva completamente.
3. Preparar un blanco de reactivos solamente con agua destilada caliente y llevándola a través de los mismos pasos del procedimiento que la muestra.
4. Enfriar las soluciones, asegurándose que estén cubiertas con papel aluminio o utilizando cristalería color ámbar en un ambiente oscuro o luz amarilla.
5. Transferir cuantitativamente a un balón volumétrico color ámbar de 250.0 mL. Lavar varias veces el beaker con pequeñas porciones de agua destilada y transfiera los lavados al balón. Aforar a 250.0 mL con agua destilada y homogenizar.

k) PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

1. Transferir 5.0 mL de la solución preparada de la muestra a dos tubo de ensayo de 20 mL (con tapón esmerilado o de rosca).
2. Agregar 5.0 mL de hidróxido de sodio 0.1 N a cada tubo y mezcle en un agitador tipo Vortex por 30 segundos.
3. En otros dos tubos de ensayo de 20 mL (con tapón esmerilado o de rosca), coloque 2.0 mL de la solución obtenida de cada tubo del paso (g). Agregar 2-3 gotas de fenolftaleína 1% p/v, agregue 3.0 mL de etanol absoluto a cada tubo. Mezcle en agitador tipo Vortex por 5 segundos.
4. Medir 3.0 mL de hexano con una pipeta volumétrica y luego agregar cuidadosamente a cada uno de los tubos del paso (h). Cierre cada tubo inmediatamente y agite vigorosamente en el agitador Vortex por 1 minuto, para asegurar la extracción completa del retinol. Destape ligeramente los tubos para aliviar la presión de gas, la fase acuosa es de color fucsia mientras que la fase orgánica es incolora.

5. Nota: realizar por duplicado la extracción con hexano a partir de la muestra patrón del balón volumétrico de 250.0 mL.
6. Ajustar a cero de absorbancia el espectrofotómetro con hexano. A mayor brevedad posible transfiera la solución de hexano a una celda de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz con una pipeta Pasteur. Lea la absorbancia del blanco y de la muestra a 325 nm.

CALCULO

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

$$\text{Palmitato de retinol (mg/kg)} = \frac{\text{Abs}_{\text{corregida}}}{\epsilon} \times \frac{\text{Vh}}{\text{Vaz}} \times \frac{\text{VI}}{\text{P}} \times \frac{\text{D}}{\text{R}}$$

En donde:

- Absorbancia corregida = $\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$
- Absorbancia del blanco debería de ser menor de 0.050.
- Parámetros de la ecuación ver cuadro N°4

Cuadro N°4: Parámetros de la ecuación de palmitato de retinol.

PARAMETRO	EXPLICACION	VALOR
ϵ	Coeficiente de absorptividad del palmitato de retinol en hexano($\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mL}$)	0.092
Vh	Volumen de la fase orgánica(mL)	3.0
Vaz	Volumen de la alícuota analizada de la solución de azúcar (mL)	2.0
VI	Volumen inicial de la muestra(mL)	250.0
P	Peso de la muestra(g)	Según lo pesado
R	Recuperación	0.905
D	Dilución(5/10)	2

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

La ecuación anterior se simplifica a:

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

8. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

Tabla N°1: Procedimientos para la determinación de los parámetros de desempeño y criterios de aceptación

PARAMETROS DE DESEMPEÑO	METODOLOGIA	CRITERIO
<p>1. EXACTITUD</p>	<p>Se efectuara 10 replicas del material de referencia (estándar mas azúcar) a una concentración de 15 ppm (100%) en preparaciones independientes usando el método de estudio.</p> <p>La exactitud del método se realizara agregando cantidades del estándar al azúcar crudo (al 100% de su peso establecido en el método), para obtener niveles de concentración del 10 ppm (67%), 15 ppm (100%) y 20 ppm (133%) de las concentraciones teóricas de la muestra.</p> <p>Se evaluaron tres niveles de concentración, cada uno de estos por triplicado, realizando así 9 determinaciones en total.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Que no exista diferencia significativa entre las media obtenidas de las dos variables de estudio para un nivel de confianza del 95% - El porcentaje de recobro debe estar entre el 80 – 110%

Tabla N°1: Continuación

PARAMETROS DE DESEMPEÑO	METODOLOGIA	CRITERIO
2. REPETIBILIDAD	<p>El analista titular efectuara 10 replicas independientes de muestra en la matriz en estudio que es 15 ppm (100%) en las mismas condiciones operativas.</p> <p>Calcular el coeficiente de variación.</p>	<p>– El porcentaje de coeficiente de variación no debe superar el 7.3%</p>

Tabla N°1: Continuación

PARAMETROS DE DESEMPEÑO	METODOLOGIA	CRITERIO
3. PRECISION INTERMEDIA	<p>El analista sustituto efectuara 10 replicas independientes de muestra en la matriz en estudio que es 15 ppm (100%) en distinto tiempo.</p> <p>Calcular el coeficiente de variación de las dos series de datos (analista titular y suplente)</p>	<p>– El porcentaje de coeficiente de variación no debe superar el 7.3%</p>

Tabla N°1: Continuación

PARAMETROS DE DESEMPEÑO	METODOLOGIA	CRITERIO
4. LINEALIDAD DEL METODO	Se realizaran por triplicado 5 niveles de concentración del estándar mas muestra, en preparaciones independientes de 5 ppm (33.33%), 10 ppm (67%), 15 ppm (100%), 20 ppm (133%), 25 ppm (166.66%). Utilizando el método de estudio.	<ul style="list-style-type: none"> - El $r^2 \geq 0.98$ - El $IC_{(b)}$, el valor de la pendiente debe incluirse dentro de su intervalo. - El $IC_{(a)}$, el valor de la ordenada debe incluirse dentro de su intervalo. - El %CVy/x, no mayor de 3%.

Tabla N°1: Continuación

PARAMETROS DE DESEMPEÑO	METODOLOGIA	CRITERIO
5. LINEALIDAD DEL SISTEMA	Se realizaran por triplicado 5 niveles de concentración del estándar, en preparaciones independientes 5 ppm (33.33%), 10 ppm (67%), 15 ppm (100%), 20 ppm (133%), 25 ppm (166.66%). Utilizando el método de estudio.	<ul style="list-style-type: none"> - El $r^2 \geq 0.98$ - El $IC_{(b)}$, el valor de la pendiente debe incluirse dentro de su intervalo.

Tabla N°1: Continuación

PARAMETROS DE DESEMPEÑO	METODOLOGIA	CRITERIO
<p>6. LIMITE DE CUANTIFICACION</p>	<p>Se analizara una serie de blancos de la muestra (n=10) y se calculó la media, la desviación estándar del blanco de las respuestas obtenidas.</p> <p>Con corrección de la lectura frente al blanco en los que la lectura problema se obtiene por comparación con un blanco.</p> $LC = K \times S_{blanco} \times b$ <p>Donde:</p> <p>LC: limite de cuantificación K: Constante que para limite de cuantificación es 10 S_{blanco}: desviación estándar de la respuesta de los n blancos. b: pendiente de la recta de calibración de linealidad del método.</p>	<p>– N/A</p>

Tabla N°1: Continuación

PARAMETROS DE DESEMPEÑO	METODOLOGIA	CRITERIO
7. INTERVALO / RANGO	Este parámetro se establecera determinado el valor máximo cuantificable de la linealidad del método y el valor mínimo del límite de cuantificación.	– Debe de incluir la concentración inferior y superior del analito, con adecuada precisión, exactitud y linealidad.

9. REFERENCIAS

- Aguirre Ortega L, Garcia Garcia J, Garcia Junca T, Martin Pomar M, Mateos Perez B, Illera Fontanet M, et at., Validación de métodos analíticos; Barcelona. España. Marzo 2001.Pag. 45-96
- Arroyave G. y Dary O. Manual para la fortificación de azúcar con vitamina A; Determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada. Parte 3. 2ª edición, USAID/OMNI-INCAP/OPS, 1997. Pág. 13-17
- CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), guía técnica; validación de métodos analíticos fisicoquímicos. 2010

5.2 Evaluación de los parámetros de desempeño para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

5.2.1 Determinación de la exactitud del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible

La exactitud del método se realizó determinando el porcentaje de recobro y la veracidad del método, de la siguiente manera:

5.2.1.1 Porcentaje de recobro₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

Se prepararon tres concentraciones de muestra más estándar a concentraciones conocidas de vitamina A (10, 15 y 20 ppm) y analizadas por triplicado realizando así nueve determinaciones en total. Se calculó la cantidad de vitamina A por medio de la ecuación de recta de calibración y el porcentaje de recobro, utilizando las siguientes formulas:

- **Ecuación de la curva de calibración (ver anexo N°3):**

$$\hat{y} = 48.827x - 0.4148$$

- **Porcentaje de recobro:**

$$\%R = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} \times 100$$

Tabla N°2: Resultados del porcentaje de recobro para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible

N° de replica	y(cantidad adicionada de vitamina A)	x ₁ (Abs1)	x ₂ (Abs2)	\bar{X} (promedio abs)	\hat{y} (cantidad recuperada de vitamina A)	% Recobro
1	10	0.213	0.219	0.216	10.132	101.3
2	10	0.215	0.219	0.217	10.181	102.8
3	10	0.218	0.216	0.217	10.181	102.8
1	15	0.306	0.311	0.309	14.648	97.7
2	15	0.309	0.310	0.310	14.697	98.0
3	15	0.309	0.314	0.312	14.795	98.6
1	20	0.412	0.409	0.411	19.629	98.1
2	20	0.419	0.422	0.421	20.117	100.6
3	20	0.415	0.406	0.411	19.629	98.1
	Abs blanco	0.005			Promedio	99.7

La tabla N°2 muestra los resultados de tres niveles de concentración analizadas cada una por triplicado, en el mismo día por el mismo analista e instrumento. Se muestra la cantidad de vitamina A encontrada experimentalmente a partir de una teórica y el porcentaje de recobro de los análisis.

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos para la replica N°1:

– Media aritmética

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2}{2}$$

$$\bar{X} = \frac{0.213 + 0.219}{2} = 0.216$$

- Ecuación de la recta de calibración

$$\hat{y} = 48.827x - 0.4148$$

$$\hat{y} = (48.827)(0.216) - 0.4148 = 10.132$$

- Porcentaje de recobro:

$$\%R = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} \times 100$$

$$\%R = \frac{10.132}{10} \times 100 = 101.3\%$$

El valor obtenido como el porcentaje de recobro para cada uno de las replicas analizadas cumplen con respecto al criterio de aceptación ya que están dentro del rango de trabajo de recobro del 80%-110% para la identificación de analito en proporción de 10^{-5} según las tablas del porcentaje de recuperación del CONACYT (ver anexo N° 7)

5.2.1.2 Veracidad del método₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

El estudio se realizó analizando 10 replicas del material de referencia en este caso azúcar crudo mas el estándar de vitamina A, a una única concentración de 15 ppm en preparaciones independientes. Se calculó el estudio probabilístico de t de student utilizando las siguientes formulas:

Media:

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

Varianza:

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Estadístico t:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Tabla N°3: Resultados de la veracidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible

Muestra	y(cantidad adicionada de vitamina A)ppm	x_1 (Abs1)	x_2 (Abs2)	\bar{X} (Promedio abs)	y_1 (Vit A1) ppm	y_2 (Vit A2) ppm	Y_1 (Promedio Vit A)	$(Y-\bar{Y})^2$	Y_2 Est Vit A ppm
1	15	0.318	0.315	0.316	15.37	15.25	15.31	0.07185	15
2	15	0.311	0.305	0.308	15.03	14.75	14.89	0.02250	15
3	15	0.309	0.311	0.310	14.93	15.05	14.99	0.00267	15
4	15	0.305	0.311	0.308	14.75	15.03	14.89	0.02250	15
5	15	0.315	0.320	0.317	15.25	15.47	15.36	0.10064	15
6	15	0.306	0.314	0.310	14.80	15.20	15.00	0.00155	15
7	15	0.316	0.316	0.315	15.27	15.27	15.27	0.05344	15
8	15	0.303	0.305	0.304	14.66	14.73	14.69	0.12023	15
9	15	0.304	0.309	0.306	14.71	14.93	14.82	0.05008	15
10	15	0.316	0.312	0.314	15.27	15.10	15.19	0.02105	15
	Abs blanco	0.005				Suma	150.40	0.46650	150
						Promedio	15.04		15
						Desvest	0.2276		
						%CV	1.51		

Tabla N°4: Resultados de la veracidad del método a través del estudio probabilístico de t student suponiendo varianzas desiguales para dos muestras.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Variable 1 (Muestra)	Variable 2 (Estándar)
Media	15.040	15
Varianza	0.0518	0
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	-
Estadístico t	0.5556	-
Valor crítico de t (dos colas)	2.2622	-

La tabla N°3 muestra los resultados de las diez replicas del material de referencia, realizadas el mismo día por el mismo analista e instrumento. Se muestra la cantidad de vitamina A encontrada experimentalmente a partir de una teórica, el promedio de vitamina A, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación.

La tabla N°4 muestra los resultados del estudio probabilístico t Student de dos colas para dos muestras suponiendo varianzas desiguales. Se muestra la media obtenida de la tabla N°3, la varianza, el estadístico t y el valor crítico de t para dos colas que es un valor teórico (ver anexo N°8) para un numero de muestra de nueve (10-1) y utilizando un nivel de significancia (α) del 5%(0.05) establecido para proyectos de investigación experimental.

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

- Media aritmética

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2}{2}$$

$$\bar{X} = \frac{0.318 + 0.315}{2} = 0.31625$$

– Retinol

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = 0.318 - 0.005 \times \frac{4918.33}{100} = 15.37$$

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = 0.315 - 0.005 \times \frac{4918.33}{100} = 15.25$$

$$\bar{Y} = \frac{15.37 + 15.25}{2} = 15.31$$

– Promedio de los 10 datos de vitamina:

$$\bar{Y} = \frac{15.31 + 14.89 + 14.99 + 14.89 + 15.36 + 15.0 + 15.27 + 14.69 + 14.82 + 15.19}{10}$$

$$\bar{Y} = 15.04$$

– Desviación estándar

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

$$S = \sqrt{\frac{0.46650}{9}} = 0.2276$$

– %Coeficiente de variación

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

$$\%CV = \frac{0.22767}{15.04} \times 100 = 1.51$$

– Varianza para la muestra

$$S^2 = \frac{\sum(y - \bar{Y})^2}{(n - 1)}$$

$$S^2 = \frac{0.46650}{9} = 0.0518$$

– Varianza promedio de muestra y estándar

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_{mx}^2 + (n_2 - 1)S_{St}^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$S_p^2 = \frac{9(0.051833) + 0}{18} = 0.0259$$

– Estadístico t

$$t = \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\sqrt{S_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

$$t = \frac{15.04 - 15.0}{\sqrt{0.0259165 \left(\frac{1}{10} + \frac{1}{10} \right)}} = 0.5556$$

– Valor crítico de dos colas

Para 9 grados de libertad, con un nivel de significancia de 5% (0.05), en la tabla de t-Student para dos colas encontramos el valor crítico de 2.2622. (Ver Anexo N°8)

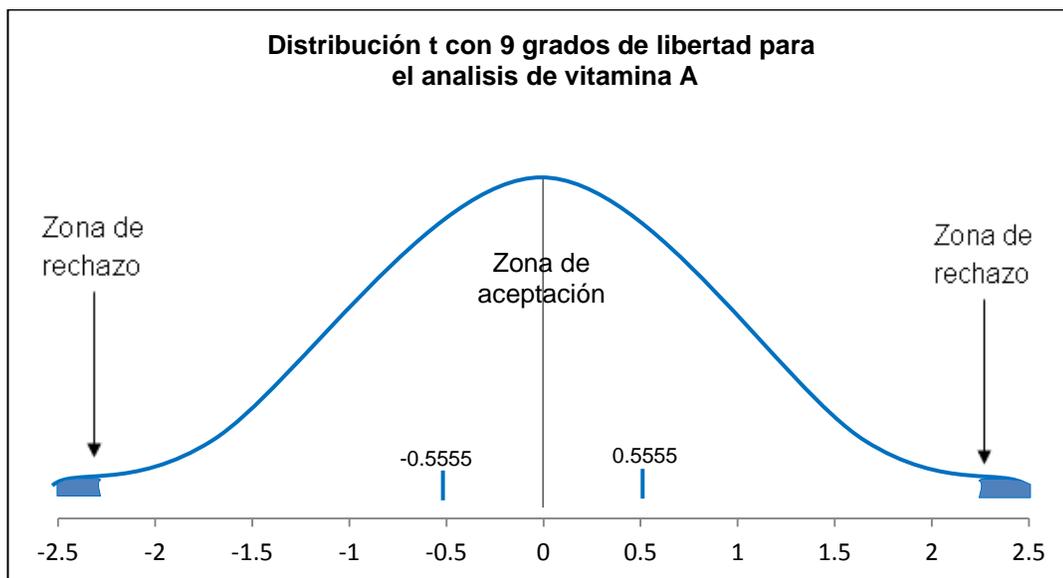


Figura N° 1: Campana de gauss para la distribución de 2 colas del estudio de veracidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible.

