

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROYECTO DE TITULACIÓN**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE  
QUÍMICA”**

**TEMA:**

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN RESISTENTE EN MATRICES  
VEGETALES

**AUTOR:**

ANDREA CRUZ ESPINOZA

Guayaquil - Ecuador

2022

## Resumen

El almidón resistente es una fracción de almidón almacenado en forma de gránulos en los carbohidratos capaz de proveer beneficios metabólicos al ser humano y a su vez, un almidón de alta propiedad tecnológica para la industria alimentaria. Los criterios específicos de un producto son establecidos en base a los resultados analíticos que proporcione el laboratorio, de aquí la importancia de procesos que garantice métodos aptos para su ejecución entregando así, resultados exactos y confiables. El objetivo del trabajo es realizar la validación de un método enzimático para determinar almidón resistente en matrices vegetales bajo la AOAC 2002.02. En la metodología analítica se trabajó con cinco materiales de referencia: Almidón de frejol rojo, almidón de maíz con alto contenido de amilosa, material producido por modificación enzimática de almidón de tapioca (Actistar), almidón resistente, almidón de papa; y tres matrices alimentarias: harina de frejol de variedad Centenario (nivel bajo-b), almidón de banano estado 1 de variedad Cavendish (nivel medio-m) y harina de papa de variedad Pucashungo (nivel alto-a). Se evaluó ocho parámetros de desempeño. Los resultados del método fueron; si es selectivo, LD = 2.98 %AR, LC = 4.02 %AR,  $R^2 = 0.9983$ , rango de trabajo: 4.02% - 50.98 %AR, exactitud: b 100.79%, m: 98.90%, a 83.64 % , repetibilidad/reproducibilidad-RSD%: b (1.85 /1.89), m (5.03 /4.71) y a (6.55/6.06), robustez (prueba F): 1.87, 1.00, 1.25, 1.85, 1.79, 1.83, 1.24 e incertidumbre: b  $\pm 0.20$  %AR, m  $\pm 5.38$ %AR y a  $\pm 8.42$  %AR. El ensayo desarrollado a nivel alto mostró que el pellet no se disolvió perdiendo capacidad de recuperación y aunque las medias son estadísticamente iguales, la dispersión de los datos fue mayor a en los niveles medio y alto.

Palabras claves: Validación, almidón resistente, parámetros de desempeño, niveles

## Abstract

Resistant starch is a fraction of starch stored in the form of granules in carbohydrates capable of providing metabolic benefits to humans and so, a starch with a high technological property for the food industry. The specific criteria of a product are established based on the analytical results provided by the laboratory, hence the importance of processes that guaranteed suitable methods for its execution, thus delivering accurate and reliable results. The objective of the work is to carry out the validation of an enzymatic method to determine resistant starch in vegetable matrices under the AOAC 2002.02. In the analytical methodology, five reference materials were used: red bean starch, corn starch with high amylose content, material produced by enzymatic modification of tapioca starch (Actistar), resistant starch, potato starch; and three food matrices: Centenario variety bean flour (low level-b), Cavendish variety stage 1 plantain starch (medium level-m) and Pucashungo variety potato flour (high level-a). Eight performance parameters were evaluated. The results of the method were; if selective, LD = 2.98 %AR, LC = 4.02 %AR, R<sup>2</sup>= 0.9983, working range: 3.91% - 59.22 %AR, accuracy: b 100.79%, m: 98.90%, a 83.64%, repeatability/reproducibility- RSD%: b (1.85 /1.89), m (5.03 /4.71) and a (6.55/6.06), robustness (F test): 1.87, 1.00, 1.25, 1.85, 1.79, 1.83, 1.24 and uncertainty: b  $\pm$  0.20 %AR , m  $\pm$  5.38 %AR and a  $\pm$  8.42 %AR. The test developed at a high level showed that the pellet did not dissolve, losing its recovery capacity and, although the means are statistically equal, the dispersion of the data was greater at the medium and high levels.

Keywords: Validation, resistant starch, performance parameters, levels

## **DEDICATORIA**

A Dios. -

Génesis 1:27 Y creó Dios al hombre a su imagen, a imagen de Dios lo creó; varón y hembra los creó.

A mis padres. -

A mis padres, Econ. Vicente Cruz y Sra. Andrea Espinoza, quienes decidieron construir mi vida en base a principios básicos, la perseverancia, la responsabilidad y la dedicación con sacrificio.

A mi familia. –

Mi esposo y mi hijo, Ing. Danny Dillon A. y Danny Dillon C., por su paciencia y quienes dieron un toque especial a mi motivación profesional y personal.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi tutora, usted formó parte importante de esta historia con su aporte profesional que la distingue. Además, su virtud, experiencia y paciencia marcaron el camino para culminar este proyecto. Muchas gracias por sus palabras de aliento, cuando más las necesite; por estar allí cuando mis horas de trabajo se hacían largas y confusas. Gracias.

A la coordinación y a los profesores de la maestría quienes con su paciencia y conocimiento aportaron en la presentación de este proyecto.

A mis compañeros de trabajo y de profesión, Rómulo Salazar G., Fabiola Cornejo Z., María de Los Ángeles Garofalo C., Cindy Espinales M, y Juliana Criollo F., por el apoyo en el uso del equipamiento ya que sin su consentimiento no hubiera podido realizar este proyecto.

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación, me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

---

Andrea Cruz Espinoza

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



---

Joel Vielma Puente, PhD  
Coordinador



---

MBA. Carmen Montiel Izquierdo  
Tutora



---

Nadia Flores Manrique, MSc.  
DOCENTE EVALUADOR

## ABREVIATURAS O SIGLAS

AACC. Asociación de Estadounidenses de Químicos y Cereales  
ACS. American Chemical Society  
AMG. Amyloglucosidase  
AOAC. Association of Analytical Communities, Association of Official Agricultural Chemists  
AR. Almidón resistente  
BPL. Buenas Practicas de Laboratorio  
BRC. British Retail Consortium

CAS. Chemical Abstracts Service  
Ciclo DMAIC. Diseñar o definir, Medir, Analizar, Mejorar, Controlar  
EN 45001:1989. Criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo  
ENT. Enfermedades no transmisibles  
EURACHEM. A focus for analytical chemistry in Europe  
FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  
FSSC 22000. Dertificación del Sistema de Seguridad Alimentaria  
GFP. Productos sin gluten  
GOPOD. Glucose Oxidase/Peroxidase  
HACCP. Sistema de Análisis de Peligros y de puntos críticos de control  
HPLC. High Performance Liquid Cromatography  
ID. Calificación de diseño  
IFS. Norma Internacional de Alimentos  
ILAC. Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios  
INEN. Servicio Ecuatoriano de Normalización  
INIAP. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias  
IQ. Calificación de instalación  
ISO. Organización Internacional de Normalización  
ISO22000. Sistema de gestión de Seguridad Alimentaria  
ISO 9001. Sistema de Gestión de la Calidad  
ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración  
ISO/IEC 25. (General requirements for the competence of calibration and testing laboratories)  
LC. Límite de Cuantificación  
LD. Límite de detección  
NMKL. Nordic Committee on Food Analysis  
NTE. Norma Técnica Ecuatoriana  
OMS. Organización Mundial de la Salud  
OQ. Calificación de Operación  
PDCA. Planificar, HACer, Verificar y Actuar  
PQ. Calificación de desempeño  
SAE. Servicio de Acreditación Ecuatoriana  
USP-NF. Farmacopea de los Estados Unidos-Formulario Nacional  
VIM. Vocabulario Internacional de Metrología

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes .....	3
1.2. Descripción del problema.....	5
1.3. Objetivos .....	6
1.4. Hipótesis .....	6
1.5. Alcance .....	7
CAPÍTULO 2.....	8
MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Almidón resistente .....	8
2.2. Validación de un método analítico.....	10
2.3. Requisitos de gestión y técnicos para el estudio de una validación .....	11
2.4. Proceso de validación de método .....	16
2.5. Estimación de la incertidumbre .....	27
2.6. Informe de validación y declaración de método validado .....	30
2.7. Control de calidad para los análisis de rutina.....	32
CAPÍTULO 3.....	34
3. METODOLOGÍA.....	34
3.1. Elección del método .....	34
3.2. Procedimiento analítico .....	35
3.2.1. Reactivos analíticos .....	35
3.2.2. Equipos, materiales e instrumentos analíticos .....	40
3.2.3. Metodología analítica .....	51
3.3. Diseño experimental.....	57
3.4. Incertidumbre de medida.....	64
3.5. Herramienta estadística para el análisis.....	67
3.6 Informe de validación .....	70
3.7 Aseguramiento de calidad de los resultados .....	71
CAPÍTULO 4.....	73

4. RESULTADOS .....	73
4.1. Puesta inicial del método.....	73
4.2. Verificación inicial .....	74
4.3. Parámetros de desempeño .....	74
4.3.1 Selectividad.....	75
4.3.2 Blancos .....	76
4.3.3 Límite de detección (LD) .....	78
4.3.4 Límite de cuantificación (LC).....	80
4.3.5 Linealidad.....	81
4.3.6 Rango de trabajo.....	81
4.3.7 Exactitud .....	82
4.3.8 Reproducibilidad y repetibilidad .....	83
4.3.9 Robustez .....	87
4.4 Incertidumbre de medida.....	90
4.5 Resumen del desempeño.....	92
4.6. Declaración del método.....	94
4.7 Aseguramiento de la calidad de los resultados .....	95
CAPÍTULO 5.....	97
CONCLUSIONES.....	97
RECOMENDACIONES .....	98
REFERENCIAS .....	99
ANEXOS.....	102

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 4.1	Probabilidad Normal.....	78
Figura 4.2	Distribución Normal.....	79
Figura 4.3	Curva de calibrado Glucosa Standard .....	81
Figura 4.4	Varianza en tres niveles.....	86
Figura 4.5	Comparación de siete modificaciones sencillas en el método. ....	89
Figura 4.6	Factores vs incertidumbre.....	92

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1	Reactivos de laboratorio .....	36
Tabla 3.2	Equipos de laboratorio .....	41
Tabla 3.3	Cronograma de mantenimiento y calibración .....	44
Tabla 3.4	Ajuste de equipamiento.....	46
Tabla 3.5	Diseño experimental del método.....	57
Tabla 3.6	Incertidumbre de medida .....	64
Tabla 3.7	Incertidumbre combinada y expandida .....	66
Tabla 3.8	Técnicas estadísticas para validación del método .....	67
Tabla 3.9	Validez de los resultados .....	71
Tabla 4.1	Resultados de muestra de almidón.....	74
Tabla 4.2	Almidón de frejol rojo, 4.9 % .....	75
Tabla 4.3	Estadístico t-student a nivel de significancia $\alpha= 0.05$ .....	76
Tabla 4.4	Blanco reactivo del ensayo .....	77
Tabla 4.5	Blanco muestra del ensayo.....	77
Tabla 4.6	Concentraciones de almidón resistente de 4.9% .....	79
Tabla 4.7	Límite de detección .....	80
Tabla 4.8	Límite de cuantificación.....	80
Tabla 4.9	Rango de trabajo.....	82
Tabla 4.10	Exactitud del método .....	82
Tabla 4.11	Reproducibilidad y repetibilidad en los tres niveles .....	84
Tabla 4.12	Evaluación de desempeño del método en el laboratorio por nivel.....	87
Tabla 4.13	Prueba de Robustez a nivel medio .....	88
Tabla 4.14	Prueba F en término de dispersión.....	89
Tabla 4.15	Incertidumbres del método en tres niveles de estudio.....	91
Tabla 4.16	Resultados del método en función de objetivos.....	93
Tabla 4.17	Resultados aptos para el ensayo.....	95
Tabla 4.18	Validez de los resultados .....	96

## **LISTADO DE ANEXOS**

ANEXO A Origen de los métodos oficiales AOAC 2022.02 y AACC 32.40-01

ANEXO B Método de ensayo: determinación de almidón resistente en matrices vegetales - Método oficial AOAC-

ANEXO C Informe de validación

ANEXO D Equipamiento usado en el laboratorio

ANEXO E Flujograma del método analítico



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

El propósito del estudio es realizar la validación de un método enzimático para cuantificar el almidón resistente a partir de matrices vegetales. Según el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el almidón resistente se encuentra en cereales, semillas, legumbres, musáceas, algunos tubérculos y raíces. En el Ecuador, los principales cultivos son arroz, trigo, maíz suave y duro, banano, yuca, papa, fréjol. El almidón resistente puede incorporarlo en una amplia gama de productos como panificación, pastelería, galletería, cereales extruidos, productos horneados, bebidas, embutidos y alimentos fermentados [1].

Los beneficios fisiológicos del almidón resistente son potencialmente positivos en el mejoramiento de la salud de la microbiota, la disminución de la cantidad de grasa, mejorar la sensibilidad en la insulina, regulación de glucosa en la sangre (glicemia) y el control del metabolismo lipídico [1]. Es decir que, el almidón resistente puede variar la cinética de degradación de los nutrientes, lo que conlleva al diseño de nuevos productos con menor índice glicémico y energético. AR podría ser un ingrediente usado como gran potencial en desarrollo de productos para el tratamiento de enfermedades crónicas porque puede regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos así también las posibles asociaciones con la salud de la microbiota [1].

Actualmente, el laboratorio no cuenta con procedimientos validados que permita ofrecer servicios de análisis para la entrega de resultados exactos y confiables, pero los laboratorios con una alta competencia técnica son contratados para la verificación de la calidad de los productos. Además, otra ventaja es optimizar los procesos de medición durante el análisis del mensurando porque disminuyen los costos por repetición de pruebas, desperdicios de materiales y reactivos; cumpliendo así uno de los requisitos del proceso de las normas internacionales como Organización

Internacional de Normalización (ISO), Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), guía EURACHEM [2] [3][4].

El estudio es de tipo investigativo, descriptivo y experimental porque tiene como objetivo el describir, controlar e indagar las situaciones o eventos durante el estudio. Los pasos propuestos para alcanzar los objetivos específicos son:

- Investigación documental: Esta etapa es de suma importancia porque se diseñará la metodología de trabajo que incluye el diseño de experimentos para el análisis en el laboratorio. Por lo tanto, se analizará los requerimientos de antes, durante y después de la validación del método de ensayos analíticos usando fuentes fiables como normas internacionales, libros, reglamentos o directrices que haga referencia a los parámetros de desempeño y estadísticos establecidos para comprobar que los métodos cumplen con los propósitos para los cuales fueron diseñados [2] [5].
- Ejecución del ensayo analítico: Esta fase usará el método investigativo tipo experimental que permitirá recolectar los datos (fuente primaria) en un formato específico del experimento diseñado. El experimento se ejecutará en un laboratorio con atención al uso de los instrumentos o equipos de medición, unidades de medida, mantención de las condiciones ambientales y demás variables establecidas en las normas y guías; especialmente en la norma ISO/IEC 17025:2017 [6]
- Analizar los aspectos generales como los estadísticos del ensayo analítico y sus resultados: En esta etapa, el análisis se realizará en dos etapas: Primeramente, se realizará el método investigativo de la observación científica que recoge la información de cada uno de los datos generados en el trabajo. A continuación, se realizará el método investigativo de medición porque revelará el comportamiento de los análisis (tendencias), las condiciones constantes de un número grande de veces del estudio del fenómeno con resultados muy estables (regularidades), y las relaciones en

el proceso o fenómeno objeto del estudio, por medio de cálculos estadísticos para determinar si el procedimiento es válido para su fin previsto [7].

- Presentar las evidencias de la validación: Por último, se resumirá la presentación del informe de la validación del método del ensayo analítico y la declaración del método. A su vez, los requerimientos de control de calidad para los análisis de rutina [3].

## **1.1. Antecedentes**

Los ensayos son uno de los pilares de la evaluación de conformidad de productos y procesos que depende de la calidad de los métodos analíticos como de los procesos en los laboratorios para la garantía de calidad de los resultados obtenidos. [8]. Hoy en día, las empresas buscan laboratorios de ensayos analíticos o de investigación que cuenten con la capacidad de proporcionar los resultados exactos y confiables que satisfagan las exigencias del siglo 21.

En la industria alimentaria, las empresas buscan adquirir y/o mantener Sistemas de Certificación como Certificación del Sistema de Seguridad Alimentaria (FSSC 22000), British Retail Consortium (BRC), Sistema de Gestión de Seguridad Alimentaria (ISO22000), Sistema De Análisis De Peligros y De Puntos Críticos De Control (HACCP), Norma Internacional de Alimentos (IFS) con el fin de velar por el cumplimiento de los diversos sistemas de gestión de seguridad alimentaria que garanticen la entrega de productos sanos, nutritivos y de alto nivel de calidad. En este contexto, surge la necesidad de asegurar el correcto desempeño de los sistemas de inspección y certificación de alimentos en la evaluación de conformidad de los productos [8].

El laboratorio de análisis tiene una estructura organizativa jerárquica que se responsabiliza de desarrollar un Sistema de Calidad que garantice la calidad de los resultados en las investigaciones científicas en el campo de alimentos; la cual es clave para la correcta toma de decisiones en soluciones de problemas, nuevas

tecnologías; en busca de mejorar la calidad de vida de la población. La Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC) es una organización de evaluación de la conformidad para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración conocida como ISO 17025; es decir, que el laboratorio debe cumplir y/o demostrar que es técnicamente competente y capaz de producir resultados técnicamente válidos.

En los laboratorios se establecen requisitos que incluyen, no solamente elementos del sistema de calidad, sino también demostración objetiva de la idoneidad técnica del laboratorio y de la calidad de los resultados informados y requisitos relativos a los métodos de ensayo utilizados. Los requisitos solamente pueden ser alcanzados a través del desarrollo y de la validación de los métodos por medio de estudios colaborativos en centros y laboratorios de reconocido prestigio u organizaciones internacionales como Association of Analytical Communities (AOAC), Codex Alimentario porque coordinan el desarrollo de métodos, guías para la validación, sistema de validación y certificación y cuantificación de la incertidumbre; aportando así soluciones analíticas reconocidas por la comunidad científica y permitiendo el desarrollo del comercio y el cuidado de la salud pública [8].

El Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE) es un organismo oficial para la evaluación de la conformidad en el Ecuador, que es adscrita del Ministerio de Industrias y Productividad. EL SAE acredita a los laboratorios bajo la Norma Técnica Ecuatoriana NTE — INEN ISO/IEC 17025:2018 sobre "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración" que demuestra la competencia técnica y el profesionalismo para la ejecución de los ensayos. Actualmente, no existe un laboratorio acreditado por el SAE para la cuantificación de almidón resistente en matrices vegetales.

## 1.2. Descripción del problema

La enfermedad celiaca es un trastorno del sistema inmunitario propio del individuo que afecta principalmente al intestino delgado y se origina por la ingestión de gluten a partir de harinas de origen vegetal, en individuos genéticamente susceptibles siendo la media de prevalencia en la población general de alrededor 1%. Los crecientes casos existentes de personas que padecen enfermedades crónicas no transmisibles podrían incorporar en su dieta AR como un gran potencial en el tratamiento de este tipo de enfermedades [1]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que mueren 41 millones de personas cada año por las enfermedades no transmisibles (ENT), lo que equivale un 71% de las muertes que se producen en el mundo.

Los productos sin gluten (GFP) son una alternativa valiosa para los individuos con enfermedad celíaca causando un aumento de consumo GFP entre los sensibles al gluten que resulta en un crecimiento exponencial en el mercado de GFP. El almidón representa un ingrediente interesante para los productos sin gluten, específicamente una pequeña proporción del mismo, denominado almidón resistente (AR) [9].

Las industrias alimentarias están incorporando AR como ingrediente alimentario de alta funcionalidad y tecnológica, siendo una de las tres fracciones principales del almidón actuando como espesante, estabilizador coloidal y agente gelificante. La importancia de conocer su contenido permitirá incorporar la materia prima adecuada que reforzará las características tecnológicas de los alimentos como mejorar textura, estabilidad del producto sin afectar las características de sabor, olor y color del alimento, siendo un alto atractivo para los consumidores [1].

El laboratorio debe asegurar la fiabilidad de los resultados a la parte analítica del problema. Los laboratorios con métodos no validados se encuentran en desventaja con respecto a otros porque no pueden demostrar la fiabilidad de los resultados, por lo tanto, no pueden garantizar el derecho que tienen las personas de contar con

servicios de óptima calidad y de su elección; así como una información precisa y confiable sobre las características del objeto en estudio.

A su vez, el laboratorio no podrá ofrecer servicios de análisis para la verificación y/o validación de una matriz específica porque no son realizados por un laboratorio competente. La pérdida de competitividad frente a otros laboratorios que brindan resultados válidos en los que se puede confiar, o que se trate de un laboratorio técnicamente competente para el control de la calidad, cumplimiento de requisitos, normas u especificaciones [3] [10] [11]. Finalmente, el prestigio de la universidad se puede ver influenciada negativamente porque no tiene la capacidad de emitir resultados que generen confianza; en donde se espera que el laboratorio tenga un grado de conocimiento técnico adecuado que permita la satisfacción del cliente en los resultados.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Desarrollar el esquema de validación del método analítico almidón resistente mediante digestión enzimática en tres matrices vegetales.

#### **1.3.2. Objetivo Específico**

- Aplicar la metodología de validación del método AOAC 2002.02 usando el equipamiento del laboratorio.
- Comprobar la validez de los resultados para el método de ensayo con respecto a los objetivos de validación
- Declarar el método validado con los procedimientos adecuados con el fin de asegurar en el tiempo, la validez de los resultados.

### **1.4. Hipótesis**

La validación de un método analítico aumenta la competencia técnica del laboratorio.

## **1.5. Alcance**

La validación del método analítico Almidón Resistente por medio de digestión enzimática tiene el propósito de confirmar si el procedimiento utilizado en matrices vegetales bajo el método AOAC 2002.02 es apropiado para su uso previsto en el laboratorio. La validación del método permitirá ofrecer un servicio de análisis de ensayos con resultados exactos y reproducibles. El proyecto empezará con una investigación documental que definirá el equipamiento calificado para la ejecución de los ensayos, las características de desempeño a llevarse a cabo en el laboratorio, el estudio de los datos, la interpretación de los resultados y la declaración de aptitud de uso previo a un estudio de incertidumbre del método e informe de validación. Finalmente, se presentará la documentación pertinente con respecto al aseguramiento de calidad de los resultados para las pruebas de rutina.

# CAPÍTULO 2

## MARCO TEÓRICO

### 2.1. Almidón resistente

El almidón es una de las principales moléculas de los carbohidratos que se obtiene de plantas, tubérculos y cereales como yuca, maíz, papa, entre otros. El almidón está almacenado en forma de gránulos compactos insolubles que varían de tamaño y forma de acuerdo a su especie [12]. El tipo A es encontrado en cereales, tipo B en tubérculos, frutas, almidones rico en amilosa y tipo C que contiene A y B encontrado en leguminosas, raíces y semillas [13][14][15].

Químicamente, el almidón es un polisacárido que se compone de un solo monosacárido (glucosa) que tiene dos principales estructuras: Amilosa, es una molécula lineal unido por enlace  $\alpha$  1-4 que constituye el 20-25% del almidón y amilopectina, es una molécula ramificada unido por enlace  $\alpha$  1-4 y  $\alpha$  1-6 que constituye el 70-75% del almidón [12]. Adicional, contiene estructuras cristalinas con diferentes proporciones de amilopectina. La amilosa se encuentra en las partes amorfas del cristal de almidón mientras que la amilopectina le da al almidón su estructura cristalina.

El almidón se clasifica en almidón de rápida disponibilidad, de lenta disponibilidad y resistente (RS). El almidón resistente es una forma de almidón que resiste la digestión en el estómago y el intestino delgado, por lo tanto se clasifica como un tipo de fibra dietética. RS puede actuar como sustrato para la fermentación microbiana en el intestino grueso siendo los productos finales hidrógeno, dióxido de carbono, metano y ácidos grasos de cadena corta como el fórmico, acético, propiónico, butírico, valérico y pequeñas cantidades de ácidos orgánicos y alcoholes [12]. La resistencia del almidón a la digestión está relacionada con un alto contenido de amilosa asociado a una tasa de digestibilidad más lenta. Las

estructuras cristalinas B y C parecen ser más resistente a la digestión produciendo almidón resistente; por ejemplo: almidón rico en amilosa siendo muy utilizado en la preparación de alimentos [16].

El almidón resistente se ha clasificado en: RS1 el cual es físicamente no accesible a la digestión, RS2 en que los gránulos de almidón nativo están protegidos de la digestión por la estructura del gránulo, RS3 formado generalmente durante la retrogradación porque el almidón se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y las regiones cristalinas del almidón se derrite. Luego, estos geles de almidón se enfrían y vuelven a formar cristales que son resistentes a la hidrólisis. Finalmente, RS4 los cuales son los almidones que han sido modificados por método químico [16].

Las preparaciones comerciales de RS (tratamientos físicos, químicos y enzimáticos) están disponibles y se pueden agregar a los alimentos (pan, galletas, barras nutritivas, productos lácteos) como ingrediente para reducir el valor calórico y mejorar las características de textura, organolépticas junto con el aumento de la cantidad de fibra dietética. Es decir que, el almidón resistente tiene uso en una amplia gama de productos alimenticios y produce alimentos de alta calidad debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas como: aumentar el contenido total de fibra dietética de los alimentos y tener productos alimenticios sin afectar el sabor y la textura, proporcionar fibra en algunos alimentos para aquellos que siguen regímenes de dieta bajos en carbohidratos, buenas cualidades de extrusión y formación de película, mejorar las características organolépticas en productos altos de fibra, entre otros [17].

A su vez, tiene propiedades bioactivas únicas porque tiene una importancia sustancial debido a su impacto positivo en la salud. Entre los beneficios para la salud se incluyen la mejora de la salud del colon y la microflora, el control de la diabetes, el índice glucémico y los niveles bajos de colesterol, triglicéridos en la sangre, la formación reducida de cálculos biliares, el aumento de la absorción de minerales y el potencial para modificar la oxidación de grasas [18].

## 2.2. Validación de un método analítico

Uno de los pasos más importantes si implementas un nuevo método analítico es la validación. La validación es un proceso sistemático que demuestra al método estar listo para obtener resultados fiables porque así asegura que, la medición de los análisis de rutina es lo suficientemente cercano al valor verdadero para el contenido del analito en la muestra [10].

Los métodos analíticos que se desarrollen en un laboratorio para obtener datos de composición química de alimentos deben ser adecuados, usar técnicas analíticas exactas y ser realizados por técnicos competentes [19]. La calidad de los trabajos y resultados esperados exigen un determinado nivel de calidad interna y externa en el laboratorio analítico. La calidad de los resultados generados depende de la calidad de las diferentes etapas del proceso analítico [20].

Los procesos analíticos deben ser capaz de generar confianza a sus beneficiarios porque se espera que el analista tenga un grado de conocimiento técnico que proporcione una respuesta veraz a la parte analítica del problema. El conocimiento técnico permite tener una certeza de los datos obtenidos; es decir una correcta medición asegura tener resultados acertados [1].

Actualmente se encuentra vigente la norma NTE INEN - ISO/IEC 17025:2018 Tercera Edición que indica los "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración". La primera versión fue la norma ISO/IEC 17025:1999 que reemplazó la norma ISO/IEC 25 y la norma Europea EN 45001:1989. ISO 17025:2017 tiene dos secciones: Primero, corresponde a los requisitos de la norma ISO 9001 para un sistema de gestión de la calidad y; finalmente, corresponde a requisitos técnicos relacionados a aspectos con directa influencia sobre el resultado del análisis [21].

La ISO 17025 demuestra que laboratorios, entre estas, tiene la capacidad de producir resultados analíticos confiables validados técnicamente [21]. La norma

define la validación como “la confirmación a través del examen y del aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” [3]. La validación del método permite a los técnicos demostrar que un método es 'adecuado para el uso previsto' [10].

### **2.3. Requisitos de gestión y técnicos para el estudio de una validación**

El laboratorio tomará en cuenta todos los aspectos relacionados al estudio analítico pasando por los requisitos básicos para asegurar la calidad; es decir, las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL o GPL). BPL es un sistema de calidad que contiene directrices relacionado con los procesos organizativos y las condiciones bajo las cuales los estudios son planificados, realizados, controlados, registrados, archivado e informados garantizando así, unos determinados niveles de calidad en el laboratorio [22].

Las normativas europeas 2004/10/CE y 2004/9/CE recogen los principios generales sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de BPL y al control de su aplicación para las pruebas sobre las sustancias químicas y, relativa a la inspección como la verificación de las Buenas Prácticas de Laboratorio; respectivamente [22].

La calidad de un laboratorio requiere un compromiso de todo el personal para así asegurar que funcione el proceso correctamente. El sistema se divide en [23]:

- **Gestión de la calidad:** Es responsabilidad de la gerencia y el director del laboratorio proveer los medios a disposición para conseguir los objetivos de calidad.
- **Control de la calidad:** Es la persona que se relaciona con la gerencia y el personal del laboratorio el cual coordina todos los medios y ejecuta/ perfecciona los objetivos para su cumplimiento.
- **Sistema de calidad:** El personal de laboratorio realiza los objetivos de calidad

planteados desde la gestión de calidad basado en flujos de proceso con los recursos humanos, económicos, infraestructura y equipos, conocimientos y experiencia, entre otros.

El padre de la gestión de la calidad, W. Edwards Deming, describió que un “sistema” es “una serie de funciones o actividades dentro de una organización que trabajan juntas para el objetivo de la organización” [14]. Cada sistema es de dependencia recíproca por lo tanto requieren de la gestión para mantenerse en armonía [22].

Existen enfoques que pueden resultar útiles en muchos laboratorios como el Ciclo DMAIC (Diseñar o definir, Medir, Analizar, Mejorar, Controlar) o Seis Sigma para la mejora del proceso, el modelo de Deming PDCA (Planificar, Hacer, Verificar y Actuar) para la mejora del Sistema de Gestión de Calidad, el cual está diseñado para asegurar que el laboratorio cumpla con sus objetivos y requerimientos de la calidad. Adicionalmente, hay herramientas que son casi universalmente requeridas siendo uno de estos, los protocolos de validación de métodos; sin embargo, la organización y la implementación dependerá de los recursos y capacidades disponibles en los laboratorios [22].

Al día de hoy, la norma ISO/IEC 17025:2018 refiere que es esencial el liderazgo de la dirección y el compromiso para asegurar la calidad en todas las actividades y procesos del laboratorio. Los requerimientos de gestión por la dirección del laboratorio son la base para alcanzar una calidad en el diseño y la implementación de los requerimientos técnicos para las fases pre-analíticas, analíticas y post-analíticas para la competencia del laboratorio. Es decir, que la gestión es responsable de solucionar todos los problemas de la calidad para su garantía, el cual es una parte de la gestión de la calidad con el fin de brindar la confianza de que los requerimientos de calidad sean cumplidos y todos los procedimientos y actividades realizados deben alcanzar y mantener la calidad especificada del Sistema de Gestión de Calidad [24]. Entonces, la ISO 17025:2018 menciona los requerimientos técnicos y requisitos de recursos para la adquisición de todas los

bienes y medios adecuados para las operaciones y desarrollar los procesos que proporcionen la competencia deseada [22].

**1. Personal:** El personal debe tener la competencia técnica para los servicios de calidad dentro de un sistema de gestión del laboratorio. También, es integrar un sistema de valoración periódica de la competencia para mantener el personal capacitado. Además, es importante el entrenamiento y la formación continua para mantener y actualizar las habilidades técnicas y el conocimiento científico.

**2. Instalaciones y condiciones ambientales:** Un laboratorio necesita espacio adecuado y condiciones ambientales que estén diseñados y controlados apropiadamente, que no comprometan con los resultados del ensayo durante el desarrollo de las actividades del laboratorio.

**3. Equipamiento:** La adquisición de equipamiento analítico es una tarea particularmente decisiva debido a que la calidad del ensayo es determinada principalmente por el tipo de equipos/materiales de medición. Además, es esencial el desarrollo de especificaciones, mantenimiento y calibración planificada, calidad del equipo/instrumento, comprobaciones intermedias para mantener la confianza en el desempeño del equipo.

El equipo debe cumplir con los requisitos especificados antes de su puesta en operación. La calificación de un equipo es la acción de revisar y documentar que el equipo analítico cumple con las especificaciones requeridas y funciona adecuadamente para su uso previsto, es decir, que los elementos del equipo funcionan correctamente y realmente conducen a los resultados esperados. Los equipos del laboratorio deben someterse a calificaciones de diseño, instalación, operativa y de desempeño.

**3.1.** La calificación de diseño (ID) requiere la revisión documentada de actividades que determina las especificaciones operacionales y funcionales del equipo o instrumento analítico y criterios para la selección basándose en el uso esperado del bien.

- 3.2. La calificación de instalación (IQ) es la ejecución de pruebas en el laboratorio para asegurar que los equipos analíticos están instalados correctamente y operan de acuerdo con las especificaciones establecidas.
- 3.3. La calificación de operación (OQ) se refiere a la comprobación documentada de que los equipos analíticos se desempeñan según lo proyectado en todos los intervalos de operación.
- 3.4. La calificación del desempeño (PQ) es la comprobación documentada de que un equipo analítico opera y demuestra la efectividad y da reproducibilidad del proceso dentro de los parámetros y especificaciones definidas en condiciones normales de operación.