Según los resultados obtenidos en el estudio estadístico t-Student se inicia con la prueba de hipótesis, para comparar la media encontrada contra el valor estándar de referencia a través de varios pasos que se presentan a continuación:

a) Paso 1: establecimiento de hipótesis

Ho: valor de la media encontrada del estándar igual al valor del estándar de referencia

Hi: valor de la media encontrada del estándar diferente al valor estándar de referencia

b) Paso 2: establecimiento de la significancia

Alfa (α) = 0.05 es decir, se trabajara con un nivel de confianza del 95%

c) Paso 3: el estadístico a utilizar

Será t-Student ya que tenemos menos de 30 datos, las varianzas de la muestra y el estándar son diferentes. Utilizamos Excel, prueba de hipótesis t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.

d) Paso 4: establecimiento del criterio

Rechazamos H_0 si $|t| > t_{\alpha, n-1}$

Rechazamos la H_0 , si el estadístico t es mayor al valor crítico de t para dos colas con un nivel de confianza del 95%.

e) Paso 5: decisión

En este caso se acepta la hipótesis nula (H_0), ya que el valor estadístico t (0.5556), es menor que el valor crítico de t de dos colas (± 2.2622), por lo que se establece que no existen diferencias significativas entre el valor de la media encontrada del estándar y el valor teórico del estándar de referencia.

5.2.2 Determinación de la precisión (repetibilidad y precisión intermedia) del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible

5.2.2.1 Repetibilidad (2)(10)(12)(20)

La evaluación de la repetibilidad se realizó por el analista, en el mismo día y mismos instrumentos preparando diez replicas independientes de muestra a una concentración de 15 ppm. Se calculó la cantidad de vitamina A en forma de retinol, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación, utilizando las siguientes formulas:

Retinol:

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

Desviación estándar:

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

%Coeficiente de variación

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

Tabla N°5: Resultados de repetibilidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

N° de replicas	Concentración teórica (ppm)	x ₁ (Abs 1)	x ₂ (Abs 2)	y ₁ (Vit A 1)	y ₂ (Vit A 2)	Y (promedio de Vit A)	(Y- \bar{Y}) ²
1	15	0.332	0.336	15.94	16.13	16.03	0.0305
2	15	0.344	0.351	16.53	16.87	16.70	0.2395
3	15	0.322	0.326	15.44	15.64	15.54	0.4441
4	15	0.358	0.358	17.21	17.21	17.21	1.0116
5	15	0.335	0.343	16.08	16.48	16.28	0.0051
6	15	0.35	0.353	16.82	16.97	16.89	0.4707
7	15	0.318	0.318	15.25	15.25	15.25	0.9245
8	15	0.327	0.321	15.69	15.39	15.54	0.4441
9	15	0.351	0.352	16.87	16.92	16.89	0.4707
10	15	0.326	0.33	15.64	15.84	15.74	0.2206
	Abs blanco	0.008			Sumatoria	162.08	4.2616
					\bar{Y} Promedio	16.21	
					Desv Est	0.69	
					%CV	4.25	

La tabla N°5 muestra los resultados de las diez replicas de la muestra a una misma concentración de 15 ppm analizadas, en el mismo día por el mismo analista e instrumento. Se muestra la cantidad de vitamina A encontrada experimentalmente, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación. A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos para el análisis N°1:

– Retinol

$$\text{Retinol (mg/kg)} = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

$$\text{Retinol (mg/kg)} = 0.332 - 0.008 \times \frac{4918.33}{100g} = 15.94$$

$$\text{Retinol (mg/kg)} = 0.336 - 0.008 \times \frac{4918.33}{100g} = 16.13$$

– Media aritmética

$$\bar{Y} = \frac{y_1 + y_2}{2}$$

$$\bar{Y} = \frac{15.94 + 16.13}{2} = 16.03$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{162.08}{10}$$

$$\bar{Y} = 16.21$$

$$(Y - \bar{Y})^2 = (16.03 - 16.21)^2 = 0.030485$$

$$\sum (Y - \bar{Y})^2 = 4.2616$$

- Desviación estándar

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

$$S = \sqrt{\frac{4.2616}{(10 - 1)}} = 0.69$$

- % Porcentaje de coeficiente de variación

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

$$\%CV = \frac{0.69}{16.21} \times 100 = 4.25\%$$

El valor obtenido con el porcentaje del coeficiente de variación del análisis de la repetibilidad del método es un valor aceptable ya que es menor del 7.3% el cual es un valor propuesto por el CONACYT en relación a la concentración del analito, para el análisis de identificación de principios activos en trazas para una proporción del 10^{-5} en el rango de unidades de 10 ppm. (Ver anexo N°7)

5.2.2.2 Precisión intermedia₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

La evaluación de la precisión intermedia se realizó con diferente analista y en tiempo diferente, el resto de condiciones se mantuvieron. Se prepararon diez replicas independientes de muestra a una concentración de 15 ppm. Los cálculos se realizaron con los datos de la repetibilidad y los obtenidos de la precisión intermedia encontrando la cantidad de vitamina A en forma de retinol,

la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación, utilizando las siguientes formulas:

Retinol:

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

Desviación estándar:

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

%Coeficiente de variación

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

Tabla N°6: Resultados de precisión intermedia del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

N° de replicas	Concentración teórica (ppm)	X ₁ (Abs 1)	X ₂ (Abs 2)	Y ₂ (Vit A 2)	Y ₂ (Vit A 2)	Y (promedio de Vit A)	(Y- \bar{Y}) ²
1	15	0.320	0.314	15.44	15.15	15.30	0.6467
2	15	0.338	0.340	16.33	16.43	16.38	0.0772
3	15	0.326	0.325	15.74	15.69	15.71	0.1491
4	15	0.325	0.322	15.69	15.54	15.62	0.2347
5	15	0.328	0.335	15.84	16.18	16.01	0.0083
6	15	0.320	0.318	15.44	15.35	15.39	0.4981
7	15	0.320	0.321	15.44	15.49	15.47	0.3994
8	15	0.330	0.336	15.94	16.23	16.08	0.0003
9	15	0.342	0.346	16.53	16.72	16.62	0.2744
10	15	0.342	0.335	16.53	16.18	16.35	0.0642
11	15	0.332	0.336	16.03	16.23	16.13	0.0010
12	15	0.344	0.351	16.62	16.97	16.80	0.4843
13	15	0.322	0.326	15.54	15.74	15.64	0.2115
14	15	0.358	0.358	17.31	17.31	17.31	1.4698
15	15	0.335	0.343	16.18	16.57	16.38	0.0772
16	15	0.35	0.353	16.92	17.07	16.99	0.7969
17	15	0.318	0.318	15.35	15.35	15.35	0.5700
18	15	0.327	0.321	15.79	15.49	15.64	0.2115
19	15	0.351	0.352	16.97	17.02	16.99	0.7969
20	25	0.326	0.33	15.74	15.94	15.84	0.0692
	Abs blanco	0.006			Sumatoria	322.00	7.0406
					\bar{Y} Promedio	16.10	
					Desv Est	0.61	
					%CV	3.8	

La tabla N°6 muestra los resultados de las diez replicas de la muestra de la precisión intermedia y los diez de la repetibilidad a una misma concentración de 15 ppm analizadas en diferente día y por analista diferente. Se muestra la cantidad de vitamina A encontrada experimentalmente, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación.

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos para el análisis N°1:

– Retinol

$$\text{Retinol (mg/kg)} = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

$$\text{Retinol (mg/kg)} = 0.320 - 0.006 \times \frac{4918.33}{100g} = 15.44$$

$$\text{Retinol (mg/kg)} = 0.314 - 0.006 \times \frac{4918.33}{100g} = 15.15$$

– Media aritmética

$$\bar{Y} = \frac{y_1 + y_2}{2}$$

$$\bar{Y} = \frac{15.44 + 15.15}{2} = 15.30$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{322.0}{20}$$

$$\bar{Y} = 16.10$$

$$(Y - \bar{Y})^2 = (15.30 - 16.10)^2 = 0.6467$$

$$\sum (Y - \bar{Y})^2 = 7.0406$$

- Desviación estándar

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

$$S = \sqrt{\frac{7.0406}{(20 - 1)}} = 0.61$$

- % Porcentaje de coeficiente de variación

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

$$\%CV = \frac{0.61}{16.10} \times 100 = 3.8\%$$

El valor obtenido con el porcentaje de coeficiente de variación para el análisis de la precisión intermedia es un valor aceptable ya que es menor del 7.3% el cual es un valor propuesto por el CONACYT en relación a la concentración del analito, para el análisis de identificación de principios activos en trazas para una proporción del 10^{-5} en el rango de unidades de 10 ppm. (Ver anexo N°7)

5.2.3 Determinación de la linealidad del método y del sistema para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible

5.2.3.1 Linealidad del método₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

Se hizo analizando cinco concentración de 5, 10, 15, 20 y 25 ppm de la muestra de azúcar crudo fortificado con vitamina A, analizándolas por triplicado de esta manera se pudo elaborar la curva de calibración concentración vrs absorbancia. Se calculó la cantidad de vitamina A por medio de la ecuación de la curva de

calibración, el valor de la pendiente, la ordenada al origen, coeficiente de determinación, intervalo de confianza de la pendiente, intervalo de confianza para la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión utilizando las siguientes formulas:

Ecuación de la curva de calibración para determinar la cantidad de vitamina A (ver anexo N°3):

$$\hat{y} = 48.827x - 0.4148$$

Pendiente:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})}{\sum(x - \bar{X})^2}$$

Ordenada al origen:

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

Coeficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})]^2}{[\sum(x - \bar{X})^2][\sum(y - \bar{Y})^2]}$$

Intervalo de confianza de la pendiente:

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

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

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

Intervalo de confianza de la ordenada del origen:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (x - \bar{X})^2}}$$

$$IC_{(a)} = b_a \pm t_{0.975, n-2} S_a$$

Coeficiente de variación de regresión:

$$\%CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\hat{y}} \times 100$$

Tabla N°7: Resultados de la linealidad del método para la cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

N° de replica	y (concentración teórica de vitA)	x ₁ (Abs1)	x ₂ (Abs2)	X (Abs promedio)	X ²	\hat{y} (cantidad de Vit A estimada)	$(y-\hat{y})^2$	$(X-\bar{X})$	$(X-\bar{X})^2$	$(\hat{y}-\bar{\hat{y}})$	$(y-\bar{y})^2$	$(X-\bar{X})(\hat{y}-\bar{\hat{y}})$
1	0	0.005	0.005	0.005	0.00003	-0.171	0.0291	-0.259	0.0671	-12.652	156.25	3.278
2	0	0.005	0.005	0.005	0.00003	-0.171	0.0291	-0.259	0.0671	-12.652	156.25	3.278
3	0	0.005	0.005	0.005	0.00003	-0.171	0.0291	-0.259	0.0671	-12.652	156.25	3.278
1	5	0.114	0.114	0.114	0.01300	5.151	0.0229	-0.150	0.0225	-7.329	56.25	1.100
2	5	0.115	0.115	0.115	0.01323	5.200	0.0401	-0.149	0.0222	-7.281	56.25	1.085
3	5	0.114	0.113	0.114	0.01288	5.127	0.0161	-0.151	0.0227	-7.354	56.25	1.107
1	10	0.213	0.219	0.216	0.04666	10.132	0.0174	-0.048	0.0023	-2.349	6.25	0.113
2	10	0.215	0.219	0.217	0.04709	10.181	0.0326	-0.047	0.0022	-2.300	6.25	0.108
3	10	0.218	0.216	0.217	0.04709	10.181	0.0326	-0.047	0.0022	-2.300	6.25	0.108
1	15	0.306	0.311	0.309	0.09517	14.648	0.1237	0.044	0.0020	2.167	6.25	0.096
2	15	0.309	0.31	0.310	0.09579	14.697	0.0917	0.045	0.0021	2.216	6.25	0.100
2	15	0.309	0.314	0.312	0.09703	14.795	0.0421	0.047	0.0022	2.314	6.25	0.110
1	20	0.412	0.409	0.411	0.16851	19.629	0.1379	0.146	0.0214	7.148	56.25	1.046
2	20	0.419	0.422	0.421	0.17682	20.117	0.0137	0.156	0.0245	7.636	56.25	1.194
3	20	0.415	0.406	0.411	0.16851	19.629	0.1379	0.146	0.0214	7.148	56.25	1.04635
1	25	0.524	0.521	0.523	0.27301	25.097	0.0095	0.258	0.0668	12.616	156.25	3.25993
2	25	0.533	0.528	0.531	0.28143	25.488	0.2381	0.266	0.0710	13.007	156.25	3.46491
3	25	0.52	0.525	0.523	0.27301	25.097	0.0095	0.258	0.0668	12.616	156.25	3.25993
Sumatoria	225			4.754	1.809	224.657	1.0532		0.5537		1312.5	27.03582
Promedio	$\bar{Y}=12.5$			$\bar{X}=0.264$		$\bar{\hat{Y}}=12.481$						

Con los datos obtenidos en la tabla N° 7 se procedió al cálculo de la curva de calibración concentración vrs absorbancia. Además se calculó el valor de la \hat{y} estimada a partir de la ecuación de la curva de calibración (ver anexo N°3) para encontrar la cantidad de vitamina A, el valor de la pendiente, la ordenada al origen, coeficiente de determinación, intervalo de confianza de la pendiente, intervalo de confianza para la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión. A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Ecuación de la curva de calibración para determinar la cantidad de vitamina A:

$$\hat{y} = 48.827x - 0.4148$$

$$\hat{y} = (48.827)(0.005) - 0.4148 = -0.171 \text{ (Para la replica N°1)}$$

Pendiente:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})}{\sum(x - \bar{X})^2}$$

$$b = \frac{27.03582}{0.55371} = 48.827$$

Ordenada al origen:

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

$$a = 12.481 - (48.827)(0.264) = 0.4148$$

Coeficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})]^2}{[\sum(x - \bar{X})^2][\sum(y - \bar{Y})^2]}$$

$$r^2 = \frac{(27.03582)^2}{(0.55371)(1312.5)} = 1.00$$

Intervalo de confianza de la pendiente:

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{1.053}{18 - 2}} = 0.257$$

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

$$S_b = \frac{0.257}{\sqrt{0.554}} = 0.345$$

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

$$IC_{(b)} = 48.827 \pm (2.12)(0.345) = 48.095, 49.558$$

Intervalo de confianza de la ordenada del origen:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum(x - \bar{X})^2}}$$

$$S_a = 0.257 \sqrt{\frac{1.809}{18(0.554)}} = 0.10946$$

$$IC_{(a)} = a \pm t_{0.975, n-2} S_a$$

$$IC_{(a)} = 0.4148 \pm (2.12)(0.10946) = 0.1828, 0.6468$$

%Coeficiente de variación de regresión:

$$\%CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\hat{y}} \times 100$$

$$\%CV_{y/x} = \frac{0.257}{12.481} \times 100 = 2.05\%$$

Los resultados estadísticos comprueban que la grafica concentración vrs absorbancia de la linealidad del método posee las características adecuadas, puesto que cumple con cada uno de los valores encontrados:⁽¹⁰⁾

- La pendiente con su respectivo intervalo de confianza puesto que el valor de la pendiente esta dentro del intervalo encontrado.
- La ordenada al origen con su respectivo intervalo de confianza puesto que el valor de la ordenada esta dentro del intervalo encontrado.
- El coeficiente de determinación encontrado es 1 utilizando aproximaciones en comparación al encontrado en el grafico a través del programa Excel que fue de 0.999, cumple ya que es un valor mayor a 0.98.
- El valor del porcentaje del coeficiente de variación de regresión que es 2.05% cumple ya que no es un valor mayor al 3% para métodos de análisis espectrofotométricos o químicos.