**4. Trazabilidad metrológica:** El laboratorio tiene patrones calibrados con un estándar de medición de mayor exactitud y precisión para una magnitud determinada, por lo tanto, puede asegurar que la medición efectuada tiene un determinado grado de precisión. El laboratorio debe asegurar que el material se encuentre como en su estado inicial que garantice calidad de los resultados.

**5. Productos y servicios suministrados externamente:** El laboratorio debe especificar las características de reactivos, materiales y servicios para asegurar el cumplimiento de las especificaciones técnicas que permita alcanzar los objetivos propuestos. El laboratorio debe responsabilizarse de las verificaciones y calificaciones necesarias de sus productos y servicios para garantizar la calidad. Además, el laboratorio debe tener procedimiento de actualización de inventario, monitoreo del almacenamiento y el seguimiento para los nuevos pedidos.

La misma norma menciona los requerimientos del proceso que representa los requisitos para la competencia en el laboratorio en tres fases: preanalíticas, analíticas y postanalíticas [22] [24]. Los requisitos de competencia deben ser llevada a cabo por personal competente y capacitado por el personal pertinente.

- **Fase preanalítica:** El laboratorio debe tener procedimientos documentados de información complementaria para las actividades preanalíticas con el fin de asegurar la validez de los resultados de los análisis de ensayo. Esta fase corresponde a la obtención, manipulación y acondicionamiento de las muestras para su ingreso a la etapa analítica.
- **Fase analítica:** Esta fase abarca desde que la muestra ingresa al laboratorio para ser analizada hasta que se obtiene un resultado. El laboratorio debe realizar los procedimientos analíticos requeridos hasta demostrar que han sido verificados y validados para su uso previsto.
- **Fase postanalítica:** Esta fase comprende los resultados analíticos hasta que son entregados al cliente final. Es decir que se requiere antes de la emisión del informe técnico, la revisión técnica exhaustiva del técnico que incluye el almacenamiento, revisión y seguimiento de los datos o resultados anómalos como negativos, menores a blanco o fuera de la linealidad.

Por último, la norma menciona los requerimientos del sistema de gestión para dirigir, operar y controlar la organización en forma sistemática, transparente y de manera continua hacia la mejora en el desempeño del laboratorio. El laboratorio debe asegurar que el Sistema de Gestión de la Calidad funciona de forma correcta y que se obtienen todos los resultados esperados en un laboratorio [22].

- **Documentos y registros:** Existen requerimientos mínimos de contenido para los documentos y registros establecidos por la norma pertinente. Es de suma importancia tener un sistema de gestión de documentos para su identificación y garantizar que cada política, proceso, procedimiento y formulario es la versión original. Así mismo, se necesita un sistema de gestión de registros que permita la creación, identificación, cambio, revisión, retención y almacenamiento de los documentos y registros.
- **Evaluaciones:** Las evaluaciones continuas son una parte fundamental del

Sistema de Gestión de la Calidad. Las evaluaciones internas, auditorías internas, revisión por la dirección son controladores de proceso e indicadores de la calidad para monitorear la calidad y el desempeño del sistema.

- **Riesgos y oportunidades:** Las acciones tomadas mediante la identificación, análisis y evaluación de todos los riesgos ligados a procesos es con el fin de reducir o eliminar todas las fallas que derivan de los riesgos. También, posibilita que el Aseguramiento del Sistema de Gestión de la Calidad pueda alcanzar sus resultados previstos, aumentar los efectos esperados y alcanzar la mejora del sistema.
- **Gestión de eventos de no conformidad:** Se refiere al seguimiento de los problemas, las fallas de equipos, los informes de no conformidad y quejas revisadas y aceptadas que hayan ocurrido. El estudio de las incidencias debería concluir con acciones correctivas, acciones preventivas y mejora continua.
- **Mejora continua:** La información originada en la gestión de eventos de no conformidad incluido las evaluaciones internas y/o externas, auditorías y por dirección deberían orientar una ruta con tareas específicas para la mejora del sistema. Las acciones correctivas deben apuntar a eliminar los problemas para alcanzar los nuevos niveles de calidad y de desempeño.

## 2.4. Proceso de validación de método

La norma ISO 17025:2018 indica que el laboratorio requiere el uso de métodos y procedimientos apropiados como también la verificación de estos. Además, el proceso de evaluación de la incertidumbre, informe y declaración del método con los análisis de control de calidad a llevar a cabo con los ensayos rutinarios.

### **2.4.1. Establecimiento del método analítico**

Fundamentalmente, la metodología analítica es una serie de etapas y operaciones analíticas, siendo éste el más idóneo en función de las exigencias y necesidades del laboratorio, con el fin de obtener resultados que puedan ser fiables a partir de un material de estudio. Es importante señalar que para obtener los mejores resultados deben considerarse las etapas analíticas como muestreo, preparación de la muestra, procedimiento de determinación, cálculos, reportes e interpretación de resultados [25].

### **2.4.2. Definición de objetivos y selección de métodos analíticos**

El éxito de la metodología analítica es, primeramente, identificar y definir claramente el problema a resolver. Es decir, delinear la estrategia de análisis sobre la base a las interrogantes planteadas: ¿Qué analito deseo medir?, ¿Cuál es la matriz?, ¿Cuál es el rango de concentraciones del analito a determinar?, ¿Qué otro compuesto o elemento se haya presente en la sustancia?, ¿Qué operaciones o procesos químicos, físicos y biológicos pueden afectar la concentración o estabilidad del analito objeto del estudio?, ¿Qué componentes propios de la matriz puede ocasionar interferencia en el análisis?, ¿Qué exactitud y precisión requiere el método analítico para alcanzar el objetivo propuesto?, ¿Qué equipamiento se necesita para ejecutar el ensayo?, ¿Qué técnica analítica es la adecuada para el estudio de dicho analito? [25].

La elección del método es de mayor importancia en el bosquejo del análisis previo al desarrollo del método. Además de tomar en cuenta los objetivos analíticos planteados es necesario considerar otros aspectos como: posibilidad de destrucción de la muestra, cantidad de muestra disponible, económico, volumen total de muestra pequeña, técnica rápida y sencilla, tiempo que se dispone para efectuar el análisis y validación del método analítico siendo este; principalmente, la parte integral del desarrollo de un

método analítico, de buenas prácticas de fabricación y en el aspecto comercial, acordar la compra de un servicio o bien porque se garantiza la fiabilidad de resultados [25].

### **2.4.3. Planteamiento del método**

AOAC es una normativa internacional que ha adoptado métodos analíticos los cuales son utilizados por agencias gubernamentales para los análisis de fertilizantes, alimentos, piensos, pesticidas, medicamentos, cosméticos, sustancias peligrosas y otros materiales relacionados con la agricultura, la salud y bienestar y medio ambiente [23].

Las líneas principales de acción de la AOAC son: Desarrollo y validación de métodos analíticos a través de consensos, mejoramiento de los procedimientos de Aseguramiento de la Calidad en los laboratorios, desarrollo y promoción de criterios de desempeño para alcanzar los estándares de acreditación de los laboratorios analíticos, con el fin de promover la calidad de las mediciones y la validación de métodos analíticos para alcanzar así, la visión de “confianza” internacional en los resultados analíticos. Los métodos AOAC son reconocidos internacionalmente como un recurso aprobado debido al riguroso proceso de validación [23].

De acuerdo al tipo de método se procede a la validación. El método normalizado o estándar son emitidos por organizaciones internacionalmente reconocidas como Farmacopea de los Estados Unidos-Formulario Nacional (USP-NF), AOAC, entre otros. En métodos normalizados solo se realiza la verificación de algunos parámetros de desempeño, por ejemplo: repetibilidad, veracidad, incertidumbre de medición, límite de detección (siempre y cuando se indiquen en la norma). No obstante, el alcance de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar. Sin embargo, si se modifica un método normalizado, es decir que puede tener cambios sobre la calidad de los resultados, el laboratorio evaluará qué parámetros de validación que

deben ser verificados [10].

- **Método AACC 32-40.01 y método AOAC 2002.02:** Ambos métodos oficiales son derivados y similares entre sí de los métodos Englyst et al. (1982), Goñi et al. (1996), Chung et al. (2006), entre, como lo muestra el Anexo A. El rango de trabajo para la determinación de AR es desde 2% hasta 64 % en alimentos y muestras de almidón crudo de tipo 1, 2 y 3.
  - Moler muestra en forma gruesa.
  - Incubar en baño de agua en agitación con enzimas  $\alpha$ -amilasa pancreática y amiloglucosidasa (AMG) a temperatura de 37 °C por 16 horas.
  - Recuperar el pellet mediante lavados con etanol o IMS usando la centrifugación.
  - Disolver con hidróxido de potasio en agitación vigorosa.
  - Neutralizar con tampón acetato .
  - Agregar AMG al residuo a temperatura de 50 °C por 30 minutos.
  - Cuantificar glucosa mediante colorimetría

Los métodos oficiales, AACC y AOAC, son asociaciones reconocidas a nivel mundial sin ánimo de lucro. Los laboratorios de todo el mundo confían en los métodos aprobados porque son sometidos a un estudio científico riguroso y sistemático para garantizar que los estándares sean altamente confiables y suficientes para que las terceras personas (academias, agencias reguladoras, industrias, entre otros) puedan disponer de estos con la confianza de tener procedimientos analíticos idóneos.

#### **2.4.4. Herramientas de validación**

El proceso de validación requiere un conjunto de materiales con características específicas para el desarrollo analítico en el laboratorio. Las características específicas son las propiedades físicas, químicas, térmicas, entre otros, que posee cada material para el fin propuesto en el ensayo [10].

- **Blancos:** Los blancos en un método analítico permiten evaluar la cantidad de señal medida que es atribuible al analito y cuánta es a otros factores.
  - **Blanco de reactivo:** Son todos los reactivos utilizados durante el proceso analítico para determinar si contribuyen a la señal de la medida.
  - **Blanco de muestra:** Es la muestra matriz sin presencia de analito y se somete a todos los pasos del proceso analítico. El blanco muestra permite tener una conocer las posibles interferencias que pueden aparecer en un análisis de muestras de rutina.
  
- **Muestras de rutina:** Las muestras de rutina son importantes ya que permite que se conozca la información sobre precisión, interferencias, entre otros, que puede aparecer en la muestra durante el trabajo en el laboratorio.
  
- **Soluciones/material fortificado:** Es la muestra enriquecida con una cantidad conocida al analito que permitirá incrementar la respuesta del analito medido. También se puede fortificar una concentración conocida del interferente para determinar como el analito es afectado.
  
- **Patrón de medida:** Es una medida certificada, instrumento de medida, material de referencia o sistema de medida destinado a reproducir varios valores de una magnitud como referencia [25]. Es decir que, un material de referencia certificado es un material que posee uno a más de sus valores de expresados en un certificado a través de procedimientos técnicamente válidos y elaborados por un organismo competente. Si se dispone de un material con un valor de “referencia” permite dar seguimiento y establecer si los resultados obtenidos son correctos o no

para cada uno de los ensayos. [26].

- **Estadística:** La mayoría de los factores que intervienen en los experimentos se comportan como una variable aleatoria por lo que el comportamiento de los sistemas de estudio es consecuencia de muchas variables aleatorias. Las estadísticas son esenciales para recolectar y analizar la información a fin de tomar decisiones correctas [7].
  - **Media aritmética** se define como una serie de datos que se obtiene dividiendo la suma de todos los datos entre el total de ellos.
  - **Varianza** se define como la media aritmética de los valores de las desviaciones obtenidas de la variable con respecto a la media aritmética elevada al cuadrado.
  - **Desviación Estándar** se define como la raíz cuadrada de la varianza.
  - **Desviación estándar relativa** se define como el porcentaje de la desviación de los datos con respecto a la media.
  - **Porcentaje de recuperación** se define como el porcentaje que representa el valor medio con respecto al valor teórico.
  - **Coefficiente de variación** se define como una medida relativa de la variación expresado en porcentaje, el cual mide la dispersión de los datos con respecto a la media.

- **Error absoluto** se define como la diferencia entre una medida de un valor y el valor verdadero.
- **Error relativo (porcentual)** se define como el cociente del error absoluto y el valor verdadero multiplicado por 100.
- **Análisis de varianza** se define como la primera prueba de significación que compara más de dos variables. Es decir, que es una forma de comprobar si dos o más medias muestrales fueron obtenidos de poblaciones con la misma media paramétrica respecto de una variable dada.

#### 2.4.5. Criterios de validación del método analítico

La Norma NTE- ISO/IEC 17025:2018, Codex Alimentario 2001, IUPAC 2002, AOAC 2000, Nordic Committee on Food Analysis 1996 (NMKL) mencionan los requisitos o criterios de validación que debe cumplir un método analítico:

- **Selectividad/Especificidad:** El grado de interferencias para los métodos analíticos pueden considerarse controvertidos porque tales términos coexisten: la selectividad y la especificidad. La selectividad determina el analito particular en una mezcla compleja sin interferencia de otros componentes presente en la mezcla. La especificidad se utiliza para el análisis de un solo componente cuando el método está libre de interferencias y solo determina el analito deseado [6] [27].
- **Límite de detección (LD):** La detección es la capacidad de discernir una señal débil en presencia de ruido de fondo, por lo que reducir el ruido permite la detección de concentraciones más pequeñas de analito. El

blanco mide solo el ruido de fondo o de línea de base. Las mediciones de blancos suponen un comportamiento de los blancos en forma normal, representado por una curva Gaussiana, pero se puede encontrar valores diferentes de cero. En el LD, la zona de importancia es la zona positiva en que se establece un nivel de confianza de donde aumenta la probabilidad de que el valor obtenido sea diferente de cero. En esta zona es más probable que se cometa el error tipo 1 o falso positivo, es decir de declarar la presencia del analito aun cuando se sabe que no lo contiene.

LD es la concentración más baja de analito que se puede detectar y se obtiene midiendo un número adecuado de repeticiones (8-10 repeticiones es común) de un blanco apropiado o estándar de baja concentración y determinar la desviación estándar de la señal en blanco. Por lo tanto, durante años se considera que el LD es la concentración de analito que da una señal que es igual a tres veces la desviación estándar del espacio en blanco. Se define LD como la relación señal/ruido a 3 en un nivel de confianza de 99.87% y la zona correspondiente  $\alpha$  es de 0.13% o 0.0013: esta es la probabilidad de que un blanco produzca una señal que haga suponer la presencia del analito, esto es, la detección del analito [10] [25].

$$LD = \bar{x} \pm 3\sigma$$

Ec 2.2.4.1

- **Límite de cuantificación (LC):** Es la concentración más baja de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con una exactitud y precisión dadas utilizando el método establecido. El LC es más alto que el LD por lo tanto, debería tener una mejor precisión. LC suele ser definida como la concentración equivalente a un factor numérico de acuerdo al coeficiente de variación CV permitido o establecido por el laboratorio siendo K 10 para un CV máximo permitido de 10%. Es decir, 10 veces la desviación estándar del blanco y puede determinarse a partir de la muestra blanco [10] [25].

$$LC = x \pm 10\sigma$$

Ec 2.2.4.2

- **Linealidad:** La calibración analítica representa la relación entre cantidades conocidas del analito en la muestra y la respuesta del instrumento y se ajusta a una función lineal dentro del rango de trabajo determinado. Los aspectos más importantes en la planificación experimental para la calibración analítica son [6] [28]:
  - El tipo de las muestras de calibración, ya sea con matriz o sin matriz.
  - La metodología de calibración (patrón externo, patrón interno o adición de patrón).
  - El rango de concentraciones y la distribución de los puntos a lo largo de la curva de calibración.
  - El número de mediciones repetidas para cada nivel de calibración.
  - El número de series o diferentes curvas de calibración.
  - El coeficiente de correlación o  $R^2$  debe ser muy próximo a 1 para que represente un verdadero ajuste lineal[28].
  
- **Rango de medida:** Es un intervalo lineal de un método analítico o de instrumento que se origina desde la concentración más baja hasta la totalidad de la línea recta; es decir, empieza desde la concentración de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente hasta el límite de linealidad [6].
  
- **Exactitud:** Según el ítem 2.13 del VIM, Exactitud es el “Grado de concordancia entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando”. Es decir, que indica la proximidad entre el valor verdadero y el valor experimental. La medición es más exacta cuando existe un error total de medición menor y el instrumento está relacionado con los resultados medidos a lo más cercano del valor referencia. Se puede expresar en [10]:

$$\% \text{ Recuperación: } \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100\% \quad \text{Ec 2.2.4.3}$$

**xx**

$$\text{Error absoluto } (\varepsilon): \bar{x} - x_{ref} \quad \text{Ec 2.2.4.4}$$

$$\text{Error relativo } (\varepsilon\%): \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100\% \quad \text{Ec 2.2.4.5}$$

El error total es la suma de los errores sistemáticos y aleatorios. Los errores sistemáticos son producidos por la imperfección de los equipos, imprecisiones del método de medición o por algún descuido del operador. El error sistemático se asocia al concepto de veracidad el cual, es la proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. Estadísticamente, se relaciona con la media y el sesgo [22] [29].

- **Precisión:** La precisión es la medida del grado de cercanía de los valores medidos repetidamente a múltiples muestras de un mismo procedimiento en condiciones de operación específicas [6]. Las incertidumbres experimentales se pueden evidenciar mediante un gran número de mediciones del mismo valor de una magnitud en condiciones iguales (repetición de las mediciones) se denominan errores aleatorios [10].

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad \text{Ec 2.2.4.6}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{xi=1}^n (xi - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Ec 2.2.4.7}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{xi=1}^n (xi-\bar{x})^2}{n-1} \quad \text{Ec 2.2.4.8}$$

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad \text{Ec 2.2.4.9}$$

Generalmente, se expresa como desviación estándar (s o SD), coeficiente de variación (CV), desviación estándar relativa (RSD) y varianza (s<sup>2</sup>) [19]. Según la Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH), la precisión debe realizarse en tres niveles diferentes: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad [30].

- **7.1. Repetibilidad:** Es una medida de la variabilidad de los resultados del método que se obtiene durante un corto intervalo de tiempo y manteniendo las mismas condiciones de operación [10].
- **7.2. Precisión intermedia:** La precisión intermedia se refiere a la medida de variabilidad de los resultados del método por las variaciones dentro del laboratorio tales como diferentes períodos experimentales, analistas, equipos, entre otros [30].
- **7.3. Reproducibilidad:** La reproducibilidad se refiere a los resultados de ensayos colaborativos entre laboratorios. La documentación en apoyo de los estudios de precisión debe incluir la desviación estándar, la desviación estándar relativa o el coeficiente de variación e intervalo de confianza [30].
- **Robustez:** Es la capacidad del método para no ser afectado por pequeños cambios deliberados en parámetro del método como porcentaje de reactivo, pH, fuerza iónica o temperatura, entre otros. Es decir, la variación de los parámetros controlados uno a uno con la finalidad de conocer si hubo la influencia del resultado para determinar el efecto sobre los resultados del método [30] [6] .

## 2.5. Estimación de la incertidumbre

La incertidumbre y la trazabilidad son las propiedades metroológicas básicas asociadas a un resultado cuantitativo que caracterizan su fiabilidad. La incertidumbre es el parámetro asociado al resultado de una medición que determina la dispersión de los valores de una cantidad que son atribuidos a un mensurando; es decir que es expresado como el rango de concentración donde cabe esperar que se encuentre el resultado. La estimación de la incertidumbre se establece en los métodos de rutina y a lo largo de todo el proceso analítico [31].

Los errores aleatorios, en todo proceso de verificación de la trazabilidad, contribuyen principalmente a la creación de incertidumbre y estos son las causas de los errores tipo I y II. Por lo tanto, en el proceso será fundamental tomar en cuenta las incertidumbres relacionadas tanto a la referencia como a los resultados, para asegurar así la comparación de los resultados con la referencia por la cadena no interrumpida de comparaciones reales [31].

Para la estimación de incertidumbres, se sugiere los cuatro pasos principales: [32]

- La especificación de un mensurando requiere el conocimiento inicial de una propiedad del fenómeno, cuerpo o sustancia que puede expresar un número y una referencia, incluyendo los componentes y las entidades químicas de la cual depende.
- Identificación de todas las fuentes de incertidumbre, es decir todas las posibles causas que originan una incertidumbre en la medición. Las fuentes más consideradas son método, materiales, medio ambiente, mano de obra y equipo.

- Cuantificación de cada componente de incertidumbre identificados en cada fuente.
- Cálculo de la incertidumbre total (expandida y combinada) según las reglas de la propagación de incertidumbre.

La guía Euracheam plantea la aplicación del diagrama Ishikawa o diagrama “causa y efecto” porque permite identificar el problema y determinar exactamente sus posibles causas. Las evaluaciones de incertidumbre se basan en distribuciones de probabilidad y los componentes son cuantificadas por varianza y desviación estándar [29][32].

La incertidumbre típica A (ua) es estimada a partir de observaciones individuales entre sí de una de las magnitudes de entrada en las mismas condiciones de medida y viene dado por la varianza experimental de la media ( $S^2$ ) o desviación estándar (S) [33]. En algunas condiciones pueden utilizarse otros métodos estadísticos, como el método de mínimos cuadrados o el análisis de la varianza [29][32].

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1} \quad \text{Ec 2.3.1}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Ec 2.3.2}$$

La incertidumbre típica tipo B (ub) es estimado a partir de decisión científica basado en información acerca de la variabilidad posible de cada componente identificado. Se estima a partir de [32] [33]:

- Resultados de medidas pasadas.
- La experiencia o el conocimiento general del comportamiento y

propiedades de los materiales y los instrumentos utilizados.

- Las fichas técnicas del fabricante.
- La información de certificados de calibración u otros.
- Los valores de referencia en libros y manuales.

La incertidumbre B puede encontrarse en distribución normal, rectangular y triangular y antes de combinarse debe normalizarse a incertidumbre estándar. La elección de la distribución depende del lugar de probabilidad de mayor cantidad de datos [29], [33].

- Si se ha dado una incertidumbre en forma de intervalo de confianza de un 95 % o 99% sin especificar la distribución entonces para IC= 95% y 99.7%, el divisor es 2 y 3; respectivamente. Adicional, en forma de una desviación estándar  $s$ , una desviación estándar relativa  $s/x$ , o un porcentaje de coeficiente de variación %CV sin especificar la distribución.
- La distribución rectangular es la posibilidad de que la medición en un intervalo con límites definidos es igual a cualquier valor dentro de ese intervalo; es decir una estimación de rango +/- a sin mencionar la forma de distribución o da unos límites sin indicar el intervalo de confianza, entonces el divisor es  $\sqrt{3}$ .
- La distribución triangular es aquella que tiene una tendencia central de muy poca dispersión en los valores de una medición, es decir que existe una estimación en forma de un rango máximo +/- a dado por una distribución simétrica, entonces el divisor es  $\sqrt{6}$ .

La incertidumbre tipo C o incertidumbre combinada se obtiene mediante la ley de propagación de errores. Para calcular la incertidumbre combinada se suma las raíces cuadradas de las varianzas de tipo A y B [32].

$$uc^2 = \sqrt{ua^2 + ub^2} \quad \text{Ec 2.3.3}$$

La incertidumbre expandida se expresa con un alto nivel de confianza a partir de la incertidumbre combinada. La elección del factor k, el cual usualmente se encuentra en el intervalo de 2 (95,5%, IC) a 3 (99.7%, IC) está basada en la probabilidad de cobertura o nivel de confianza requerido para el intervalo y los grados de libertad [32].

$$up = kuc \quad \text{Ec 2.3.4}$$

## **2.6. Informe de validación y declaración de método validado**

Según el Reporte 40 OMS V3 menciona que el reporte de validación es un documento en donde los registros, resultados y la evaluación de un programa completo de validación son recopilados y resumidos. También puede contener propuestas para la mejora del proceso y/o equipo. La norma ISO 78 [34] indica directrices para elaborar normas de métodos de análisis químico. Dentro de los capítulos, se encuentra la información mínima que deberá incluirse en el informe sobre el ensayo:

- Muestra
  - Objeto, Alcance
- La norma utilizada incluyendo el año de publicación
  - Referencia al protocolo utilizado

- El método utilizado
  - Descripción del proceso actualizado
  - Diseño experimental
  - Criterios de aceptación
  
- El resultado(s), incluyendo
  - Datos de la validación
  - Resultados analíticos
  - Resultados estadísticos
  - Resumen de los resultados (parámetro, criterio, resultado y conclusión).
  - Interpretación de resultados
  
- Cualquier desviación del procedimiento
  
- Cualquier característica inusual observada
  
- La fecha del ensayo.
  - Fecha de validación
  - Personas

Si el requisito propuesto no se cumple este se mantiene hasta que el método demuestre su capacidad de cumplir con el requisito establecido en el método. Si el requisito cumple, se debe demostrar que la incertidumbre  $\mu_m$ , obtenido de la medición por los errores aleatorios que suceden durante la medición, patrones de referencia (trazabilidad) u otras fuentes de error, es menor o igual a la incertidumbre  $\mu_r$  requerida al nivel de confianza fijado; es decir que  $\mu_m \leq \mu_r$ . Si se cumple esta desigualdad, se infiere que la medición es “exacta” para el fin propuesto. Por lo tanto, el método se considera “válido” y se da paso a la publicación en el laboratorio [35].

Todos los registros del proceso de validación deben ser conservados y controlados siendo estos los documentos técnicos fundamentales en el laboratorio [35]. El proceso de validación finaliza con una conclusión obtenida sobre los requisitos de desempeño el cual establecerá criterios de control como parte del aseguramiento de calidad del método de ensayo en el laboratorio; y una declaración del cumplimiento del requisito establecido (aptitud del método) [10], [35]

## **2.7. Control de calidad para los análisis de rutina**

Un laboratorio necesita el diseño de un procedimiento de control para confirmar el cumplimiento de la calidad esperada para los resultados de las pruebas. Las reglas estadísticas de control y el número de mediciones de control deben ser seleccionados para ofrecer una detección apropiada de los errores analíticos, siendo el punto de partida los requisitos de calidad analítica, precisión y sesgo del método en el estudio de validación [22].

Un control estadístico permitirá asegurar que la calidad de los ensayos de rutina cumpla con las necesidades establecidas para el uso previsto del procedimiento a medir [28]. Es importante definir criterios de aceptación, de rechazo y las pruebas que se usarán para demostrar su validez como los ensayos de repetibilidad / reproducibilidad, ensayos de desviación, cartas de estabilidad y consistencia, verificación de linealidad, verificación de límites de detección y cuantificación, ensayos de aptitud entre laboratorios, análisis de varianza, pruebas de recuperación, pruebas de calificación entre técnicos, pruebas de control ambiental [35] [36].

Los materiales de Referencia certificados son muy útiles para verificar que se cumplan dichos criterios de aceptación y a su vez es necesario para la validación del método para comprobar la exactitud de los resultados [35]. La norma internacional 17034-2016 describe los requisitos generales para competencia de

los productores de materiales de referencia incluyendo los materiales de referencia certificados (MRC). Las muestras son altamente estables y homogéneas para unas propiedades específicas y que se acompaña de un certificado que indica los valores del material con una incertidumbre asociada y se relacionan con patrones de medida.

# CAPÍTULO 3

## 3. METODOLOGÍA

La investigación está planteada de forma que cumpla el objetivo central de la aplicación práctica. El nivel de estudio es de carácter descriptivo, experimental, deductivo, cuantitativa y transversal porque se aplica a la resolución del problema específico obteniendo así, datos medibles que permite el análisis descriptivo e inferencia en un tiempo definido.

La investigación desarrollada fue una medición del objeto de estudio con el fin de especificar cada desempeño de la muestra. A su vez, se utilizaron muestras, muestras fortificadas y controles con el fin de obtener los resultados; al tiempo que evitó otros factores que intervengan en la observación y se establezca fenómenos que provoque un efecto determinado. Por último, se evaluaron las características mediante la observación, razonamiento y herramientas estadísticas el cual estableció la validez del método analítico.

### 3.1. Elección del método

La norma ISO 17025 menciona en la cláusula 7.2.1, la importancia de la selección y verificación del método analítico como un proceso de resolución apropiada del problema analítico pero que cumpla con las expectativas de desempeño esperado. Las pruebas in vitro de almidón resistente son de interés en las industrias alimentarias previo al desarrollo de un producto y en la investigación científica de los proyectos. Las normas AOAC y AACC establecieron un esquema de procedimiento aceptado a nivel mundial. Hoy en día, se puede encontrar en el mercado a disposición el kit aprobado por estas organizaciones mencionadas. En el marco de lo expuesto, el problema analítico es cuantificar el contenido de almidón resistente desde el 2% hasta el 64% en un carbohidrato complejo de solo glucosa (monosacárido), siendo este el homopolisacárido más abundante en la naturaleza; el almidón. Las muestras usadas

para ensayo fueron harina de frejol centenario, almidón de banano estado 1 de variedad Cavendish y harina de papa Pucashungo.

## **3.2. Procedimiento analítico**

La norma ISO 78 [34] abarca veinte capítulos que contiene los principios aplicables al diseño y redacción de los métodos de análisis químico, pero estos se pueden omitir o agregar, si se necesitan; e incluirlos en lugares más apropiados del apartado. El método de ensayo analítico es un procedimiento considerado como una operación técnica y organizada con el fin de determinar las características específicas de un problema analítico específico. En el Anexo B, se encuentra el método analítico: DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN RESISTENTE EN MATRIZ VEGETAL.

Por otro lado, la norma ISO 17025 menciona en la cláusula 6 que, el laboratorio debe acondicionar o solicitar condiciones ambientales y físicas en base a los requerimientos del método de referencia, reactivos, equipos, materiales que permitan realizar las actividades en el laboratorio con el fin de verificar que el método propuesto es idóneo para el objetivo planteado.

### **3.2.1. Reactivos analíticos**

Las sustancias químicas y enzimáticas son reactivos especialmente indicados para aplicaciones analíticas con especificaciones garantizadas porque es esencial para obtener resultados precisos. Los grados de sustancias más adecuados para la investigación analítica fueron: ISO, grado ACS (American Chemical Society), grado analítico, grado HPLC y grado USP. En la tabla 3.1 se detalla los reactivos necesarios para el desarrollo de la metodología analítica.