5.2.3.2 Linealidad del sistema₍₂₎₍₁₀₎₍₁₂₎₍₂₀₎

Se hizo analizando cinco concentración (5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL) del estándar de palmitato de retinol analizándolas por triplicado, de esta manera se pudo elaborar la curva de calibración concentración vrs absorbancia. Se calculo la cantidad d vitamina A por medio de la ecuación de la curva de calibración, el valor de la pendiente, coeficiente de determinación e intervalo de confianza de la pendiente utilizando las siguientes formulas:

**Ecuación de la recta de calibración para la determinación de vitamina A
(ver Anexo N°3):**

$$\hat{y} = 0.0902x + 0.0173$$

Pendiente:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})}{\sum(x - \bar{X})^2}$$

Coeficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})]^2}{[\sum(x - \bar{X})^2][\sum(y - \bar{Y})^2]}$$

Intervalo de confianza de la pendiente:

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

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

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

Tabla N°8: Resultados de la linealidad del sistema para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

N° de análisis	x (concentración teórica del estándar)	y1 (Abs1)	y2 (Abs2)	y3 (Abs3)	Y (promedio de abs)	\hat{y} (estimada)	$(Y-\hat{y})^2$	$(x-\bar{X})$	$(x-\bar{X})^2$	$(Y-\bar{Y})$	$(Y-\bar{Y})^2$	$(x-\bar{X})(Y-\bar{Y})$
1	0	0	0	0	0.000	0.017	0.00030	-12.50	156.3	-1.128	1.271	14.0937
2	5	0.469	0.470	0.470	0.470	0.468	0.000002	-7.50	56.3	-0.677	0.458	5.0737
3	10	0.897	0.987	0.897	0.927	0.919	0.00006	-2.50	6.3	-0.226	0.051	0.5637
4	15	1.394	1.394	1.394	1.394	1.370	0.00056	2.50	6.3	0.226	0.051	0.5637
5	20	1.828	1.828	1.828	1.828	1.821	0.00004	7.50	56.3	0.677	0.458	5.0737
6	25	2.247	2.247	2.247	2.247	2.272	0.00064	12.50	156.3	1.128	1.271	14.0937
Sumatoria	75				6.866	6.869	0.00161		437.50		3.560	39.4625

Con los datos obtenidos en la tabla N° 8 se procedió al cálculo de la curva de calibración concentración vrs absorbancia. Además se calculo el valor de la \hat{y} estimada a partir de la ecuación de la curva de calibración (ver anexo N°3), la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación, el intervalo de confianza de la pendiente. A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Ecuación de la curva de calibración:

$$\hat{y} = 0.0902x + 0.0173$$

$$\hat{y} = (0.0902)(0) + 0.0173 = 0.0173 \text{ (Para el análisis N°1)}$$

Pendiente:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})}{\sum(x - \bar{X})^2}$$

$$b = \frac{39.46250}{437.500} = 0.0902$$

Coeficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})]^2}{[\sum(x - \bar{X})^2][\sum(y - \bar{Y})^2]}$$

$$r^2 = \frac{(39.46250)^2}{(437.500)(3.560)} = 0.999$$

Intervalo de confianza de la pendiente:

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{0.00161}{6-2}} = 0.0200$$

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

$$S_b = \frac{0.0200}{\sqrt{437.500}} = 0.00096$$

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

$$IC_{(b)} = 0.0902 \pm (2.78)(0.00096) = 0.0875, 0.0929$$

Los resultados estadísticos comprueban que la grafica concentración vrs absorbancia de la linealidad del sistema aplicando el respectivo método de estudio posee las características adecuadas, puesto que cumple con cada uno de los valores encontrados: ⁽¹⁰⁾

- La pendiente con su respectivo intervalo de confianza puesto que el valor de la pendiente esta dentro del intervalo encontrado.
- El coeficiente de determinación encontrado que es 0.999, cumple ya que es un valor mayor a 0.98.

5.2.4 Determinación del límite de cuantificación para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible⁽¹⁰⁾

Se realizó el límite de cuantificación analizando diez blancos de la muestra es decir azúcar crudo sin fortificar con vitamina A por duplicado.

Se calculó la desviación estándar de los blancos y el límite de cuantificación utilizando las formulas siguientes:

Desviación estándar:

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

Limite de cuantificación

$$LC = K \times S_{\text{blanco}} \times b$$

Donde:

LC: limite de cuantificación

K: constante para limite de cuantificación que es de diez (10)

S_{blanco} : desviación estándar de la respuesta de los diez blancos

b: valor de la pendiente de linealidad del método que es 48.827

Tabla N°9: Resultados del límite de cuantificación para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

Nº análisis	y ₁ Absorbancia 1	y ₂ Absorbancia 2	Y Promedio	(Y - \bar{Y}) ²
1	0.005	0.004	0.005	0.00000025
2	0.004	0.004	0.004	0.00000000
3	0.004	0.003	0.004	0.00000025
4	0.002	0.003	0.003	0.00000225
5	0.005	0.005	0.005	0.00000100
6	0.005	0.004	0.005	0.00000025
7	0.004	0.004	0.004	0.00000000
8	0.003	0.004	0.004	0.00000025
9	0.004	0.004	0.004	0.00000000
10	0.005	0.004	0.005	0.00000025
		Sumatoria	0.040	0.00000450
		promedio	$\bar{Y} = 0.004$	
		Desvest	0.0007071	

La tabla N°9 muestra los resultados de las absorbancias obtenidas de los blanco analizados por duplicado. Se muestra el promedio aritmético (\bar{Y}), desviación estándar (S) y el límite de cuantificación. A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

– Media Aritmética:

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{0.005 + 0.004}{2} \approx 0.005$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{0.005 + 0.004 + 0.004 + 0.003 + 0.005 + 0.005 + 0.004 + 0.004 + 0.004 + 0.005}{10}$$

$$\bar{Y} = 0.004$$

$$(Y - \bar{Y})^2 = (0.005 - 0.004)^2 = 0.00000025$$

$$\sum (Y - \bar{Y})^2 = 0.00000450$$

– Desviación Estándar:

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

$$S = \sqrt{\frac{0.00000450}{(10 - 1)}} = 0.0007071$$

– Limite de cuantificación

$$LC = K \times S_{\text{blanco}} \times b$$

$$LC = 10 \times 0.0007071 \times 48.827 = 0.345 \text{ ppm}$$

En el límite de cuantificación se comprobó de forma estadística en el cual se determinó un valor de 0.345 ppm, que a partir de esta concentración se puede cuantificar vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible.

5.2.5 Determinación del intervalo del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible₍₁₀₎

El intervalo del método se determinó considerando que debe de estar conformado por el valor máximo cuantificable de la linealidad del método y el valor mínimo cuantificable del límite de cuantificación. Por lo que el intervalo del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible es de 0.345 ppm a 25 ppm.

5.3 Informe de validación

INFORME DE VALIDACION PARA EL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA A (RETINOL) EN AZÚCAR MORENO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA / VISIBLE.		
Elaboro: Br. Néstor Manuel Luna	Superviso: Licda. Ivonne Arévalo	Autorizo: Licda. María Bercian
10/ENE/2013	21/ENE/22013	27/ENE/2013
Firma/Fecha Analista	Firma/Fecha Supervisora UES	Firma/Fecha Jefe de laboratorio de fabrica

- Protocolo de validación del método analítico. Ver paginas N° 67-82
- Resultados analíticos, estadísticos e interpretación de resultados de los parámetros de desempeño.

Cuadro N°5: Resultados de exactitud

Resultados de Exactitud		
Resultado	Criterio de aceptación	Decisión
% Recobro = 99.7%	El porcentaje de recobro debe de estar entre el rango del 80 – 110%.	Conforme
Estadístico t = 0.5555 valor tabla para t de dos colas = ± 2.2622	Que no exista diferencia significativa entre las media obtenidas de las dos variables de estudio para un nivel de confianza del 95%	Conforme
Nota: ver anexo N°2 y la tabla de los resultados N°2, 3 y 4		

Cuadro N°6: Resultados de precisión

Resultados de Precisión		
Resultado	Criterio de aceptación	Decisión
Repetibilidad %CV = 4.25%	El porcentaje del coeficiente de variación no debe de superar el 7.3%	Conforme
Precisión Intermedia %CV = 3.8%	El porcentaje del coeficiente de variación no debe de superar el 7.3%	Conforme
Nota: ver anexo N°2 y tabla de resultados N°5 y 6		

Cuadro N°7: Resultados de linealidad del método y sistema

Resultados de Linealidad del Método		
Resultado	Criterio de aceptación	Decisión
$r^2 = 0.999$	El coeficiente de determinación deberá ser mayor a 0.98	Conforme
$b = 48.827$ IC(b) = 48.096 , 49.558	El IC(b), el valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo.	Conforme
$a = 0.4148$ IC(a) = 0.1828 , 0.6468	El IC(a), el valor de la ordenada debe incluirse en el intervalo.	Conforme
$\%CV_{(y/x)} = 2.05\%$	El $\%CV_{(y/x)}$, no mayor del 3% si es químico o espectrofotométrico.	Conforme
Resultados de Linealidad del Sistema		
$r^2 = 0.999$	El coeficiente de determinación deberá ser mayor 0.98	Conforme
$b = 0.0902$ IC(b) = 0.0875 , 0.0929	El IC(b), el valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo.	Conforme
Nota: ver anexo N°2 y tabla de resultados N°7 y 8		

Cuadro N°8: Resultados de límite de cuantificación

Resultados de Limite de Cuantificación		
Resultado	Criterio de aceptación	Decisión
LC= 0.345 ppm	N/A	Conforme
Nota: ver anexo N°2 y tabla de resultados N°9		

Cuadro N°9: Resultados de intervalo / rango

Resultados de Intervalo / Rango		
Resultado	Criterio de aceptación	Decisión
0.345 ppm – 25 ppm de vitamina A	Debe de incluir la concentración inferior y superior del analito, con adecuada precisión, exactitud y linealidad.	Conforme
Nota: ver anexo N°3		

- Conclusiones (ver página N°119 y 120)

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Desarrollar un protocolo de validación de un método analítico antes de iniciar un proceso de validación, permite establecer y planear todo lo que se va a llevar a cabo para la ejecución del proceso, para que el método analítico muestre confiabilidad y resultados exactos, precisos y reproducibles.
2. En estudio de la veracidad del método en el parámetro de exactitud demostró que no existe diferencia significativa con respecto al estándar de vitamina A, por medio de la aplicación del estudio probabilístico de t Student; en el cual el t estadístico resultó estar dentro del rango de trabajo para un curva de dos colas. En cuanto al porcentaje de recobro el método cumple, ya que ningún dato sobrepaso el criterio de aceptación que debe de ser del 80 al 110%.
3. El método demostró ser preciso ya que se obtuvieron resultados del porcentaje de coeficiente de variación para la repetibilidad (CV 4.25%) y para la precisión intermedia (CV 3.8%) menores al 7.3% que es el criterio de aceptación por lo que se establece que el método es preciso.
4. El método se comprobó que es lineal a partir de los resultados obtenido de la linealidad del método y del sistema con la curva de calibración concentración vrs absorbancia ya que los valores obtenidos del coeficiente de determinación fueron mayor a 0.98, y las pendientes para ambos casos estaban dentro del intervalo de confianza; obteniendo un método de análisis lineal, exacto y preciso para su utilización.

5. El límite de cuantificación realizado estadísticamente posee un límite cuantificable a partir de 0.345 ppm para la utilización de este método analítico.
6. La validación de un método de análisis se culmina con el respectivo informe de validación donde se debe declarar el cumplimiento de los parámetros de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos.
7. Según los resultados obtenidos en el proceso de validación se establece que el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible puede aplicarse con toda confiabilidad en cualquier laboratorio azucarero como también en prácticas didácticas universitarias.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES

1. Que al desarrollar el método de análisis de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno se evite la luz directa hacia la muestra ya que puede afectar la oxidación de la vitamina A, a pesar de los agentes antioxidantes que pueda contener el fortificante en su formulación.
2. Realizar por parte del Ministerio de Salud de El Salvador monitoreos durante la producción de azúcar moreno y su comercialización para verificar las cantidades de vitamina A exigidas en el país y disminuir el déficit de esta vitamina en la población salvadoreña.
3. Utilizar este proceso de validación como una guía que pueda orientar a los estudiantes de la carrera de Licenciatura en Química y Farmacia en temas de validación de métodos analíticos para que puedan aumentar sus conocimientos en las cátedras de control de calidad.
4. Fomentar la relación que existe entre la Facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador y las empresas privadas para que les permitan a futuros egresados realizar sus investigaciones de trabajo de graduación y ampliar sus conocimientos en el campo de la industria.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar G.M, Nájera Mejía A.R, determinación de vitamina A agregada y trazas de plomo en azúcar obtenida en los ingenios nacionales y consumidas en el país, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, marzo 1998.
2. Aguirre Ortega L, García García J, García Junca T, Martín Pomar M, Mateos Pérez B, Illera Fontanet M, et al., Validación de métodos analíticos; Barcelona. España. Marzo 2001. Pag. 45-96
3. Ardon Ardon E.L, Ardon Ardon E.A, propuesta de una técnica de fortificación con hierro para la horchata de morro, Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia, septiembre 2008.
4. Arroyave G, Chinchilla D, Dary O, Mora J.O. Fortificación del Azúcar con vitamina A en Centro América: Experiencias y lecciones aprendidas. USAID. Agosto 2000. Pag.1,5-10
5. Arroyave G. y Dary O. Manual para la fortificación de azúcar con vitamina A; Determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada. Parte 3. 2ª edición, USAID/OMNI-INCAP/OPS, 1997. Pág. 13-17
6. Atherton P.G, Carter M.P, Bengtsson M, Jebbes J, et al, libro de métodos 2012, comisión internacional para la unificación de los métodos de análisis de azúcar, Berlín, Alemania 2012.
7. Belloso Mendoza K.J, de León Granados D, Ortiz Ventura B.E. Tratamiento tributario y contable del proceso productivo del azúcar en un ingenio que

aplica el método de corto estándar. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. Noviembre 2010. Pág. 11-15

8. Bonilla G, Estadística II; métodos prácticos de interferencia estadística, 2ª edición, UCA editores, San Salvador, El Salvador 1992.pag. 129-145
9. Cadenas Jauregui C. del C. Evaluación de la presencia de vitamina A en azúcar expendida a menudo en el departamento del Progreso en área de mayor riesgo y exposición al calor. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Julio 2008. Pág. 10-11
10. CONACYT (consejo nacional de ciencia y tecnología), guía técnica; validación de métodos analíticos fisicoquímicos. 2010
11. Dary Omar, Guamuch M, Makhumula P, Manual para el monitoreo interno de la fortificación de azúcar con vitamina A: Aseguramiento de calidad e inspección de calidad, Primera edición, INCAP/UNICEF, 2007. Pág.18-24
12. De Gil A.I, Molina C. Seminario-taller: validación de métodos analíticos físicos-químicos. Colegio de Químicos y Farmacéuticos de El Salvador. Junio 2007
13. Grupo CASSA. Hoja técnica de azúcar blanco sulfitado. Código D-OVT-002. Edición 001. Agosto 2011. Pág. 1-3
14. Grupo CASSA. Hoja técnica de azúcar crudo. Código D-OVT-005. Edición 001. Agosto 2011. Pág. 1-3

15. Grupo CASSA, Ingenio Chaparrastique, manual de capacitación personal laboratorio, agosto 2011
16. Grupo CASSA. Manual de instructivo de laboratorio. Código I-OCP-125. Edición 001. Agosto 2011. Pág. 1-4
17. Herrera Arriola C.M, Peña C.M, análisis fisicoquímicos y microbiológicos de la harina de trigo producidas en El Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, noviembre 2006
18. Méndez hurtate C. O. Validación del método analítico para la cuantificación de retinol en azúcar fortificada de consumo nacional. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Septiembre 2003
19. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social; Departamento de Saneamiento Ambiental, Departamento de nutrición. Documentos legales y técnicos administrativos del programa eliminación de la deficiencia de vitamina A en El Salvador. San Salvador, El Salvador. 2005. Pág. 1, 5-9, 15-16.
20. Miller J. C., Miller J.N, Estadística y Quiometría para química Analítica 4ª edición, Pearson Educación S.A, Madrid, España 2002. Pág. 110-122
21. Norma ISO 17025:
<http://www.conacyt.gob.sv/criterios%20de%20acreditacion%2010.pdf>
22. Norma salvadoreña obligatoria NSO 67.20.01:03 de azúcares:
http://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/AZUCAR/AZUCARES_ESPECIFICACIONES.pdf

23. United States Pharmacopoeia (USP) (siglas en inglés farmacopea de los Estados Unidos), 2006. Validación de métodos farmacopeicos. Capítulo general <1225> 30ª Edición-NF25.

24. Tabla de t Student :

http://www.emp.uva.es/inf_acad/hermer/estad2/material/e2t_tabla_t_de_student.pdf

25. www.asamblea.gob.sv/eparlamento/indice-legislativo/buscador-de-documentos-legislativos/ley-de-fortificacion-del-azucar-con-vitamina-a

26. www.ecured.cu/index.php/Archivo:Proceso_del_azucar.jpg

27. www.perafan.com/azucar/ea02azuc.html

GLOSARIO⁽¹⁵⁾

Azúcar blanco sulfitado: también llamado azúcar blanco, es un producto blanco cristalino obtenido de la transformación del jugo de caña, el cual fue sometido al proceso de sulfitación. Se obtiene al final del proceso luego de la separación por centrifugación de la masa cocida A, posterior secado y fortificado con palmitato de retinol.

Azúcar moreno: es un producto cristalino obtenido de la transformación del jugo de caña, el cual no fue sometido al proceso de sulfatación. Se obtiene al final del proceso luego de la separación por centrifugación de la masa cocida A, posteriormente secado y fortificado con palmitato de retinol.

Bagazo: es un residuo fibroso obtenido al final del prensado de la caña en los molinos, se usa principalmente como combustible en las calderas para producir vapor.

Cachaza: residuo de la industrialización de la caña de azúcar, compuesto por sacarosa, azúcares simples, coloides coagulados, cera, fibra de caña, partículas de suelo y una importante presencia de elementos minerales.

Imbibición: es el proceso por el cual se añade agua o jugo al bagazo, para que se mezcle con el jugo existente en este y lo diluya.

Meladura: es un sedimento o lodo de color oscuro que resulta después del proceso de clarificación y filtración del jugo de caña.

ANEXOS

ANEXO N°1 ESQUEMATIZACION DEL PROCESO DE FABRICACION DEL AZÚCAR ⁽²⁶⁾

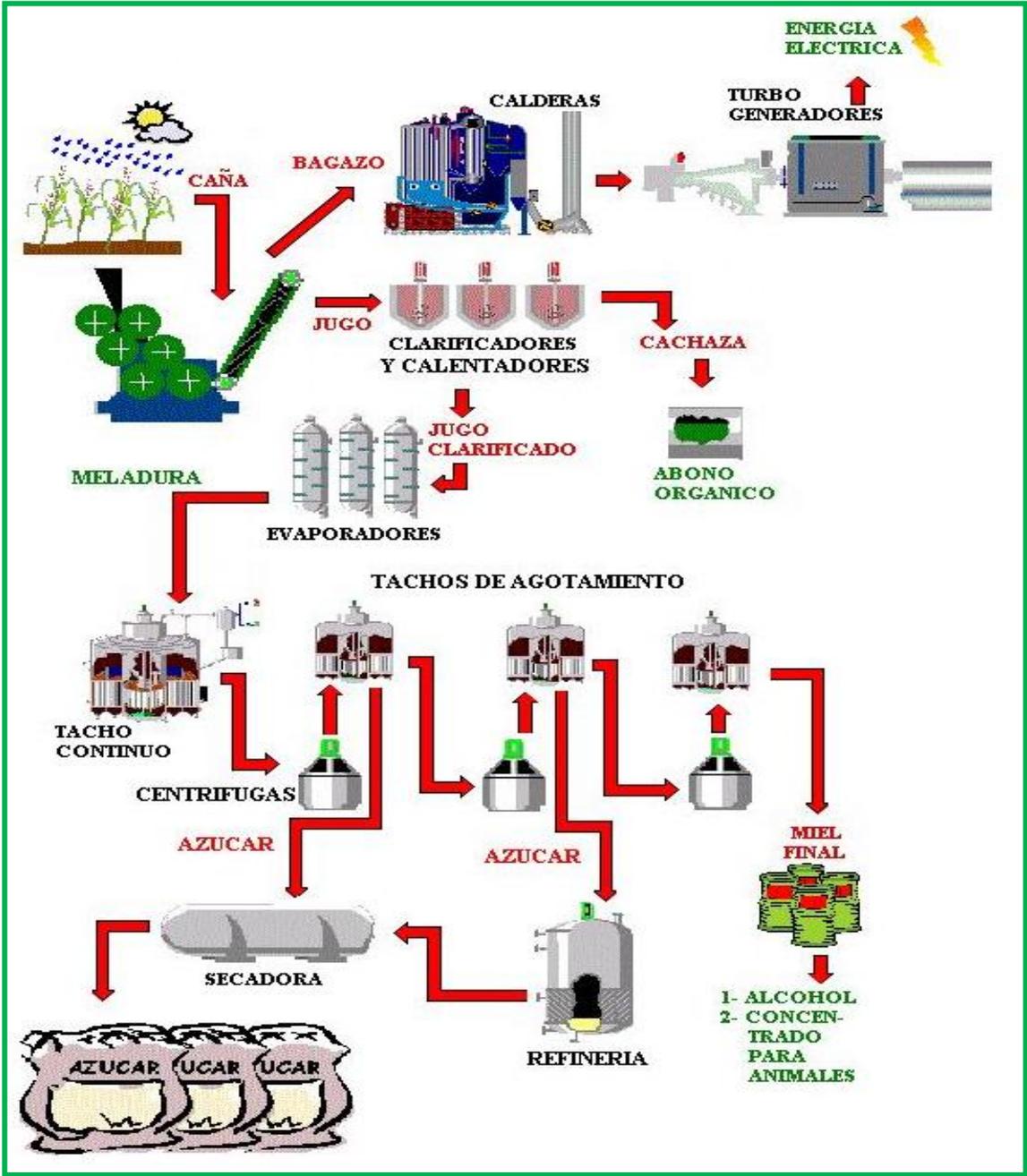


Fig. N° 2: Esquematación del proceso de fabricación del azúcar ⁽²⁶⁾

ANEXO N°2

**RESULTADOS ANALÍTICOS Y ESTADÍSTICOS DE LOS
PARAMETROS DE DESEMPEÑO**

RESULTADOS ANALÍTICOS Y ESTADÍSTICOS DE LOS PARAMETROS DE DESEMPEÑO.

Tabla N°2: Resultados del porcentaje de recobro para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible

Nº de replica	y(cantidad adicionada de vitamina A)	x ₁ (Abs1)	x ₂ (Abs2)	\bar{X} (promedio abs)	\hat{y} (cantidad recuperada de vitamina A)	% Recobro
1	10	0.213	0.219	0.216	10.132	101.3
2	10	0.215	0.219	0.217	10.181	102.8
3	10	0.218	0.216	0.217	10.181	102.8
1	15	0.306	0.311	0.309	14.648	97.7
2	15	0.309	0.310	0.310	14.697	98.0
3	15	0.309	0.314	0.312	14.795	98.6
1	20	0.412	0.409	0.411	19.629	98.1
2	20	0.419	0.422	0.421	20.117	100.6
3	20	0.415	0.406	0.411	19.629	98.1
	Abs blanco	0.005			Promedio	99.7

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos para la réplica N°1:

- Media aritmética

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2}{2}$$

$$\bar{X} = \frac{0.213 + 0.219}{2} = 0.216$$

- Ecuación de la recta de calibración

$$\hat{y} = 48.827x - 0.4148$$

$$\hat{y} = (48.827)(0.216) - 0.4148 = 10.132$$

– Porcentaje de recobro:

$$\%R = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} \times 100$$

$$\%R = \frac{10.132}{10} \times 100 = 101.3\%$$

$$\%\bar{R} = 99.7\%$$

Tabla N°3: Resultados de la veracidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible

Muestra	y(cantidad adicionada de vitamina A)ppm	x_1 (Abs1)	x_2 (Abs2)	\bar{X} (Promedio abs)	y_1 (Vit A1) ppm	y_2 (Vit A2) ppm	Y_1 (Promedio Vit A)	$(Y-\bar{Y})^2$	Y_2 Est Vit A ppm
1	15	0.318	0.315	0.316	15.37	15.25	15.31	0.07185	15
2	15	0.311	0.305	0.308	15.03	14.75	14.89	0.02250	15
3	15	0.309	0.311	0.310	14.93	15.05	14.99	0.00267	15
4	15	0.305	0.311	0.308	14.75	15.03	14.89	0.02250	15
5	15	0.315	0.320	0.317	15.25	15.47	15.36	0.10064	15
6	15	0.306	0.314	0.310	14.80	15.20	15.00	0.00155	15
7	15	0.316	0.316	0.315	15.27	15.27	15.27	0.05344	15
8	15	0.303	0.305	0.304	14.66	14.73	14.69	0.12023	15
9	15	0.304	0.309	0.306	14.71	14.93	14.82	0.05008	15
10	15	0.316	0.312	0.314	15.27	15.10	15.19	0.02105	15
	Abs blanco	0.005				Suma	150.40	0.46650	150
						Promedio	15.04		15
						Desvest	0.2276		
						%CV	1.51		

Tabla N°4: Resultados de la veracidad del método a través del estudio probabilístico de t student suponiendo varianzas desiguales para dos muestras.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Variable 1 (Muestra)	Variable 2 (Estándar)
Media	15.040	15
Varianza	0.0518	0
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	-
Estadístico t	0.5556	-
Valor crítico de t (dos colas)	2.2622	-

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

- Media aritmética

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2}{2}$$

$$\bar{X} = \frac{0.318 + 0.315}{2} = 0.31625$$

- Retinol

$$\text{Retinol (mg/kg)} = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

$$\text{Retinol (mg/kg)} = 0.318 - 0.005 \times \frac{4918.33}{100} = 15.37$$

$$\text{Retinol (mg/kg)} = 0.315 - 0.005 \times \frac{4918.33}{100} = 15.25$$

$$\bar{Y} = \frac{15.37 + 15.25}{2} = 15.31$$

- Promedio de los 10 datos de vitamina:

$$\bar{Y} = \frac{15.31 + 14.89 + 14.99 + 14.89 + 15.36 + 15.0 + 15.27 + 14.69 + 14.82 + 15.19}{10}$$

$$\bar{Y} = 15.04$$

- Desviación estándar

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

$$S = \sqrt{\frac{0.46650}{9}} = 0.2276$$

- %Coeficiente de variación

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

$$\%CV = \frac{0.22767}{15.04} \times 100 = 1.51$$

- Varianza para la muestra

$$S^2 = \frac{\sum(y - \bar{Y})^2}{(n - 1)}$$

$$S^2 = \frac{0.46650}{9} = 0.0518$$

- Varianza promedio de muestra y estándar

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_{mx}^2 + (n_2 - 1)S_{St}^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$S_p^2 = \frac{9(0.051833) + 0}{18} = 0.0259$$

- Estadístico t

$$t = \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\sqrt{S_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

$$t = \frac{15.04 - 15.0}{\sqrt{0.0259165 \left(\frac{1}{10} + \frac{1}{10} \right)}} = 0.5556$$

- Valor crítico de dos colas

Para 9 grados de libertad, con un nivel de significancia de 5% (0.05), en la tabla de t-Student para dos colas encontramos el valor crítico de 2.2622. (Ver Anexo N°8)

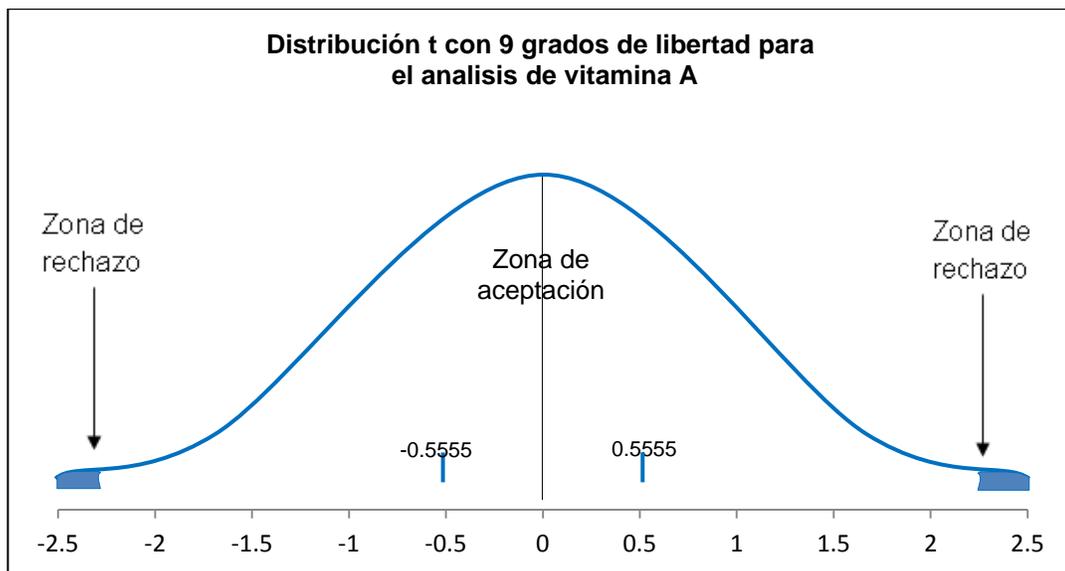


Figura N° 1: Campana de gauss para la distribución de 2 colas del estudio de veracidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible.