**Tabla 3.1 Reactivos de laboratorio**

<b>Enzimas</b>	<b>Características</b>	<b>Condiciones de almacenamiento</b>
Amilase Porcine Pancreas	<b>Sinónimos:</b> $\alpha$ -Amylase, 4- $\alpha$ -D-glucan-glucanohydrolase <b>CAS Number:</b> 9000-90-2 <b>Specific activity:</b> $\geq 5$ units/mg solid	2-8 °C / cada 3 años (retest)
Amyloglucosidase from Rhizopus sp.	<b>Sinónimos:</b> 1,4- $\alpha$ -D-Glucan glucohydrolase, Exo-1,4- $\alpha$ -glucosidase <b>CAS Number:</b> 9032-08-0 <b>Specific activity:</b> $\geq 40,000$ units/g solid	-20 °C / cada 2 años (retest)
Enzimas reactivas GOPOD	Glucose oxidase, Peroxidase, 4- aminoantipyrine.	$\leq -10C$ / $> 5$ años
<b>Reactivos</b>	<b>Características</b>	<b>Condiciones de almacenamiento</b>
Tampón GOPOD pH 7.4	p-hydroxybenzoic acid, Sodium azide (0.095% w/v).	4 °C / $> 4$ años
Ácido maleico Reagent Plus	<b>Fórmula líneal:</b> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> <b>Sinónimos:</b> Toxilic acid, <i>Cis</i> -Butenedioic acid <b>CAS Number:</b> 203-742-5 <b>Pureza:</b> $\geq 99\%$ (HPLC) <b>Densidad:</b> 1.59 g/mL at 25 °C (lit.) <b>Peso molecular:</b> 116.07 g/mol	Ambiente / cada 6 años (retest)
	<b>Fórmula líneal:</b> NaOH	

Hidróxido de Sodio	<p><b>Sinónimos:</b> Soda Caústica</p> <p><b>CAS Number:</b> 1310-73-2</p> <p><b>Pureza:</b> ≥ 99.0%</p> <p><b>Densidad:</b> 2.13 g/cm<sup>3</sup> (at 20°C)</p> <p><b>Peso molecular:</b> 40 g/mol</p>	Ambiente / 5 – 30 °C
Cloruro de Calcio Dihidratado	<p><b>Fórmula lineal:</b> CaCl<sub>2</sub>*2H<sub>2</sub>O</p> <p><b>CAS Number:</b> 10035-04-8</p> <p><b>Pureza:</b> 99.0 to 105.0 %</p> <p><b>Densidad:</b> 0.830g/cm<sup>3</sup></p> <p><b>Peso molecular:</b> 147.1 g/mol</p>	Ambiente / cada 5 años (retest)
Azida de sodio Reagent Plus	<p><b>Fórmula lineal:</b> NaN<sub>3</sub></p> <p><b>Sinónimos:</b> NSC 3072, Hydrazoic acid sodium salt</p> <p><b>CAS Number:</b> 26628-22-8</p> <p><b>Pureza:</b> ≥ 99.5%</p> <p><b>Peso molecular:</b> 65.01 g/mol</p>	Ambiente / cada 5 años (retest)
Ácido glacial acético	<p><b>Fórmula lineal:</b> C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub></p> <p><b>Sinónimos:</b> Ethanoic acid</p> <p><b>CAS Number:</b> 64-19-7</p> <p><b>Pureza:</b> ≥99.8%</p> <p><b>Densidad:</b> 1.04 g/cm<sup>3</sup> (25 °C)</p> <p><b>Peso molecular:</b> 65.05 g/mol</p>	15°C - 25°C / 2 años
Glicerol Anhidro	<p><b>Fórmula lineal:</b> C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>(OH)<sub>3</sub></p> <p><b>Sinónimos:</b> Glicerina</p> <p><b>CAS Number:</b> 56-81-5</p> <p><b>Pureza:</b> Min 99.5%</p> <p><b>Densidad:</b> 1.26 g/cm<sup>3</sup></p>	Ambiente / 5 años

	<b>Peso molecular:</b> 92.10 g/mol	
Etanol	<b>Fórmula lineal:</b> CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH <b>Sinónimos:</b> Ethyl alcohol <b>CAS Number:</b> 64-17-5 <b>Pureza:</b> Min 99.9% <b>Densidad:</b> 0,79 g/cm <sup>3</sup> a 20 °C <b>Peso molecular:</b> 46.07 g/mol	15°C - 25°C / 2 años
<b>Material de referencia</b>	<b>Características</b>	<b>Condiciones de almacenamiento</b>
High amylose maize starch	<b>Humedad:</b> 12.3 % w/w <b>AR (“as is basis”):</b> 44.8 % w/w	Ambiente / > 2 años
Native Potato Starch	<b>Humedad:</b> 12.3 % w/w <b>AR (“as is basis”):</b> 63.4 % w/w	Ambiente / > 2 años
Kidney Beans	<b>Humedad:</b> aprox 2 % w/w <b>AR (“as is basis”):</b> 4.9 % w/w	Ambiente / > 2 años
Actistar (material produced by enzymatic modification of tapioca starch)	<b>Humedad:</b> aprox 8.7 % w/w <b>AR (“as is basis”):</b> 48.3 % w/w	Ambiente / > 2 años
Resistant Starch	<b>Humedad:</b> aprox 14.3% w/w <b>AR (“as is basis”):</b> 44 % w/w	Ambiente / > 2 años

Glucosa Standard	<b>Fórmula lineal:</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> <b>Concentración:</b> 1 mg/ml in 0.1% benzoic acid <b>Origen biológico:</b> Maize <b>Pureza:</b> Min 99.9% <b>Peso molecular:</b> 180.16 g/mol	2 - 8 °C / cada 2 años (retest)
<b>Soluciones volumétricas normal</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Condiciones de almacenamiento</b>
Buffer de Maleato de Sodio 100 mM, pH 6.0	Ácido Maleico Hidróxido de Sodio 4 M Cloruro de Calcio Dihidratado Azida Sodium	4°C / 12 meses
Tampón de acetato de sodio 1.2 M, pH 3.8	Ácido Acético Glacial Hidróxido de Sodio 4 M	Ambiente / 12 meses
Tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 4.5	Ácido Acético Glacial Hidróxido de Sodio 4M	4°C / 2 meses
Solución de hidróxido de potasio 2M	Hidróxido de Potasio	Ambiente / > 2 años
<b>Otras soluciones</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Condiciones de almacenamiento</b>
Etanol acuoso) (aprox. 50% v/v)	Etanol min 99%	Ambiente / > 2 años
Stock de amiloglucosidasa (3300 U/ml)	Amyloglucosidase from Rhizopus sp. Glicerol	4°C / máx. 5 años

AMG diluido (300 U/mL)	Stock de amiloglucosidasa (3300 U/ml) Buffer de Maleato de Sodio (100 mM)	-20 °C / > 5 años
Solución fresca de $\alpha$ -amilasa pancreática (10 mg, 30 U/mL) que contiene AMG (3 U/mL)	$\alpha$ -amilasa pancreática Buffer de Maleato de Sodio (100 mM) AMG diluido	Día de preparación
Reactivo de GOPOD	Tampón reactivo GOPOD Enzimas reactivas GOPOD	2-5 °C / ~ 3 meses o < -10 °C / 12 meses

El agua también requiere una calidad específica para los análisis; es decir que precisa de unas propiedades inherentes y de pureza que garantice la calidad necesaria para fines analíticos. La calidad de agua según ASTM II es Resistencia 10-15 M $\Omega$  x cm a 25 C, conductividad 0.067-0.1  $\mu$ S/cm, retención de bacterias y partículas  $\emptyset$  99% y rendimiento de permeado 12 L/h

### 3.2.2. Equipos, materiales e instrumentos analíticos

El laboratorio dispone de equipos, instrumentos y materiales basados en el requerimiento analítico con el acondicionamiento adecuado que asegure la exactitud necesaria que ofrezca resultados válidos. En la tabla 3.2 se detalla los equipos necesarios para el desarrollo de la metodología analítica.

**Tabla 3.2 Equipos de laboratorio**

<b>Equipos</b>	<b>Criterios técnicos</b>
Espectrofotómetro	Fuente de luz de flash de xenón, potencia promedio máxima de 10W. $\lambda$ range:200 to 999 nm, $\lambda$ exactitud: $\pm 2$ nm, $\lambda$ precisión: $\pm 0.2$ nm (STD), $\lambda$ bandpass: 2.4 nm, incremento:1 nm, resolución: 0.0001 OD
Balanza analítica	Max 220 g, legibilidad: 0.1 mg, precisión: máx. 0.7 mg, linealidad: $\pm 0.2$ mg
pH metro	pH 0 – 14, legibilidad: 0.001, precisión: $\pm 0.002$
Vortex Analógico	Velocidad: 300-3200 rpm (1-10). Orbital: 4.9 mm, Tapón Touch
Premolino	Discos con estrías
Molino	Tipo Martillo, malla 0.8 mm
Plato de agitación magnético	15 x 15 cm Barra de agitación magnética
Centrífuga # 1	Fuerza: máx. 13480 xg, temperatura ambiente. Rotor de capacidad 50 ml x 6
Centrífuga # 2	Fuerza: máx. 13500 rpm, temperatura ambiente. Rotor de capacidad 50 ml x 6
Termomixer	Temperatura: 5-100 °C, legibilidad: 0.1 C, precisión: $\pm 0.5$ °C, Rango de velocidad: 150 – 900 rpm

Medidor de Humedad	Masa: máx. 70 g, legibilidad: 0.001 g, precisión: $\pm 0.05\%$ , temperatura: 40-200 °C, legibilidad: 1° C
Baño María con agitación	Max 100 °C, legibilidad: 0.1 C, estabilidad/uniformidad: $\pm 0.1$ °C / $\pm 0.05$ °C a 37 C. Rpm: máx. 200 rpm. Legibilidad: 10 rpm,
Refrigerador-Congelador	Temperatura: 5 - 6 °C (parte baja) Temperatura: max -22°C (parte alta)
Equipo de agua	Agua type II. Conductividad: 10-15 MΩ/cm
<b>Instrumentos de medición</b>	<b>Criterios técnicos</b>
Cronómetros	Intervalo: 9 h: 59 min: 59,99 s. División de escala: 0.01
Termohigrómetro A	Sonda externa: -50 hasta 70 °C. Escala: 1°C. Precisión: $\pm 1$ °C Humedad: 25 – 95%. Escala: 1 % Precisión: $\pm 2\%$ RH
Termohigrómetro B	Sonda externa: -58 hasta 70 °C, Resolución: 0.1°C Precisión: $\pm 1$ °C Humedad: 25 – 99%. Escala: 1 % Precisión: $\pm 2\%$ RH
Micropipeta monocanal variable 0.5-10 ul	Legibilidad: 0.01 $\mu$ l Nivel alto: 10 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 1,00$ %, Imprecisión: $\pm 0,60$ % Nivel medio: 5 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 1,60$ %, Imprecisión: $\pm 1,00$ % Nivel bajo: 1 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 7,00$ %, Imprecisión: $\pm 4,00$ %

Micropipeta monocal variable 10-100 ul	Legibilidad: 0.1 $\mu$ l Nivel alto: 100 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 0,60$ %, Imprecisi3n: $\pm 0,20$ % Nivel medio: 50 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 0,80$ %, Imprecisi3n: $\pm 0,40$ % Nivel bajo: 10 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 3,00$ %, Imprecisi3n: $\pm 1,00$ %
Micropipeta monocal variable 100-1000 ul	Legibilidad: 2 $\mu$ l Nivel alto: 1000 $\mu$ l = CV: 0.3% y inexactitud: $\pm 0.8$ % Nivel bajo: 100 $\mu$ l = CV: 3% y Inexactitud: $\pm 8.0$ %
Micropipeta monocal variable 1000-10000 ul	Legibilidad: 10 $\mu$ l Nivel alto: 10000 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 0,60$ %, Imprecisi3n: $\pm 0,20$ % Nivel medio: 5000 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 0,80$ %, Imprecisi3n: $\pm 0,30$ % Nivel bajo: 1000 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 3,00$ %, Imprecisi3n: $\pm 0,60$ %
Micropipeta monocal variable 30-300 ul	Legibilidad: 0.2 $\mu$ l Nivel alto: 300 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 0,60$ %, Imprecisi3n: $\pm 0,30$ % Nivel medio: 150 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 1,00$ %, Imprecisi3n: $\pm 0,50$ % Nivel bajo: 30 $\mu$ l = Inexactitud: $\pm 3,00$ %, Imprecisi3n: $\pm 1,00$ %
<b>Materiales volum3tricos</b>	<b>Criterios t3cnicos</b>
Matraz 100 ml	Clase A, Tolerancia: $\pm 0.1$ ml
Matraz 200 ml	Clase A, Tolerancia: $\pm 0.15$ ml
Matraz 1000 ml	Clase A, Tolerancia: $\pm 0.4$ ml
Matraz 2000 ml	Clase A, Tolerancia: $\pm 0.6$ ml

### 3.2.2.1 Mantenimiento y calibración

El mantenimiento preventivo está diseñado para evitar averías mediante el control periódico del equipo porque se reduce las probabilidades de que se produzcan fallas disminuyendo así, los costos de inversión del equipo. A su vez, el mantenimiento periódico permite la devolución del estado de este a unas buenas condiciones. El mantenimiento proactivo de los equipos es fundamental para la precisión de los resultados y para aumentar la duración de vida del equipo. A su vez, maximiza el rendimiento y la confianza del equipo al presentar resultados exactos.

La calibración es un requisito de los equipos de medición que garantiza la fiabilidad de los equipos, corrigiendo errores en el rango de medida del método analítico usando patrones certificados (trazable) por empresas acreditadas bajo la norma ISO 17025. Adicionalmente, este proceso permite conocer el nivel de incertidumbre del equipo. La tabla 3.3 se enfoca en los puntos de calibración seleccionados en función de las medidas realizadas por el método de estudio y la frecuencia de los mantenimientos y calibración de estos equipos.

**Tabla 3.3 Cronograma de mantenimiento y calibración**

<b>Equipos</b>	<b>Puntos a calibrar</b>	<b>Mantenimiento (M) Calibración (C)</b>
Espectrofotómetro	No aplica	M: Si (Verificar con placa calibrada región VIS). Frecuencia: Anual
Balanza analítica	Prueba de repetibilidad, excentricidad e histéresis	M y C: Si. Frecuencia: Anual
pH metro	pH 4, 7 y 10	M y C: Si. Frecuencia: Anual

Vortex Analógico	No aplica	M: Si Frecuencia: Trianual
Premolino	No aplica	M: Si Frecuencia: Bianual
Molino	No aplica	M: Si Frecuencia: Bianual
Plato de agitación magnético	No aplica	M: Si Frecuencia: Bianual
Centrífuga	No aplica	M: Si Frecuencia: Anual
Termomixer	Temperatura: 50 °C	M y C: Si. Frecuencia: Anual
Termobalanza	Masa: 5 g Temperatura: 130 °C	M y C: Si. Frecuencia: Anual
Baño María con agitación	Temperatura: 37 °C y 50 °C	M y C: Si. Frecuencia: Anual
Refrigerador-Congelador	Temperatura: 4 °C (parte baja) Temperatura: -20°C (parte alta)	M y C: Si. Frecuencia: Anual
<b>Instrumentos de medición</b>	<b>Puntos a calibrar</b>	<b>Mantenimiento (M) Calibración (C)</b>
Cronómetros	0.5, 1, 2, 5 y 9 horas	M y C: Si. Frecuencia: Anual
Termohigrómetro A	Temperatura: 4 C y -20 C	M y C: Si. Frecuencia: Anual
Termohigrómetro B	Temperatura: 37 °C y 50 °C	M y C: Si. Frecuencia: Anual

Micropipeta monocanal variable 0.5-10 ul	1 ul, 5 ul y 10 ul	M y C: Si. Frecuencia: Semestral
Micropipeta monocanal variable 10-100 ul	15 ul, 50 ul y 100 ul	M y C: Si. Frecuencia: Semestral
Micropipeta monocanal variable 100-1000 ul	200 ul, 400 ul y 1000 ul	M y C: Si. Frecuencia: Semestral
Micropipeta monocanal variable 1000-10000 ul	2000 ul, 4000 ul y 10000 ul	M y C: Si. Frecuencia: Semestral
Micropipeta monocanal variable 30-300 ul	30 ul, 150 ul y 300 ul	M y C: Si. Frecuencia: Semestral
<b>Materiales volumétricos</b>	<b>Criterios técnicos</b>	<b>Calibración (C)</b>
Matraz aforado	Volumen: 100 ml, 200 ml, 1000 ml, 2000 ml	C: Si Frecuencia: Anual

### 3.2.2.2. Ajuste inicial de equipos e instrumentos

El ajuste de equipos e instrumentos de medición permite identificar posibles desviaciones del equipo o instrumento y estos pueden ser corregidos por el mismo personal. La tabla 3.4 detalla el protocolo de ajuste de cada equipamiento.

**Tabla 3.4 Ajuste de equipamiento**

<b>Equipo</b>	<b>Proceso</b>
<b>Espectrofotómetro</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verificar el UPS en modo LINE</li> <li>2. Abrir el programa GEN 5.1 en la PC de escritorio</li> <li>3. Encender el lector de microplacas</li> </ol>

	<ol style="list-style-type: none"> <li>4. Esperar que el portador de placas esté fuera de la puerta de acceso para su uso.</li> <li>5. Seleccionar la barra de herramientas, System, Diagnostic Test y Run System Test.</li> <li>6. Anotar el resultado: "SYSTEM TEST PASS or Error Codes"</li> </ol>
<p><b>Balanza analítica</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nivelar la balanza</li> <li>2. Encender la balanza</li> <li>3. Retirar todo objeto sobre el plato de pesado.</li> <li>4. Seleccionar en calibración interna</li> <li>5. Anotar el resultado</li> </ol>
<p><b>pH metro</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. Limpieza de sonda de pH</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inspeccionar el electrodo; no debe tener roturas, rasguños, acumulaciones de cristales de sal, o depósitos en la junta/membrana</li> <li>• Agitar la solución de limpieza.</li> <li>• Vertir suficiente solución de limpieza en el vaso de precipitados para cubrir la unión del electrodo.</li> <li>• Sumergir la sección del electrodo que requiere limpieza. Colocar el electrodo</li> <li>• Remojar el electrodo durante unos 30 minutos en la solución de limpieza mientras revuelve moderadamente la solución.</li> </ul> </li> </ol>

	<ul style="list-style-type: none"><li>• Retirar el electrodo de la solución de limpieza y enjuague bien el electrodo con agua destilada.</li><li>• Presionar la parte superior del electrodo Sure Flow para vaciar la solución de llenado. Asegúrese de que la unión se vacíe y se restablezca correctamente.</li><li>• Descubrir el orificio de llenado quitando la cinta y luego agregue la solución de relleno al electrodo. Para mantener un caudal adecuado, el nivel de solución de llenado debe estar siempre por encima de la unión de referencia y por lo menos una pulgada por encima del nivel de la muestra.</li><li>• Agitar el electrodo hacia abajo (similar a un termómetro clínico) para eliminar las burbujas de aire.</li><li>• Dejar el electrodo en remojo en la solución de almacenamiento durante 30 a 60 minutos.</li></ul> <p><b>2. Medición de pH</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Observar que los buffers 4, 7 y 10 estén libres de impurezas.</li><li>• Ambientar los buffers en el lugar de lectura.</li><li>• Encender el equipo.</li></ul>
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aperturar el orificio de llenado debe siempre que el electrodo esté en uso.</li> <li>• Enjuagar el electrodo y la sonda ATC con agua destilada y secar el electrodo de pH</li> <li>• Seleccionar calibración y colocar la solución en pH 7, 4 y 10. Cada cambio de pH, debe enjuagar el electrodo y repetir la calibración</li> <li>• Usar las fechas indicadoras hasta el valor de pH a la temperatura de trabajo, en caso de ajuste.</li> <li>• Seleccionar "Measure".</li> <li>• Anotar el dato.</li> </ul>
<p><b>Termobalanza</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Calentar el equipo por 30 minutos.</li> <li>2. Programar la temperatura a 130 °C</li> <li>3. Introducir el valor objetivo de la muestra</li> <li>4. Alzar la tapa.</li> <li>5. Colocar el platillo y cerrar la tapa</li> <li>6. Abrir la tapa y colocar min 5 gramos de muestra esparcida de manera homogénea sobre el plato de aluminio.</li> <li>7. Masa 5 gramos</li> <li>8. Cerrar la tapa y esperar los resultados.</li> <li>9. Anotar el dato.</li> </ol>
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colocar el rack con sus fijadores</li> <li>2. Agregar agua destilada al baño</li> </ol>

<p style="text-align: center;"><b>Baño María con agitación</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>3. Encender el equipo</li> <li>4. Colocar la temperatura y las revoluciones por minuto deseada.</li> <li>5. Seleccionar ON</li> <li>6. Colocar un termómetro calibrado</li> <li>7. Anotar el dato.</li> </ol>
<p style="text-align: center;"><b>Refrigeradora-Congelador</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colocar el termómetro en cada puerta asegurando que esté en el centro del equipo.</li> <li>2. Anotar el dato</li> </ol>
<p style="text-align: center;"><b>Termomixer</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colocar el valor de temperatura y RPM deseada.</li> <li>2. Colocar el valor de termómetro calibrado</li> <li>3. Anotar el dato.</li> </ol>
<p style="text-align: center;"><b>Micropipetas</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Enjuagar previamente la punta 5 veces con el líquido que va a dispensar.</li> <li>2. Sumergir la punta de la pipeta entre 1-2 mm para microvolumen y entre 3-6 mm para macrovolumen y el ángulo de inmersión lo más vertical posible o menor a 20 grados del ángulo vertical</li> <li>3. Dosificar con el extremo de la punta apoyada contra la pared del recipiente manteniendo un ritmo regular</li> <li>4. Usar la técnica de pipeteo en muestras fluidas e inversa en caso de soluciones viscosas</li> </ol>

### 3.2.3. Metodología analítica

El procedimiento es un método de ejecución o de pasos a seguir de forma sistemática y ordenada para obtener el resultado. A continuación, se explica la preparación de los reactivos, las muestras, los procedimientos y los cálculos seguidos.

- **Preparación de reactivos**

**1. Buffer de Maleato de Sodio (100 mM, pH 6.0):** Se adicionaron 23,2 g de ácido maleico en 1600 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 6,0 con hidróxido de sodio 4 M (160 g/l). Se añadió 0,6 g de cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y 0,4 g de azida de sodio y se disolvió. Se ajustó el volumen a 2 L.

**2. Tampón de acetato de sodio (1,2 M, pH 3,8):** Se adicionaron 68,6 mL de ácido acético glacial (1,05 g/mL) a 800 mL de agua destilada y se ajustó a pH 3,8 usando hidróxido de sodio 4 M. Se llevó a volumen de 1 L con agua destilada.

**3. Tampón de acetato de sodio (100 mM, pH 4,5):** Se adicionaron 5,8 mL de ácido acético glacial a 900 mL de agua destilada y se ajustó a pH 4,5 usando hidróxido de sodio 4 M. Se ajustó el volumen a 1 L con agua destilada.

**4. Solución de hidróxido de potasio (2 M):** Se adicionaron 112,2 g de KOH a 900 mL de agua desionizada y agitar hasta disolver. Se ajustó el volumen a 1 L.

**5. Etanol acuoso (o IMS) (aprox. 50% v/v):** Se adicionaron 500 mL de etanol (95% v/v o 99% v/v) o industrial alcoholes metílicos (IMS; etanol desnaturalizado; ~ 95 % v/v de etanol más metanol al 5 % v/v) hasta 500 ml de H<sub>2</sub>O.

**6. Stock de amiloglucosidasa (3300 U/ml):** Se pesaron 1.6734 g de Amyloglucosidase 98600 U/g y se diluyó en 25 ml de agua destilada. Se agitó suavemente y se agregó 25 ml de Glicerol. La solución es viscosa.

**7. AMG diluido (300 U/mL):** Se diluyó 2 mL de stock AMG en 22 mL con sodio 100mM tampón de maleato (0,1 M, pH 6,0). Se repartió en alícuotas de 5 ml y se almacenó congeladas en polipropileno. Es estable a ciclos de congelación/descongelación repetida.

**8. Reactivo de GOPOD:** Este reactivo se almacenó a temperatura de congelación en alícuotas. No se congeló y descongeló en más de una vez.

- Tampón reactivo GOPOD: Se diluyó el contenido del frasco 3 en 1 litro de agua destilada.

- Enzima reactivo GOPOD: Se añadió 20 ml del paso anterior al frasco 4 y transfirió cuantitativamente a la botella que contiene el resto de la Solución 3. Se cubrió esta botella con aluminio papel de aluminio para proteger el reactivo de la luz.

**9. Solución fresca de  $\alpha$ -amilasa pancreática (10 mg, 30 U/mL) que contiene AMG (3 U/mL):** Inmediatamente, antes de su uso, se suspendió 0.3 g de  $\alpha$ -amilasa pancreática 10 Unit/mg solid en 100 mL de sodio tampón de maleato (100 mM, pH 6,0) y se agitó durante 5 min. Se agregó 1.0 mL de AMG diluido (300 U/mL) y se mezcló bien. Se centrifugó a > 1500 g durante 10 min y se decantó cuidadosamente la solución sobrenadante.

## 2. Preparación de muestras

1. Se molió aprox. 50 g de muestra de cereal o vegetal liofilizado o producto terminado en molino por un tamiz de 0,8 mm.

2. Se transfirió todo el material a un frasco de plástico de boca ancha y mezcle bien agitando e invirtiendo. Las preparaciones industriales de almidón se suelen suministrar en forma de polvo fino, por lo que no es necesario moler.

- **Proceso de análisis**

1. **Hidrólisis y solubilización de almidón no resistente.**

- a. Se pesó con precisión, una muestra de  $100 \pm 5$  mg directamente en el tubo de centrifuga 50 ml y suavemente golpee el tubo para asegurarse de que la muestra caiga al fondo.
- b. Se agregó 4,0 mL de  $\alpha$ -amilasa pancreática (10 mg/mL) que contiene AMG (3 U/mL) a cada tubo.
- c. Se tapó herméticamente los tubos. A continuación, se mezcló en un Vortex y se adjuntó horizontalmente en un Baño de Agua con agitación, alineados en la dirección al movimiento.
- d. Se incubó los tubos a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación continua (200 strokes /min) durante exactamente 16 h (Nota: Para movimiento lineal, un ajuste de 100 al Baño María equivale a 200 golpes/min; 100 adelante y 100 atrás).
- e. Se retiró los tubos del baño de agua y se eliminó el exceso de agua superficial con una toalla de papel. Seguido, se retiró las tapas de los tubos y se trató el contenido con 4,0 mL de etanol (99% v/v) o IMS (99% v/v) con agitación vigorosa en un mezclador Vortex.
- f. Se centrifugó los tubos a 5500 xg durante 10 min.
- g. Se decantó con cuidado los sobrenadantes y se volvió a suspender los gránulos en 2 mL de etanol al 50% o IMS al 50% con agitación

vigorosa en un mezclador Vortex. Luego, se añadió otros 6 ml de IMS al 50 % y se mezcló los tubos.

- h. Se centrifugó de nuevo a 5500 xg durante 10 min.
- i. Se decantó los sobrenadantes y se repitió paso g y h, una vez más.
- j. Se decantó con cuidado los sobrenadantes y se invirtió los tubos en papel absorbente para escurrir el exceso de líquido.

## **2. Medición de almidón resistente**

### **Sección I**

- a. Se añadió una barra agitadora magnética (5 x 15 mm) y 2 mL de 2 M KOH a cada tubo para volver a suspender los gránulos.
- b. Se disolvió el almidón resistente agitando durante aprox. 20 min en un baño de hielo/agua sobre un agitador magnético. No mezcle en un mezclador de vórtice ya que esto puede hacer que el almidón se emulsione, pero se aseguró que el contenido del tubo se agite vigorosamente a medida que se agrega solución de KOH ya que evitó la formación de un bulto de material de almidón que luego será difícil de disolver.
- c. Se agregó 8 ml de tampón de acetato de sodio 1,2 M (pH 3,8) a cada tubo en agitación con el agitador magnético. Luego, se añadió inmediatamente 0,1 mL de AMG y se mezcló bien usando el agitador magnético.
- d. Se colocó el tubo en un baño de agua a 50°C y se incubó los tubos durante 30 min con mezcla intermitente en un mezclador Vortex.

### **Para muestras que contienen > 10% RS**

- a. Se transfirió cuantitativamente el contenido del tubo a un matraz volumétrico de 100 mL usando una piceta de agua. Se usó un imán

externo para retener la barra agitadora en el tubo mientras se lavó la solución del tubo con agua destilada.

- b. Se ajustó a 100 mL con agua destilada y se mezcló bien.
- c. Se centrifugó una alícuota de la solución a 5500 xg durante 10 min.

#### **Para muestras que contienen < 10% RS**

- a. Se centrifugó directamente los tubos a 1.500 xg durante 10 min (sin dilución).
- b. El volumen final en el tubo fue de aprox. 10,3 ml  $\pm$  0.05 ml.

#### **Sección II**

- a. Se transfirió alícuotas de 0,1 ml (por triplicado) de la solución diluida en el paso 7 o los sobrenadantes sin diluir del paso 8 en tubos de centrífuga 50 ml y se agregó 3,0 mL de reactivo GOPOD.
- b. Se preparó soluciones en blanco de reactivo mezclando 0,1 mL de 100 mM tampón de acetato de sodio (pH 4,5) y 3,0 mL de reactivo GOPOD.
- c. Se preparó estándares de D-glucosa (por cuadruplicado) mezclando 0,1 mL de D-glucosa (1 mg/mL) y 3,0 mL de reactivo GOPOD.
- d. Se incubó a 50°C durante 20 min, se enfrió y se configuró el espectrofotómetro a cero con el reactivo blanco.
- e. Se midió la absorbancia de cada solución a 510 nm frente al blanco de reactivo.
- f. Se obtuvo promedio de los duplicados.
- g. La respuesta de color con glucosa fue lineal en el rango de absorbancia 0-1.5 unidades de absorbancia

### **3. Cálculos**

**a. Muestras que contienen > 10% RS (% “as is”, en peso seco)**

$$\text{Almidón resistente (g/100 g muestra)} = \Delta A \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = \Delta A \times F/W \times 90$$

**b. Muestras que contienen < 10% RS (% “as is”, en peso seco)**

$$\text{Almidón resistente (g/100 g muestra)} = \Delta A \times F \times 10.3/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = \Delta A \times F/W \times 9.27$$

Donde:

**$\Delta A$**  = absorbancia (reacción) leída frente al blanco de reactivo.

**F** = 100 ( $\mu\text{g}$  de D-glucosa) dividido por la absorbancia GOPOD para este 100  $\mu\text{g}$  de D-glucosa. Es la conversión de absorbancia a microgramos (la absorbancia obtenida para 100  $\mu\text{g}$  de D-glucosa en la reacción de GOPOD).

**100/0,1** = Corrección de volumen (0,1 mL tomados de 100 mL).

**1/1000** = Conversión de microgramos a miligramos.

**W (peso seco de la muestra analizada)** = Peso  $\times$  [(100-contenido de humedad) /100].

**100/W** = Factor para presentar RS como porcentaje del peso de la muestra. 7

**162/180** = factor para convertir de D-glucosa libre, según lo determinado, a anhidro-D-glucosa como ocurre en el almidón.

**10,3/0,1** = corrección de volumen (0,1 mL tomados de 10,3 mL) para muestras que contienen 0-10% RS donde la solución no se diluye y el volumen final es ~ 10,3 ml.

### 3.3. Diseño experimental

La demostración del método analítico se fundamentó en los objetivos planteados y en los criterios de desempeño que debo cumplir cuando declaro el método validado. La tabla 3.5 describe el diseño experimental aplicado en la validación del método.

Es necesario indicar que el blanco muestra y blanco reactivo son herramientas de trabajo a realizar previo al desarrollo de la validación. El blanco muestra se obtuvo de la etapa de solubilización del almidón. El blanco reactivo equivale a la absorbancia de la solución inferior a 0,050 frente al agua destilada en 10 réplicas de reactivo Tampón de acetato de sodio (pH 4,5) y GOPOD para cuantificar contenido de glucosa.

**Tabla 3.5 Diseño experimental del método**

Parámetro de desempeño	Procedimiento	Objetivos de validación	Aplicación práctica
<b>Selectividad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analizar muestras que contienen diferentes interferencias sospechosas en presencia del analito de interés.</li> <li>- Analizar los efectos de las interferencias: si la presencia de interferencias disminuye (efecto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No es selectivo cuando:</li> <li>- Resultado negativo en muestras identificadas que tengan el analito de interés</li> <li>-Falso positivo en muestras con el analito de interés, pero no lo detecta.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DÍA 1.</li> <li>Analizar 10 réplicas de almidón no resistente de la etapa:</li> <li>Solubilización de almidón a partir de un almidón de</li> </ul>

	<p>sustractivo) o aumentan (efecto aditivo) la cantidad esperada del analito</p>	<p>Es "100% selectivo" cuando se tiene ausencia de efecto interferentes.</p> <p>Si <math>t</math> (el valor calculado de <math>t</math> sin tomar en cuenta el signo) es mayor que un cierto valor de <math>t</math> crítico, para el nivel de confianza 95% y grados de libertad <math>v = n - 1</math>, entonces se existe diferencia significativa entre ambos valores (Miller and Miller, 2002).</p>	<p>frejol rojo de 4.9%.</p>
<p><b>Límite de detección</b></p>	<p>En base a la desviación estándar:</p> <p>-Leer varias veces muestras que no contienen al analito, esto es muestras "blanco". El límite de detección debe ser lo suficientemente bajo para que el análisis cumpla su objetivo</p>	<p>Límite de detección: 1 %</p> <p>El nivel de confianza para tres desviaciones estándar es de 99.87 % entonces la zona correspondiente de <math>\alpha</math> (nivel de significancia) es 0.13% (IUPAC, 2002) para blancos que presentan valores</p>	<p>DIA 2.</p> <p>Analizar 10 réplicas de almidón de frejol de 4.9 % que recupere al menos un 50 % del analito.</p>

	usando el método IUPAC.	diferentes de cero.  El límite de detección teórico debe recuperar al menos el 50% de la muestra control.	
<b>Límite de cuantificación</b>	A través de la desviación estándar de las mediciones de blancos:  -Analizar un número apropiado de muestra de blancos y calcular la desviación estándar de las respuestas.	Límite de cuantificación: 2 % (protocolo de ensayo MEGAZYME)  Factor numérico (k) de acuerdo al coeficiente de variación permitido o establecido por laboratorio. Si K=10 entonces el CV máximo permitido es de 10% para desviación estándar de las mediciones de blancos.  El límite de cuantificación debe ser al menos el 70% de recuperación de mi muestra control para que el análisis cumpla su objetivo mediante el método IUPAC.	DIA 2 A DÍA 6  Analizar 16 réplicas en cinco días de almidón de frejol de 4.9% que recupere al menos un 70% de la muestra.