Según los resultados obtenidos en el estudio estadístico t-Student se inicia con la prueba de hipótesis, para comparar la media encontrada contra el valor estándar de referencia a través de varios pasos que se presentan a continuación:

f) Paso 1: establecimiento de hipótesis

Ho: valor de la media encontrada del estándar igual al valor del estándar de referencia

Hi: valor de la media encontrada del estándar diferente al valor estándar de referencia

g) Paso 2: establecimiento de la significancia

Alfa (α) = 0.05 es decir, se trabajara con un nivel de confianza del 95%

h) Paso 3: el estadístico a utilizar

Será t-Student ya que tenemos menos de 30 datos, las varianzas de la muestra y el estándar son diferentes. Utilizamos Excel, prueba de hipótesis t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.

i) Paso 4: establecimiento del criterio

Rechazamos Ho si $|t| > t_{\alpha, n-1}$

Rechazamos la Ho, si el estadístico t es mayor al valor crítico de t para dos colas con un nivel de confianza del 95%.

j) Paso 5: decisión

En este caso se acepta la hipótesis nula (Ho), ya que el valor estadístico t (0.5556), es menor que el valor crítico de t de dos colas (± 2.2622), por lo que se

establece que no existen diferencias significativas entre el valor de la media encontrada del estándar y el valor teórico del estándar de referencia.

Tabla N°5: Resultados de repetibilidad del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

N° de replicas	Concentración teórica (ppm)	x ₁ (Abs 1)	x ₂ (Abs 2)	y ₁ (Vit A 1)	y ₂ (Vit A 2)	Y (promedio de Vit A)	(Y- \bar{Y}) ²
1	15	0.332	0.336	15.94	16.13	16.03	0.0305
2	15	0.344	0.351	16.53	16.87	16.70	0.2395
3	15	0.322	0.326	15.44	15.64	15.54	0.4441
4	15	0.358	0.358	17.21	17.21	17.21	1.0116
5	15	0.335	0.343	16.08	16.48	16.28	0.0051
6	15	0.35	0.353	16.82	16.97	16.89	0.4707
7	15	0.318	0.318	15.25	15.25	15.25	0.9245
8	15	0.327	0.321	15.69	15.39	15.54	0.4441
9	15	0.351	0.352	16.87	16.92	16.89	0.4707
10	15	0.326	0.33	15.64	15.84	15.74	0.2206
	Abs blanco	0.008			Sumatoria	162.08	4.2616
					\bar{Y} Promedio	16.21	
					Desv Est	0.69	
					%CV	4.25	

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos para el análisis N°1:

– Retinol

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = 0.332 - 0.008 \times \frac{4918.33}{100\text{g}} = 15.94$$

$$\text{Retinol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = 0.336 - 0.008 \times \frac{4918.33}{100\text{g}} = 16.13$$

– Media aritmética

$$\bar{Y} = \frac{y_1 + y_2}{2}$$

$$\bar{Y} = \frac{15.94 + 16.13}{2} = 16.03$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{162.08}{10}$$

$$\bar{Y} = 16.21$$

$$(Y - \bar{Y})^2 = (16.03 - 16.21)^2 = 0.030485$$

$$\sum (Y - \bar{Y})^2 = 4.2616$$

– Desviación estándar

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

$$S = \sqrt{\frac{4.2616}{(10 - 1)}} = 0.69$$

– % Porcentaje de coeficiente de variación

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

$$\%CV = \frac{0.69}{16.21} \times 100 = 4.25\%$$

Tabla N°6: Resultados de precisión intermedia del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

N° de replicas	Concentración teórica (ppm)	X ₁ (Abs 1)	X ₂ (Abs 2)	Y ₂ (Vit A 2)	Y ₂ (Vit A 2)	Y (promedio de Vit A)	(Y- \bar{Y}) ²
1	15	0.320	0.314	15.44	15.15	15.30	0.6467
2	15	0.338	0.340	16.33	16.43	16.38	0.0772
3	15	0.326	0.325	15.74	15.69	15.71	0.1491
4	15	0.325	0.322	15.69	15.54	15.62	0.2347
5	15	0.328	0.335	15.84	16.18	16.01	0.0083
6	15	0.320	0.318	15.44	15.35	15.39	0.4981
7	15	0.320	0.321	15.44	15.49	15.47	0.3994
8	15	0.330	0.336	15.94	16.23	16.08	0.0003
9	15	0.342	0.346	16.53	16.72	16.62	0.2744
10	15	0.342	0.335	16.53	16.18	16.35	0.0642
11	15	0.332	0.336	16.03	16.23	16.13	0.0010
12	15	0.344	0.351	16.62	16.97	16.80	0.4843
13	15	0.322	0.326	15.54	15.74	15.64	0.2115
14	15	0.358	0.358	17.31	17.31	17.31	1.4698
15	15	0.335	0.343	16.18	16.57	16.38	0.0772
16	15	0.35	0.353	16.92	17.07	16.99	0.7969
17	15	0.318	0.318	15.35	15.35	15.35	0.5700
18	15	0.327	0.321	15.79	15.49	15.64	0.2115
19	15	0.351	0.352	16.97	17.02	16.99	0.7969
20	25	0.326	0.33	15.74	15.94	15.84	0.0692
	Abs blanco	0.006			Sumatoria	322.00	7.0406
					\bar{Y} Promedio	16.10	
					Desv Est	0.61	
					%CV	3.8	

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos para el análisis N°1:

– Retinol

$$\text{Retinol (mg/kg)} = \text{Abs}_{\text{corregida}} \times \frac{4918.33}{p}$$

$$\text{Retinol (mg/kg)} = 0.320 - 0.006 \times \frac{4918.33}{100g} = 15.44$$

$$\text{Retinol (mg/kg)} = 0.314 - 0.006 \times \frac{4918.33}{100g} = 15.15$$

– Media aritmética

$$\bar{Y} = \frac{y_1 + y_2}{2}$$

$$\bar{Y} = \frac{15.44 + 15.15}{2} = 15.30$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{322.0}{20}$$

$$\bar{Y} = 16.10$$

$$(Y - \bar{Y})^2 = (15.30 - 16.10)^2 = 0.6467$$

$$\sum (Y - \bar{Y})^2 = 7.0406$$

– Desviación estándar

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

$$S = \sqrt{\frac{7.0406}{(20 - 1)}} = 0.61$$

– % Porcentaje de coeficiente de variación

$$\%CV = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

$$\%CV = \frac{0.61}{16.10} \times 100 = 3.8\%$$

Tabla N°7: Resultados de la linealidad del método para la cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

N° de replica	y (concentración teórica de vitA)	x ₁ (Abs1)	x ₂ (Abs2)	X (Abs promedio)	X ²	\hat{y} (cantidad de Vit A estimada)	$(y-\hat{y})^2$	$(X-\bar{X})$	$(X-\bar{X})^2$	$(\hat{y}-\bar{\hat{y}})$	$(y-\bar{y})^2$	$(X-\bar{X})(\hat{y}-\bar{\hat{y}})$
1	0	0.005	0.005	0.005	0.00003	-0.171	0.0291	-0.259	0.0671	-12.652	156.25	3.278
2	0	0.005	0.005	0.005	0.00003	-0.171	0.0291	-0.259	0.0671	-12.652	156.25	3.278
3	0	0.005	0.005	0.005	0.00003	-0.171	0.0291	-0.259	0.0671	-12.652	156.25	3.278
1	5	0.114	0.114	0.114	0.01300	5.151	0.0229	-0.150	0.0225	-7.329	56.25	1.100
2	5	0.115	0.115	0.115	0.01323	5.200	0.0401	-0.149	0.0222	-7.281	56.25	1.085
3	5	0.114	0.113	0.114	0.01288	5.127	0.0161	-0.151	0.0227	-7.354	56.25	1.107
1	10	0.213	0.219	0.216	0.04666	10.132	0.0174	-0.048	0.0023	-2.349	6.25	0.113
2	10	0.215	0.219	0.217	0.04709	10.181	0.0326	-0.047	0.0022	-2.300	6.25	0.108
3	10	0.218	0.216	0.217	0.04709	10.181	0.0326	-0.047	0.0022	-2.300	6.25	0.108
1	15	0.306	0.311	0.309	0.09517	14.648	0.1237	0.044	0.0020	2.167	6.25	0.096
2	15	0.309	0.31	0.310	0.09579	14.697	0.0917	0.045	0.0021	2.216	6.25	0.100
2	15	0.309	0.314	0.312	0.09703	14.795	0.0421	0.047	0.0022	2.314	6.25	0.110
1	20	0.412	0.409	0.411	0.16851	19.629	0.1379	0.146	0.0214	7.148	56.25	1.046
2	20	0.419	0.422	0.421	0.17682	20.117	0.0137	0.156	0.0245	7.636	56.25	1.194
3	20	0.415	0.406	0.411	0.16851	19.629	0.1379	0.146	0.0214	7.148	56.25	1.04635
1	25	0.524	0.521	0.523	0.27301	25.097	0.0095	0.258	0.0668	12.616	156.25	3.25993
2	25	0.533	0.528	0.531	0.28143	25.488	0.2381	0.266	0.0710	13.007	156.25	3.46491
3	25	0.52	0.525	0.523	0.27301	25.097	0.0095	0.258	0.0668	12.616	156.25	3.25993
Sumatoria	225			4.754	1.809	224.657	1.0532		0.5537		1312.5	27.03582
Promedio	$\bar{Y}=12.5$			$\bar{X}=0.264$		$\bar{\hat{Y}}=12.481$						

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Ecuación de la curva de calibración para determinar la cantidad de vitamina A:

$$\hat{y} = 48.827x - 0.4148$$

$$\hat{y} = (48.827)(0.005) - 0.4148 = -0.171 \text{ (Para la réplica N}^\circ\text{1)}$$

Pendiente:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})}{\sum(x - \bar{X})^2}$$

$$b = \frac{27.03582}{0.55371} = 48.827$$

Ordenada al origen:

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

$$a = 12.481 - (48.827)(0.264) = 0.4148$$

Coefficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})]^2}{[\sum(x - \bar{X})^2][\sum(y - \bar{Y})^2]}$$

$$r^2 = \frac{(27.03582)^2}{(0.55371)(1312.5)} = 1.00$$

Intervalo de confianza de la pendiente:

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{1.053}{18-2}} = 0.257$$

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

$$S_b = \frac{0.257}{\sqrt{0.554}} = 0.345$$

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

$$IC_{(b)} = 48.827 \pm (2.12)(0.345) = 48.095, 49.558$$

Intervalo de confianza de la ordenada del origen:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum(x - \bar{X})^2}}$$

$$S_a = 0.257 \sqrt{\frac{1.809}{18(0.554)}} = 0.10946$$

$$IC_{(a)} = a \pm t_{0.975, n-2} S_a$$

$$IC_{(a)} = 0.4148 \pm (2.12)(0.10946) = 0.1828, 0.6468$$

%Coeficiente de variación de regresión:

$$\%CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\hat{y}} \times 100$$

$$\%CV_{y/x} = \frac{0.257}{12.481} \times 100 = 2.05\%$$

Tabla N°8: Resultados de la linealidad del sistema para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

N° de análisis	x (concentración teórica del estándar)	y1 (Abs1)	y2 (Abs2)	y3 (Abs3)	Y (promedio de abs)	\hat{y} (estimada)	$(Y-\hat{y})^2$	$(x-\bar{X})$	$(x-\bar{X})^2$	$(Y-\bar{Y})$	$(Y-\bar{Y})^2$	$(x-\bar{X})(Y-\bar{Y})$
1	0	0	0	0	0.000	0.017	0.00030	-12.50	156.3	-1.128	1.271	14.0937
2	5	0.469	0.470	0.470	0.470	0.468	0.000002	-7.50	56.3	-0.677	0.458	5.0737
3	10	0.897	0.987	0.897	0.927	0.919	0.00006	-2.50	6.3	-0.226	0.051	0.5637
4	15	1.394	1.394	1.394	1.394	1.370	0.00056	2.50	6.3	0.226	0.051	0.5637
5	20	1.828	1.828	1.828	1.828	1.821	0.00004	7.50	56.3	0.677	0.458	5.0737
6	25	2.247	2.247	2.247	2.247	2.272	0.00064	12.50	156.3	1.128	1.271	14.0937
Sumatoria	75				6.866	6.869	0.00161		437.50		3.560	39.4625

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

Ecuación de la curva de calibración:

$$\hat{y} = 0.0902x + 0.0173$$

$$\hat{y} = (0.0902)(0) + 0.0173 = 0.017 \text{ (Para el análisis N°1)}$$

Pendiente:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})}{\sum(x - \bar{X})^2}$$

$$b = \frac{39.46250}{437.500} = 0.0902$$

Coefficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[\sum(x - \bar{X})(y - \bar{Y})]^2}{[\sum(x - \bar{X})^2][\sum(y - \bar{Y})^2]}$$

$$r^2 = \frac{(39.46250)^2}{(437.500)(3.560)} = 0.999$$

Intervalo de confianza de la pendiente:

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{0.00161}{6 - 2}} = 0.0200$$

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

$$S_b = \frac{0.0200}{\sqrt{437.500}} = 0.00096$$

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

$$IC_{(b)} = 0.0902 \pm (2.78)(0.00096) = 0.0875, 0.0929$$

Tabla N°9: Resultados del límite de cuantificación para el método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible

Nº análisis	y ₁ Absorbancia 1	y ₂ Absorbancia 2	Y Promedio	(Y - \bar{Y}) ²
1	0.005	0.004	0.005	0.00000025
2	0.004	0.004	0.004	0.00000000
3	0.004	0.003	0.004	0.00000025
4	0.002	0.003	0.003	0.00000225
5	0.005	0.005	0.005	0.00000100
6	0.005	0.004	0.005	0.00000025
7	0.004	0.004	0.004	0.00000000
8	0.003	0.004	0.004	0.00000025
9	0.004	0.004	0.004	0.00000000
10	0.005	0.004	0.005	0.00000025
		Sumatoria	0.040	0.00000450
		promedio	$\bar{Y} = 0.004$	
		Desvest	0.0007071	

A continuación se ejemplifica como se realizaron los cálculos:

– Media Aritmética:

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{0.005 + 0.004}{2} \approx 0.005$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{Y} = \frac{0.005 + 0.004 + 0.004 + 0.003 + 0.005 + 0.005 + 0.004 + 0.004 + 0.004 + 0.005}{10}$$

$$\bar{Y} = 0.004$$

$$(Y - \bar{Y})^2 = (0.005 - 0.004)^2 = 0.00000025$$

$$\sum (Y - \bar{Y})^2 = 0.00000450$$

– Desviación Estándar:

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

$$S = \sqrt{\frac{0.00000450}{(10 - 1)}} = 0.0007071$$

– Límite de cuantificación

$$LC = K \times S_{\text{blanco}} \times b$$

$$LC = 10 \times 0.0007071 \times 48.827 = 0.345 \text{ ppm}$$

Determinación del intervalo del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible₍₁₀₎

El intervalo del método se determinó considerando que debe de estar conformado por el valor máximo cuantificable de la linealidad del método y el valor mínimo cuantificable del límite de cuantificación. Por lo que el intervalo del método de cuantificación de vitamina A en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta/visible es de 0.345 ppm a 25 ppm.

ANEXO N°3: GRAFICAS DE LINEALIDAD DEL MÉTODO Y DEL SISTEMA

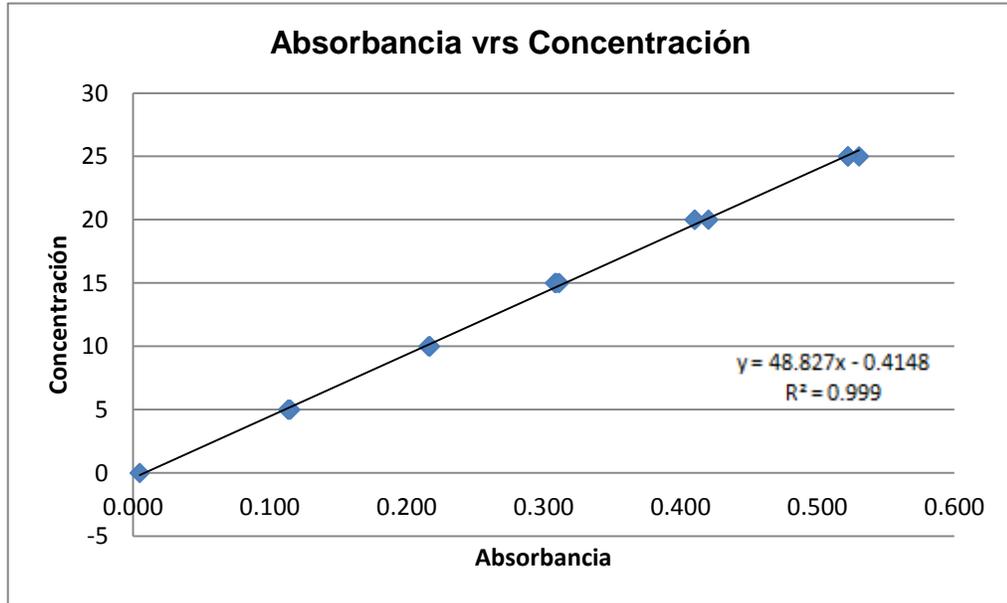


Figura N°3: grafico de la curva de calibración para la linealidad del método.

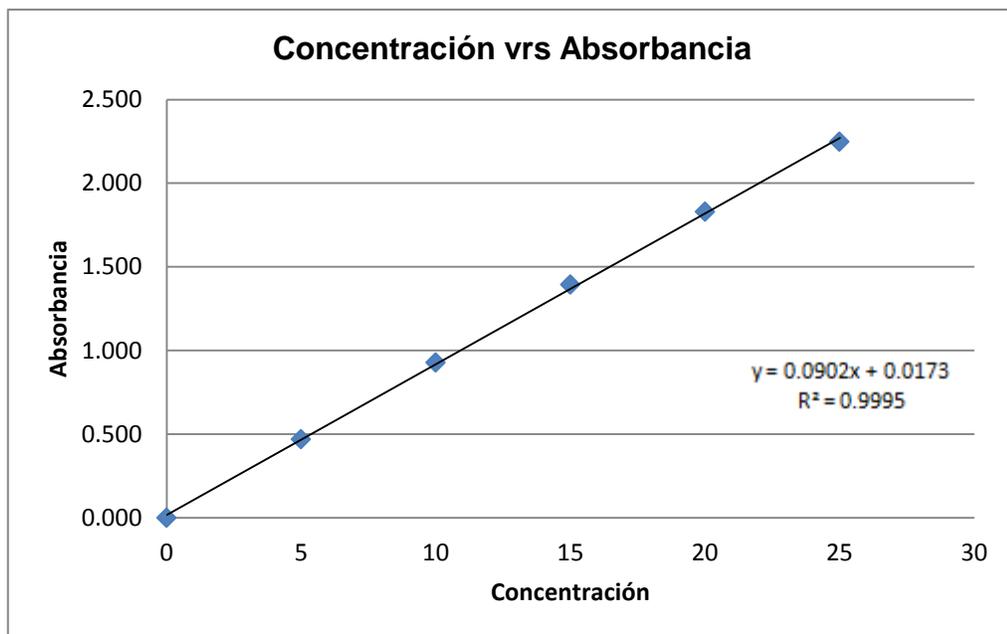


Figura N°4: grafico de la curva de calibración para la linealidad del sistema.

ANEXO N°4

**CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ESTÁNDAR DRY VITAMINA A
PALMITATE 250 MS CWD**

**CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ESTÁNDAR DRY VITAMINA A
PALMITATE 250MS CWD**



Certificate of Analysis

BASF A/S

12.10.2011

9997
BASF de El Salvador S.A. de C.V.
89 Av. Norte, 2o. Nivel # 207
00000 SAN SALVADOR-COL ESCALON
EL SALVADOR

Product name: Dry Vitamin A Palmitate 250 MS CWD
25KG Fibreboard Boxes
No.:
Order/item: 1363611248/000010
Delivery/item: 2064316260/900005
Customer ref.: 200471
Inspection lot no: 030003462201

Article no.: 50934737
Batch: 86131564A0
Quantity: 4,850.0 kg
Product no.: 10780487
Production date: 23.09.2011
Date of analysis: 10.10.2011
Best before /
retest date: 22.09.2013

Characteristic	Unit	Value	Lower Limit	Upper Limit	Method
Vitamin A assay	IU/g	277000	250000	287000	Ph. Eur.
Appearance*	-	OK	-	-	Visual
Through mesh 20 USP	%	100	100	-	Sieving
Through mesh 40 USP	%	99	90	-	Sieving
Through mesh 100 USP	%	6	-	15	Sieving
Loss on drying	%	2	-	5	Gravimetric
Total aerobic microbial count (TAMC)	1/g	< 100	-	1000	Ph. Eur./USP

Additional Information :

Appearance:

* Free-flowing light yellow powder consisting of particles of almost uniform size.

BASF A/S
Ms Maria Trolle Gronemann
Quality Assurance

Page : 1 of 2

This certificate has been electronically printed and is valid without signature.

P.O. Box 236
Malmgården 5
DK 2750 Ballerup
Telephone: +45 44 73 01 00



The Chemical Company

Certificate of Analysis

BASF A/S

9997
BASF de El Salvador S.A. de C.V.
89 Av. Norte, 2o. Nivel # 207
00000 SAN SALVADOR COL ESCALON
EL SALVADOR

Product name: Dry Vitamin A Palmitate 250 MS CWD
25KG Fibreboard Boxes
No.:
Order/item: 1363611248/000010
Delivery/item: 2064316260/900005
Customer ref.: 200471
Inspection lot no: 030003462201

Article no.: 50934737
Batch: 86131564A0
Quantity: 4,850.0 kg
Product no.: 10780487
Production date: 23.09.2011
Date of analysis: 10.10.2011
Best before /
retest date: 22.09.2013

Confirmation:

Lead
Cadmium
Mercury
Arsenic
Heavy metals
The confirmation is based on random sampling.

max. 2 mg/kg AAS-Gr.
max. 1 mg/kg AAS-Gr.
max. 0.1 mg/kg AAS-cold vapour
max. 1 mg/kg Ph.Eur./USP
max. 10 mg/kg USP

Confirmation:

Total yeasts and moulds count (TYMC)
Staphylococcus aureus
E. coli
Ps. Aeruginosa
Enterobacteria
The confirmation is based on random sampling.

max. 100 cfu/g Ph.Eur./USP
Abs. in 10 g Ph.Eur./USP
Abs. in 10 g Ph.Eur./USP
Abs. in 10 g Ph.Eur./USP
Abs. in 1 g ISO 21528

ANEXO N°5

**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE QUIPOS
UTILIZADOS DURANTE LA VALIDACIÓN**

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE QUIPOS UTILIZADOS DURANTE LA VALIDACIÓN

- Balanza analítica METTLER TOLEDO AB204-5

ARAGON VALENCIA & ASOCIADOS S.A. DE C.V.
 METROLOGIA, NORMALIZACION, PRUEBAS Y ENSAYOS; Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD
 LABORATORIO DE METROLOGIA
 Email: ava_metrologia@hotmail.com, metrologia@aragonvalencia.com
 PC-MET-005 Rev 1

Registro: SMB- 594 e/11
CERTIFICADO DE CALIBRACION
Página: 01 de 01

Instrumento : Balanza	Solicitante : Ingenio Chaparrastique	
Marca : Mettler Toledo	Dirección : Carretera al Litoral, San Miguel	
Modelo : AB204-5	Fecha de calibración : 2011-10-19	AAAA-MM-DD
Rango : 0 g a 220 g	Recal. recomendada : 2012-10	AAAA-MM
Escala(s) mínima(s) : 0,0001 g	Patrón(es) utilizado(s) : -Juego de masas	Certificado SMM-003e/11
Nº de serie : 1127361376		
Código Interno : MA370-LF005-CH		
Ubicación : Laboratorio de Fabrica		
Cond. Ambientales : T: 24,85 °C HR: 55 %		

Procedimiento o norma utilizada: Recomendación Internacional N° 76 de la Organización Internacional de Metrología Legal (OIML)

La incertidumbre de la calibración se presenta en el numeral 3

1. **Método:** Comparación directa con el patrón, con carga ascendente hasta el límite máximo de carga ó de operación y luego descendiendo hasta el punto cero, realizando la prueba de excentricidad en los puntos indicados del plato.
2. **Trazabilidad:** se garantiza a través del uso de patrones Internacionales calibrados en:
 - INSCO Metrology, Inc., cuya trazabilidad está dada por patrones del NIST de los Estados Unidos de Norteamérica
 - CONACYT cuya trazabilidad esta dada a patrones del Mettler Toledo de Suiza.
3. **Resultados de la calibración:**

Valor Nominal (g)	Prueba de linealidad				EMP (g)	Prueba de Excentricidad			
	Valor Medido (g)		Error (g)			Pos. Plato	Valor Nominal (g)	Valor Medido (g)	Error (g)
	Ascendente	Descendente	Ascendente	Descendente					
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
0.5000	0.5000	0.5000	0.0000	0.0000	±0.0010	1	70.0000	70.0001	0.0001
1.0000	0.9999	1.0000	-0.0001	0.0000	±0.0010	2	70.0000	70.0002	0.0002
3.0000	3.0000	3.0000	0.0000	0.0000	±0.0010	3	70.0000	70.0001	0.0001
5.0000	5.0000	5.0000	0.0000	0.0000	±0.0010	4	70.0000	70.0001	0.0001
10.0000	10.0001	10.0001	0.0001	0.0001	±0.0020	5	70.0000	70.0000	0.0000
20.0000	19.9999	20.0001	-0.0001	0.0001	±0.0030	6	70.0000	70.0001	0.0001
40.0000	40.0001	40.0001	0.0001	0.0001	±0.0030				
60.0000	60.0000	60.0001	0.0000	0.0001	±0.0030				
110.0000	110.0001	110.0001	0.0001	0.0001	±0.0030				
210.0000	210.0000	--	0.0000	--	±0.0030				
Incertidumbre Expandida Ue =			±0.00006		Plato				
Histéresis máxima =			0.0002						
Intervalo de verificación (e) =			0.0010						

Clase según calibración: II

Los resultados aquí presentados son válidos únicamente para el momento de la calibración esto implica que el manejo y cuidado posterior a la calibración del instrumento es responsabilidad de la empresa solicitante.

La incertidumbre se calculó según la Guía para la evaluación y expresión de la incertidumbre para la medición de resultados del NIST de los Estados Unidos de Norteamérica, nota técnica No. 1297

La incertidumbre expandida esta calculada para un nivel de confianza del 95 % el cual da un factor de cobertura K=2.

Este certificado cumple con los requisitos de las Normas ISO 17025: 2005 e ISO 10012-1

Alteraciones o cambios invalidan el presente. Este certificado no es valido sin firma original, este podrá ser reproducido y utilizado en forma completa solo con la autorización expresa de Aragón Valencia & Asociados S.A. de C.V.

F:
Metrologo

Empresa Certificada ISO 9001:2008

F:
Gerente Técnico

Aragón Valencia & Asociados S.A.
 Col. Lomas de San Francisco Casa 2-A, Calle 1
 Antiguo Cuscatlan, San Salvador, El Salvador
 Tel.: (503) 2248-1359, (503)2248-1358;
 Telefax: (503) 272-1157

Aragón Valencia & Asociados S.A.
 19 avenida B 0-67 zona 15 Vista Hermosa II,
 Ciudad de Guatemala, Guatemala,
 Telefono (502) 5294-2894 Telefax: (502) 2369-2306

Aragón Valencia & Asociados S.A.
 Bo. Guamilito 9 ave. entre 11 y 12 calle N° 86
 San Pedro Sula, Honduras,
 Telefax: (504) 557-3406

- Balanza semianalítica METTLER TOLEDO PL3002

ARAGON VALENCIA & ASOCIADOS S.A. DE C.V.
 METROLOGIA, NORMALIZACION, PRUEBAS Y ENSAYOS; Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD
 LABORATORIO DE METROLOGIA
 Email: ava_metrologia@hotmail.com, metrologia@aragonvalencia.com
 PC-MET-005 Rev 1



Registro: SMB- 597 e/11 **CERTIFICADO DE CALIBRACION** Pagina: 01 de 01

Instrumento : Balanza **Solicitante** : Ingenio Chaparrastique
Marca : Mettler Toledo **Dirección** : Carretera al Litoral, San Miguel
Modelo : PL3002 **Fecha de calibración** : 2011-10-19 AAAA-MM-DD
Rango : 0 g a 3 100 g **Recal. recomendada** : 2012-10 AAAA-MM
Escala(s) mínima(s) : 0,01 G **Patrón(es) utilizado(s)** : -Juego de masas Certificado SMM-009e/11
Nº de serie : 1227430170
Código Interno : MA370-LF007-CH
Ubicación : Laboratorio de Fabrica
Cond. Ambientales : T: 24,9 °C HR: 92 %

Procedimiento o norma utilizada: Recomendación Internacional N° 76 de la Organización Internacional de Metrología Legal (OIML)

- La incertidumbre de la calibración se presenta en el numeral 3
- Método:** Comparación directa con el patrón, con carga ascendente hasta el límite máximo de carga ó de operación y luego descendiendo hasta el punto cero, realizando la prueba de excentricidad en los puntos indicados del plato.
 - Trazabilidad:** se garantiza a través del uso de patrones Internacionales calibrados en:
 -INSCO Metrology, Inc., cuya trazabilidad está dada por patrones del NIST de los Estados Unidos de Norteamérica
 -CONACYT cuya trazabilidad esta dada a patrones del Mettler Toledo de Suiza.
 - Resultados de la calibración:**

Valor Nominal (g)	Valor Medido (g)		Error (g)		EMP (g)	Prueba de Excentricidad			
	Ascendente	Descendente	Ascendente	Descendente		Pos. Plato	Valor Nominal (g)	Valor Medido (g)	Error (g)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,10	1	1000,00	1000,00	0,00
10,00	10,00	10,00	0,00	0,00	±0,10	2	1000,00	1000,00	0,00
30,00	30,00	30,00	0,00	0,00	±0,10	3	1000,00	1000,00	0,00
50,00	50,00	50,00	0,00	0,00	±0,10	4	1000,00	1000,00	0,00
100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	±0,10	5	1000,00	999,99	-0,01
200,00	200,00	200,00	0,00	0,00	±0,10	6	1000,00	1000,00	0,00
400,00	400,00	400,00	0,00	0,00	±0,10				
600,00	600,00	600,01	0,00	0,01	±0,20				
1100,00	1100,00	1100,01	0,00	0,01	±0,20				
2100,00	2100,01	2100,00	0,01	0,00	±0,30				
3100,00	3100,01	--	0,01	--	±0,30				

Incertidumbre Expandida Ue =	±0,006	Plato
Histeresis máxima =	0,01	
Intervalo de verificación (e) =	0,10	

Clase según calibración: **II**

Los resultados aquí presentados son válidos únicamente para el momento de la calibración esto implica que el manejo y cuidado posterior a la calibración del instrumento es responsabilidad de la empresa solicitante.
 La incertidumbre se calculó según la Guía para la evaluación y expresión de la incertidumbre para la medición de resultados del NIST de los Estados Unidos de Norteamérica, nota técnica No. 1297
 La incertidumbre expandida esta calculada para un nivel de confianza del 95 % el cual da un factor de cobertura K=2.
 Este certificado cumple con los requisitos de las Normas ISO 17025: 2005 e ISO 10012-1
 Alteraciones o cambios invalidan el presente. Este certificado no es valido sin firma original; este podrá ser reproducido y utilizado en forma completa solo con la autorización expresa de Aragón Valencia & Asociados S.A. de C.V.