<p><b>Linealidad</b></p>	<p>-Obtener las medias de la concentración. -Construir una gráfica con la media aritmética de las réplicas sobre el eje Y (ordenadas), en función de la concentración sobre el eje X.</p>	<p>Analizar la recta en 5 puntos a concentraciones distintas distribuidas en intervalos proporcionales con una correlación lineal <math>R^2 \geq 0.991</math> el cual debe complementarse la confirmación de la linealidad mediante evaluación visual de la recta obtenida (AOAC, 2002)</p>	<p>DIA 3 A DIA 7.  Realizar curva de calibración previo a cada estudio de exactitud y precisión. Analizar los puntos de 0, 0.15, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg/ml por triplicado de glucosa estándar para establecer la pendiente de la curva de calibración.</p>
<p><b>Intervalo de trabajo</b></p>	<p>-Realizar una serie de mediciones a diferentes rangos de control por duplicado</p>	<p>El rango de trabajo debe permitir la obtención de los resultados a partir del LC y mínimo un 70% del valor de recuperación en todo el</p>	<p>DÍA 3 A DÍA7  Analizar 16 réplicas de muestra de harina de frejol</p>

		rango.	durante 5 días  Analizar 30 réplicas en muestra de harina de papa durante 4 días
<b>Exactitud</b>	La muestra de referencia seleccionada debe ser analizada "n" veces con el método a ser validado en diferentes días.	<b>Evaluación de la recuperación por criterios establecidos:</b> (AOAC, 2002)  <b>Concentración</b> 100% entonces <b>Recuperación</b> 98-101%	DIA 3 A DIA 7.  Analizar 5 veces el material de control 4.9%, 44.8% y 63.4% a nivel bajo, medio y alto, respectivamente.
<b>Repetibilidad</b>	-Usar MR para experimentos de precisión. -Determinar la precisión intermedia utilizando ANOVA de una sola vía referenciada en ASTM E 691-14 y en ISO	Comparación con los resultados de medición de %AR del método normalizado AOAC 2002.02.  <b>Nivel bajo:</b> % RSDr: máx 2.42 %	DÍA 3 A DÍA 7  Nivel bajo: 16 réplicas con harina de frejol durante cinco días

	5725-3:1994.	<p><b>Nivel medio</b> % RSDr: máx 3.18 %</p> <p><b>Nivel alto</b> % RSDr: máx 4.20 %</p> <p>Recuperación de al menos un 70%</p>	<p>Nivel medio: 27 réplicas de almidón de banano estado 1 durante 4 días</p> <p>Nivel alto: 30 réplicas de harina de papa durante 4 días</p>
<b>Reproducibilidad</b>	<p>-Usar MR para experimentos de precisión.</p> <p>-Determinar la precisión intermedia a partir de desviación estándar y por análisis de varianzas según ISO 5725-2:1994 utilizando ANOVA de una sola vía referenciada en ASTM E 691-14 y en ISO 5725-3:1994.</p>	<p>Comparación con los resultados de medición de %AR del método normalizado.</p> <p><b>Nivel bajo:</b> % RSDr: máx 4.58%</p> <p><b>Nivel medio</b> % RSDr: máx 8.47%</p> <p><b>Nivel alto</b> % RSDr: máx 5.94%</p> <p>Recuperación de al menos un 70%</p>	<p>DÍA 3 A DÍA 7</p> <p>Nivel bajo: 16 réplicas con harina de frejol durante cinco días</p> <p>Nivel medio: 27 réplicas de almidón de banano estado 1 durante 4 días</p> <p>Nivel alto: 30 réplicas de harina de papa durante 4 días</p>

<p><b>Robustez</b></p>	<p>-Seleccionar factores que tienen el efecto significativo en el método e inducir a modificaciones deliberadas.</p> <p>-Experimentos de robustez con variaciones sencillas: Efecto individual de cada factor en términos de dispersión.</p>	<p>Si <math>F_{cal} \leq F(\alpha, v_1, v_2)</math> la hipótesis nula no puede ser rechazada y el proceso puede ser considerado robusto.</p>	<p>DIA 8 O DIA 11.</p> <p>Analizar 5 réplicas de muestra con concentraciones conocidas y modificando 7 variables, uno a uno:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pesar 80 mg de muestra</li> <li>2. Agregar 3 ml de solución de enzima fresca <math>\alpha</math>-amilasa pancreática.</li> <li>3. Agregar 1.5 ml de KOH 2 M por 20 min.</li> <li>4. Diluir 80 ml de buffer pH 6.0 en 0.3 gramos de alfa amilasa.</li> <li>5. Incubar por 30 minutos con la enzima AMG a 50 °C</li> </ol>
------------------------	--	--	---

			<p>en un equipo de baño seco con agitación</p> <p>6. Incubar a 37 C por 16.5 horas.</p> <p>7. Incubar a 48 C por 30 minutos la enzima AMG</p>
--	--	--	---

### 3.4. Incertidumbre de medida

El instrumento de medición, el analista, el ambiente, los materiales, los reactivos y el método son los factores a tomar en cuenta en una medición porque influye en el proceso de análisis y de manera directa con el resultado de medición. La identificación de factores se reconoce con el diagrama de causa – efecto o diagrama de Ishikawa. En la tabla 3.6, se especifican las fórmulas de medición de incertidumbre por cada factor y en la tabla 3.7, se detallan las fórmulas para obtener la incertidumbre expandida.

**Tabla 3.6 Incertidumbre de medida**

Factores	Tipo	Distribución	Fórmula
		Normal	<p>1. Agrupados alrededor de la media, [Incertidumbre expandida: U y K: Factor de cobertura]</p> <p style="text-align: center;">U/k</p> <p>2. Para nivel de confianza 95%</p> <p style="text-align: center;">[Rango/2] / 1.96</p>

Maquinarias	B	Rectangular	<p>1. Tolerancia (T) <math>T/\sqrt{3}</math></p> <p>2. Resolución (R) <math>R/\sqrt{3}</math></p>
Mano de obra	A	N/A	1. ANOVA de una vía - Análisis de varianza
Medio ambiente	B	Normal	<p>1. Agrupados alrededor de la media, [Incertidumbre expandida: U y K: Factor de cobertura] <math>U/k</math></p> <p>2. Para nivel de confianza 95% <math>[Rango/2] / 1.96</math></p>
		Rectangular	<p>1. Tolerancia (T) <math>T/\sqrt{3}</math></p> <p>2. Resolución (R) <math>R/\sqrt{3}</math></p>
Método	A	N/A	1. ANOVA de una vía- Análisis de varianza
		N/A	<p>1. Agrupados alrededor de la media, [Incertidumbre expandida: U y K: Factor de cobertura] <math>U/k</math></p>

	B		<p>2. Para nivel de confianza 95% Rango/2 / 1.96</p> <p>3. Curva de calibración Residuos/pendiente</p>
		Triangular	Rango / $\sqrt{6}$
Materiales		Normal	<p>4. Agrupados alrededor de la media, [Incertidumbre expandida: U y K: Factor de cobertura] U/k</p> <p>5. Para nivel de confianza 95% [Rango/2] / 1.96</p>
	B	Rectangular	<p>1. Tolerancia (T) T/ <math>\sqrt{3}</math></p> <p>2. Resolución (R) R/ <math>\sqrt{3}</math></p>

**Tabla 3.7 Incertidumbre combinada y expandida**

Incertidumbre	Requisitos	Fórmula
Incertidumbre combinada	1. Suma de las raíces cuadradas de las varianzas de tipo A y B	$uc^2 = \sqrt{ua^2 + ub^2}$

Incertidumbre expandida	2. Intervalo de confianza de 95.5%, k= 2	$up = kuc$
----------------------------	---	------------

### 3.5. Herramienta estadística para el análisis

El uso de herramientas estadísticas es esencial para demostrar de manera objetiva la calidad de los resultados analíticos demostrando que es idóneo para el método previsto. La tabla 3.8 resume los métodos descriptivos e inferencia estadística usados para el posterior análisis de datos.

**Tabla 3.8 Técnicas estadísticas para validación del método**

Parámetro de desempeño	Herramienta Estadística
<b>Selectividad</b>	Prueba t para evaluación del sesgo  <b>Veracidad a través del sesgo</b> $Ve = \bar{y} - \mu$ $\bar{y}$ : promedio muestral $\mu$ : valor de referencia
	<b>Evaluación empleando el estadístico t</b>  La incertidumbre del MR no se considera significativa o no proviene de una fuente confiable.  $t = (\bar{y} - \mu) \sqrt{n} / SD$  $\bar{y}$ : promedio muestral SD: Desviación estándar muestral

	<p>n: número muestral  <math>\mu</math>: valor de referencia</p>
<b>Límite de detección</b>	$Y_{LOD} = Y_{\text{blanco}} + 3SD_{\text{blanco}}$ <p><math>Y_{\text{blanco}}</math>: Valor promedio de las señales del blanco,  <math>SD_{\text{blanco}}</math>: La desviación estándar de las lecturas.</p>
<b>Límite de cuantificación</b>	$Y_{LOC} = Y_{\text{blanco}} + 10SD_{\text{blanco}}$ <p><math>Y_{\text{blanco}}</math>: Valor promedio de las señales del blanco,  <math>SD_{\text{blanco}}</math>: La desviación estándar de las lecturas.</p>
<b>Linealidad</b>	<p><b>Media aritmética de cada concentración.</b></p> $\bar{x} = \frac{\sum_{xi=1}^{xi=n} xi}{n}$ <p><b>Pendiente</b>  <math>y = mx + b</math>  y: señal medida  m: pendiente  b: señal del instrumento para el blanco.</p> <p><b>R<sup>2</sup>: Coeficiente de correlación</b></p>
<b>Intervalo de trabajo</b>	<p><b>Media aritmética</b></p> $\bar{x} = \frac{\sum_{xi=1}^{xi=n} xi}{n}$ <p>Valor<sub>min</sub> – Valor<sub>máx.</sub></p>

<p><b>Exactitud (Veracidad)</b></p>	<p style="text-align: center;">—</p> <p style="text-align: center;">% <i>Recuperación</i>: <math>\frac{x}{x_{ref}} \times 100\%</math></p>
<p><b>Repetibilidad / Reproducibilidad</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>ANOVA de una sola vía</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Desviación estándar</b> STD: <math>\sqrt{\sigma^2}</math></p> <p style="text-align: center;"><b>Media aritmética</b></p> $\bar{x} = \frac{\sum_{xi=1}^{xi=n} xi}{n}$ <p style="text-align: center;"><b>Desviación estándar relativa %</b></p> $RSD \% = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%$
<p><b>Robustez</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Prueba F</b></p> <p style="text-align: center;">Hipótesis nula <math>H_0</math>: <math>s_{total} = s_A</math> Hipótesis alterna <math>H_1</math>: <math>s_{total} \neq s_A</math></p> $\hat{F} = \frac{s_{total}^2}{s_A^2} = \frac{s_A^2 + s_B^2}{s_A^2}$ <p style="text-align: center;">sA: Error experimental (Desviación debida al analito) sB: Desviación por los factores de influencia e interferencias conocida</p>

### 3.6 Informe de validación

El informe de resultados es un documento que contiene la información suficiente que concluye si la validación es apta para los fines establecidos. El contenido del informe tiene:

- Objetivo
- Alcance
- Información técnica
  - Reactivos
  - Equipos
  - Materiales de referencia
  - Personal
- Normativa
- Necesidad analítica
- Parámetros validados, fijación de objetivos, Actividad
- Resultados analíticos
- Resultados estadísticos
- Interpretación de resultados
- Cuadro resumen [parámetro, criterio, resultado, conclusión]
- Identificación de factores
  - Diagrama de Ishikawa
- Cálculo de incertidumbre
  - Tabla de estimación
  - Histograma de factores
  - Declaración de aptitud del método

### 3.7 Aseguramiento de calidad de los resultados

La inspección de los resultados del ensayo permite conocer la uniformidad de los factores que influyen en la fiabilidad y exactitud del resultado. Además, proporciona información de la calidad del proceso analítico llevado a cabo en el laboratorio a través del tiempo. La tabla 3.9 indica el mecanismo establecido para verificar de manera sistemática y continuada que los resultados analíticos se mantienen dentro de los límites de calidad.

**Tabla 3.9 Validez de los resultados**

<b>Controles internos de calidad</b>	<b>Característica</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Estadística</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Pruebas funcionales del equipo	Comprobación de parámetros técnicos del equipo.	Antes de cada ensayo	N/A	Cumple los requisitos técnicos del equipo
Blanco muestra	La muestra no contiene analito o muy bajo analito	Inicio de cada lote de ensayo	Media* STD*	$\leq$ LD *Se define luego de la obtención de los resultados de validación
Material de referencia certificado	Proporciona un resultado y valor de incertidumbre.	Inicio de cada lote de ensayo	%R*, CV*	*Se define luego de la obtención de los resultados de validación
Análisis de duplicado.	Muestras de rutina.	Cada ensayo	Precisión*	*Se define luego de la obtención de los resultados de validación.



# CAPÍTULO 4

## 4. RESULTADOS

El proceso realizado en las instalaciones del laboratorio se realizó de manera metódica, secuencial y crítica a lo largo del protocolo de validación del método analítico Almidón Resistente mediante digestión enzimática. A continuación, se menciona de manera detallada el proceso llevado a cabo para determinar % de Almidón Resistente en matrices vegetales.

### 4.1. Puesta inicial del método

El método de ensayo como el análisis de cada etapa fue la base para alistar las condiciones iniciales antes de desarrollar los ensayos. Las soluciones de trabajo fueron preparados conforme a lo establecido en el protocolo del ensayo y almacenados a la temperatura establecida. Los equipos/instrumentos de medición, materiales, reactivos/enzimas, material de control/muestras, ambiente fueron los elementos revisados antes de la realizar la metodología analítica.

- Equipos/instrumentos de medición: Se realizó el mantenimiento y calibración de este equipamiento descrito en la tabla 3.2.2. luego de confirmar que cumplen el rango de trabajo requerido para el ensayo. Adicionalmente, durante los ensayos se verificó temperaturas y tiempo con termohigrómetros y cronómetro; respectivamente, de los equipos que apliquen. Con respecto al espectrofotómetro y balanza analítica, se revisó mediante herramientas propias del equipo que aprobó su funcionamiento. La micropipeta se acondicionó al realizar un enjuague con el mismo material de disposición por cinco veces
- Materiales: Se verificó la disponibilidad de este equipamiento para la ejecución del procedimiento de acuerdo al ensayo analítico. Todo el material de vidrio fue alistado enjuagando el material con agua destilada, con el fin de que este quede libre de cualquier residuo que pueda llegar a afectar la precisión de los resultados de los análisis.
- Reactivos/Enzimas: Se revisó la pureza del material enlistado en la tabla 3.2.1.

y que el material de empaque este bien sellado y almacenado en el lugar adecuado, Adicionalmente, si hay la cantidad requerida para la ejecución del ensayo.

- Material de control/muestras Se observó que el material de control, descrito en la tabla 3.2.1, tenga las condiciones de empaque en buen estado y bien sellados. Adicionalmente, que no muestre apelmazamiento las muestras de harina de frejol variedad Centenario (F), almidón de banano estado 1 variedad Cavendish (Ba) y harina de papa variedad Pushucango (P).
- Ambiente: El espacio físico y las áreas de trabajo estén a temperatura 22-24 C y humedad 50-55 % las cuales garantiza el rendimiento adecuado al equipo/instrumento de medición.

## 4.2. Verificación inicial

Se ejecutó el ensayo conforme a lo establecido en el procedimiento AOAC 2002.022 con una muestra de almidón de maíz de alto contenido de amilosa de 44.8%. La tabla 4.1 muestra la media, desviación estándar y error porcentual.

**Tabla 4.1 Resultados de muestra de almidón**

Muestra	Media	Desviación estándar	$\epsilon$ %
Maíz de alto contenido de amilosa	45.70	0.03	2.01

El protocolo se realizó por duplicado y la media del ensayo mostró una medida de tendencia central cercano al valor teórico de 45.70% RS y una baja dispersión de los datos de 0.03% RS que representa un error ~2% del valor esperado.

## 4.3. Parámetros de desempeño

La evaluación de cada parámetro que caracteriza el método de prueba fue llevada a cabo en el laboratorio. Los datos aberrantes no fueron tomados en cuenta para los

análisis estadísticos.

### 4.3.1 Selectividad

Este análisis se realizó con una muestra que contiene muy bajo analito, obtenido de 16 horas de solubilización de almidón de frejol rojo de concentración conocida. El análisis se realizó por duplicado y se repitió el experimento 10 veces. La tabla 4.2 muestra la media, recuperación del material y sesgo para el método de medición a partir de un material con una concentración de 4.9% de almidón resistente.

**Tabla 4.2 Almidón de frejol rojo, 4.9 %**

Muestra	Media	% R	Sesgo
Almidón 4.9%	5.03	102	0.4
Bajo analito	0.32	6	4.48

Los resultados indican que las medias de las muestras A y B fueron 50.3% y 0.32% de almidón resistente, respectivamente y la proporción de analito recuperado de la muestra A fue 102% y la muestra B fue 6 %. Finalmente, la diferencia entre el valor teórico y el valor real es mínima en A mientras que en B es 4.48. Para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos en la evaluación del sesgo se usó la distribución de probabilidad t de Student (prueba t). La prueba de hipótesis es:

- Hipótesis nula,  $H_0 = 4.9$
- Hipótesis alterna,  $H_1 \neq 4.9$

La tabla 4.3 muestra el estadístico t suponiendo varianzas desiguales a un nivel de confianza de 95% usando el análisis de datos en Excel 2010.

**Tabla 4.3 Estadístico t-student a nivel de significancia  $\alpha= 0.05$**

<b>Parámetros</b>	<b>Variable 1</b>	<b>Variable 2</b>
Media	5,02657799	0,31709982
Varianza	0,04985952	0,00233415
Observaciones	8	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	58,5679195	
P(T<=t) una cola	4,0111E-12	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954804	
P(T<=t) dos colas	8,0223E-12	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600414	

El valor experimental, estadístico t, es mayor que el valor crítico de t y el valor p, entonces tengo evidencia para rechazar la hipótesis nula, es decir que si hay diferencia significativa entre las medias de las muestras.

### **4.3.2 Blancos**

El estudio de los blancos es una herramienta de trabajo con propiedades específicas requerido para la validación, el cual permitió definir el alcance del método y establecer las condiciones de medición.

- **Blanco reactivo**

Se realizó 10 réplicas y la cuantificación se realizó por duplicado para la determinación del blanco reactivo descrito en el protocolo. La tabla 4.4 muestra la media y la dispersión de los datos con respecto a la media de la absorbancia.

**Tabla 4.4 Blanco reactivo del ensayo**

<b>Muestra</b>	<b>Promedio (abs)</b>	<b>Desviación estándar</b>
Buffer 100 mM pH 4.5 + GOPOD	0.04	0.001

- **Blanco muestra**

La muestra que contiene muy bajo analito se analizó por 10 veces y la cuantificación se realizó por duplicado. La tabla 4.5 muestra la media de la absorbancia y la media como la desviación estándar del almidón resistente.

**Tabla 4.5 Blanco muestra del ensayo**

<b>Muestra</b>	<b>Promedio (abs)</b>	<b>Promedio %AR</b>	<b>Desviación Estándar %AR</b>
Almidón solubilizado por 16 horas	0.027	0.317	0.048

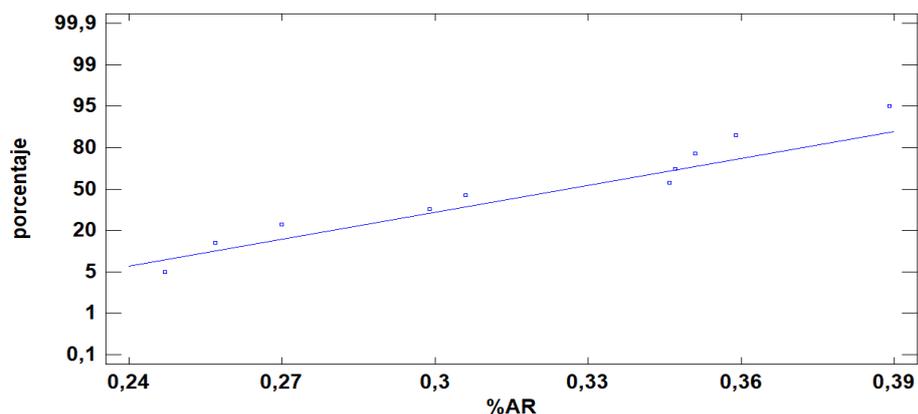
La señal del equipo de medición es menor en blanco muestra que en blanco reactivo debido a que se restó la absorbancia de la muestra con el reactivo blanco para calcular la concentración de almidón resistente.

### 4.3.3 Límite de detección (LD)

En base a la desviación estándar y muestras en blanco diferentes de cero, el LD es expresado como el promedio más tres veces la desviación estándar de las lecturas en blanco. Es decir, que el LD teórico es 0.46% AR.

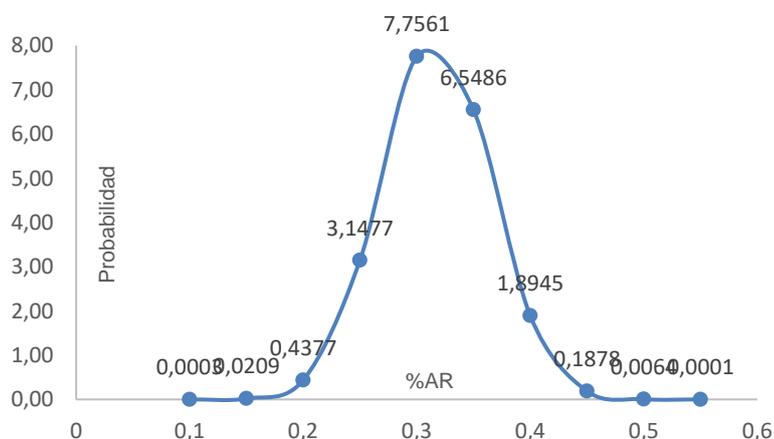
La figura 4.1 muestra el gráfico de probabilidad normal caer aproximadamente a lo largo de la línea recta. Es decir, que los datos del blanco son muestras aleatorias de una distribución normal, aunque la desviación del valor con respecto a la línea referencia en 1 extremo indica que el dato pueda provenir de una distribución con cola relativamente más larga que una distribución normal.

**Figura 4.1 Probabilidad Normal**



La figura 4.2 muestra la distribución normal a un nivel de confianza de 99.87% donde la probabilidad asociada a Z de una distribución normal estándar  $N(0,1)$  fue 3.195. Es decir que, la probabilidad de encontrar un valor z menor o igual a 3.195 es 0.9987. Por lo tanto, a un nivel de confianza de 99.87% mi valor teórico de LD se encuentra entre 0.16 y 0.47 %AR.

**Figura 4.2 Distribución Normal**



In situ, la glucosa liberada por la hidrólisis del almidón resistente a partir de frijoles rojos de concentración inicial 4.9% fue diluida a diferentes concentraciones con agua tipo II, del 10 % al 90% para observar cual tuvo una recuperación de al menos un 50 % de recuperación de mi analito. La cuantificación se realizó por triplicado. La tabla 4.6 muestra el % de almidón resistente y el % de recuperación de las diferentes concentraciones.

**Tabla 4.6 Concentraciones de almidón resistente de 4.9%**

Diluciones	%AR	% R
<b>M10%</b>	0,051	1,04%
<b>M20%</b>	0,166	3,38%
<b>M30%</b>	0,407	8,31%
<b>M40%</b>	0,739	15,08%
<b>M50%</b>	1,165	23,77%
<b>M60%</b>	1,806	36,86%
<b>M70%</b>	2,424	49,47%
<b>M75%</b>	3,030	61,83%
<b>M80%</b>	3,051	62,26%
<b>M90%</b>	4,003	81,69%
<b>M100%</b>	4,989	101,82%

Según lo observado en la tabla 4.3, a mayor concentración de glucosa mayor concentración de almidón resistente, por tanto, hay mayor recuperación del analito. El porcentaje de recuperación de almidón resistente a un LD teórico fue  $\approx 9.4\%$ , que es menor al mínimo de recuperación aceptado. Tomando en cuenta que se debe recuperar un mínimo de 50%, se procedió a realizar el análisis independiente de muestra que contiene 3.03 % AR. El análisis se cuantificó por duplicado y se repitió el experimento 10 veces. La tabla 4.7 muestra la media, desviación estándar y % de recuperación de la muestra

**Tabla 4.7 Límite de detección**

<b>Muestra</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>%R</b>
<b>M75%</b>	2.98	0.21	60.87

#### **4.3.4 Límite de cuantificación (LC)**

En base a la media y la desviación estándar de las mediciones en blanco muestra descrito en el punto 4.3.2, el LC es expresado como el promedio más 10 veces la desviación estándar de las lecturas. Es decir, que el LC teórico es 0.80 % AR. Según lo observado en la tabla 4.3, el porcentaje de recuperación del almidón resistente a un LC teórico fue  $\approx 16\%$ . El valor recuperado es no aceptable porque el límite de cuantificación debe ser al menos el 70% de recuperación. Por lo tanto, se procedió a realizar el análisis independiente de muestra que contiene 4.00 % AR. La tabla 4.8 muestra la media, la desviación estándar y el % de recuperación de la muestra con concentración 90% AR de 16 réplicas que se cuantificó por duplicado.

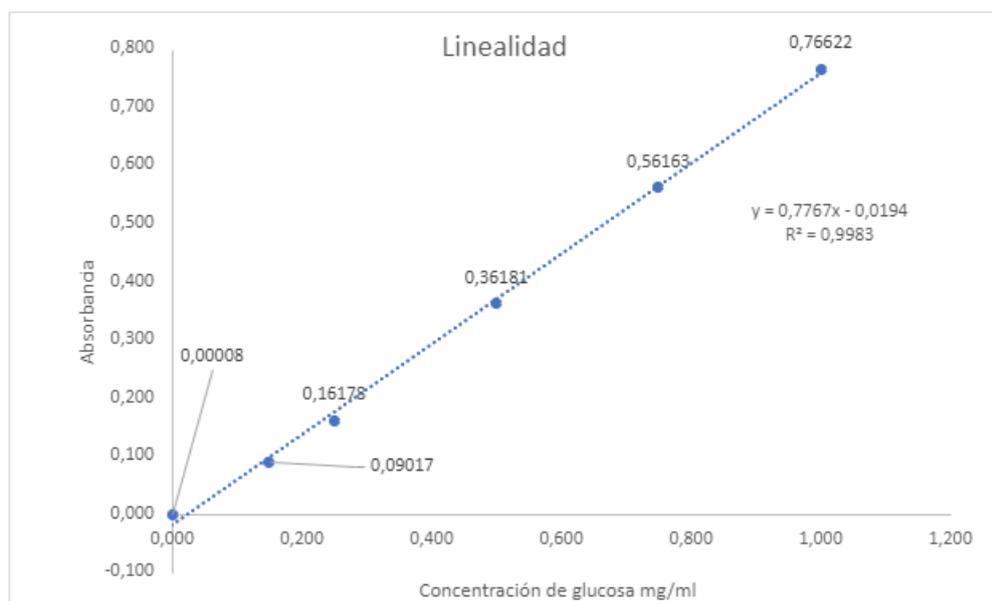
**Tabla 4.8 Límite de cuantificación**

<b>Muestra</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>%R</b>
<b>M90%</b>	4.02	0.08	83.44

### 4.3.5 Linealidad

Se usó el reactivo comercial D-Glucose estándar para la medición de glucosa. Se preparó las muestras a diferente concentración de glucosa estándar: 0, 0.15, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg/ml. Cada punto se cuantificó por duplicado y triplicado en los ensayos. La figura 4.3 muestra la recta de calibrado obteniendo la ecuación de la recta siendo la pendiente 0.7767 y el intercepto 0.0194.

**Figura 4.3 Curva de calibrado Glucosa Standard**



El coeficiente de determinación tuvo un ajuste de 0.9983 el cual es cercano a 1, es decir que está cerca del modelo lineal ajustado por lo tanto las predicciones de concentración de una muestra son totalmente fiables.

### 4.3.6 Rango de trabajo

Las muestras fueron harina de frejoles y de papa para los niveles bajo y alto, respectivamente. Se realizó 16 réplicas a nivel bajo y se cuantificó por duplicado

siguiendo la metodología descrita en 3.2.3. En el análisis de nivel alto se observó una formación de gel al agregar KOH 2M que dificultó la disolución de almidón resistente con el agitador magnético. Por lo tanto, se realizó pruebas de disolución del almidón resistente adicionando: 1 ml de agua destilada, 2 ml de agua de destilada y 0.2 ml de etanol al 80%. Finalmente, se recuperó  $\approx$  80% del analito si disolvía con 2 ml de agua destilada o 0.2 ml de etanol al 80%. Entonces, se realizó 30 réplicas en nivel alto y la cuantificación se realizó por duplicado. En la tabla 4.9 se menciona el intervalo de trabajo del método.

**Tabla 4.9 Rango de trabajo**

<b>Muestra</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>% Almidón resistente</b>	4.02	50.98

#### **4.3.7 Exactitud**

Se realizó el estudio por 5 días, cada día se analizó muestras con concentraciones en los niveles bajo, medio y alto. Se realizó 6 réplicas en todos los niveles. Todas las cuantificaciones se realizaron por duplicado. En la tabla 4.10 muestro el % de almidón resistente de la muestra control, % de almidón resistente obtenido en el laboratorio, % de recuperación del analito y el error porcentual, respectivamente.

**Tabla 4.10 Exactitud del método**

<b>Nivel</b>	<b>Control %AR</b>	<b>%AR</b>	<b>% R</b>	<b><math>\epsilon</math> %</b>
<b>Bajo</b>	4.90	4.94	100.79	0.79
<b>Medio</b>	44.80	44.31	98.90	1
<b>Alto</b>	63.40	53.03	83.64	16

De los datos observados se demostró que a nivel bajo se tuvo la mayor la recuperación y una mejor precisión de medición del analito que en nivel medio y alto. El nivel medio tiene una mejor recuperación y una menor inexactitud de la medida que el nivel alto. El nivel alto tiene una recuperación  $\approx 84\%$  que corresponde a una disminución porcentual de  $\approx 10$  puntos con respecto al control, equivalente a un 16% menos del analito esperado. A nivel alto, la disolución del almidón resistente, bajo las mismas condiciones del procedimiento a nivel bajo y medio, no permitió una liberación neta de la glucosa causando que la enzima AMG 3300U/ml no pueda catalizar la hidrólisis de terminales  $\alpha$ -1-4- residuos de D-glucosa unidos sucesivamente desde los extremos no reductores de malto-oligosacáridos y polisacáridos con liberación de  $\beta$ -D-glucosa. La mayoría de las formas de la enzima pueden hidrolizar rápidamente los enlaces  $\alpha$ -(1-6)-D-glucosídicos cuando el siguiente enlace en la secuencia es  $\alpha$  1,4 y algunas preparaciones de esta enzima hidrolizan enlaces glucosídicos 1,6- y  $\alpha$  -1-3-D en otros polisacáridos

#### **4.3.8 Reproducibilidad y repetibilidad**

Se realizó el ensayo usando muestra de harina de frejoles, almidón de banano estado 1 y almidón de papa que representan los niveles bajo, medio y alto, respectivamente. A nivel bajo se realizó 16 réplicas en 5 días, a nivel medio se realizó 27 réplicas en 4 días y a nivel alto se realizó 30 réplicas en 4 días. La cuantificación en todos los niveles se realizó por duplicado. Los datos aberrantes no se consideran en el análisis de resultados.

En la tabla 4.11 se muestra el análisis de varianza a un intervalo de confianza de 95% usando la ANOVA de un solo factor en que la hipótesis nula se extrae de una población con media iguales frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás. El análisis ANOVA asume una distribución normal de los datos, y homocedasticidad (homogeneidad de varianzas) La variación en las mediciones se divide en la variación entre los diferentes niveles de la variación o factor (los diferentes tratamientos) y la

variación entre individuos dentro de cada nivel. Suponiendo que las medias de los grupos son iguales, la variación entre grupos es comparable a la variación entre individuos.

**Tabla 4.11 Reproducibilidad y repetibilidad en los tres niveles**

Análisis de varianza		Nivel de % AR		
		Bajo	Medio	Alto
Suma de cuadrados	Entre grupos	0,025	2.279	3.123
	Dentro de los grupos	0,050	88.029	188.967
	Total	0,075	90.309	192.090
Promedio de los cuadrados	Entre grupos	0,006	0.760	1.041
	Dentro de los grupos	0,006	4.891	11.810
F calculado		1.138	0.155	0.088
Probabilidad		0,398	0,925	0,966
F crítico		3.633	3.160	3,239

Se proporcionó una condición variable distinta (días) conocido como tratamiento y en cada día se realizaron réplicas. Bajo la hipótesis mencionada se pudo estimar la variación dentro de las muestras (dentro de grupo) y la variación entre muestras (entre grupos) en cada nivel o tratamiento.

Según lo observado en la tabla 4.11 existe una variabilidad de los datos indicados en suma de los cuadrados mientras aumenta el % Almidón Resistente por nivel. La mayor variabilidad de los datos en cada nivel fue atribuido al error (dentro de grupos) por la discrepancia entre los datos con respecto a un modelo de estimación mientras que la menor variabilidad fue atribuida al tratamiento (días). La suma total de los cuadrados representó la suma de los cuadrados de los factores como de la aleatoriedad o error.

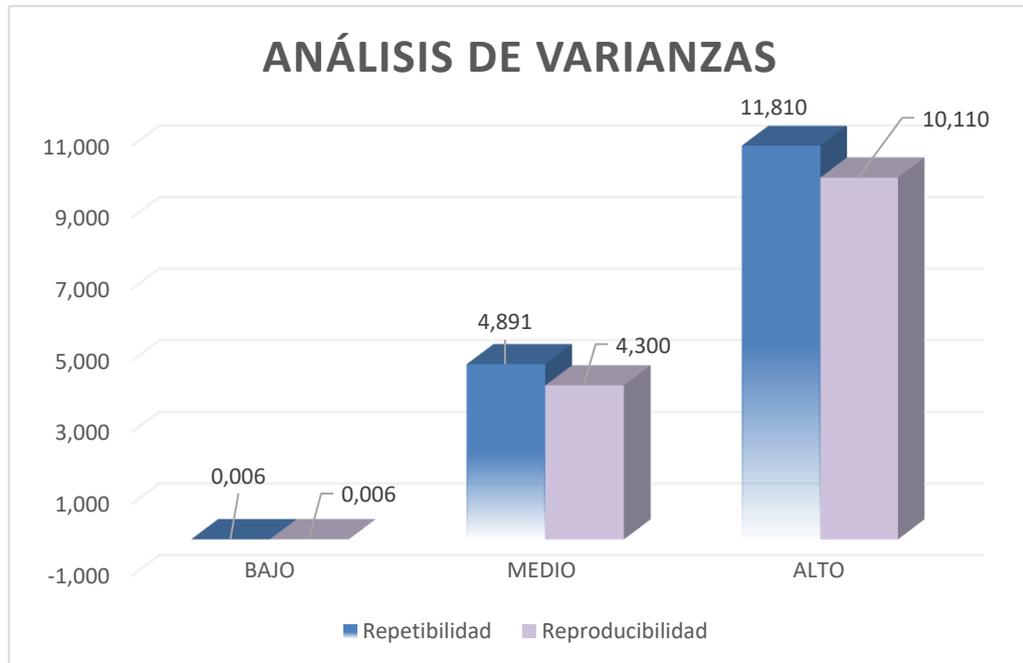
Los promedios de los cuadrados entre grupos representaron la variación entre las medias de las muestras (días), pero los promedios de los cuadrados dentro de grupo representaron la variación dentro de las muestras; al convertir las sumas cuadráticas entre los grados de libertad de cada grupo. La mayor variación o mayor dispersión con respecto a la medida general de las observaciones se encontró mayor a nivel medio y alto siendo ambos mayores dentro de los grupos que entre grupos (días); excepto a nivel bajo que la dispersión entre la medida general y entre días son las mismas

En el análisis de varianza ANOVA de un factor se usó la prueba F (F calculado) para evaluar estadísticamente la igualdad de las medias de los grupos con respecto a F crítico (tabla). La prueba F es la proporción de los promedios de los cuadrados entre grupos y dentro de grupos. Todos los datos de la prueba F en los tres niveles son menores que F crítico es decir que realmente los datos provienen de un mismo grupo de mediciones, esto es, que la media es similar. También el valor p en todos los niveles es mayor que un nivel de significancia 0.05, es decir que las diferencias entre las medias no son estadísticamente significativas porque no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis de que las medias de población son todas iguales debido a que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de AR entre un nivel de día y otro día, con un nivel del 95,0% de confianza.

La figura 4.4 mostró la dispersión de las variaciones debido al error causado por dispositivos de medición usando el mismo sistema de medición bajo las mismas condiciones (repetibilidad) y la variación causada por el sistema de medición cuando se mide las mismas prueba repetidas veces usando el mismo

sistema bajo las mismas condiciones en diferentes días (reproducibilidad).

**Figura 4.4 Varianza en tres niveles**



La varianza de repetibilidad corresponde a los promedios de los cuadrados dentro de los grupos, pero la varianza de reproducibilidad corresponde a la suma de cuadrados total entre los grados de libertad totales. Las condiciones de repetibilidad se realizaron bajo el mismo procedimiento de medición, analista, instrumento de medición, mismo laboratorio mientras que las condiciones de reproducibilidad se realizaron modificando el tiempo del ensayo, pero manteniendo las demás condiciones. En el nivel bajo son iguales las varianzas y en los niveles medio como alto se tuvo ligeramente mayor variabilidad en repetibilidad con respecto a la reproducibilidad, es decir que la variable de los datos en el grupo es apenas mayor que entre grupo.

El método normalizado AOAC Official Method 2002.02 Resistant Starch in Starch and Plant Materials contiene resultados de estudio entre laboratorios. La tabla 4.12 reveló que a mayor nivel entonces mayor dispersión de datos en r y R, es decir que la precisión de la media de los resultados es mejor en el nivel bajo debido a que los datos están menos dispersos con respecto a su media.

En el nivel medio, la variación de datos con respecto a la media entre laboratorios y con laboratorios es menor que el nivel alto. La dispersión de los datos del laboratorio con respecto al estudio indicado en el método AOAC es mayor en repetibilidad a nivel medio como alto y reproducibilidad a nivel alto.

**Tabla 4.12 Evaluación de desempeño del método en el laboratorio por nivel**

	Nivel de % AR		
	Bajo	Medio	Alto
%RSD r	1.85 (2.42)	5,03 (3.18)	6.55 (4.20)
%RSD R	1.89 (4.58)	4.71 (8.47)	6.06 (5.94)

( ) RSD % de estudio entre laboratorios publicados en la norma AOAC 2002.02

Las variaciones de repetibilidad son mayores cuando los instrumentos de medición no están funcionando adecuadamente, la ubicación del ensayo necesita ser mejorado o existe una variabilidad excesiva en ambas. Sin embargo, la reproducibilidad es mayormente causada por el operario como también el no mantener las mismas condiciones de ambiente, ruidos, entre otros o el instrumento de medición presenta deriva.

#### 4.3.9 Robustez

Se modificó 7 sucesos del protocolo normal manteniendo el resto de las condiciones normales. Se realizó la determinación del % AR en el nivel medio por cinco veces las variables 1 al 3, 5 al 7 y por cuatro veces la variable 4. Finalmente, la cuantificación por duplicado. En la tabla 4.13 se muestra el promedio ( $\bar{X}$ ), desviación estándar (STD), varianza ( $\sigma^2$ ), sesgo de medición ( $\bar{y}$ ) porcentaje de recuperación (%R) de la variable.

**Tabla 4.13 Prueba de Robustez a nivel medio**

<b>VARIABLES</b>	$\bar{X}$	STD	$\sigma^2$	<b>Control de referencia %AR</b>	$\bar{y}$	<b>% R</b>
1	47.84	1.92	3.68	48.30	0.46	99.03
2	48.21	1.54	2.36	48.30	0.09	99.81
3	47.24	1.03	1.07	48.30	1.06	97.80
4	45.85	1.90	3.60	48.30	2.45	94.93
5	38.68	1.83	3.36	44.00	5.32	87.90
6	34.30	1.89	3.52	44.00	9.68	78.00
7	35.91	1.04	1.04	44.00	8.09	81.62

1: 1.5 ml de solución KOH 2 M

2: Baño Seco digital 50 C \* 30 minutos a 200 rpm

3: 80 mg de muestra

4: 3 ml de la solución enzimática amilasa-AMG 300 U/ml

5: 0.3 gramos de amilasa en 80 ml de buffer pH 6

6: 16.5 horas de incubación a 37°C para solubilizar el almidón

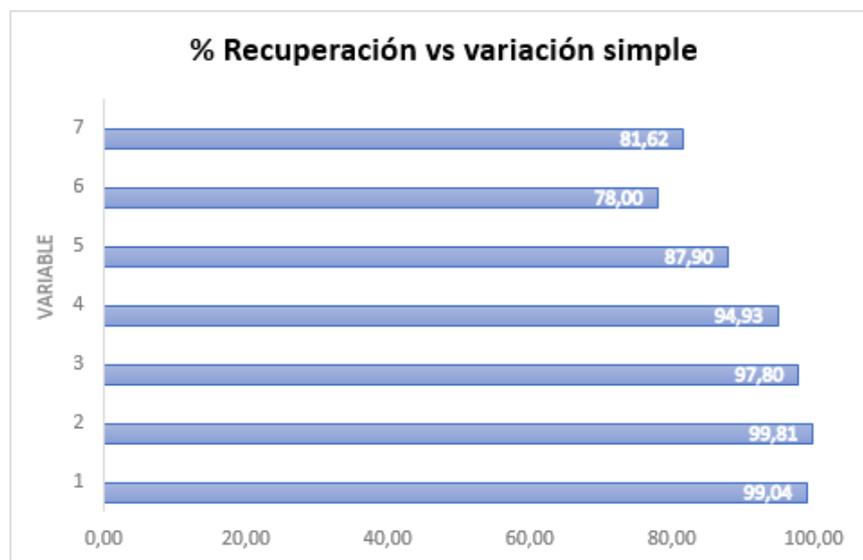
7: Incubar a 48 C con AMG 3000 U/ ml por 30 minutos

Se realizó modificaciones deliberadas en las variables que tendría el efecto más significativo; si uso un equipo alterno, disminuyo el volumen de reactivo, de buffer y muestra, aumento el tiempo o reduzco la temperatura de incubación.

La figura 4.5 comparó de manera rápida siete variaciones sencillas, el cual mostró una mayor recuperación de la muestra control usando un baño seco – agitación, pero una menor recuperación si aumento 0.5 horas de incubación en la etapa de solubilización. La segunda variable que obtuvo mejor recuperación fue reduciendo 0.5 ml de Hidróxido de Potasio 2M en la etapa inicial del ensayo para obtener el almidón resistente. Seguidamente, si reduzco 20 mg de almidón evidenció que tengo obtengo sesgo que, si aumento la concentración de la solución enzimática amilasa-amiloglucosidasa, aumento 0.5 horas de

incubación inicial y disminuyo 2 grados en la etapa de disolución del almidón resistente. Por último, si extraigo y cuantifico mi muestra aumentando 0.5 horas de incubación en la solubilización del almidón y reduciendo 2 C la incubación de la enzima madre AMG 3000 U/ml, la proporción recuperada es 78.0 % y 81.62%, respectivamente.

**Figura 4.5 Comparación de siete modificaciones sencillas en el método.**



La prueba F evaluó las desviaciones en la condición inicial y bajo condiciones experimentales sobre la precisión de la medición a un nivel de significancia de 0.05 con un nivel de confianza 95%. La prueba de hipótesis es:

- Hipótesis nula,  $H_0 = \sigma^2A$
- Hipótesis alterna,  $H_1 \neq \sigma^2A$

La tabla 4.14 se muestra las varianzas del método estándar-nivel medio ( $\sigma^2A$ ), modificado-nivel medio ( $\sigma^2B$ ), grado de libertad del numerador ( $v_1$ ), grado de libertad del denominador ( $v_2$ ), t número de tratamiento y n número de muestras.

**Tabla 4.14 Prueba F en término de dispersión**

Variables	$\sigma^2A$	$\sigma^2B$	v1 (t-1)	v2 (n-t)	F cal	F tabla
1	4.24	3.68	2	25	1.87	5.69
2		0.010		25	1.00	
3		1.07		25	1.25	
4		3.60		24	1.85	5.72
5		3.36		25	1.79	5.69
6		3.52		25	1.83	
7		1.04		25	1.24	

La prueba F evaluó si existe dependencia entre método estándar y modificado en una sola variable, es decir, si las proporciones de una variable son diferentes en función del valor de la otra variable. El resultado estadístico F, en todos los resultados, es menor que el F crítico, por lo tanto, no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula. El proceso puede ser considerado como robusto, sin embargo, las variables # 3 hasta # 7 son escenarios a controlar para no afectar la calidad del ensayo.

#### 4.4 Incertidumbre de medida

La definición del mensurando para encontrar el porcentaje de almidón resistente de una muestra vegetal es:

##### **Muestras que contienen > 10% RS (% “as is”, en peso seco)**

$$\text{Almidón resistente (g/100 g muestra)} = \Delta A \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = \Delta A \times F/W \times 90$$

##### **Muestras que contienen < 10% RS (% “as is”, en peso seco)**

$$\text{Almidón resistente (g/100 g muestra)} = \Delta A \times F \times 10.3/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = \Delta A \times F/W \times 9.27$$

En este caso, el almidón resistente es el mensurando y la absorbancia, masa, volumen, reactivo y humedad son las magnitudes de entrada.

Las causas de incertidumbres del método se describen en el diagrama de Ishikawa como muestra el Anexo C, punto 11.

La incertidumbre del método se determinó por medio de dos tipos: A y B. La incertidumbre tipo A se midió por medio del análisis de varianza (ANOVA) del estudio de precisión en cada nivel, que es la suma de las desviaciones estándares de entre y dentro de los grupos. También, el método de los mínimos cuadrados que es útil para evaluar las incertidumbres procedentes de variaciones aleatorias, a corto y a largo plazo, de los resultados de patrones de referencia de valor conocido en todos los niveles. La incertidumbre tipo B con distribución normal, rectangular y triangular a partir de certificados de calibración, tolerancia de medidas de material de vidrio, resolución de equipos y pureza del reactivo. Luego, se aplica la ley de propagación de errores de las incertidumbres y finalmente, por un factor de cobertura  $k=2$  para un intervalo de confianza de 95.5% para obtener la incertidumbre expandida. La tabla 4.15 muestra el resultado de la estimación de las incertidumbres en los niveles ajo, medio y alto.

**Tabla 4.15 Incertidumbres del método en tres niveles de estudio**

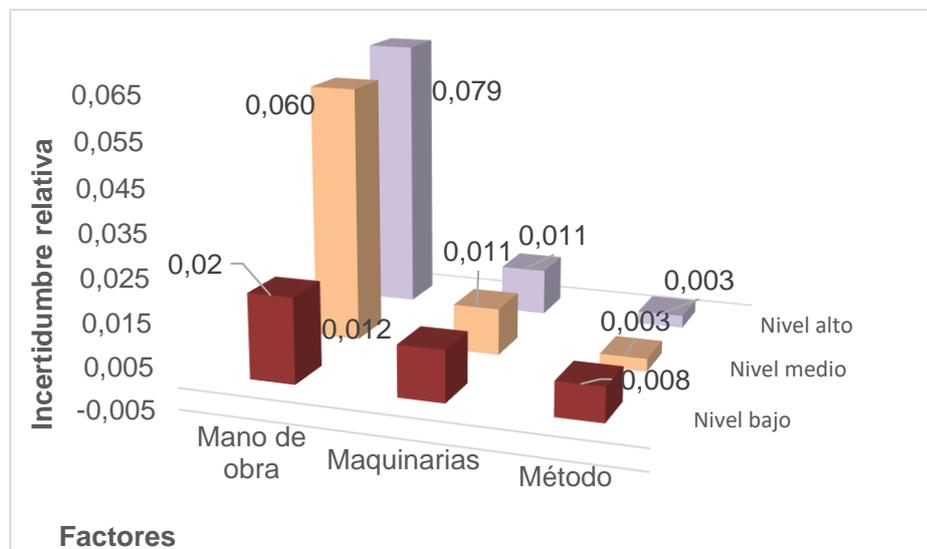
	<b>Factor</b>	<b>Nivel bajo</b>	<b>Nivel medio</b>	<b>Nivel alto</b>
<b>(Incertidumbre relativa-<math>U_p/x_i</math>)</b>	Mano de obra	0.020	0.060	0.079
	Maquinarias	0.012	0.011	0.011
	Método	0.008	0.003	0.003
<b>Incertidumbre combinada C (1)</b>		0.025	0.060	0.061
<b>% AR (2)</b>		4.020	43.98	52.49

<b>Incertidumbre C * %AR (1*2)</b>	0.10	2.69	4.21
<b>Incertidumbre expandida</b>	0.20	5.38	8.42

El parámetro asociado al resultado de la medida atribuido al mensurando es  $4.02 \pm 0.20$  %AR,  $43.98 \pm 5.38$  %AR y  $52.49 \pm 8.42$  %AR en los niveles bajo, medio y alto, respectivamente.

En la figura 4.6 se muestra los aspectos que influyen en el resultado de una medida en los tres niveles de estudio. Es decir, el factor que está contribuyendo en la duda del valor verdadero de la medición a los niveles bajo, medio y alto siendo la mano de obra, en especial nivel medio y alto, el de mayor factor que refleja la imposibilidad de conocer exactamente el valor del mensurando.

**Figura 4.6 Factores vs incertidumbre**



## 4.5 Resumen del desempeño

A continuación, se informa el cuadro de resultados en función de los objetivos de validación y su evaluación final. En el anexo C encontrará el informe de la validación.

**Tabla 4.16 Resultados del método en función de objetivos**

<b>Parámetro de desempeño</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusión</b>
<b>Selectividad</b>	t <sub>cal</sub> > t crítico entonces hay diferencia significativa a un nivel de confianza de 95%	t <sub>cal</sub> : 58,57 t <sub>crítico</sub> :1.86	Cumple
<b>Límite de Detección</b>	%AR: 1 y R min 50%	%AR: 2.98, R: 60.87%	No cumple
<b>Límite de cuantificación</b>	%AR: 2 y R min 70%	%AR: 4.02, R: 83.44%	No cumple
<b>Linealidad</b>	R <sup>2</sup> ≥ 0.991	R <sup>2</sup> =0.9983	Cumple
<b>Intervalo de trabajo</b>	2 % - 64 % AR R min 70%	4.02% - 50.98 %AR	No cumple
<b>Exactitud</b>	98-101 %	Nivel bajo: 100.79% Nivel medio: 98.90% Nivel alto: 83.64%	Cumple Cumple No cumple
<b>Repetibilidad</b>	<b>Nivel bajo</b>		
	% RSDr: máx 2.42 %	% RSDr: 1.85%	Cumple
	<b>Nivel medio</b>		
	% RSDr: máx 3.18 %	% RSDr: 5.03 %	No cumple

	<b>Nivel medio</b>		
	% RSDr: máx 4.20 %	% RSDr: 6.55 %	No cumple
<b>Reproducibilidad</b>	<b>Nivel bajo</b>		
	% RSDr: máx 4.58%	% RSDr: 1.89%	Cumple
	<b>Nivel medio</b>		
	% RSDr: máx 8.47%	% RSDr: 4.71%	Cumple
	<b>Nivel alto</b>		
	% RSDr: máx 5.94%	% RSDr: 6.06%	No cumple
<b>Robustez</b>	<b>Prueba F</b>  Si $F_{cal} \leq F$ entonces el proceso puede ser considerado robusto.	1.- $F_{cal}= 1.79, F= 5.69$ 2.- $F_{cal}= 1.51, F= 5.69$ 3.- $F_{cal}= 1.23, F= 5.69$ 4.- $F_{cal}: 1.77, F= 5.72$ 5.- $F_{cal}= 1.72, F= 5.69$ 6.- $F_{cal}= 1.77, F= 5.69$ 7.- $F_{cal}= 1.17, F= 5.69$	Cumple

#### 4.6. Declaración del método

En base a los resultados obtenidos se declara como método apto para su uso con los siguientes parámetros. En el anexo D encontrará las imágenes de las materias primas, material de referencia y del procedimiento en general.

**Tabla 4.17 Resultados aptos para el ensayo**

<b>Parámetro de desempeño</b>	<b>Apto</b>		
Límite de Detección	%AR: 2.98		
Límite de cuantificación	%AR: 4.02		
Linealidad	R <sup>2</sup> =0.9983		
Intervalo de trabajo	4.02% - 50.98 %AR		
Exactitud	Nivel bajo: 100.79% Nivel medio: 98.90% Nivel alto: 83.64%		
Repetibilidad	Bajo RSDr: 1.85%	Medio RSDr: 5.03%	Alto RSDr: 6.55%
Reproducibilidad	Bajo RSDR 1.89%	Medio RSDR 4.71%	Alto RSDr: 6.06%

## 4.7 Aseguramiento de la calidad de los resultados

Los ensayos a ejecutar para mantener la calidad de la prueba serán evaluados con los parámetros de control mencionados a continuación en la tabla 4.18

**Tabla 4.18 Validez de los resultados**

<b>Controles internos de calidad</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Estadística</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Pruebas funcionales de todos los equipos/instrumentos de medición	Antes de cada ensayo	N/A	Cumple los requisitos técnicos del equipo
Blanco muestra	Inicio de cada lote de ensayo	Media STD	0.317 ± 0.048 %RS
Material de referencia certificado	Inicio de cada lote de ensayo	%R	Nivel bajo, medio y alto medio: % R 98-101%
Análisis de duplicado.	Muestra de rutina a cada ensayo	Precisión	Nivel bajo: RSDr max 1.87% Nivel medio: RSDr max 5.03% Nivel alto: RSDr max 6.55%

# CAPÍTULO 5

## CONCLUSIONES

La exactitud del método se comprobó con materiales de referencia de almidón de frejol rojo, almidón de maíz con alto contenido de amilosa y almidón de papa correspondientes a los niveles bajo (b), medio (m), y alto (a) respectivamente. La exactitud cumple en nivel b con una recuperación de 100.79% y nivel m de 98.90 %. La recuperación del analito en el nivel a fue 82.79% debido a que no se pudo disolver el almidón resistente del pellet por lo tanto afectó la exactitud del método.

En base a los objetivos de validación, el método cumple en selectividad, linealidad, exactitud (nivel bajo, nivel medio), repetibilidad (nivel bajo), reproducibilidad (nivel bajo y medio) y robustez.

En las muestras seleccionadas, harina de frejol, almidón de banano estado 1 y harina de papa, es apto el método determinar el porcentaje de almidón resistente (%AR) en los siguientes parámetros: LD:  $2.98 \pm 0.21$  %AR, LC:  $4.02 \pm 0.08$  %AR, linealidad:  $R^2 \geq 0.9983$ , intervalo de trabajo (AR): 4.02% – 50.98 %AR, exactitud: b: 100.79%, m: 98.90%, a: 83.64%, repetibilidad (RSDr%): b: 1.85%, m: 5.03%, a: 6.55% y reproducibilidad (RSDR%): b: 1.89%, m: 4.71%, a: 6.06%.

La metodología a nivel alto requiere un análisis bibliográfico para definir los pasos en el ensayo con el fin de disolver el almidón resistente y alcanzar así el objetivo de validación propuesto bajo la norma AOAC 2000.

Los valores de dispersión en nivel medio y alto fue causado por la falta de entrenamiento y el factor tiempo de la persona para realizar la metodología siendo estas, las condiciones que originan la variabilidad en los datos.

## **RECOMENDACIONES**

- I. Realizar un estudio de deriva con un histórico de calibraciones con el fin de conocer el error de medida y así poder aplicar la corrección, si fuese necesario.
- II. Asegurar que la centrifugación en la etapa de solubilización del almidón retenga la mayor cantidad de la muestra para evitar recuperación baja del analito.
- III. Entrenar al menos a dos personas para que realicen la validación del método.

# REFERENCIAS

- [1] P. Villarroel Heise, C. Gómez, C. Vera, and J. Torres, "Resistant starch: Technological characteristics and physiological interests," *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 45, no. 3, pp. 271–278, 2018, doi: 10.4067/s0717-75182018000400271.
- [2] M. Thompson, S. L. R. Ellison, and R. Wood, "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, no. 5, pp. 835–855, 2002, doi: 10.1351/pac200274050835.
- [3] INEN/ISO, "Ecuatoriana Nte Inen-Iso / Iec 17025," p. 33, 2018.
- [4] I. Work *et al.*, "Ap pen dix D : Guide lines for Col lab o ra tive Study Pro ce dures To Val i date Char ac ter is tics of a Method of Anal y sis," *Main*, 2005.
- [5] S. Dagron, "Die International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)," *Handb. Ethik und R. der Forsch. am Menschen*, pp. 541–545, 2014, doi: 10.1007/978-3-642-35099-3\_86.
- [6] United States Pharmacopeial Convention., "VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES Test," *United States Pharmacopeial Conv.*, vol. 1, p. 3445, 2007.
- [7] M. D. Cookson and P. M. R. Stirk, *Practice statistical*. 2019.
- [8] Federico Castellucci, "RECOMENDACIONES ARMONIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS EN UN SOLO LABORATORIO (informe técnico)," *Dir. -General la OIV*, pp. 1–32, 2005.
- [9] I. Larretxi *et al.*, "Effect of analytically measured fiber and resistant starch from gluten-free products on the diets of individuals with celiac disease," *Nutrition*, vol. 70, 2020, doi: 10.1016/j.nut.2019.110586.
- [10] V. Barwick, P. Morillas, S. L. R. Ellison, J. Engman, and E. Gjengedal, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics Second Edition*, vol. 379, no. 2–3. 1999.
- [11] M. Thompson' and R. Wood2, "Resulting from the Symposium on Harmonization of Internal Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories," *Pure Appl. Chem*, vol. 67, no. 4, pp. 22–23, 1995.
- [12] M. Achparaki *et al.*, "We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %," *Intech*, p. 13, 2012, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA00172J%0Ahttps://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>.
- [13] D. L. Topping and P. M. Clifton, "Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides," *Physiol. Rev.*, vol. 81, no. 3, pp. 1031–1064, 2001, doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1031.
- [14] J. Aristizábal and T. Sánchez, "Aristizábal, J., & Sánchez, T. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Fao, 163, 134.

- <https://doi.org/9253056770-9789253056774>écnica para producción y análisis de almidón de yuca,” *Fao*, vol. 163, p. 134, 2007, [Online]. Available: <http://www.fao.org/3/a-a1028s.pdf>.
- [15] A. S. Aldana, E. R. Sandoval, and A. F. Quintero, “Aplicación Del Análisis Por Calorimetría Diferencial De Barrido (Dsc) Para La Caracterización De Las Modificaciones Del Almidón a,” *Año*, vol. 72, pp. 45–53, 2005, [Online]. Available: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v72n146/a04v72n146.pdf>.
- [16] I. L. Brown, “Applications and uses of resistant starch,” *J. AOAC Int.*, vol. 87, no. 3, pp. 727–732, 2004, doi: 10.1093/jaoac/87.3.727.
- [17] A. P. Nugent, “Health properties of resistant starch,” *Nutr. Bull.*, vol. 30, no. 1, pp. 27–54, 2005, doi: 10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x.
- [18] A. Bojarczuk, S. Skąpska, A. Mousavi Khaneghah, and K. Marszałek, “Health benefits of resistant starch: A review of the literature,” *J. Funct. Foods*, vol. 93, no. May, 2022, doi: 10.1016/j.jff.2022.105094.
- [19] F. Raposo and C. Ibelli-Bianco, “Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 129, p. 115913, 2020, doi: 10.1016/j.trac.2020.115913.
- [20] P. Héctor Araya *et al.*, *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos em nutrición*. 1997.
- [21] J. Westgard *et al.*, “Cómo garantizar la calidad analítica,” *Rev Mex Patol Clín*, vol. 57, no. 4, pp. 179–189, 2010.
- [22] J. Westgard and G. Migliarino, *Sistemas de gestión de la calidad para el laboratorio clínico*, vol. 2, no. 0. 2014.
- [23] Organización Panamericana de la Salud, “Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos.,” 2010. [Online]. Available: <file:///C:/Users/DOCENTE/Downloads/Espanol-control-calidad-laboratorios-farmaceuticos.pdf>.
- [24] J. O. Westgard and S. A. Westgard, *Basic Quality Management Systems*. .
- [25] J. W. Robinson, E. M. Skelly F, and G. M. Frame II, *Instrumental Analytical Chemistry An Introduction*. 2021.
- [26] I. S. O. Guide, “GUIDE 33 Materials the Standard preview,” 2000.
- [27] T. Verbić, Z. Dorkó, and G. Horvai, “Selectivity in analytical chemistry,” *Rev. Roum. Chim.*, vol. 58, no. 7–8, pp. 569–575, 2013.
- [28] D. C. Harris, “Análisis Químico Cuantitativo 3a Edición (Sexta Edición Original),” *Editor. Reverté, S.a.*, pp. 419–451, 2003, [Online]. Available: <https://drive.google.com/file/d/1xbID4QvwwwMURlpWaFKkAU2FSEwynnoe/view?ts=5f2cb311>.
- [29] A. E. Esquivel, *y sus aplicaciones Metrología*. .
- [30] M. E. S. S. KRULL, *Analytical Method Development And Validation*. .
- [31] Y. Garg, P. Sharma, and S. K. Pandey, “International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd Edition,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 58, no. 36, pp. 3493–3495, 2012, doi: 10.1016/j.tetlet.2017.07.069.

- [32] S. Rasul, A. M. Kajal, and A. Khan, "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements," *J. Bangladesh Acad. Sci.*, vol. 41, no. 2, pp. 145–163, 2018, doi: 10.3329/jbas.v41i2.35494.
- [33] Jaime Restrepo Díaz, "metrología aseguramiento metrológico in...pdf." .
- [34] ISO, "ISO 78-2:1999, METODOS DE ANALISIS QUÍMICO," vol. 2021, no. 261, pp. 830–835, 2002, [Online]. Available: Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.
- [35] Manuel A. Leiva-Guzmán, *Materiales de referencia y comparaciones interlaboratorios*. 2006.
- [36] H. G. Pulido and R. D. L. V. Salazar, *Control estadístico de calidad y seis SIGMA*, 2da Edition, vol. 59. 2014.

# **ANEXOS**

## **ANEXO A**

**Origen de los métodos oficiales AOAC 2022.02 y AACC  
32.40-01**

**Método de Englyst et al. (1982):** Este método fue el primer procedimiento para determinar AR.

- Homogenizar y ebulir la muestra.
- Agregar a la muestra, las enzimas  $\alpha$ -amilasa, pululanasa y amiloglicosidasa por un tiempo de 16 h a 40 °C.
- El almidón no hidrolizado (AR) es precipitado con etanol absoluto y el residuo (pellet) lavado con etanol (EOH) 80 %.
- Secar el pellet con acetona y luego se solubiliza con hidróxido de potasio (KOH) a temperatura ambiente.
- Tomar una alícuota de almidón solubilizado e hidrolizar con la enzima amiloglicosidasa en presencia de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) a 65 °C por un tiempo de 1 h.
- Enfriar, centrifugar y determinar el contenido de glucosa (AR tipo 3) por cromatografía líquida-gaseosa.

**Método de Berry (1986):** El procedimiento es una modificación del método Englyst et. al 1982. En el método usa la mezcla enzimática  $\alpha$ -amilasa/pululanasa y no ocurre el calentamiento inicial a 100°C.

**Método de Englyst et al. (1992):** La base del método Englyst et al. (1982) fue modificado en el año 1992. La medición de AR comprende los AR tipo 1, 2 y 3.

- La hidrólisis enzimática se realiza a 37 °C
- Se adiciona goma guar para aumentar la viscosidad del medio, perlas de vidrio para un eficiente mezclado; además lograr una ruptura de células durante la digestión y emplear un movimiento longitudinal para imitar el movimiento peristáltico del intestino.
- Se empleó una mezcla de pancreatina, amiloglicosidasa e invertasa (digestión)

**Método de Muir and O'Dea (1992):** El procedimiento desarrollado fue

- Triturar las muestras (masticadas)
- Agregar pepsina y luego una mezcla de  $\alpha$ -amilasa pancreática y amiloglucosidasa (AMG) con agitación a pH 5,0 y 37°C en agitación durante 15 h.
- Recuperar el pellet con tampón de acetato por centrifugación.
- RS es digerido por una combinación de calor, dimetilsulfóxido DMSO y tratamientos termoestables de  $\alpha$ -amilasa

**Método de Goñi et al. (1996):** Este método parte de modificaciones propuestos por Englyst et al. (1992) y Berry (1986). Se determina solo el AR tipo 2 de alimentos crudos (temperatura máxima 40 °C) y AR tipo 3.

- pH 1.5 para simular el pH gástrico
- Enzima pepsina por 1 hora y 40 °C para retirar las proteínas
- pH a 6,9 para lograr condiciones parecidas al intestino delgado
- Hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa pancreática a 37 °C durante 16 h para emular el tiempo de tránsito en el intestino delgado
- Ensayo colorimétrico para cuantificar glucosa.

**Los métodos de Faisant et al. (1995), Akerberg et al. (1998), Champ (1992) y Chung et al. (2006)** son derivados ensayos analíticos a partir de los anteriores métodos con modificaciones en: concentración de enzimas, preparación de muestras, el pH, el agregado o no de etanol luego del paso de incubación de la enzima  $\alpha$ -amilasa (Perera et al., 2010).

## **ANEXO B**

**MÉTODO DE ENSAYO: DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN  
RESISTENTE EN MATRICES VEGETALES - MÉTODO  
OFICIAL AOAC-**

**Advertencia:** Las personas que utilicen el laboratorio deben estar familiarizadas con las normas generales de seguridad. Los pictogramas de los reactivos muestran los peligros y advertencias que deben ser considerados antes de aplicarlo. Es total responsabilidad del usuario, el establecimiento de una apropiada seguridad y prácticas de salud. A su vez, de garantizar la conformidad con las condiciones de cualquier reglamento nacional.