F:
Metrologo

Empresa Certificada ISO 9001:2008

F:
Gerente Técnico

Aragón Valencia & Asociados S.A.
 Col. Lomas de San Francisco Casa 2-A, Calle 1
 Antiguo Cuscatlan, San Salvador, El Salvador
 Tel.: (503) 2248-1359, (503)2248-1358:
 Telefax: (503) 273-1157

Aragón Valencia & Asociados S.A.
 19 avenida B 0-67 zona 15 Vista Hermosa II.
 Ciudad de Guatemala, Guatemala
 Telefono (502) 5294-2894 Telefax: (502) 2369-2306

Aragón Valencia & Asociados S.A.
 Bo. Guamilito 9 ave, entre 11 y 12 calle N° 86
 San Pedro Sula, Honduras,
 Telefax: (504) 557-3406

– Espectrofotómetro ultravioleta /visible SHIMADZU UV MINI 1240



R y A Servicios Profesionales S.A. de C.V.
Paseo Miralvalle # 165, Colonia Miralvalle, San Salvador. PBX: 21216464
Fax: 22847112 Email: ryasa@ryasa.com.sv

CONSTANCIA DE CALIBRACION.

CLIENTE: INGENIO CHAPARRASTIQUE S.A. DE C.V.
DIRECCION: Km 144 ½ CARRETERA AL CUCO, SAN MIGUEL.
CONTACTO: LIC. MARIA BERCIAN.
TEL.: 26821221 # DE CERTIFICADO: ICH131011ES.

INSTRUMENTO: ESPECTROFOTOMETRO ULTRAVIOLETA/VISIBLE.
MARCA: SHIMADZU MODELO: UV MINI 1240.
NUMERO DE SERIE: A18939434338 FECHA DE CALIBRACION: 13/10/2011.

LOS FILTROS UTILIZADOS PARA LA VERIFICACION DE LA CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO SON CERTIFICADOS TRAZABLES NIST .
MARCA: HELIMA # DE CATALOGO: 666-000 # DE SET: 1443.
FECHA DE CALIBRACION: 26/08/10 VENCEN: 26/08/12

CONDICIONES: TEMPERATURA DEL AMBIENTE: 21.5 °C
PRUEBA DE EXACTITUD FOTOMETRICA.

FILTRO	440 nm	465 nm	546 nm	590 nm	635 nm
NG 5 (F3)	0.497 A _{0.497A}	0.456 A _{0.454A}	0.468 A _{0.467A}	0.495 A _{0.496A}	0.483 A _{0.483A}
NG 11 (F2)	0.265 A _{0.263A}	0.237 A _{0.234A}	0.241 A _{0.236A}	0.255 A _{0.252A}	0.256 A _{0.253A}

ERROR MAXIMO PERMITIDO = ERROR DEL EQUIPO MAS ERROR DEL FILTRO CERTIFICADO
PARA F3 = 0.010 PARA F2 = 0.009

INSERTEZA ENCONTRADA:
 $U_R = 1.02041E^{-4}$ $U_P = 2.55102E^{-3}$ $U_{rA} = 2.55102E^{-3} \Rightarrow U_A = 2.60079E^{-3}$

PRUEBA DE EXACTITUD DE LONGITUD DE ONDA CON FILTRO DE HOLMIO (F1)

λ CERTIFICADA	360.85 nm	536.30 nm	637.45nm
λ MEDIDA	361.50 nm	537.00 nm	637.00 nm

ERROR MAXIMO ENCONTRADO EN LONGITUDES DE ONDA: 0.70 nm OK
ERROR MAXIMO ACEPTABLE: 1.0 nm = ERROR DEL EQUIPO MAS ERROR DEL FILTRO.

PRUEBAS ADICIONALES

RUIDO DE LINEA BASE RMS:	< 0.001 ABS	OK
PRUEBA DE FILTRO DE HOLMIO:	EN TODO EL RANGO	OK
REPETIBILIDAD EN LECTURAS:	EXCELENTE	OK
PRECISION EN LECTURAS:	EXCELENTE	OK

$U_R = \frac{\text{Ruido fotométrico}}{1.96}$ $U_P = \frac{\text{Presición fotométrica}}{1.96}$ $U_{rA} = 0.434294 \times U_{\%T}$ $U_A = (U_R^2 + U_P^2 + U_{rA}^2)$


INGENIERO DE SERVICIO: HECTOR RAMIREZ



ANEXO N°6

**PARÁMETROS DE DESEMPEÑO A APLICAR PARA CADA CASO
DEL PROCESO DE VALIDACIÓN DADO POR EL CONACYT ⁽¹⁰⁾**

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO A APLICAR PARA CADA CASO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN DADO POR EL CONACYT

Cuadro N°10: Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba: Métodos Normalizados. ⁽¹⁰⁾

Métodos Normalizados				
Parámetros	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios**	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas**	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/ Especificidad	Sí	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del Sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del Método	No	+	+	+
Rango	No	+	+	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión Intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	+	No	No	No
Límite de Cuantificación	No	+	+	+
Robustez	+	+	+	+

- **+**: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis.
- **++**: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

- *: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (ejemplo: disolución, liberación de analito, etc.) el método usado para la cuantificación (cuando aplique) se validará de acuerdo a columnas 2 ó 3.
- ** Ver Anexo 7

Cuadro N°11: Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba: Métodos Desarrollados / Internos⁽¹⁰⁾

Métodos Desarrollados / Internos				
Parámetros	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios**	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas**	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/ Especificidad	Sí	Sí	Sí	+
Estabilidad analítica de la muestra	Sí	Sí	Sí	+
Linealidad del Sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del Método	No	Sí	Sí	+
Rango	No	Sí	Sí	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión Intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	Sí	No	+	No
Límite de Cuantificación	No	+	Sí	+
Robustez	+	Si	Sí	+

- **+**: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis.
- **++**: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

- *: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (ejemplo: disolución, liberación de analito, etc.) el método usado para la cuantificación (cuando aplique) se validará de acuerdo a columnas 2 ó 3.
- ** Ver Anexo 7.

ANEXO N°7

CLASIFICACIÓN, CRITERIOS DE PRECISIÓN Y EXACTITUD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANALITO ⁽¹⁰⁾

CLASIFICACIÓN, CRITERIOS DE PRECISIÓN Y EXACTITUD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANALITO.

Cuadro N° 12: Clasificación en función a la concentración del analito ⁽¹⁰⁾

Clasificación	Concentración del analito
Ultra – trazas	< 0.00001%
Trazas	0.00001% - 0.01%
Micro - componentes	0.01% - 1%
Macro – componentes	> 1%

Cuadro N°13: Concentración del analito vrs precisión ⁽¹⁰⁾

Analito %	Proporción de analito	Unidades	CV%
100	1	100%	1.3
10	10 ⁻¹	10%	2.8
1	10 ⁻²	1%	2.7
0.1	10 ⁻³	0.1%	3.7
0.01	10 ⁻⁴	100ppm	5.3
0.001	10 ⁻⁵	10ppm	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1ppm	11
0.00001	10 ⁻⁷	100ppb	15
0.000001	10 ⁻⁸	10ppb	21
0.0000001	10 ⁻⁹	1ppb	30

Cuadro N°14: Porcentaje de recuperación de analito a distintas concentraciones ⁽¹⁰⁾

Ingrediente Activo (%)	Proporción de Analito	Unidades	Recuperación Promedio (%)
100	1	100%	98 – 102
10	10 ⁻¹	10%	98 – 102
1	10 ⁻²	1%	97 – 103
0.1	10 ⁻³	0.1%	95 – 105
0.01	10 ⁻⁴	100ppm	90 – 107
0.001	10 ⁻⁵	10ppm	80 – 110
0.0001	10 ⁻⁶	1ppm	80 – 110
0.00001	10 ⁻⁷	100ppb	80 – 110
0.000001	10 ⁻⁸	10ppb	60 – 115
0.0000001	10 ⁻⁹	1ppb	40 – 120

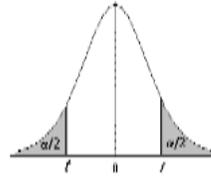
ANEXO N°8

TABLA DE t STUDENT ⁽²⁴⁾

Tabla de la t de Student.

Contiene los valores t tales que $P(|T| > t) = \alpha$,

donde n son los grados de libertad.



$n \setminus \alpha$	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,1584	0,3249	0,5095	1,0000	1,9626	3,0777	6,3137	12,7062	31,8210	63,6559	636,5776
2	0,1421	0,2887	0,4447	0,8165	1,3862	1,8856	2,9200	4,3027	6,9645	9,9250	31,5998
3	0,1366	0,2767	0,4242	0,7649	1,2498	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8408	12,9244
4	0,1338	0,2707	0,4142	0,7407	1,1896	1,5332	2,1318	2,7765	3,7469	4,6041	8,6101
5	0,1322	0,2672	0,4082	0,7267	1,1558	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	6,8685
6	0,1311	0,2648	0,4043	0,7176	1,1342	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	5,9587
7	0,1303	0,2632	0,4015	0,7111	1,1192	1,4149	1,8946	2,3646	2,9979	3,4995	5,4081
8	0,1297	0,2619	0,3995	0,7064	1,1081	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	5,0414
9	0,1293	0,2610	0,3979	0,7027	1,0997	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	4,7809
10	0,1289	0,2602	0,3966	0,6998	1,0931	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	4,5868
11	0,1286	0,2596	0,3956	0,6974	1,0877	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	4,4369
12	0,1283	0,2590	0,3947	0,6955	1,0832	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	4,3178
13	0,1281	0,2586	0,3940	0,6938	1,0795	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	4,2209
14	0,1280	0,2582	0,3933	0,6924	1,0763	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	4,1403
15	0,1278	0,2579	0,3928	0,6912	1,0735	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467	4,0728
16	0,1277	0,2576	0,3923	0,6901	1,0711	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	4,0149
17	0,1276	0,2573	0,3919	0,6892	1,0690	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,9651
18	0,1274	0,2571	0,3915	0,6884	1,0672	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,9217
19	0,1274	0,2569	0,3912	0,6876	1,0655	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,8833
20	0,1273	0,2567	0,3909	0,6870	1,0640	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,8496
21	0,1272	0,2566	0,3906	0,6864	1,0627	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,8193
22	0,1271	0,2564	0,3904	0,6858	1,0614	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,7922
23	0,1271	0,2563	0,3902	0,6853	1,0603	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,7676
24	0,1270	0,2562	0,3900	0,6848	1,0593	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7970	3,7454
25	0,1269	0,2561	0,3898	0,6844	1,0584	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,7251
26	0,1269	0,2560	0,3896	0,6840	1,0575	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,7067
27	0,1268	0,2559	0,3894	0,6837	1,0567	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,6895
28	0,1268	0,2558	0,3893	0,6834	1,0560	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,6739
29	0,1268	0,2557	0,3892	0,6830	1,0553	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,6595
30	0,1267	0,2556	0,3890	0,6828	1,0547	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,6460
40	0,1265	0,2550	0,3881	0,6807	1,0500	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	3,5510
80	0,1261	0,2542	0,3867	0,6776	1,0432	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387	3,4164
120	0,1259	0,2539	0,3862	0,6765	1,0409	1,2886	1,6576	1,9799	2,3578	2,6174	3,3734
∞	0,126	0,253	0,385	0,674	1,036	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576	3,291

ANEXO N° 9

LEY DE FORTIFICACIÓN DEL AZÚCAR CON VITAMINA A ⁽²⁵⁾

LEY DE FORTIFICACIÓN DEL AZÚCAR CON VITAMINA A

DECRETO Nº 843.-

LA ASAMBLEA LEGISLATIVA DE LA REPUBLICA DE EL SALVADOR,

CONSIDERANDO:

- I. Que de conformidad al Art. 65 de la Constitución, la salud de los habitantes de la República constituye un bien público que el Estado y las personas están obligadas a velar por su conservación y restablecimiento;
- II. Que la misma Carta Magna señala, que el Consejo Superior de Salud Pública velará por la salud del pueblo y coadyuvará con el Estado en la política nacional de salud, controlando y supervisando su aplicación;
- III. Que uno de los problemas nutricionales que sufre la población salvadoreña, es la deficiencia orgánica de Vitamina "A", que produce lesiones oculares y aún la ceguera, especialmente entre los salvadoreños de escasos recursos económicos;
- IV. Que uno de los medios para superar dicha deficiencia y evitar las consecuencias a que se refiere el considerando anterior, es enriquecer con Vitamina "A" el azúcar centrifugada que se consume en el país, de acuerdo con los procedimientos técnicos adecuados;

POR TANTO,

En uso de sus facultades constitucionales y a iniciativa del Presidente de la República, por medio de los Ministros de Salud Pública y Asistencia Social y de Economía.

DECRETA la siguiente:

LEY DE FORTIFICACION DEL AZUCAR CON VITAMINA "A"

TITULO I

CAPITULO UNICO

OBJETO DE LA LEY

Art. 1.- El objeto de la presente ley es establecer normas que regulen la obligación de los centros de producción o ingenios azucareros para la fortificación del azúcar con vitamina "A", Palmitato de Retinilo, como medio para controlar y prevenir la deficiencia nutricional de la población.

Art. 2.- Toda azúcar centrifugada destinada al consumo interno, deberá fortificarse con Palmitato de Retinilo, bajo la responsabilidad de cada centro de producción o ingenio azucarero en las condiciones que se fijen en esta ley o en su Reglamento de Aplicación.

TITULO II

CAPITULO UNICO

ORGANISMOS DE APLICACION

Art. 3.- Los organismos estatales encargados de velar por el debido cumplimiento de las normas contenidas en esta ley y su reglamento, son el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y el Ministerio de Economía.

Art. 4.- Al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social le corresponderán las atribuciones siguientes:

a) Proporcionar, dentro de su competencia, el apoyo técnico para ejecutar las acciones requeridas en el proceso de elaboración de la premezcla necesaria para el proceso de fortificación del azúcar;

b) Capacitar al personal de los centros de producción involucrados directamente en el proceso de fortificación, tanto en el conocimiento de los análisis cuali-cuantitativos de Palmitato de Retinilo como en el proceso mismo de la fortificación;

c) Efectuar periódicamente monitoreo del proceso de fortificación en su integridad así como evaluaciones de concentraciones de Palmitato de Retinilo en los lugares de producción del azúcar y en los expendios al consumidor; y Las demás que le señale esta Ley o su Reglamento.

Art. 5.- Al Ministerio de Economía le corresponderá:

a) Ejercer los controles necesarios para que no se importe azúcar sin fortificar;

b) Las demás que le señale esta Ley y su Reglamento.

Art. 6.- Cada centro de producción de azúcar o ingenio azucarero, tendrá a su cargo la compra o importación de Palmitato de Retinilo para la elaboración de la premezcla, la cual podrá hacerse en él, sí cuenta con el equipo necesario, o podrá comprarla en otro ingenio que pueda hacerlo.

El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, apoyado por la Comisión Salvadoreña para el Desarrollo Azucarero y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, tendrán a su cargo la supervisión de la manufactura y control de calidad de la premezcla y del proceso de fortificación a nivel de ingenio.