**OBJETIVO:** Determinar el contenido de almidón resistente en almidones y material vegetal expresado como RS g/100 g

**ALCANCE:**

- Tipo de muestra: Vegetal
- Matriz: Almidón de frejoles rojos, almidón de banano estado 1 y almidón de papa
- Analito: Almidón resistente
- Unidades: Porcentaje
- Técnica analítica: Espectrofotómetro en región visible

**RANGO O INTERVALO DE TRABAJO:** El método permite determinar el parámetro AR en el rango 4% - 58%

**MÉTODO DE REFERENCIA:** AOAC Método Oficial 2002.02. Resistant Starch in Starch and Plant Materials

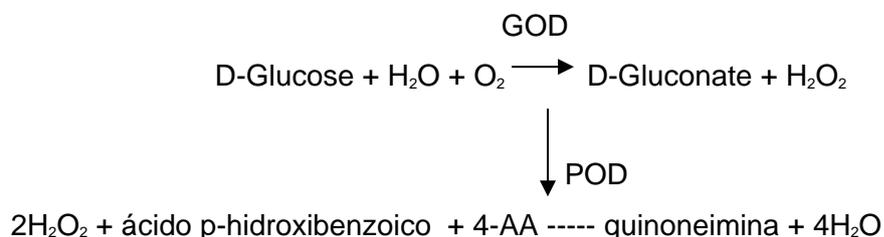
**PRINCIPIO [38]:**

El almidón no resistente es solubilizado e hidrolizado a glucosa por acción de las enzimas  $\alpha$ -amilasa pancreática y amiloglicosidasa (AMG) por un tiempo de 16 horas a temperatura de 37 °C en baño de agua con agitación constante. La reacción finaliza al momento de agregar etanol acuoso o alcoholes metílicos industriales (IMS) y luego de algunos enjuagues con etanol acuoso o IMS (50% v/v) para obtener el almidón resistente (RS) como un sedimento (pellet) por medio de la centrifugación. El RS se disuelve en KOH 2 M agitando de manera vigorosa en un baño de hielo con barras

magnéticas. Después de un tiempo, la solución se neutraliza con tampón de acetato 1.2 M pH 3.8 y el almidón se hidroliza cuantitativamente a glucosa en presencia de AMG. La glucosa se mide con el reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (GOPOD) y esta medida, aplicado fórmula, es el contenido de RS de la muestra.

## REACCIONES:

- 1. GOPOD [Glucose Oxidase (E.C. 1.1.3.4) – Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)]:** El mecanismo de este ensayo detecta la glucosa mediante colorimetría por método enzimático a longitud de onda 510 nm. Se basa en la cantidad de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producido a través de la oxidación de la glucosa a D-gluconato por acción de la enzima glucosa oxidasa (GOD). A continuación, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona con ácido *p*-hidroxibenzoico (mezcla de fenol) y 4-aminoantipirina (4-AA) en presencia de la enzima peroxidasa (POD) para producir un colorante de quinoneimina con un pico absorbancia a 510 nm, el cual es proporcional a la concentración de la glucosa en la muestra. El color desarrollado es amarillo pálido, rosa débil o rosa fuerte. La reacción es la siguiente [39] [40]:



- 2. Enzima  $\alpha$ -amilasa pancreática (E.C. 3.2.1.1):** La  $\alpha$ -amilasa aislada de páncreas del porcino, de masa molar 51-54 KDa, es una glicoproteína. Es una sola cadena polipeptídica de ~475 residuos que contiene dos grupos SH, cuatro puentes disulfuro y un átomo de Ca<sup>2+</sup> estrechamente unido para la estabilidad. Además, los iones de cloruro son necesarios para mantener la actividad, la estabilidad y el rango de pH para la actividad es de 5,5 a 8,0, con un pH óptimo de 7 [41]. La  $\alpha$ -amilasa hidroliza los enlaces internos  $\alpha$ -(1,4) D-glucosídicos en polisacáridos de tres o más unidades de D-glucosa unidas con  $\alpha$ -(1,4). Los sustratos naturales como el almidón y el glucógeno se descomponen en glucosa y maltosa [41].

**3. Enzima amiloglucosidasa (E.C. 3.2.1.3):** La amiloglucosidasa cataliza la hidrólisis de terminales  $\alpha$ -(1-4)-residuos de D-glucosa unidos sucesivamente desde los extremos no reductores de malto oligosacáridos y polisacáridos con liberación de  $\beta$ -D-glucosa. Una unidad liberará 1,0 mg de glucosa del almidón en 3 min a pH 4,5 y temperatura 55 °C [41]. La mayoría de las formas de la enzima pueden hidrolizar rápidamente los enlaces  $\alpha$ -(1-6) - D glucosídicos cuando el siguiente enlace en la secuencia es  $\alpha$  1,4 - D glucosídico y además, algunas preparaciones de esta enzima hidrolizan enlaces 1,6- y  $\alpha$  (1-3) - D glucosídicos en otros polisacáridos. Es decir que, las amiloglucosidasas son capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -D-(1-4),  $\alpha$ -D-(1-6) y  $\alpha$ -D-(1-3) de los oligosacáridos [41].

## REACTIVOS Y MATERIALES:

Durante el ensayo, solamente utilice reactivos de grado analítico reconocidos y agua destilada para la preparación de soluciones de trabajo. Los materiales de trabajo deben estar libre de polvo y en caso de que requiera, previamente ser enjuagados con agua destilada.

### ○ Reactivos

Ácido maleico Reagent Plus. Pureza: $\geq 99\%$ (HPLC)
Hidróxido de Sodio. Pureza: $\geq 99\%$
Cloruro de Calcio Dihidratado. Pureza: 99.0 to 105.0 %
Azida de sodio Reagent Plus. Pureza: $\geq 99.5\%$
Ácido acético glacial. Pureza: $\geq 99.8\%$
Glicerol Anhidro. Pureza: Min 99.5%
Etanol. Pureza: Min 99.9%
GOPOD Reagent buffer pH 7.4

- **Enzimas**

Amilase Porcine Pancreas. Specific activity: $\geq 5$ units/mg solid
Amyloglucosidase from Rhizopus sp. Specific activity: $\geq 40,000$ units/g solid
GOPOD reagent enzymes

- **Material de referencia**

High amylose maize starch	44.8 %
Native Potato Starch	63.4 %
Kidney Beans	4.9%
Actistar	48.3 %
Resistant Starch	44.0%
Glucosa Standard 1 mg/ml	Pureza: Min 99.9%

- **Soluciones volumétricas normal**

Buffer de Maleato de Sodio 100 mM, pH 6.0: Pesar 23,2 g de ácido maleico en 1600 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6,0 con hidróxido de sodio 4 M (160 g/l). Luego, agregar 0,6 g de cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y 0,4 g de azida de sodio. Disolver y ajustar el volumen a 2 L.

Tampón de acetato de sodio 1.2 M, pH 3.8: Medir 68,6 mL de ácido acético glacial (1,05 g/mL) e incorporar en 800 mL de agua destilada. Ajustar a pH 3,8 usando hidróxido de sodio 4 M. Llevar a volumen de 1 L con agua destilada.

**Tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 4.5:** Medir 5,8 mL de ácido acético glacial e incorporar en 900 mL de agua destilada. Ajustar a pH 4,5 usando hidróxido de sodio 4 M. Llevar a volumen a

1 L con agua destilada

○ **Otras soluciones**

Solución de hidróxido de potasio 2M: Pesar 112,2 g de KOH y agregar en 900 mL de agua desionizada y agitar hasta disolver. Se ajustó el volumen a 1 L.

Etanol acuoso (aprox. 50% v/v): Medir 500 ml de etanol y agregar 500 ml de agua destilada.

Stock de amiloglucosidasa (3300 U/ml): Pesar 1.6734 g de Amyloglucosidase 40000 U/g y se diluyó en 25 ml de agua destilada. Se agitó suavemente y se agregó 25 ml de Glicerol. La solución es viscosa

AMG diluido (300 U/mL): Diluir 2 mL de stock AMG en 22 mL con sodio 100mM tampón de maleato (0,1 M, pH 6,0).

Solución fresca de  $\alpha$ -amilasa pancreática (10 mg, 30 U/mL) que contiene AMG (3 U/mL): En fresco, pesar 0.3 g de  $\alpha$ -amilasa pancreática 10 Unit/mg solid y aforar hasta 100 mL de sodio tampón de maleato (100 mM, pH 6,0). Agitar durante 5 minutos y agregar 1.0 mL de AMG diluido (300 U/mL). Se centrifugó a 5000 xg durante 10 min y se decantó cuidadosamente la solución sobrenadante.

**Reactivo de GOPOD**

Tampón reactivo GOPOD: Se diluyó el contenido del frasco GOPOD REAGENT BUFFER en 1 litro de agua destilada.

Enzima reactivo GOPOD: Se añadió 10 ml del paso anterior al frasco GOPOD REAGENT ENZYMES. Agitar suavemente. Luego, se agregó 10 ml adicionales al frasco, otra vez. Agitar suavemente y transferir a la botella de volumen 1 litro. Cubrir esta botella con aluminio papel de aluminio para proteger el reactivo de la luz.

## EQUIPAMIENTO:

Los equipos e instrumentos volumétricos deben ser acondicionados antes de su uso. Seguir las recomendaciones técnicas descrita en los manuales.

### ○ Equipos

Espectrofotómetro: $\lambda$ : 510 nm, resolución: 0.0001 OD
Balanza analítica: Max 220 g, legibilidad: 0.1 mg
pH metro: pH 0 – 14, legibilidad: 0.001.
Vortex Analógico
Plato de agitación magnético
Centrífuga: 5500 rpm, temperatura ambiente, rotor de capacidad 50 ml
Termomixer: Temperatura: 50 °C, legibilidad: 0.1 C., velocidad: 200 rpm
Medidor de Humedad: Masa: 5 gramos, legibilidad: 0.001 g, temperatura: 130 °C, legibilidad: 1° C
Baño María con agitación: 37°C y 50°C, legibilidad: 0.1 C. Rpm: 100 rpm. Legibilidad: 10 rpm,
Refrigerador-Congelador: 6 °C y -20 °C
Equipo de agua: Conductividad: 10-15 M $\Omega$ /cm

### ○ Instrumentos de medición

Cronómetro: 9 h 59 min 59,99 s. Escala: 0.01
Termohigrómetro A: -20 C – 10 C. Escala 1°C
Termohigrómetro B: 37 y 50 °C. Escala 1 °C
Micropipeta monocal variable 0.5-10 ul. Legibilidad: 0.01 $\mu$ l
Micropipeta monocal variable 10-100 ul. Legibilidad: 0.1 $\mu$ l
Micropipeta monocal variable 100-1000 ul. Legibilidad: 2 $\mu$ l
Micropipeta monocal variable 1000-10000 ul. Legibilidad: 10 $\mu$ l

Micropipeta multicanal variable 30-300 ul. Legibilidad: 0.2  $\mu$ l

○ **Materiales volumétricos**

Matraz 100 ml	Clase A, Tolerancia: $\pm$ 0.1 ml
Matraz 200 ml	Clase A, Tolerancia: $\pm$ 0.15 ml
Matraz 1000 ml	Clase A, Tolerancia: $\pm$ 0.4 ml
Matraz 2000 ml	Clase A, Tolerancia: $\pm$ 0.6 ml

**PROCEDIMIENTO:**

**Preparación de muestras**

1. Se molió aprox. 50 g de muestra de cereal o vegetal liofilizado o producto terminado en molino por un tamiz de 0,8 mm.
2. Se transfirió todo el material a un frasco de plástico de boca ancha y mezcle bien agitando e invirtiendo. Las preparaciones industriales de almidón se suelen suministrar en forma de polvo fino, por lo que no es necesario moler.

**Proceso de análisis**

- **Hidrólisis y solubilización de almidón no resistente.**
  - a. Se pesó con precisión, una muestra de  $100 \pm 5$  mg directamente en el tubo de centrífuga 50 ml y suavemente golpee el tubo para asegurarse de que la muestra caiga al fondo.
  - b. Se agregó 4,0 mL de  $\alpha$ -amilasa pancreática (10 mg/mL) que contiene AMG (3 U/mL) a cada tubo.

- c. Se tapó herméticamente los tubos. A continuación, se mezcló en un Vortex y se adjuntó horizontalmente en un Baño de Agua con agitación, alineados en la dirección al movimiento.
  - d. Se incubó los tubos a 37°C con agitación continua (200 strokes /min) durante exactamente 16 h (Nota: Para movimiento lineal, un ajuste de 100 al Baño María equivale a 200 golpes/min; 100 adelante y 100 atrás).
  - e. Se retiró los tubos del baño de agua y se eliminó el exceso de agua superficial con una toalla de papel. Seguido, se retiró las tapas de los tubos y se trató el contenido con 4,0 mL de etanol (99% v/v) o IMS (99% v/v) con agitación vigorosa en un mezclador Vortex.
  - f. Se centrifugó los tubos a 5500 xg durante 10 min.
  - g. Se decantó con cuidado los sobrenadantes y se volvió a suspender los gránulos en 2 mL de etanol al 50% o IMS al 50% con agitación vigorosa en un mezclador Vortex. Luego, se añadió otros 6 ml de IMS al 50 % y se mezcló los tubos.
  - h. Se centrifugó de nuevo a 5.500 xg durante 10 min.
  - i. Se decantó los sobrenadantes y se repitió paso g y h, una vez más.
  - j. Se decantó con cuidado los sobrenadantes y se invirtió los tubos en papel absorbente para escurrir el exceso de líquido.
- **Medición de almidón resistente**

### **Sección I**

- e. Se añadió una barra agitadora magnética (5 x 15 mm) y 2 mL de 2 M KOH a cada tubo para volver a suspender los gránulos.
- f. Se disolvió el almidón resistente agitando durante aprox. 20 min en un baño de hielo/agua sobre un agitador magnético. No mezcle en un mezclador de vórtice ya que esto puede hacer que el almidón se emulsione, pero se aseguró que el

contenido del tubo se agite vigorosamente a medida que se agrega solución de KOH ya que evitó la formación de un bulto de material de almidón que luego será difícil de disolver. En caso de muestras mayor a 48% de AR, disolver en 2 ml de agua destilada y mezclar en un vortex, previamente a la adición de 2 M KOH mientras se mantiene en agitación con el agitador magnético por 20 minutos.

- g. Se agregó 8 ml de tampón de acetato de sodio 1,2 M (pH 3,8) a cada tubo en agitación con el agitador magnético. Luego, se añadió inmediatamente 0,1 mL de AMG y se mezcló bien usando el agitador magnético.
- h. Se colocó el tubo en un baño de agua a 50°C y se incubó los tubos durante 30 min con mezcla intermitente en un mezclador Vortex.

#### **Para muestras que contienen > 10% RS**

- d. Se transfirió cuantitativamente el contenido del tubo a un matraz volumétrico de 100 mL usando una piceta de agua. Se usó un imán externo para retener la barra agitadora en el tubo mientras se lavó la solución del tubo con agua destilada.
- e. Se ajustó a 100 mL con agua destilada y se mezcló bien.
- f. Se centrifugó una alícuota de la solución a 5500 xg durante 10 min.

#### **Para muestras que contienen < 10% RS**

- c. Se centrifugó directamente los tubos a 5500 xg durante 10 min (sin dilución).
- d. El volumen final en el tubo fue de aprox. 10,3 ml  $\pm$  0.05 ml.

#### **Sección II**

- h. Se transfirió alícuotas de 0,1 ml (por triplicado) de la solución diluida en el paso 7 o los sobrenadantes sin diluir del paso 8 en tubos de centrifuga 50 ml y se agregó 3,0 mL de reactivo GOPOD.
- i. Se preparó soluciones en blanco de reactivo mezclando 0,1 mL de 100 mM tampón de acetato de sodio (pH 4,5) y 3,0 mL de reactivo GOPOD.

- j. Se preparó estándares de D-glucosa (por cuadruplicado) mezclando 0,1 mL de D-glucosa (1 mg/mL) y 3,0 mL de reactivo GOPOD.
- k. Se incubó a 50°C durante 20 min, se enfrió y se configuró el espectrofotómetro a cero con el reactivo blanco.
- l. Se midió la absorbancia de cada solución a 510 nm frente al blanco de reactivo.
- m. Se obtuvo promedio de los duplicados.
- n. La respuesta de color con glucosa fue lineal en el rango de absorbancia 0-1.5 unidades de absorbancia

## CÁLCULOS

**Muestras que contienen > 10% RS** (% “as is”, en peso seco)

$$\text{Almidón resistente (g/100 g muestra)} = \Delta A \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = \Delta A \times F/W \times 90$$

**Muestras que contienen < 10% RS** (% “as is”, en peso seco)

$$\text{Almidón resistente (g/100 g muestra)} = \Delta A \times F \times 10.3/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = \Delta A \times F/W \times 9.27$$

Donde:

**$\Delta A$**  = absorbancia (reacción) leída frente al blanco de reactivo.

**F** = 100 (µg de D-glucosa) dividido por la absorbancia GOPOD para este 100 µg de D-glucosa. Es la conversión de absorbancia a microgramos (la absorbancia obtenida para 100 µg de D-glucosa en la reacción de GOPOD).

**100/0,1** = Corrección de volumen (0,1 mL tomados de 100 mL).

**1/1000** = Conversión de microgramos a miligramos.

**W (peso seco de la muestra analizada)** = Peso x [(100-contenido de humedad) /100].

**100/W** = Factor para presentar RS como porcentaje del peso de la muestra. 7

**162/180** = factor para convertir de D-glucosa libre, según lo determinado, a anhidro-D-glucosa como ocurre en el almidón.

**10,3/0,1** = corrección de volumen (0,1 mL tomados de 10,3 mL) para muestras que contienen 0-10% RS donde la solución no se diluye y el volumen final es ~ 10,3 ml.

## ASEGURAMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD

Controles internos de calidad	Característica	Frecuencia	Estadística	Criterio de aceptación
Pruebas funcionales de todos los equipos/instrumentos de medición	Comprobación de parámetros técnicos del equipo/instrumento	Antes de cada ensayo	N/A	Cumple los requisitos técnicos del equipo
Blanco muestra	La muestra no contiene analito o muy bajo analito	Inicio de cada lote de ensayo	Media STD	0.317 ± 0.048 %RS
Material de referencia certificado	Proporciona un resultado y valor de incertidumbre.	Inicio de cada lote de ensayo	%R	Nivel bajo, medio y alto:

				% R 98-101%
Análisis de duplicado.	Muestras de rutina.	Cada ensayo	Precisión	Nivel bajo: RSDr max 1.87% Nivel medio: RSDr max 5.03% Nivel alto: 6.05 %RSD

## REFERENCIAS

Official Method 2002.02 Resistant Starch in Starch and Plant Materials

Resistant Starch assay procedure K-RSTAR 05/19 -MEGAYZME-

## **ANEXO C**

### **Informe de validación**

El resumen del estudio de validación se describe a continuación:

## 1. OBJETIVO

Comprobar el procedimiento establecido mediante ensayos analíticos que el método cumple con los objetivos de validación.

## 2. ALCANCE

- Tipo de muestra: Vegetal
- Matriz: Almidón de frejoles rojos, almidón de maíz con alto contenido de amilosa y almidón de papa
- Analito: Almidón resistente
- Unidades: Porcentaje
- Rango de concentración: 4% - 59%
- Técnica analítica: Espectrofotómetro en región visible

## 3. INFORMACIÓN TÉCNICA

- **Reactivos**
  - Ácido maleico Reagent Plus. Pureza:  $\geq 99\%$  (HPLC)
  - Hidróxido de Sodio. Pureza:  $\geq 99\%$
  - Cloruro de Calcio Dihidratado. Pureza: 99.0 to 105.0 %
  - Azida de sodio Reagent Plus. Pureza:  $\geq 99.5\%$
  - Ácido acético glacial. Pureza:  $\geq 99.8\%$
  - Glicerol Anhidro. Pureza: Min 99.5%
  - Etanol. Pureza: Min 99.9%
  - GOPOD Reagent buffer pH 7.4
- **Enzimas**

- Amilase Porcine Pancreas. Specific activity:  $\geq 5$  units/mg solid
- Amyloglucosidase from Rhizopus sp. Specific activity:  $\geq 40,000$  units/g solid
- GOPOD reagent enzymes
  
- **Material de referencia**
  - High amylose maize starch                      44.8 %
  - Native Potato Starch                              63.4 %
  - Kidney Beans    4.9%
  - Actistar    48.3 %
  - Resistant Starch                                      44.0%
  - Glucosa Standard 1 mg/ml                      Pureza: Min 99.9%
  
- **Soluciones volumétricas normal**
  - Buffer de Maleato de Sodio 100 mM, pH 6.0: Pesar 23,2 g de ácido maleico en 1600 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6,0 con hidróxido de sodio 4 M (160 g/l). Luego, agregar 0,6 g de cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y 0,4 g de azida de sodio. Disolver y ajustar el volumen a 2 L.
  - Tampón de acetato de sodio 1.2 M, pH 3.8: 1. Medir 68,6 mL de ácido acético glacial (1,05 g/mL) e incorporar en 800 mL de agua destilada. Ajustar a pH 3,8 usando hidróxido de sodio 4 M. Llevar a volumen de 1 L con agua destilada.
  - Tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 4.5: Medir 5,8 mL de ácido acético glacial e incorporar en 900 mL de agua destilada. Ajustar a pH 4,5 usando hidróxido de sodio 4 M. Llevar a volumen a 1 L con agua destilada.
  
- **Otras soluciones**
  - Solución de hidróxido de potasio 2M: Pesar 112,2 g de KOH y agregar en 900 mL de agua desionizada y agitar hasta disolver. Se ajustó el volumen

a 1 L.

- Etanol acuoso (aprox. 50% v/v): Medir 500 ml de etanol y agregar 500 ml de agua destilada.
- Stock de amiloglucosidasa (3300 U/ml): Pesar 1.6734 g de Amyloglucosidase 98600 U/g y se diluyó en 25 ml de agua destilada. Se agitó suavemente y se agregó 25 ml de Glicerol. La solución es viscosa  
AMG diluido (300 U/mL): Diluir 2 mL de stock AMG en 22 mL con sodio 100mM tampón de maleato (0,1 M, pH 6,0).
- Solución fresca de  $\alpha$ -amilasa pancreática (10 mg, 30 U/mL) que contiene AMG (3 U/mL): En fresco, pesar 0.3 g de  $\alpha$ -amilasa pancreática 10 Unit/mg solid y aforar hasta 100 mL de sodio tampón de maleato (100 mM, pH 6,0). Agitar durante 5 minutos y agregar 1.0 mL de AMG diluido (300 U/mL). Se centrifugó a 5000 xg durante 10 min y se decantó cuidadosamente la solución sobrenadante.
- Reactivo de GOPOD

Tampón reactivo GOPOD: Se diluyó el contenido del frasco GOPOD REAGENT BUFFER en 1 litro de agua destilada.

Enzima reactivo GOPOD: Se añadió 10 ml del paso anterior al frasco GOPOD REAGENT ENZYMES. Agitar suavemente. Luego, se agregó 10 ml adicionales al frasco, otra vez. Agitar suavemente y transferir a la botella de volumen 1 litro. Cubrir esta botella con aluminio papel de aluminio para proteger el reactivo de la luz.

- **Equipos**

- Espectrofotómetro:  $\lambda$  : 510 nm, resolución: 0.0001 OD
- Balanza analítica: Max 220 g, legibilidad: 0.1 mg
- pH metro: pH 0 – 14, legibilidad: 0.001.
- Vortex Analógico
- Plato de agitación magnético
- Centrífuga: 7500 rpm, temperatura ambiente, rotor de capacidad 50 ml
- Termomixer: Temperatura: 50 °C, legibilidad: 0.1 C., velocidad: 200 rpm
- Medidor de Humedad: Masa: 5 gramos, legibilidad: 0.001 g, temperatura: 130 °C, legibilidad: 1° C
- Baño María con agitación: 37°C y 50°C, legibilidad: 0.1 C. Rpm: 100 rpm.

- Legibilidad: 10 rpm,
- Refrigerador-Congelador: 6 °C y -20 °C
- Equipo de agua: Conductividad: 10-15 MΩ/cm
  
- **Instrumentos de medición**
  - Cronómetro: 9 h 59 min 59,99 s. Escala 0.01
  - Termohigrómetro A: -20 C – 10 C. Escala 1°C
  - Termohigrómetro B: 37 y 50 °C. Escala 1 °C
  - Micropipeta monocanal variable 0.5-10 ul. Legibilidad: 0.01 µl
  - Micropipeta monocanal variable 10-100 ul. Legibilidad: 0.1 µl
  - Micropipeta monocanal variable 100-1000 ul. Legibilidad: 2 µl
  - Micropipeta monocanal variable 1000-10000 ul. Legibilidad: 10 µl
  - Micropipeta multicanal variable 30-300 ul. Legibilidad: 0.2 µl
  
- **Materiales volumétricos**
  - Matraz 100 ml      Clase A, Tolerancia: ± 0.1 ml
  - Matraz 200 ml      Clase A, Tolerancia: ± 0.15 ml
  - Matraz 1000 ml      Clase A, Tolerancia: ± 0.4 ml
  - Matraz 2000 ml      Clase A, Tolerancia: ± 0.6 ml
  
- **Personal**
  - Nombre: Andrea Cruz Espinoza
  - Mes-año: Agosto 2022

#### 4. **NORMATIVA**

- Tipo de método: Normalizado
- Método: AOAC 2002.02

- Nombre del método: Resistant Starch in Starch and Plant Materials-Enzymatic Digestion.

## 5. NECESIDAD ANALÍTICA

El % de almidón resistente es de interés para la industria alimentaria y para la investigación científica por ser un analito de alta funcionalidad y tecnológica. Por lo tanto, el laboratorio determinó comprobar la metodología AOAC 2002.02 en el laboratorio usando enzimas de la marca SIGMA y reactivo GOPOD de la marca Megayzme. El método normalizado no requiere su validación completa. No obstante, el laboratorio necesita comprobar que el método utilizado es el apropiado, antes de seguir realizando el ensayo, mediante el análisis y la verificación de los parámetros de desempeño.

## 6. OBJETIVO DE VALIDACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Parámetro de desempeño	Objetivos de validación	Aplicación práctica
<b>Selectividad</b>	$t_{cal} > t_{crítico}$ entonces hay diferencia significativa a un nivel de confianza de 95%	DÍA 1.  Analizar 10 réplicas de almidón no resistente de la etapa: Solubilización de almidón a partir de un almidón de frejol rojo de 4.9%.
	%AR: 1 y R min 50%	DIA 2.

<b>Límite de detección</b>		Analizar 10 réplicas de almidón de frejol de 4.9 % que recupere al menos un 50 % del analito.
<b>Límite de cuantificación</b>	%AR: 2 y R min 70%	DIA 2 A DÍA 6  Analizar 16 réplicas en cinco días de almidón de frejol de 4.9% que recupere al menos un 70% de la muestra.
<b>Linealidad</b>	$R^2 \geq 0.991$	DIA 3 A DIA 7.  Realizar curva de calibración previo a cada estudio de exactitud y precisión.  Analizar los puntos de 0, 0.15, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg/ml por triplicado de glucosa estándar para establecer la pendiente de la curva de calibración.
<b>Intervalo de trabajo</b>	2 % - 64 % AR R min 70%	DÍA 3 A DÍA7  Analizar 16 réplicas de muestra de harina de frejol durante 5 días

		Analizar 30 réplicas en muestra de harina de papa durante 4 días
<b>Exactitud</b>	98-101 %	DIA 3 A DIA 7.  Analizar 5 veces el material de control 4.9%, 44.8% y 63.4% a nivel bajo, medio y alto, respectivamente.
<b>Repetibilidad</b>	<p>Comparación con los resultados de medición de %AR del método normalizado AOAC 2002.02.</p> <p><b>Nivel bajo:</b> % RSDr: máx 2.42 %</p> <p><b>Nivel medio</b> % RSDr: máx 3.18 %</p> <p><b>Nivel alto</b> % RSDr: máx 4.20 %</p> <p>Recuperación de al menos un 70%</p>	<p>DÍA 3 A DÍA 7</p> <p>Nivel bajo: 16 réplicas con harina de frejol durante cinco días</p> <p>Nivel medio: 27 réplicas de almidón de banano estado 1 durante 4 días</p> <p>Nivel alto: 30 réplicas de harina de papa durante 4 días</p>

<p><b>Reproducibilidad</b></p>	<p>Comparación con los resultados de medición de %AR del método normalizado.</p> <p><b>Nivel bajo:</b> % RSDR: máx 4.58%</p> <p><b>Nivel medio</b> % RSDR: máx 8.47%</p> <p><b>Nivel alto</b> % RSDR: máx 5.94%</p> <p>Recuperación de al menos un 70%</p>	<p>DÍA 3 A DÍA 7</p> <p>Nivel bajo: 16 réplicas con harina de frejol durante cinco días</p> <p>Nivel medio: 27 réplicas de almidón de banano estado 1 durante 4 días</p> <p>Nivel alto: 30 réplicas de harina de papa durante 4 días</p>
<p><b>Robustez</b></p>	<p>Si <math>F_{cal} \leq F(\alpha, v_1, v_2)</math> la hipótesis nula no puede ser rechazada y el proceso puede ser considerado robusto.</p>	<p>DIA 8 O DIA 11.</p> <p>Analizar 5 réplicas de muestra con concentraciones conocidas y modificando 7 variables, uno a uno:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pesar 80 mg de muestra</li> <li>2. Agregar 3 ml de</li> </ol>

		<p>solución fresca enzimática <math>\alpha</math>-amilasa pancreática.</p> <p>3. Agregar 1.5 ml de KOH 2 M por 20 min.</p> <p>4. Diluir 80 ml de buffer pH 6.0 en 0.3 gramos de alfa amilasa.</p> <p>5. Incubar por 30 minutos con la enzima AMG a 50 <math>^{\circ}</math>C en un equipo de ba<math>\tilde{n}</math>o seco con agitaci3n</p> <p>6. Incubar a 37 C por 16.5 horas.</p> <p>7. Incubar a 48 C por 30 minutos la enzima AMG</p>
--	--	--

## 7. RESULTADOS ANALÍTICOS – SELECTIVIDAD-

COLUMNA DE PLACA																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
A			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10					
B			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10					
C	mNAR1	mNAR2	mNAR3	mNAR4	mNAR5	mNAR6	mNAR7	mNAR8	mNAR9	mNAR10	ctrl	blk					
D	mNAR1	mNAR2	mNAR3	mNAR4	mNAR5	mNAR6	mNAR7	mNAR8	mNAR9	mNAR10	ctrl	blk					
PLACA VACÍA																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
A			0,046	0,046	0,048	0,046	0,045	0,043	0,043	0,045	0,043	0,044					
B			0,046	0,043	0,043	0,045	0,046	0,043	0,043	0,043	0,044	0,044					
C																	
D	0,043	0,043	0,043	0,044	0,043	0,045	0,045	0,043	0,043	0,044	0,043	0,042					
E	0,044	0,044	0,044	0,043	0,043	0,045	0,045	0,043	0,043	0,043	0,045	0,043					
DATOS																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
A			0,443	0,498	0,395	0,42	0,436	0,437	0,441	0,442	0,605	0,45					
B			0,447	0,477	0,4	0,433	0,434	0,428	0,441	0,441	0,61	0,452					
C																	
D	0,069	0,078	0,072	0,072	0,066	0,08	0,075	0,068	0,08	0,071	0,8	0,046					
E	0,07	0,081	0,073	0,082	0,069	0,072	0,077	0,069	0,073	0,073	0,819	0,047					
RS= 4,9%		Data 1	Data 2	Promedio	BLK	CTRL	Δ A	F	w	mg	%H	%AR (A)	% R	SESGO			
M1	M1	0,443	0,447	0,445	0,0443	0,810	0,4007	123,464411	97,62	100	2,38	4,70	95,88%	0,4			
M3	M3	0,395	0,4	0,3975			0,3975	123,464411	97,22952	99,6	2,38	4,68	95,49%				
M4	M4	0,42	0,433	0,4265			0,4265	123,464411	97,32714	99,7	2,38	5,02	102,36%				
M5	M5	0,436	0,434	0,435			0,4350	123,464411	97,52238	99,9	2,38	5,11	104,19%				
M6	M6	0,437	0,428	0,4325			0,4325	123,464411	97,22952	99,6	2,38	5,09	103,90%				
M7	M7	0,441	0,441	0,441			0,4410	123,464411	97,52238	99,9	2,38	5,18	105,62%				
M8	M8	0,442	0,441	0,4415			0,4415	123,464411	98,01048	100,4	2,38	5,16	105,22%				
M10	M10	0,45	0,452	0,451			0,4510	123,464411	97,52238	99,9	2,38	5,29	108,02%				
											PROMEDIO	5,03	102%				
RS %	4,9																
Almidón solubilizado a las 16 horas																	
		Data 1	Data 2	Promedio	Δ A	F	w	mg	%H	%AR (B)	% R	SESGO					
mNAR1	mNAR1	0,069	0,07	0,0695	0,0230	123,53	97,62	100	2,38	0,27	5,51%	4,58					
mNAR2	mNAR2	0,078	0,081	0,0795	0,0330	123,53	97,23	99,6	2,38	0,39	7,93%						
mNAR3	mNAR3	0,072	0,073	0,0725	0,0260	123,53	97,23	99,6	2,38	0,31	6,25%						
mNAR4	mNAR4	0,072	0,082	0,077	0,0305	123,53	97,33	99,7	2,38	0,36	7,32%						
mNAR5	mNAR5	0,066	0,069	0,0675	0,0210	123,53	97,52	99,9	2,38	0,25	5,03%						
mNAR6	mNAR6	0,08	0,072	0,076	0,0295	123,53	97,23	99,6	2,38	0,35	7,09%						
mNAR7	mNAR7	0,075	0,077	0,076	0,0295	123,53	97,52	99,9	2,38	0,35	7,07%						
mNAR8	mNAR8	0,068	0,069	0,0685	0,0220	123,53	98,01	100,4	2,38	0,26	5,25%						
mNAR9	mNAR9	0,08	0,073	0,0765	0,0300	123,53	98,01	100,4	2,38	0,35	7,15%						
mNAR10	mNAR10	0,071	0,073	0,072	0,0255	123,53	97,52	99,9	2,38	0,30	6,11%						
ctrl	ctrl	0,8	0,819	0,8095								PROMEDIO	0,32	6%			
blk	blk	0,046	0,047	0,0465								STD	0,0481306				

## Límite de detección

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	blk	ctrl	ctrl	ctrl	10%	10%	10%	20%	20%	20%
B	30%	30%	30%	40%	40%	40%	50%	50%	50%	60%	60%	60%
C	70%	70%	70%	80%	80%	80%	90%	90%	90%	100%	100%	100%
D	75%	75%	75%	blk	blk	ctrl	vtrl					
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,043	0,043	0,043	0,045	0,044	0,043	0,043	0,044	0,043	0,045	0,043	0,045
B	0,043	0,044	0,043	0,045	0,045	0,044	0,044	0,045	0,045	0,044	0,045	0,045
C	0,045	0,044	0,044	0,045	0,044	0,044	0,045	0,046	0,045	0,044	0,045	0,045
D	0,044	0,043	0,044	0,043	0,042	0,045	0,045					
DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,042	0,041	0,738	0,754	0,754	0,08	0,081	0,082	0,105	0,107	0,107
B	0,149	0,147	0,148	0,189	0,188	0,183	0,219	0,228	0,227	0,275	0,277	0,283
C	0,314	0,314	0,314	0,34	0,342	0,343	0,394	0,391	0,39	0,433	0,436	0,434
D	0,386	0,368	0,382	0,047	0,049	0,827	0,803					
%RS	4,9											
		Data 1	Data 2	Data 3	Promedio	Δ A	F	w	mg	%H	%AR	% R
M1	M1*	0,08	0,081	0,082	0,08	0,0400	133,57079	97,62	100	2,38	0,051	1,04%
M2	M2*	0,105	0,107	0,107	0,11	0,0653	133,57079	97,62	100	2,38	0,166	3,38%
M3	M3*	0,149	0,147	0,148	0,15	0,1070	133,57079	97,62	100	2,38	0,407	8,31%
M4	M4*	0,189	0,188	0,183	0,19	0,1457	133,57079	97,62	100	2,38	0,739	15,08%
M5	M5*	0,219	0,228	0,227	0,22	0,1837	133,57079	97,62	100	2,38	1,165	23,77%
M6	M6*	0,275	0,277	0,283	0,28	0,2373	133,57079	97,62	100	2,38	1,806	36,86%
M7	M7*	0,314	0,314	0,314	0,31	0,2730	133,57079	97,62	100	2,38	2,424	49,47%
M7,5	M7,75*	0,368	0,382	0,386	0,38	0,3342	122,69939	97,82	100,2	2,38	2,914	59,48%
M8	M8*	0,34	0,342	0,343	0,34	0,3007	133,57079	97,62	100	2,38	3,051	62,26%
M9	M9*	0,394	0,391	0,39	0,39	0,3507	133,57079	97,62	100	2,38	4,003	81,69%
M10	M10*	0,433	0,436	0,434	0,43	0,3933	133,57079	97,62	100	2,38	4,989	101,82%
blk	blk*	0,04	0,042	0,041	0,04							
ctrl	ctrl*	0,738	0,754	0,754	0,75							
blk (7,5)	blk* (7,5)	0,046	0,043		0,04							
ctrl (7,5)	ctrl* (7,5)	0,827	0,803		0,82							

LD teórico

LD min 50%



## Límite de cuantificación

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	blk	ctrl	ctrl	ctrl	10%	10%	10%	20%	20%	20%
B	30%	30%	30%	40%	40%	40%	50%	50%	50%	60%	60%	60%
C	70%	70%	70%	80%	80%	80%	90%	90%	90%	100%	100%	100%
D	75%	75%	75%	blk	blk	ctrl	vtrl					
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,043	0,043	0,043	0,045	0,044	0,043	0,043	0,044	0,043	0,045	0,043	0,045
B	0,043	0,044	0,043	0,045	0,045	0,044	0,044	0,045	0,045	0,044	0,045	0,045
C	0,045	0,044	0,044	0,045	0,044	0,044	0,045	0,046	0,045	0,044	0,045	0,045
D	0,044	0,043	0,044	0,043	0,042	0,045	0,045					
DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,042	0,041	0,738	0,754	0,754	0,08	0,081	0,082	0,105	0,107	0,107
B	0,149	0,147	0,148	0,189	0,188	0,183	0,219	0,228	0,227	0,275	0,277	0,283
C	0,314	0,314	0,314	0,34	0,342	0,343	0,394	0,391	0,39	0,433	0,436	0,434
D	0,386	0,368	0,382	0,047	0,049	0,827	0,803					
%RS	4,9											
		Data 1	Data 2	Data 3	Promedio	Δ A	F	w	mg	%H	%AR	% R
M1	M1*	0,08	0,081	0,082	0,08	0,0400	133,57079	97,62	100	2,38	0,051	1,04%
M2	M2*	0,105	0,107	0,107	0,11	0,0653	133,57079	97,62	100	2,38	0,166	3,38%
M3	M3*	0,149	0,147	0,148	0,15	0,1070	133,57079	97,62	100	2,38	0,407	8,31%
M4	M4*	0,189	0,188	0,183	0,19	0,1457	133,57079	97,62	100	2,38	0,739	15,08%
M5	M5*	0,219	0,228	0,227	0,22	0,1837	133,57079	97,62	100	2,38	1,165	23,77%
M6	M6*	0,275	0,277	0,283	0,28	0,2373	133,57079	97,62	100	2,38	1,806	36,86%
M7	M7*	0,314	0,314	0,314	0,31	0,2730	133,57079	97,62	100	2,38	2,424	49,47%
M7,5	M7,75*	0,368	0,382	0,386	0,38	0,3342	122,69939	97,82	100,2	2,38	2,914	59,48%
M8	M8*	0,34	0,342	0,343	0,34	0,3007	133,57079	97,62	100	2,38	3,051	62,26%
M9	M9*	0,394	0,391	0,39	0,39	0,3507	133,57079	97,62	100	2,38	4,003	81,69%
M10	M10*	0,433	0,436	0,434	0,43	0,3933	133,57079	97,62	100	2,38	4,989	101,82%
blk	blk*	0,04	0,042	0,041	0,04							
ctrl	ctrl*	0,738	0,754	0,754	0,75							
blk (7,5)	blk* (7,5)	0,046	0,043		0,04							
ctrl (7,5)	ctrl* (7,5)	0,827	0,803		0,82							

LC teórico

LC min 70%

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	2	2	3	3	ctrl	ctrl	blk	blk		
B	4	4	5	5	6	6	ctrl	ctrl	blk	blk		
C	7	7	9	9	10	10	ctrl	ctrl	blk	blk		
D	11	11	12	12	13	13	ctrl	ctrl	blk	blk		
E	8	8					ctrl	ctrl	blk	blk		
F	14	14	15	15	16	16	ctrl	ctrl	blk	blk		
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,043	0,043	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,04	0,045		
B	0,045	0,045	0,043	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,05	0,044		
C	0,043	0,044	0,045	0,045	0,045	0,044	0,043	0,045	0,04	0,044		
D	0,045	0,044	0,044	0,044	0,045	0,045	0,043	0,044	0,04	0,043		
E	0,044	0,043					0,44	0,044	0,04	0,042		
F	0,045	0,046	0,045	0,044	0,044	0,042	0,043	0,043	0,04	0,043		
DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,467	0,476	0,462	0,475	0,467	0,462	0,882	0,87	0,05	0,05		
B	0,475	0,48	0,463	0,464	0,487	0,494	0,843	0,86	0,05	0,046		
C	0,454	0,443	0,431	0,455	0,443	0,445	0,85	0,84	0,05	0,049		
D	0,386	0,389	0,397	0,394	0,384	0,39	0,736	0,754	0,04	0,041		
E	0,434	0,456					0,868	0,861	0,05	0,046		
F	0,384	0,386	0,397	0,394	0,389	0,39	0,738	0,754	0,04	0,042		



# Linealidad

## Nivel Bajo

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25		
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25	
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,044	0,04	0,045	
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,05		

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,045	0,044	0,045	0,045	0,045	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,044	
B	0,044	0,045	0,044	0,045	0,045	0,044	0,044	0,045	0,045	0,045		

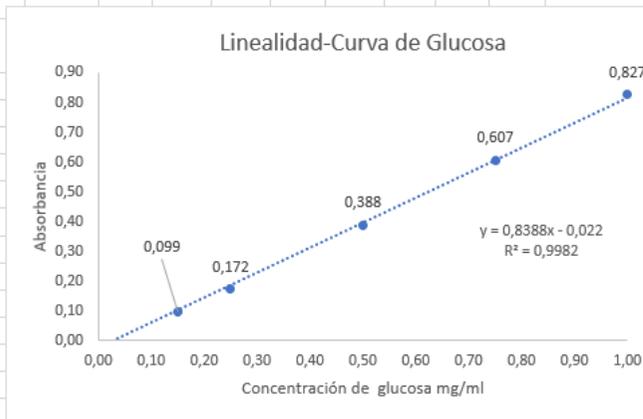
DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,049	0,05	0,047	0,049	0,05	0,147	0,149	0,148	0,222	0,22	0,221	
B	0,434	0,438	0,44	0,652	0,659	0,658	0,882	0,87	0,035	0,04		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,046	0,047	0,044	0,045	0,046	0,125	0,128	0,124	0,215	0,268	0,216	
B	0,421	0,424	0,426	0,634	0,637	0,639	0,843	0,86	0,037	0,037		

Curva de calibración de la glucosa # 1

Blk: 0,0495

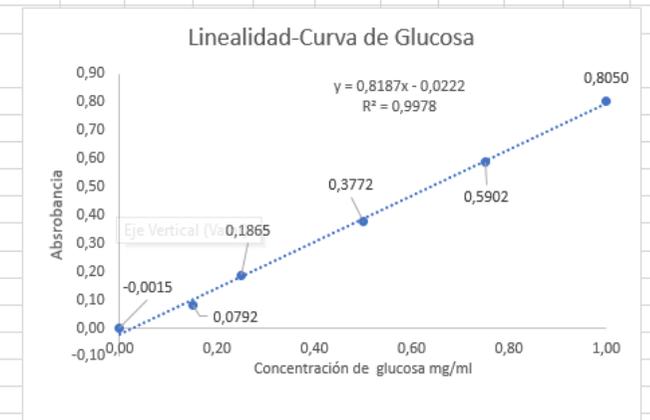
x mg/ml	y abs 510 nm
0,000	-0,001
0,150	0,099
0,250	0,172
0,500	0,388
0,750	0,607
1,000	0,827



Curva de calibración de la glucosa # 2

Blk: 0,0465

x mg/ml	y abs 510 nm
0,000	-0,0015
0,1500	0,0792
0,2500	0,1865
0,5000	0,3772
0,7500	0,5902
1,0000	0,8050



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25	
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

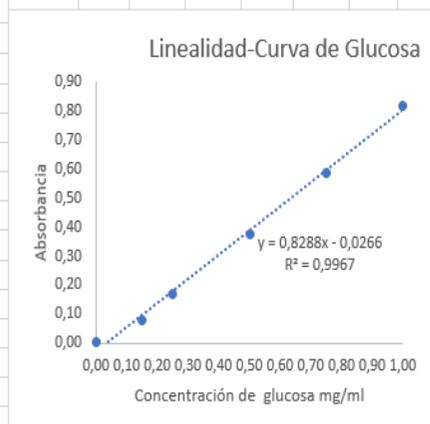
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,04	0,045	
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,05		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,046	0,046	0,047	0,049	0,049	0,125	0,128	0,127	0,228	0,21	0,214	
B	0,42	0,422	0,425	0,634	0,63	0,636	0,868	0,861	0,035	0,04		

Curva de calibración de la glucosa # 3

Blk: 0,046

x mg/ml	abs 510 nm
0,0000	0,0023
0,1500	0,0807
0,2500	0,1717
0,5000	0,3763
0,7500	0,5873
1,0000	0,8185



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25	
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

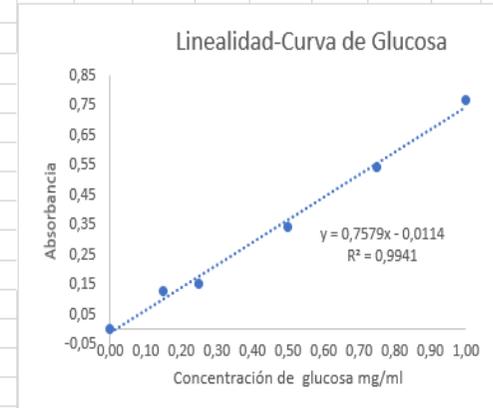
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,044	0,05	
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,048	0,049	0,048	0,049	0,048	0,175	0,175	0,175	0,201	0,205	0,2	
B	0,399	0,39	0,39	0,59	0,594	0,595	0,812	0,824	0,036	0,035		

Curva de calibración de la glucosa # 4

Blk: 0,0485

x mg/ml	abs 510 nm
0,0000	0,0000
0,1500	0,1265
0,2500	0,1548
0,5000	0,3445
0,7500	0,5445
1,0000	0,7695



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25	
B	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad	

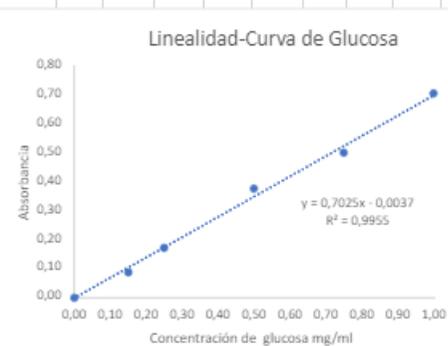
PLACA VACIA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,04	0,045	
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,05		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,041	0,042	0,041	0,042	0,041	0,12	0,127	0,139	0,21	0,22	0,214	
B	0,42	0,425	0,41	0,54	0,542	0,544	0,738	0,754	0,035	0,04		

Curva de calibración de la glucosa # 5

Blk: 0,0415

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	-0,0002
0,1500	0,0872
0,2500	0,1718
0,5000	0,3768
0,7500	0,5005
1,0000	0,7035



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25	
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

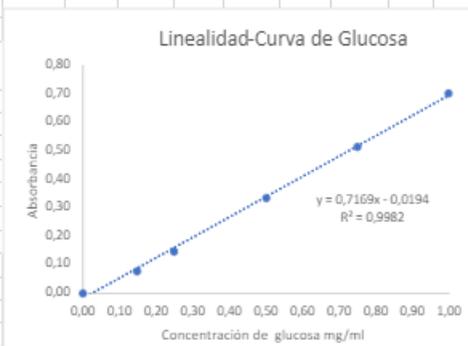
PLACA VACIA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,044	0,05	
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,041	0,04	0,04	0,041	0,12	0,12	0,121	0,191	0,186	0,19	
B	0,377	0,375	0,372	0,558	0,555	0,561	0,738	0,754	0,038	0,037		

Curva de calibración de la glucosa # 6

Blk: 0,0405

x mg/ml	abs 510 nm
0,0000	-0,0002
0,1500	0,0798
0,2500	0,1475
0,5000	0,3342
0,7500	0,5168
1,0000	0,7055



## Nivel Medio

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25	
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,044	0,045	
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,043	0,045	0,045	0,045	0,045	0,14	0,139	0,139	0,21	0,206	0,211	
B	0,41	0,411	0,412	0,62	0,617	0,619	0,816	0,825	0,035	0,037		

PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk	0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25	
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,045	0,044	0,045	0,045	0,045	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,044	
B	0,044	0,045	0,044	0,045	0,045	0,044	0,044	0,045	0,045	0,045		

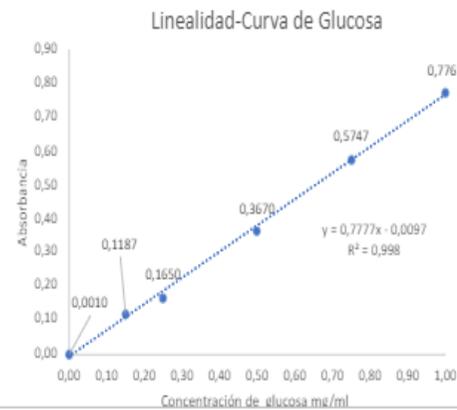
  

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,046	0,045	0,046	0,045	0,046	0,12	0,121	0,119	0,21	0,205	0,204	
B	0,402	0,405	0,401	0,603	0,601	0,602	0,804	0,803	0,039	0,038		
C												

Curva de calibración de la glucosa # 1

Blk: 0,044

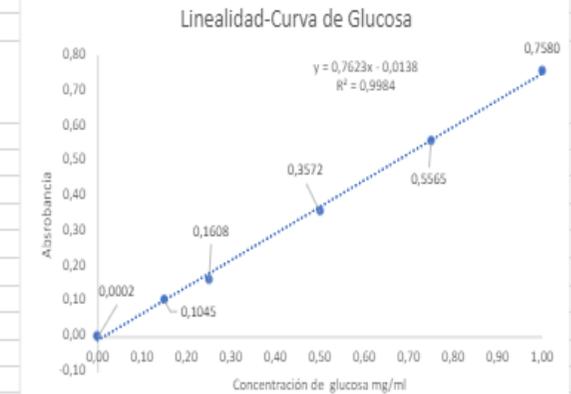
x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	0,0010
0,1500	0,1187
0,2500	0,1650
0,5000	0,3670
0,7500	0,5747
1,0000	0,7765



Curva de calibración de la glucosa # 2

Blk: 0,0455

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	0,0002
0,1500	0,1045
0,2500	0,1608
0,5000	0,3572
0,7500	0,5565
1,0000	0,7580



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
B	0,5	0,6	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

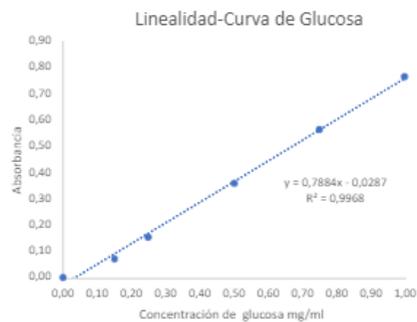
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043		0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,044	0,045	0,045
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,048	0,049		0,048	0,049	0,048	0,118	0,115	0,122	0,205	0,201	0,208
B	0,405	0,409	0,407	0,613	0,615	0,616	0,815	0,815	0,036	0,038		

Curva de calibración de la glucosa # 3

Blk: 0,0485

x mg/ml	abs 510 nm
0,0000	-0,0002
0,1500	0,0698
0,2500	0,1562
0,5000	0,3585
0,7500	0,5662
1,0000	0,7665



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

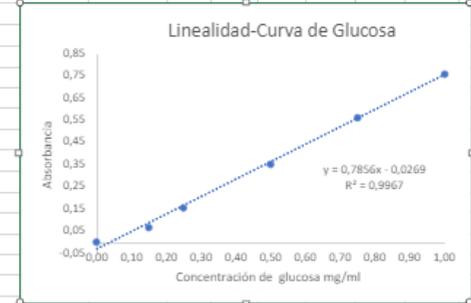
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043		0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,044	0,045	0,045
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,047	0,047		0,048	0,049	0,048	0,118	0,115	0,121	0,205	0,201	0,208
B	0,405	0,409	0,4	0,613	0,615	0,617	0,81	0,813	0,036	0,38		

Curva de calibración de la glucosa # 4

Blk: 0,047

x mg/ml	abs 510 nm
0,0000	0,0017
0,1500	0,0710
0,2500	0,1577
0,5000	0,3577
0,7500	0,5680
1,0000	0,7645



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

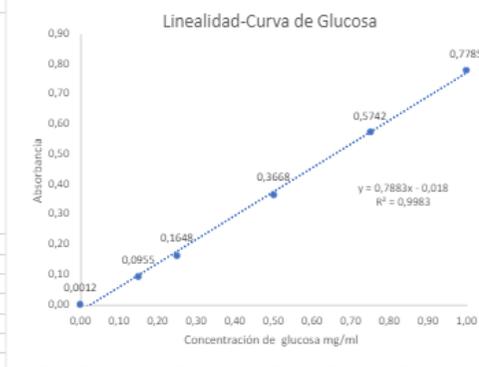
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043		0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,044	0,045	
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,045		0,045	0,046	0,046	0,14	0,139	0,141	0,208	0,209	0,211
B	0,412	0,411	0,411	0,619	0,617	0,62	0,818	0,828	0,035	0,038		

Curva de calibración de la glucosa # 5

Blk: 0,0445

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	0,0012
0,1500	0,0955
0,2500	0,1648
0,5000	0,3668
0,7500	0,5742
1,0000	0,7785



PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

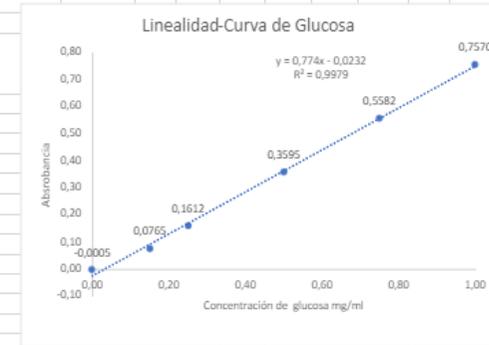
ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,045	0,044		0,045	0,045	0,045	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,044
B	0,044	0,045	0,044	0,045	0,045	0,044	0,044	0,045	0,045	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,046	0,044		0,045	0,045	0,045	0,125	0,121	0,12	0,211	0,205	0,204
B	0,404	0,405	0,406	0,604	0,605	0,602	0,804	0,801	0,036	0,037		
C												

Curva de calibración de la glucosa # 6

Blk: 0,0450

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	-0,0005
0,1500	0,0765
0,2500	0,1612
0,5000	0,3595
0,7500	0,5582
1,0000	0,7570



## Nivel Alto

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043		0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,044	0,045
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,045		

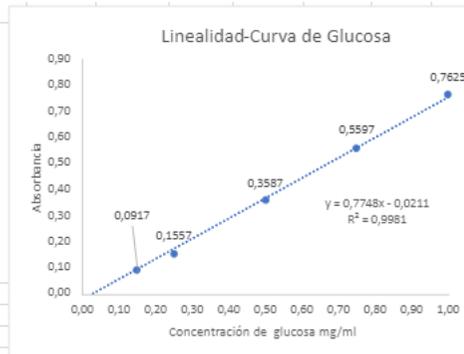
  

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,046	0,048		0,045	0,045	0,046	0,14	0,137	0,139	0,203	0,206	0,199
B	0,405	0,408	0,404	0,61	0,604	0,606	0,781	0,838	0,039	0,037		

Curva de calibración de la glucosa # 1

Blk: 0,047

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	-0,0017
0,1500	0,0917
0,2500	0,1557
0,5000	0,3587
0,7500	0,5597
1,0000	0,7625



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blk	blk		0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,045	0,044		0,045	0,045	0,045	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,044
	0,044	0,045	0,044	0,045	0,045	0,044	0,044	0,045	0,045	0,045		

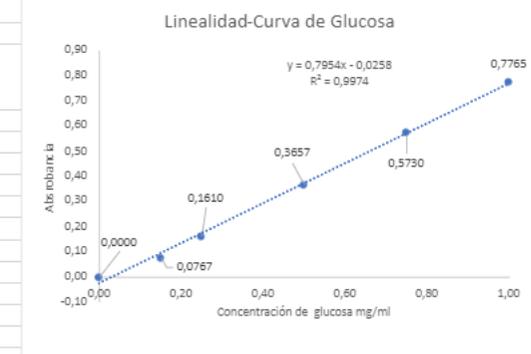
  

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,045	0,047		0,046	0,046	0,046	0,123	0,124	0,121	0,21	0,204	0,207
	0,41	0,413	0,412	0,619	0,62	0,618	0,81	0,835	0,039	0,038		

Curva de calibración de la glucosa # 2

Blk: 0,046

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	0,0000
0,1500	0,0767
0,2500	0,1610
0,5000	0,3657
0,7500	0,5730
1,0000	0,7765



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

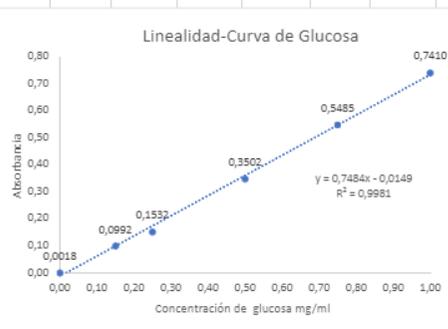
PLACA VACIA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043		0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,045	0,044	0,045
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,046	0,047		0,048	0,049	0,048	0,12	0,118	0,119	0,2	0,197	0,202
B	0,396	0,399	0,395	0,595	0,594	0,596	0,781	0,794	0,039	0,038		

Curva de calibración de la glucosa # 3

Blk: 0,0465

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	0,0018
0,1500	0,0992
0,2500	0,1532
0,5000	0,3502
0,7500	0,5485
1,0000	0,7410



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
B	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	ad	ad		

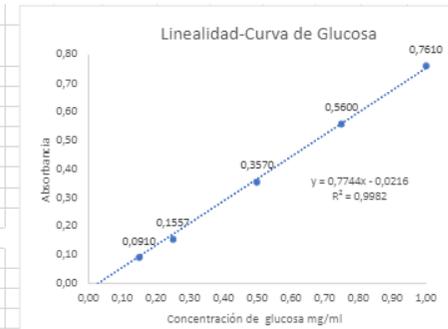
PLACA VACIA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,045		0,045	0,044	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,044	0,044
B	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,044	0,045	0,045	0,043	0,045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,048	0,048		0,046	0,045	0,046	0,141	0,137	0,139	0,203	0,208	0,2
B	0,405	0,406	0,404	0,61	0,604	0,61	0,779	0,839	0,039	0,039		

Curva de calibración de la glucosa # 4

Blk: 0,048

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	-0,00233
0,1500	0,0910
0,2500	0,1557
0,5000	0,3570
0,7500	0,5600
1,0000	0,7610



ESQUEMA DE PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0.15	0.15	0.15	0.25	0.25	0.25
B	0.5	0.5	0.75	0.75	0.75	1	1	1	ad	ad		

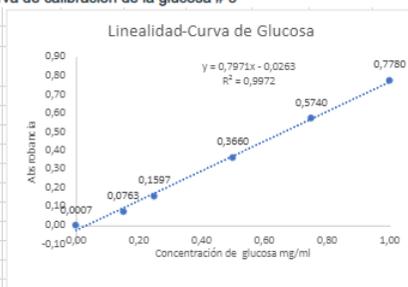
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.045	0.044		0.045	0.045	0.045	0.044	0.044	0.044	0.045	0.043	0.044
B	0.044	0.045	0.044	0.045	0.045	0.044	0.044	0.045	0.045	0.045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.046	0.048		0.046	0.046	0.048	0.121	0.124	0.122	0.206	0.204	0.207
B	0.411	0.413	0.412	0.619	0.623	0.618	0.812	0.836	0.039	0.038		

Curva de calibración de la glucosa # 5

Blk: 0,047

	y abs 510 nm
0,0000	0,0007
0,1500	0,0763
0,2500	0,1597
0,5000	0,3660
0,7500	0,5740
1,0000	0,7780



ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blk	blk		0	0	0	0.15	0.15	0.15	0.25	0.25	0.25
B	0.5	0.5	0.75	0.75	0.75	1	1	1	ad	ad		

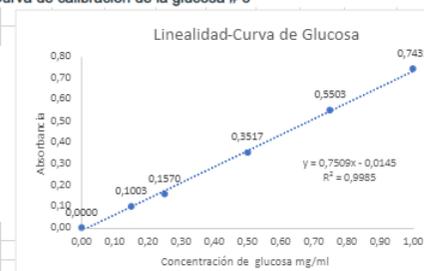
PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.044	0.043		0.045	0.044	0.045	0.046	0.045	0.045	0.045	0.044	0.045
B	0.044	0.044	0.044	0.045	0.043	0.046	0.046	0.045	0.043	0.045		

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.047	0.047		0.048	0.046	0.047	0.119	0.118	0.119	0.205	0.204	0.203
B	0.399	0.399	0.398	0.595	0.598	0.599	0.784	0.797	0.039	0.038		

Curva de calibración de la glucosa # 6

Blk: 0,047

x mg/ml	y abs 510 nm
0,0000	0,0000
0,1500	0,1003
0,2500	0,1570
0,5000	0,3517
0,7500	0,5503
1,0000	0,7435



## Intervalo de trabajo

## Rango bajo

ESQUEMA EN PLACA										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	1	1	2	2	3	3	ctrl	ctrl	blk	blk
B	4	4	5	5	6	6	ctrl	ctrl	blk	blk
C	7	7	9	9	10	10	ctrl	ctrl	blk	blk
D	11	11	12	12	13	13	ctrl	ctrl	blk	blk
E	8	8					ctrl	ctrl	blk	blk
F	14	14	15	15	16	16	ctrl	ctrl	blk	blk
PLACA VACÍA										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0,043	0,043	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,044	0,045
B	0,045	0,045	0,043	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,045	0,044
C	0,043	0,044	0,045	0,045	0,045	0,044	0,043	0,045	0,043	0,044
D	0,045	0,044	0,044	0,044	0,045	0,045	0,043	0,044	0,044	0,043
E	0,044	0,043					0,44	0,044	0,044	0,042
F	0,045	0,046	0,045	0,044	0,044	0,042	0,043	0,043	0,043	0,043
DATOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0,467	0,476	0,462	0,475	0,467	0,462	0,882	0,87	0,049	0,05
B	0,475	0,48	0,463	0,464	0,487	0,494	0,843	0,86	0,047	0,046
C	0,441	0,431	0,419	0,442	0,433	0,43	0,85	0,84	0,048	0,049
D	0,386	0,389	0,397	0,394	0,384	0,39	0,736	0,754	0,042	0,041
E	0,434	0,456					0,868	0,861	0,046	0,046
F	0,384	0,386	0,397	0,394	0,389	0,39	0,738	0,754	0,04	0,042

		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	Exactitud % R
M1	M1	0,467	0,476	0,4715	0,4220	114,1552511	97,62	100	2,38	4,117	102,42%
M2	M2	0,462	0,475	0,4685	0,4190	114,1552511	97,71762	100,1	2,38	4,084	101,59%
M3	M3	0,467	0,462	0,4645	0,4150	114,1552511	97,32714	99,7	2,38	4,061	101,02%
ctrl	ctrl	0,882	0,87	0,876							
blk	blk	0,049	0,05	0,0495							
M4	M4	0,475	0,48	0,4775	0,4310	117,4398121	97,71762	100,1	2,38	4,322	107,50%
M5	M5	0,463	0,464	0,4635	0,4170	117,4398121	97,32714	99,7	2,38	4,198	104,43%
M6	M6	0,487	0,494	0,4905	0,4440	117,4398121	97,2115	99,5	2,3	4,475	111,32%
ctrl	ctrl	0,843	0,86	0,8515							
blk	blk	0,047	0,046	0,0465							
M8	M8	0,434	0,456	0,445	0,3990	115,6738	97,72	100,1	2,38	3,941	98,02%
blk	blk	0,046	0,046	0,046							
ctrl	ctrl	0,868	0,861	0,8645							
M8	M8	0,441	0,431	0,436	0,3875	122,2493888	98,1081	100,5	2,38	4,028	100,64%
M9	M9	0,419	0,442	0,4305	0,3820	122,2493888	97,62	100	2,38	3,991	99,28%
M10	M10	0,433	0,43	0,4315	0,3830	122,2493888	98,1081	100,5	2,38	3,982	99,05%
blk	blk	0,048	0,049	0,0485							
ctrl	ctrl	0,812	0,824	0,818							
M11	M11	0,386	0,389	0,3875	0,3460	134,2281879	97,62	100	2,38	3,969	98,74%
M12	M12	0,397	0,394	0,3955	0,3540	134,2281879	97,62	100	2,38	4,061	101,02%
M13	M13	0,39	0,384	0,387	0,3455	134,2281879	97,62	100	2,38	3,963	98,59%
blk	blk	0,042	0,041	0,0415							
ctrl	ctrl	0,736	0,754	0,745							
M14	M14	0,381	0,385	0,383	0,3420	134,0482574	97,72	100,1	2,38	3,914	97,37%
M15	M15	0,392	0,395	0,3935	0,3525	134,0482574	97,62	100	2,38	4,038	100,46%
M16	M16	0,389	0,39	0,3895	0,3485	134,0482574	97,62	100	2,38	3,993	99,32%
blk	blk	0,04	0,042	0,041							
ctrl	ctrl	0,738	0,754	0,746							
									Valor mín	4,02	