TITULO III

CAPITULO UNICO

PROCEDIMIENTOS PARA LA FORTIFICACION

Art. 7.- El nivel de fortificación del azúcar deberá ser de 15 microgramos de Palmitato de Retinilo (50UI/G), que es el resultante de la estimación de

consumo diario de azúcar por la población salvadoreña ya las necesidades diarias de Palmitato de Retinilo establecidas para los niños de edad preescolar. Tanto la composición de la premezcla como el procedimiento para la preparación y control de especificaciones deberán hacerse constar en el Reglamento de aplicación de la Ley.

Art. 8.- Al mercado de exportación podrá dedicarse azúcar no fortificada con Palmitato de Retinilo y podrá venderse al mercado interno con previa y expresa autorización del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social para aquellos casos en que se compruebe técnicamente la inconveniencia, la no justificación y/o la incompatibilidad de la fortificación.

Art. 9.- Los sacos que contengan la premezcla deberán tener etiqueta impresa en la que esté identificado su contenido en la forma siguiente: "Premezcla de azúcar, Palmitato de Retinilo. Para uso exclusivo en la fortificación de azúcar. Peligro. No apta para consumo directo". Además, deberá señalar la fecha de preparación, el número de lote y la nominación de la institución a cuyo cargo está su elaboración.

Los sacos que deben usarse para empacar la premezcla, serán de polietileno negro, colocado dentro de otro saco de fibras de polipropileno, sellándolos herméticamente, procurando no dejar ningún espacio vacío en su interior a fin de impedir que se lleguen a abrir por deficiencia del material empleado en su fabricación.

Los ingenios velarán porque los sacos conteniendo premezcla sean almacenados en un lugar limpio y fresco. En el caso de que se abriera uno de los sacos, su contenido debe ser usado de inmediato y por ninguna razón deben guardarse sacos abiertos dentro de un ingenio.

Art. 10.- En los mercados al aire libre y para la venta al detalle, el azúcar debe estar empacado en bolsas plásticas transparentes, pero opacas a la luz

ultravioleta con el objeto de proteger la mejor estabilidad de la vitamina en el azúcar.

TITULO IV
CAPITULO UNICO
DE LAS INFRACCIONES Y SANCIONES

Art. 11.- Toda infracción a la presente ley y su reglamento se sancionará de la manera siguiente:

- a) Multa que se graduará entre cinco mil a veinticinco mil colones por cada infracción cometida; y
- b) Decomiso del azúcar, objeto de la infracción.

Art. 12.- Para imponer cualquier clase de sanción deberá tomarse en cuenta la naturaleza de la infracción, su mayor o menor gravedad, la repercusión que la infracción haya tenido o pueda tener en la población y la capacidad económica del infractor.

Art. 13.- Toda acción y omisión que contravenga lo dispuesto en esta Ley, se considerará como infracción contra la salud y se sancionará administrativamente de conformidad con los procedimientos establecidos en el Título III, Capítulo II, Sección Dos y Capítulo V del Código de Salud en lo que fueren aplicables.

TITULO V
CAPITULO UNICO
DISPOSICIONES FINALES Y TRANSITORIAS

Art. 14.- El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, gestionará convenios con organismos internacionales para obtener asistencia técnica y económica para cumplir adecuadamente los fines de esta ley.

Art. 15.- El proceso de fortificación del azúcar con Palmitato de Retinilo, objeto de esta ley deberá entrar en funcionamiento a partir de la zafra correspondiente al año 1994/1995.

Art. 16.- La Comisión Salvadoreña para el Desarrollo Azucarero y el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social controlarán el debido proceso de la fortificación del azúcar, en la forma prevista en las disposiciones de esta Ley y su Reglamento de aplicación.

Art. 17.- Está exceptuado del proceso de fortificación a que se refiere esta ley, la existencia del producto elaborado, que para el mercado interno se tuviere como resultado de zafra anteriores a la que termine esta ley. Para tal efecto, los interesados deberán hacer del conocimiento del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, el monto de las existencias del azúcar antes de la zafra respectiva, para que la autoridad correspondiente ejerza sobre el producto no enriquecido el control que estimare necesario.

Art. 18.- El presente Decreto entrará en vigencia ocho días después de su publicación en el Diario Oficial.

DADO EN EL SALON AZUL DEL PALACIO LEGISLATIVO: San Salvador, a los catorce días del mes de abril de mil novecientos noventa y cuatro.

LUIS ROBERTO ANGULO SAMAYOA,
PRESIDENTE.

CIRO CRUZ ZEPEDA PEÑA,
VICEPRESIDENTE.

RUBEN IGNACIO ZAMORA RIVAS,
VICEPRESIDENTE.

MERCEDES GLORIA SALGUERO GROSS,
VICEPRESIDENTE.

RAUL MANUEL SOMOZA ALFARO,
SECRETARIO.

JOSE RAFAEL MACHUCA ZELAYA,
SECRETARIO.

SILVIA GUADALUPE BARRIENTOS
ESCOBAR

SECRETARIO.

RENE MARIO FIGUEROA FIGUEROA,

SECRETARIO.

REYNALDO QUINTANILLA PRADO,
SECRETARIO.

CASA PRESIDENCIAL: San Salvador, a los veintiún días del mes de abril de mil novecientos noventa y cuatro.

PUBLIQUESE,

ALFREDO FELIX CRISTIANI BURKARD,

Presidente de la República.

GILBERTO LISANDRO VASQUEZ SOSA,

Ministro de Salud Pública y Asistencia Social.

LUIS ENRIQUE CORDOVA,

Ministro de Economía.

D. O.Nº 96

TOMO Nº 323

FECHA: 25 de Mayo de 1994

MHSC/ngcl.

ANEXO N°10

NORMATIVA SALVADOREÑA DE FORTIFICACIÓN DE AZÚCAR ⁽²²⁾

NORMATIVA SALVADOREÑA DE FORTIFICACIÓN DE AZÚCAR

NORMA

NSO 67.20.01:03

SALVADOREÑA

AZUCARES. ESPECIFICACIONES.

CORRESPONDENCIA: Esta norma es una adaptación de la Norma CODEX STAN 4-1981. Azúcar Blanco

I.C.S. 67.180

Editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Colonia Médica, Av. Dr. Emilio Alvarez, Pje. Dr. Guillermo Rodríguez Pacas # 51, San Salvador, El Salvador, Centro América. Teléfonos : 226 2800, 225 6222 ; Fax. 226 6255 ; e-mail : info@ns.conacyt.gob.sv.

INFORME

Los Comités Técnicos de Normalización del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, son los organismos encargados de realizar el estudio o la adopción de Normas. Están integrados por representantes de la Empresa Privada, Gobierno, Organismos de Protección al Consumidor y Académico Universitario.

La norma fue revisada y aprobada como NORMA SALVADOREÑA OBLIGATORIA NSO 67.20.01:03 AZUCAR. ESPECIFICACIONES por el Comité Técnico de Normalización de Azúcar Fortificada 20. La oficialización de la Norma conlleva la ratificación por la Junta Directiva de CONACYT y el Acuerdo Ejecutivo del Ministerio de Economía.

La revisión y cambios en esta Norma serán los correspondientes a los hechos por el Comité respectivo del Codex Alimentarius a nivel internacional.

MIEMBROS PARTICIPANTES DEL COMITE 20

Irene de Guirola	Asociación Azucarera de El Salvador
José Alberto Domínguez	DIZUCAR
Florentini Cabrera	DIZUCAR
Alfredo Pineda	Ingenio El Angel
José Mauricio Valdivieso	Ingenio San Francisco
Gerardo Merino	INCAP / OPS
Haydeé Rosa de Orellana	M S P A S Nutrición
Mario Lemus	M S P A S Control de Alimentos
Alicia de Alvergue	Comisión Salvadoreña para el Desarrollo Azucarero
José Emilio Suadi	Ministerio de Agricultura y Ganadería
Ricardo Harrison Parker	CONACYT

1. OBJETO

Esta Norma Salvadoreña Obligatoria establece las características físicas, químicas y especificaciones nutricionales que debe cumplir el azúcar.

2. AMBITO DE APLICACION

Esta norma se aplica a toda el azúcar que se consume en el país, cualquiera que sea su tipo, sea ésta de producción nacional, importación comercial o donación la cual debe estar fortificada con Vitamina "A", para consumo directo o indirecto.

3. DEFINICIONES

3.1 Azúcar: producto sólido cristalino, constituido principalmente por sacarosa.

3.2 Azúcar fortificada con Vitamina "A": es aquella que contiene, durante su comercialización un nivel mínimo de 5 mg/kg de Palmitato de Retinol.

3.3 ICUMSA: Comisión Internacional de Estandarización de Métodos de Análisis de Azúcar (por sus siglas en inglés).

3.4 GRADOS Z: grados de polarización en la escala internacional del azúcar.

4. TIPOS DE AZUCAR, COMPOSICION Y FACTORES ESENCIALES DE CALIDAD

4.1 AZUCAR REFINADA

Polarización	mínimo 99.7 Grados Z
Azúcar invertido	máximo 0.04%
Ceniza por conductividad	máximo 0.04%
Humedad	máximo 0.10%
Color con Vitamina "A"	máximo 80 Unidades ICUMSA-4

4.2 AZUCAR BLANCA SUPERIOR

Polarización	mínimo 99.6 Grados Z
Azúcar invertido	máximo 0.10%
Ceniza por conductividad	máximo 0.10%
Humedad	máximo 0.10%
Color con Vitamina "A"	máximo 300 Unidades ICUMSA-4
Dióxido de azufre	máximo 70 mg / kg

4.3 AZUCAR BLANCA

Polarización	mínimo 99.5 Grados Z
Azúcar invertido	máximo 0.10%
Ceniza por conductividad	máximo 0.10%
Humedad	máximo 0.10%
Color con Vitamina "A"	máximo 500 Unidades ICUMSA-4
Dióxido de azufre	máximo 70 mg / kg

4.4 AZUCAR CRUDA

Polarización	mínimo 96 Grados Z
--------------	--------------------

Azúcar invertido	máximo 1.00%
Ceniza por conductividad	máximo 0.30%
Humedad	máximo 1.00%
Color con Vitamina "A"	máximo 6000 ICUMSA-4

5. ADICION DEL FORTIFICANTE

La adición de la premezcla puede realizarse en cualquier punto desde las centrífugas de lavado hasta las tolvas de envasado, el promedio de Palmitato de Retinol debe ser de 15 mg/kg con intervalo de tolerancia de 10 a 20 mg/kg, garantizando así un mínimo de 5 mg/kg durante la vida de comercialización del azúcar.

5.1 CONTROL Y ASEGURAMIENTO DE LA FORTIFICACION

Cuando la fortificación del azúcar se realice en los centros de producción, el nivel de Palmitato de Retinol debe ser de 15 mg / kg al menos en el 80 % de las muestras analizadas.

6. HIGIENE

Se recomienda que el producto regulado por las disposiciones de esta Norma de conformidad con la NSR 67.00.337:02 Código Internacional Recomendado de Prácticas - Principios Generales sobre Higiene de los Alimentos.

6.1 LIMITE DE CONTAMINANTES PARA TODOS LOS AZUCARES

ELEMENTO	NIVEL MAXIMO
Arsénico (As)	1.00 mg / kg
Cobre (Cu)	2.00 mg / kg
Plomo (Pb)	0.50 mg / kg

7. ENVASE Y ETIQUETA

Además de los requisitos de la NSO 67.10.01:98 NORMA GENERAL PARA EL ETIQUETADO DE LOS ALIMENTOS PREENVASADOS se deben aplicar las siguientes disposiciones específicas:

7.1 Nombre y tipo del producto: Se debe indicar la siguiente leyenda: Azúcar (el especificado en el inciso 4 de la presente norma), Fortificada con Vitamina "A".

7.2 Contenido neto: Debe ser expresado en el Sistema Internacional de Unidades.

7.3 Marca comercial: La registrada ante la Dirección General de Salud.

7.4 Ingredientes: Se obvia el listado por ser un solo ingrediente alimenticio.

7.5 Identificación de lote: Para fines de identificación y fecha de fabricación, se puede usar codificación o clave del fabricante, la cual debe ser suministrada al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en el Departamento correspondiente y debe contener por lo menos el día, mes y año.

7.6 Nivel mínimo de Palmitato de Retinol: Se debe indicar la siguiente leyenda: NIVEL MINIMO DE PALMITATO DE RETINOL GARANTIZADO DE 5 mg/ kg.

7.7 Instrucciones para la conservación: Debe indicar la siguiente leyenda: ALMACENARSE EN UN LUGAR SECO Y FRESCO.

7.8 Nombre o Razón Social: Del fabricante, envasador o distribuidor y su dirección.

7.9 Registro sanitario: Se debe declarar en la etiqueta el Número de Registro Sanitario asignado al producto: REG N°.....D.G.S., EL SALVADOR.

7.10 País de origen: Si el producto es fabricado en algún país de Centroamérica, la leyenda debe ser: Producto Centroamericano hecho en(Nombre del país). En caso contrario, se debe declarar el país de origen del producto.

7.11 Diseño: El diseño de la etiqueta comercial de cada envase es opcional de cada empresa, siempre que reúna los requisitos establecidos en esta norma.

8. METODOS DE ANALISIS Y ENSAYO

Los métodos descritos a continuación son los especificados en el Volumen 13 1995 del CODEX ALIMENTARIUS.

Para determinar el contenido de Vitamina A se deben usar los métodos oficiales o internacionalmente aceptados. En caso de diferencias de técnicas analíticas se tendrá la asesoría de INCAP / OPS:

PRODUCTO	DISPOSICION	METODO	PRINCIPIO
Azúcar blanco	Azúcar invertido en Azúcares con Contenido >10% (m/m)	ICUMSA (1979) 52-55 enmendado ICUMSA (20) 004-1981 informe del tema 15, Cuadro 6 y Recomendación 4.	Titulometría
Azúcar blanco	Cenizas Conductividad	ICUMSA (1979) 85-86 004-1981	Conductrimetría
Azúcar blanco	Color	ICUMSA (1979) 125-128 004-1981 enmendado ICUMSA (20), informe del tema general 2. Apéndice 1 y Recomendación 2	Espectrofotometría

Azúcar blanco	Polarización en azúcares que necesitan ser clarificados	ICUMSA (1979) 25-30, Polarimetría 004-1981 enmendado ICUMSA (18) 175-180, 189-190 e ICUMSA (19) 66-68 y 197
Azúcar blanco	Polarización en azúcares que no necesitan ser clarificados	ICUMSA (18) 341-344, Polarimetría ICUMSA004-1981 (19) 66-68 enmendado ICUMSA (20) 190-193

9. REFERENCIAS NORMATIVAS

Para la elaboración de la presente norma se han considerado los siguientes documentos:

- Ley de Fortificación de Azúcar con Vitamina A.
- Decreto N° 843 del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 14 de abril de 1994.
- Reglamento de la Ley de Fortificación con Vitamina A.
- Decreto N° 3 del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2 de abril de 1995.
- Norma Técnica del Azúcar Centrifugada Fortificada con Vitamina A.
- SCA-02 Resolución Ministerial N° 507 del 18 de mayo de 1995.
- Azúcar Blanco. CODEX STAN 4. 1981 (Volumen 11 del CODEX ALIMENTARIUS).

10. CUMPLIMIENTO Y VERIFICACION

Corresponde la vigilancia del cumplimiento de esta Norma Salvadoreña Obligatoria al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, a través del

Departamento de Control de Alimentos y al Ministerio de Economía a través de la Dirección General de Protección al Consumidor en lo concerniente a pesos, medidas y etiquetado.

FIN DE NORMA