		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M1	M1	0,456	0,471	0,4635		0,4175	121,580547	83,4826	100,4	16,85	54,72	86,31%
M2	M2	0,421	0,429	0,425		0,379	121,580547	83,56575	100,5	16,85	49,63	78,28%
M3	M3	0,455	0,472	0,4635		0,4175	121,580547	83,15	100	16,85	54,94	86,66%
M4	M4	0,425	0,446	0,4355		0,3895	121,580547	82,9837	99,8	16,85	51,36	81,01%
M5	M5	0,397	0,403	0,4		0,354	121,580547	82,9837	99,8	16,85	46,68	73,63%
M6	M6	0,462	0,454	0,458		0,412	121,580547	83,15	100	16,85	54,22	85,52%
ctrl	ctrl	0,81	0,835	0,8225								
blk	blk	0,045	0,047	0,046								
M7	M7	0,365	0,396	0,3805		0,3335	126,502214	82,90055	99,70	16,85	45,80	72,24%
M8	M8	0,356	0,385	0,3705		0,3235	126,502214	82,8174	99,60	16,85	44,47	70,15%
ctrl	ctrl	0,784	0,797	0,7905								
blk	blk	0,047	0,047	0,047								
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M1	M1	0,47	0,489	0,4795		0,433	126,984127	83,56575	100,50	16,85	59,22	93,40%
M2	M2	0,407	0,424	0,4155		0,369	126,984127	83,39945	100,30	16,85	50,57	79,76%
M3	M3	0,357	0,372	0,3645		0,318	126,984127	83,4826	100,40	16,85	43,53	68,66%
M4	M4	0,461	0,46	0,4605		0,414	126,984127	83,15	100,00	16,85	56,90	89,75%
M5	M5	0,393	0,41	0,4015		0,355	126,984127	83,15	100,00	16,85	48,79	76,96%
M6	M6	0,356	0,372	0,364		0,3175	126,984127	83,23315	100,10	16,85	43,60	68,76%
M7	M7	0,393	0,403	0,398		0,3515	126,984127	83,06685	99,90	16,85	48,36	76,28%
M8	M8	0,38	0,396	0,388		0,3415	126,984127	82,9837	99,80	16,85	47,03	74,18%
ctrl	ctrl	0,781	0,794	0,7875								
blk	blk	0,046	0,047	0,0465								
										Valor max	50,98	

## Exactitud

### Nivel bajo

ESQUEMA EN PLACA							
	1	2	3	4	5	6	7
A	M1	M1	Blk	blk	ctrl	ctrl	
B	M2	M2	Blk	blk	ctrl	ctrl	
C	M3	M3	Blk	blk	ctrl	ctrl	
D	M4	M4	Blk	blk	ctrl	ctrl	
E	M5	M5	Blk	blk	ctrl	ctrl	

PLACA VACÍA							
	1	2	3	4	5	6	7
A	0,044	0,044	0,046	0,046	0,048	0,046	
B	0,045	0,045	0,046	0,043	0,043	0,045	
C	0,044	0,045	0,044	0,045	0,044	0,044	
D	0,043	0,043	0,043	0,044	0,043	0,045	
E	0,425	0,43	0,043	0,045	0,736	0,754	
F	0,432	0,44	0,048	0,049	0,85	0,84	

DATOS							
	1	2	3	4	5	6	7
A	0,49	0,495	0,049	0,050	0,882	0,87	
B	0,499	0,495	0,047	0,046	0,843	0,86	
C	0,473	0,499	0,046	0,046	0,868	0,861	
D	0,485	0,482	0,048	0,049	0,812	0,824	
E	0,425	0,43	0,042	0,041	0,736	0,754	
F	0,432	0,44	0,04	0,042	0,754	0,738	

		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M1	M1	0,49	0,495	0,4925	0,4430	114,16	97,62	100	2,38	4,80	98,00%
blk	blk	0,049	0,05	0,0495							
ctrl	ctrl	0,882	0,87	0,876							
M2	M2	0,499	0,495	0,497	0,4505	117,44	97,72	100,1	2,38	5,02	102,43%
blk	blk	0,047	0,046	0,0465							
ctrl	ctrl	0,843	0,86	0,8515							
M3	M3	0,473	0,499	0,486	0,4400	115,67	97,82	100,2	2,38	4,82	98,44%
blk	blk	0,046	0,046	0,046							
ctrl	ctrl	0,868	0,861	0,8645							
M4	M4	0,485	0,482	0,4835	0,4350	122,25	97,62	100	2,38	5,05	103,06%
blk	blk	0,048	0,049	0,0485							
ctrl	ctrl	0,812	0,824	0,818							
M5	M6	0,425	0,43	0,4275	0,3860	134,23	97,33	99,7	2,38	4,93	100,71%
blk	blk	0,042	0,041	0,0415							
ctrl	ctrl	0,736	0,754	0,745							
M5	M6	0,432	0,44	0,436	0,3950	134,05	98,11	100,5	2,38	5,00	102,10%
blk	blk	0,04	0,042	0,041							
ctrl	ctrl	0,738	0,754	0,746							

#	Real %AR	Teórico %AR	% Recuperación	Promedio Real %AR	Promedio Recuperación	Límite de Recuperación
1	4,802	4,90	98,00%	4,94	100,79%	98-101%
2	5,019		102,43%			
3	4,823		98,44%			
4	5,050		103,06%			
5	4,935		100,71%			
6	5,003		102,10%			

**Nivel medio**

ESQUEMA EN PLACA							
	1	2	3	4	5	6	7
A	1	1	ctrl	ctrl	blk	blk	
B	2	2	ctrl	ctrl	blk	blk	
C	3	3	ctrl	ctrl	blk	blk	
D	4	4	ctrl	ctrl	blk	blk	
E	5	5	ctrl	ctrl	blk	blk	
F	6	6	ctrl	ctrl	blk	blk	

PLACA VACÍA							
	1	2	3	4	5	6	7
A	0,044	0,044	0,043	0,045	0,043	0,045	
B	0,043	0,044	0,043	0,044	0,044	0,045	
D	0,045	0,044	0,044	0,043	0,045	0,044	
E	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,044	
F	0,043	0,044	0,043	0,044	0,044	0,045	
G	0,045	0,044	0,044	0,043	0,045	0,044	

DATOS							
	1	2	3	4	5	6	7
A	0,388	0,396	0,818	0,828	0,044	0,045	
B	0,384	0,391	0,816	0,825	0,043	0,045	
G	0,377	0,403	0,815	0,815	0,048	0,048	
H	0,377	0,4	0,81	0,813	0,047	0,047	
G	0,373	0,397	0,801	0,804	0,046	0,044	
H	0,379	0,380	0,804	0,803	0,045	0,046	

		Data 1	Data 2	Promedio	Δ A	F	w	mg	%H	%AR	% R
M1	M1	0,388	0,396	0,392	0,3475	121,5066829	85,61608	100,3	14,64	44,39	99,08%
blk	blk	0,044	0,045	0,045							
ctrl	ctrl	0,818	0,828	0,823							
M2	M2	0,384	0,391	0,388	0,343	121,2121212	85,10392	99,7	14,64	43,97	98,14%
blk	blk	0,043	0,043	0,045							
ctrl	ctrl	0,816	0,816	0,825							
M3	M3	0,377	0,403	0,390	0,342	123,4567901	85,01856	99,6	14,64	44,70	99,77%
blk	blk	0,048	0,048	0,048							
ctrl	ctrl	0,815	0,815	0,815							
M4	M4	0,377	0,400	0,389	0,3415	123,4567901	84,9332	99,5	14,64	44,68	99,72%
blk	blk	0,048	0,047	0,047							
ctrl	ctrl	0,815	0,813	0,810							
M5	M5	0,373	0,397	0,385	0,339	124,3781095	85,01856	99,6	14,64	44,63	99,63%
blk	blk	0,046	0,044	0,046							
ctrl	ctrl	0,804	0,801	0,804							
M6	M6	0,379	0,380	0,380	0,334	124,4555072	84,9332	99,5	14,64	44,05	98,32%
blk	blk	0,045	0,046	0,046							
ctrl	ctrl	0,804	0,803	0,804							

#	Real	Teórico	% Recuperación	Promedio % Almidón resistente	Promedio Recuperación	Límite de Recuperación
1	44,39	44,8	99,08%	44,31	98,90%	98-101%
2	44,07	44,8	98,38%			
3	44,42	44,8	99,16%			
4	44,27	44,8	98,82%			
5	44,63	44,8	99,63%			
6	44,05	44,8	98,32%			

## Nivel alto

ESQUEMA EN PLACA						
	1	2	3	4	5	
A	1	1	ctrl	ctrl	blk	blk
B	2	2	ctrl	ctrl	blk	blk
C	3	3	ctrl	ctrl	blk	blk
D	4	4	ctrl	ctrl	blk	blk
E	5	5	ctrl	ctrl	blk	blk
F	6	6	ctrl	ctrl	blk	blk

PLACA VACÍA						
	1	2	3	4	5	
A	0,045	0,044	0,045	0,044	0,043	0,045
B	0,045	0,045	0,043	0,044	0,043	0,043
C	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044
D	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,045
E	0,045	0,044	0,045	0,044	0,045	0,043
F	0,045	0,045	0,046	0,045	0,044	0,044

DATOS						
	1	2	3	4	5	
A	0,46	0,435	0,046	0,048	0,781	0,838
B	0,407	0,415	0,049	0,048	0,779	0,839
C	0,456	0,471	0,045	0,047	0,81	0,835
D	0,45	0,469	0,046	0,048	0,812	0,836
E	0,395	0,396	0,047	0,047	0,784	0,797
F	0,468	0,487	0,046	0,047	0,781	0,794

%R		63,4										
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M1	M1	0,46	0,435	0,4475		0,4005	123,5330451	82,9837	99,8	16,85	53,66	84,63%
blk	blk	0,046	0,048	0,047								
ctrl	ctrl	0,781	0,838	0,8095								
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M2	M2	0,407	0,415	0,411		0,3825	123,6093943	83,2332	100,1	16,85	48,45	76,42%
blk	blk	0,048	0,049	0,0485								
ctrl	ctrl	0,779	0,839	0,809								
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M3	M3	0,458	0,471	0,4635		0,4175	121,5805471	82,8174	99,6	16,85	55,16	87,01%
ctrl	ctrl	0,045	0,047	0,046								
blk	blk	0,81	0,835	0,8225								
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M4	M4	0,45	0,469	0,4595		0,413	121,3592233	83,15	100	16,85	54,25	85,57%
ctrl	ctrl	0,812	0,836	0,824								
blk	blk	0,046	0,047	0,0465								
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M5	M5	0,395	0,396	0,3955		0,3485	126,5022138	83,15	100	16,85	47,72	75,26%
ctrl	ctrl	0,047	0,047	0,047								
blk	blk	0,784	0,797	0,7905								
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
M6	M6	0,468	0,487	0,4775		0,431	126,984127	83,66575	100,50	16,85	58,94	92,97%
ctrl	ctrl	0,046	0,047	0,0465								
blk	blk	0,781	0,794	0,7875								

#	Real	Teórico	% Recuperación	Promedio % Almidón resistente	Promedio Recuperación n	Límite de Recuperación n
1	53,66	63,4	84,63%	53,03	83,64%	98-101%
2	48,45	63,4	76,42%			
3	55,16	63,4	87,01%			
4	54,25	63,4	85,57%			
5	47,72	63,4	75,26%			
6	58,94	63,4	92,97%			

## Repetibilidad & Reproducibilidad

### Nivel bajo

ESQUEMA EN PLACA										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	1	1	2	2	3	3	ctrl	ctrl	blk	blk
B	4	4	5	5	6	6	ctrl	ctrl	blk	blk
C	7	7	9	9	10	10	ctrl	ctrl	blk	blk
D	11	11	12	12	13	13	ctrl	ctrl	blk	blk
E	8	8					ctrl	ctrl	blk	blk
F	14	14	15	15	16	16	ctrl	ctrl	blk	blk
PLACA VACÍA										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0,043	0,043	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,044	0,045
B	0,045	0,045	0,043	0,044	0,043	0,045	0,044	0,045	0,045	0,044
C	0,043	0,044	0,045	0,045	0,045	0,044	0,043	0,045	0,043	0,044
D	0,045	0,044	0,044	0,044	0,045	0,045	0,043	0,044	0,044	0,043
E	0,044	0,043					0,44	0,044	0,044	0,042
F	0,045	0,046	0,045	0,044	0,044	0,042	0,043	0,043	0,043	0,043
DATOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0,467	0,476	0,462	0,475	0,467	0,462	0,882	0,87	0,049	0,05
B	0,475	0,48	0,463	0,464	0,487	0,494	0,843	0,86	0,047	0,046
C	0,441	0,431	0,419	0,442	0,433	0,43	0,85	0,84	0,048	0,049
D	0,386	0,389	0,397	0,394	0,384	0,39	0,736	0,754	0,042	0,041
E	0,434	0,456					0,868	0,861	0,046	0,046
F	0,384	0,386	0,397	0,394	0,389	0,39	0,738	0,754	0,04	0,042

		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,467	0,476	0,4715	0,4220	114,1552511	97,62	100	2,38	4,117
M2	M2	0,462	0,475	0,4685	0,4190	114,1552511	97,71762	100,1	2,38	4,084
M3	M3	0,467	0,462	0,4645	0,4150	114,1552511	97,32714	99,7	2,38	4,061
ctrl	ctrl	0,882	0,87	0,876						
blk	blk	0,049	0,05	0,0495						
M4	M4	0,475	0,48	0,4775	0,4310	117,4398121	97,71762	100,1	2,38	4,322
M5	M5	0,463	0,464	0,4635	0,4170	117,4398121	97,32714	99,7	2,38	4,198
M6	M6	0,487	0,494	0,4905	0,4440	117,4398121	97,2115	99,5	2,3	4,475
ctrl	ctrl	0,843	0,86	0,8515						
blk	blk	0,047	0,046	0,0465						
M8	M8	0,434	0,456	0,445	0,3990	115,6738	97,72	100,1	2,38	3,941
blk	blk	0,046	0,046	0,046						
ctrl	ctrl	0,868	0,861	0,8645						
M8	M8	0,441	0,431	0,436	0,3875	122,2493888	98,1081	100,5	2,38	4,028
M9	M9	0,419	0,442	0,4305	0,3820	122,2493888	97,62	100	2,38	3,991
M10	M10	0,433	0,43	0,4315	0,3830	122,2493888	98,1081	100,5	2,38	3,982
blk	blk	0,048	0,049	0,0485						
ctrl	ctrl	0,812	0,824	0,818						
M11	M11	0,386	0,389	0,3875	0,3460	134,2281879	97,62	100	2,38	3,969
M12	M12	0,397	0,394	0,3955	0,3540	134,2281879	97,62	100	2,38	4,061
M13	M13	0,39	0,384	0,387	0,3455	134,2281879	97,62	100	2,38	3,963
blk	blk	0,042	0,041	0,0415						
ctrl	ctrl	0,736	0,754	0,745						
M14	M14	0,381	0,385	0,383	0,3420	134,0482574	97,72	100,1	2,38	3,914
M15	M15	0,392	0,395	0,3935	0,3525	134,0482574	97,62	100	2,38	4,038
M16	M16	0,389	0,39	0,3895	0,3485	134,0482574	97,62	100	2,38	3,993
blk	blk	0,04	0,042	0,041						
ctrl	ctrl	0,738	0,754	0,746						

% AR	Bajo					
# de grupos	5					
Gran media AR%	4,024					
# Corrida	DÍAS					N
	1	2	3	4	5	
1	4,117103502	4,197973422	4,02842963	3,9692026	3,91414258	14
2	4,083751242	3,940553796	3,991108179	4,060976063	4,03834794	
3	4,060993296		3,981647867	3,96346675	3,99252271	
Promedio	4,087	4,069	4,000	3,998	3,982	
S <sub>2</sub>	0,000796442	0,033132432	0,00061182	0,002993889	0,00394506	
STD	0,028221306	0,182023163	0,024735001	0,054716444	0,06280972	

Origen de las variaciones	Varianza	SD	Media	RSDr	RSDR
Dentro de los grupos	0,005536317	0,07440643	4,024301397	1,84892798	1,887803539
Total	0,005771578	0,0759709			



		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,39	0,4	0,395	0,3505	121,5066829	84,9332	99,5	14,64	45,13
M2	M2	0,409	0,419	0,414	0,3695	121,5066829	85,61608	100,3	14,64	47,20
M3	M3	0,388	0,396	0,392	0,3475	121,5066829	85,61608	100,3	14,64	44,39
M4	M4	0,371	0,377	0,374	0,3295	121,5066829	85,36	100	14,64	42,21
M5	M5	0,227	0,235	0,231	0,1865	121,5066829	85,44536	100,1	14,64	23,87
M6	M6	0,354	0,366	0,36	0,3155	121,5066829	85,53072	100,2	14,64	40,34
M7	M7	0,384	0,391	0,3875	0,343	121,5066829	85,10392	99,7	14,64	44,07
blk	blk	0,044	0,045	0,0445						
ctrl	ctrl	0,818	0,828	0,823						
		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,373	0,389	0,381	0,337	121,8769043	85,44536	100,1	14,64	43,26
M2	M2	0,395	0,406	0,4005	0,3565	121,8769043	85,36	100	14,64	45,81
M3	M3	0,411	0,415	0,413	0,369	121,8769043	85,44536	100,1	14,64	47,37
blk	blk	0,043	0,045	0,044						
ctrl	ctrl	0,816	0,825	0,8205						
M4	M4	0,336	0,354	0,345	0,2995	124,4555072	85,01856	99,6	14,64	39,46
M5	M5	0,361	0,367	0,364	0,3185	124,4555072	85,44536	100,1	14,64	41,75
M6	M6	0,342	0,368	0,355	0,3095	124,4555072	85,10392	99,7	14,64	40,73
M7	M7	0,401	0,413	0,407	0,3615	124,4555072	85,10392	99,7	14,64	47,58
blk	blk	0,046	0,045	0,0455						
ctrl	ctrl	0,804	0,803	0,8035						
		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,345	0,374	0,3595	0,3145	124,6105919	85,18928	99,8	14,64	41,40
M2	M2	0,329	0,337	0,333	0,288	124,6105919	85,70144	100,4	14,64	37,69

		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,345	0,374	0,3595	0,3145	124,6105919	85,18928	99,8	14,64	41,40
M2	M2	0,329	0,337	0,333	0,288	124,6105919	85,70144	100,4	14,64	37,69
M3	M3	0,369	0,387	0,378	0,333	124,6105919	85,7868	100,5	14,64	43,53
M4	M4	0,351	0,374	0,3625	0,3175	124,6105919	85,18928	99,8	14,64	41,80
M5	M5	0,373	0,397	0,385	0,34	124,6105919	85,44536	100,1	14,64	44,63
M6	M6	0,388	0,393	0,3905	0,3455	124,6105919	84,9332	99,5	14,64	45,62
blk	blk	0,044	0,046	0,045						
ctrl	ctrl	0,801	0,804	0,8025						
M7	M7	0,377	0,403	0,39	0,342	122,6993865	85,01856	99,6	14,64	44,42
blk	blk	0,048	0,048	0,048						
ctrl	ctrl	0,815	0,815	0,815						
		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,351	0,366	0,3585	0,3115	123,228589	85,53072	100,2	14,64	40,39
M2	M2	0,377	0,4	0,3885	0,3415	123,228589	84,9332	99,5	14,64	44,59
M3	M3	0,376	0,389	0,3825	0,3355	123,228589	85,01856	99,6	14,64	43,77
M4	M4	0,25	0,263	0,2565	0,2095	123,228589	85,01856	99,6	14,64	27,33
M5	M5	0,39	0,401	0,3955	0,3485	123,228589	85,44536	100,1	14,64	45,23
M6	M6	0,366	0,386	0,376	0,329	123,228589	85,24516	100,1	14,84	42,80
blk	blk	0,047	0,047	0,047						
ctrl	ctrl	0,81	0,813	0,8115						

% AR	Medio				
f de grupos	4				
Gran media AR%	43,984				
# Corrida	Días				N
	1	2	3	4	
1	45,13	43,26	41,40		22
2	47,20	45,81	43,53	44,59	
3	44,39	47,37	41,80	43,77	
4	42,21	41,75	44,63	45,23	
5	40,34	40,73	45,62	42,80	
6	44,07	47,58	44,42		
Promedio	43,889	44,418	43,567	44,099	
STD	2,373500046	2,920753454	1,666447398	1,05235496	
S <sub>2</sub>	5,633502468	8,530800736	2,77704693	1,10745097	

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Varianza	SD	Media	% RSDr	% RSDR
Dentro de los grupos	4,89	2,211			
Total	4,300	2,074	43,98	5,03	4,71

## Nivel alto

		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,417	0,448	0,4325		0,3855	123,5330451	83,06685	99,9	16,85	51,60
M2	M2	0,364	0,38	0,372		0,325	123,5330451	82,9837	99,8	16,85	43,54
M3	M3	0,38	0,364	0,372		0,325	123,5330451	82,9837	99,8	16,85	43,54
M4	M4	0,383	0,451	0,417		0,37	123,5330451	83,3163	100,2	16,85	49,37
M5	M5	0,472	0,446	0,459		0,412	123,5330451	82,90055	99,7	16,85	55,25
M6	M6	0,465	0,436	0,4505		0,4035	123,5330451	82,9837	99,8	16,85	54,06
M7	M7	0,415	0,435	0,425		0,378	123,5330451	83,06685	99,9	16,85	50,59
blk	blk	0,049	0,048	0,0485							
ctrl	ctrl	0,779	0,839	0,809							
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,383	0,397	0,39		0,343	123,5330451	83,4826	100,4	16,85	45,68
M2	M2	0,406	0,417	0,4115		0,3645	123,5330451	83,2332	100,1	16,85	48,69
M3	M3	0,388	0,394	0,391		0,344	123,5330451	83,1500	100,00	16,85	46,00
blk	blk	0,046	0,048	0,047							
ctrl	ctrl	0,781	0,838	0,8095							
M4	M4	0,457	0,468	0,4625		0,4165	121,5805471	82,8174	99,6	16,85	55,03
M5	M5	0,421	0,434	0,4275		0,3815	121,5805471	83,06685	99,9	16,85	50,25
M6	M6	0,466	0,48	0,473		0,427	121,5805471	83,23315	100,1	16,85	56,14
M7	M7	0,424	0,426	0,425		0,379	121,5805471	82,90055	99,7	16,85	50,03
ctrl	ctrl	0,812	0,836	0,824							
blk	blk	0,046	0,048	0,047							

		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,456	0,471	0,4635		0,4175	121,5805471	83,4826	100,4	16,85	54,72
M2	M2	0,421	0,429	0,425		0,379	121,5805471	83,56575	100,5	16,85	49,63
M3	M3	0,455	0,472	0,4635		0,4175	121,5805471	83,15	100	16,85	54,94
M4	M4	0,425	0,446	0,4355		0,3895	121,5805471	82,9837	99,8	16,85	51,36
M5	M5	0,397	0,403	0,4		0,354	121,5805471	82,9837	99,8	16,85	46,68
M6	M6	0,462	0,454	0,458		0,412	121,5805471	83,15	100	16,85	54,22
ctrl	ctrl	0,81	0,835	0,8225							
blk	blk	0,045	0,047	0,046							
M7	M7	0,365	0,396	0,3805		0,3335	126,5022138	82,90055	99,70	16,85	45,80
M8	M8	0,356	0,385	0,3705		0,3235	126,5022138	82,8174	99,60	16,85	44,47
ctrl	ctrl	0,784	0,797	0,7905							
blk	blk	0,047	0,047	0,047							
		Data 1	Data 2	Promedio		$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR
M1	M1	0,47	0,489	0,4795		0,433	126,984127	83,56575	100,50	16,85	59,22
M2	M2	0,407	0,424	0,4155		0,369	126,984127	83,39945	100,30	16,85	50,57
M3	M3	0,357	0,372	0,3645		0,318	126,984127	83,4826	100,40	16,85	43,53
M4	M4	0,461	0,46	0,4605		0,414	126,984127	83,15	100,00	16,85	56,90
M5	M5	0,393	0,41	0,4015		0,355	126,984127	83,15	100,00	16,85	48,79
M6	M6	0,356	0,372	0,364		0,3175	126,984127	83,23315	100,10	16,85	43,60
M7	M7	0,393	0,403	0,398		0,3515	126,984127	83,06685	99,90	16,85	48,36
M8	M8	0,38	0,396	0,388		0,3415	126,984127	82,9837	99,80	16,85	47,03

AR %	Alto				
# de grupos	4				
Gran media AR%	52,486				
# Corrida	Días				N 20
	1	2	3	4	
1	51,60	48,69	54,72	48,36	
2	49,37	55,03	49,63	59,22	
3	55,25	50,25	54,94	50,57	
4	54,06	56,14	51,36	56,90	
5	50,59	50,03	54,22	48,79	
Promedio	52,176	52,027	52,974	52,768	
STD	2,435084266	3,323920197	2,360358139	4,969137424	
S <sub>2</sub>	5,92963538	11,04844547	5,571290545	24,69232674	

Origen de las variaciones			Media	% RSDr	% RSDR
	Varianza	SD			
Dentro de los grupos	11,810	3,437	52,486	6,548	6,058
Total	10,110	3,180			

## Robustez

ESQUEMA EN PLACA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	blk	blk
B	ctrl	ctrl	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
C	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	blk	blk
D	ctrl	ctrl	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
E	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	blk	blk
F	ctrl	ctrl	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
G	blk	blk	ctrl	ctrl	1	1	2	2	3	3	4	4
H	5	5	blk	blk	ctrl	ctrl						

- 1: 1.5 ml de solución KOH 2 M
- 2: Baño Seco digital 50 C \* 30 minutos a 200 rpm
- 3: 80 mg de muestra
- 4: 3 ml de la solución enzimática amilasa-AMG 300 U/ml
- 5: 0.3 gramos de amilasa en 80 ml de buffer pH 6
- 6: 16.5 horas de incubación a 50°C para solubilizar el almidón
- 7: Incubar a 48 C con AMG 3000 U/ ml por 30 minutos

PLACA VACÍA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,045	0,045	0,045	0,045	0,044	0,048	0,044
B	0,045	0,044	0,045	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,045	0,045
C	0,043	0,045	0,045	0,044	0,044	0,045	0,044	0,044	0,044	0,045	0,045	0,044
D	0,045	0,043	0,044	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,046	0,045	0,046	0,045
E	0,044	0,045	0,045	0,045	0,044	0,045	0,044	0,046	0,043	0,045	0,043	0,045
F	0,043	0,043	0,044	0,045	0,045	0,044	0,045	0,045	0,046	0,045	0,046	0,045
G	0,045	0,045	0,045	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,045	0,045
H	0,044	0,043	0,044	0,045	0,045	0,045						

DATOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,442	0,446	0,437	0,439	0,44	0,443	0,436	0,436	0,407	0,408	0,042	0,043
B	0,82	0,81	0,438	0,439	0,441	0,443	0,415	0,416	0,446	0,447	0,44	0,442
C	0,361	0,36	0,357	0,356	0,346	0,346	0,357	0,357	0,349	0,347	0,045	0,047
D	0,816	0,815	0,415	0,416	0,351	0,352	0,395	0,406	0,424	0,423	0,435	0,436
E	0,346	0,363	0,312	0,321	0,322	0,346	0,338	0,351	0,353	0,327	0,048	0,046
F	0,771	0,819	0,333	0,323	0,294	0,304	0,304	0,325	0,287	0,304	0,314	0,333
G	0,048	0,049	0,805	0,83	0,322	0,328	0,31	0,324	0,323	0,339	0,307	0,322
H	0,327	0,339	0,048	0,049	0,814	0,809						

	%AR	48,3									
		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
1	1	0,44	0,45	0,44	0,40	122,17	89,50	99,70	10,23	49,33	102,13%
	2	0,44	0,44	0,44	0,40	122,17	90,13	100,40	10,23	48,25	99,90%
	3	0,44	0,44	0,44	0,40	122,17	90,04	100,30	10,23	48,73	100,88%
	4	0,44	0,44	0,44	0,39	122,17	89,41	99,60	10,23	48,39	100,19%
	5	0,41	0,41	0,41	0,37	122,17	90,22	100,50	10,23	44,49	92,10%
	blk	0,04	0,04	0,04							
	ctrl	0,82	0,82	0,82							
2	1	0,44	0,44	0,44	0,40	122,17	89,86	100,10	10,23	48,46	100,32%
	2	0,44	0,44	0,44	0,40	122,17	89,77	100,00	10,23	48,93	101,31%
	3	0,42	0,42	0,42	0,37	122,17	90,13	100,40	10,23	45,51	94,22%
	4	0,45	0,45	0,45	0,40	122,17	90,22	100,50	10,23	49,24	101,94%
	5	0,44	0,44	0,44	0,40	122,17	89,59	99,80	10,23	48,91	101,26%
		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
3	1	0,361	0,360	0,3605	0,3145	122,6242	71,6365	79,8	10,23	48,451	100,31%
	2	0,357	0,356	0,3565	0,3105	122,6242	72,1751	80,4	10,23	47,478	98,30%
	3	0,346	0,346	0,3460	0,3000	122,6242	71,7262	79,9	10,23	46,16	95,57%
	4	0,357	0,357	0,3570	0,3110	122,6242	71,6365	79,8	10,23	47,912	99,20%
	5	0,349	0,347	0,3480	0,3020	122,6242	72,1751	80,4	10,23	46,178	95,61%
	blk	0,045	0,047	0,0460							
	ctrl	0,816	0,815	0,8155							
4	1	0,415	0,416	0,4155	0,3695	122,6242	89,8598	100,1	10,23	45,38	93,96%
	2	0,351	0,352	0,3515	0,3055	122,6242	89,6802	99,9	10,23	37,595	77,84%
	3	0,395	0,406	0,4005	0,3545	122,6242	89,9495	100,2	10,23	43,495	90,05%
	4	0,424	0,423	0,4235	0,3775	122,6242	89,5007	99,7	10,23	46,549	96,37%
	5	0,435	0,436	0,4355	0,3895	122,6242	89,5905	99,8	10,23	47,98	99,34%

	AR %	44									
		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
5	1	0,346	0,363	0,3545	0,3075	125,7862	85,16	100	14,84	40,878	92,90%
	2	0,312	0,321	0,3165	0,2695	125,7862	84,9897	99,8	14,84	35,898	81,59%
	3	0,322	0,346	0,3340	0,2870	125,7862	85,0748	99,9	14,84	38,191	86,80%
	4	0,338	0,351	0,3445	0,2975	125,7862	85,5006	100,4	14,84	39,391	89,52%
	5	0,353	0,327	0,3400	0,2930	125,7862	84,9897	99,8	14,84	39,028	88,70%
	blk	0,048	0,046	0,0470							
	ctrl	0,771	0,819	0,7950							
6	1	0,333	0,323	0,3280	0,2820	122,3242	85,5006	100,4	14,84	36,311	82,52%
	2	0,294	0,304	0,2990	0,2530	122,3242	85,4155	100,3	14,84	32,609	74,11%
	3	0,304	0,325	0,3145	0,2685	122,3242	85,3303	100,2	14,84	34,641	78,73%
	4	0,287	0,304	0,2955	0,2495	122,3242	85,4155	100,3	14,84	32,158	73,09%
	5	0,314	0,333	0,3235	0,2775	122,3242	85,16	100	14,84	35,874	81,53%
	blk	0,048	0,049	0,0485							
	ctrl	0,805	0,830	0,8175							
		Data 1	Data 2	Promedio	$\Delta A$	F	w	mg	%H	%AR	% R
7	1	0,322	0,328	0,3250	0,2765	123,2286	85,16	100	14,84	36,009	81,84%
	2	0,310	0,324	0,3170	0,2685	123,2286	84,8194	99,6	14,84	35,108	79,79%
	3	0,323	0,339	0,3310	0,2825	123,2286	85,4155	100,3	14,84	36,681	83,36%
	4	0,307	0,322	0,3145	0,2660	123,2286	85,0748	99,9	14,84	34,676	78,81%
	5	0,327	0,339	0,3330	0,2845	123,2286	85,0748	99,9	14,84	37,088	84,29%
	blk	0,048	0,049	0,0485							
	ctrl	0,814	0,809	0,8115							

	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>M1</b>	36,0092	36,3107	40,877549	45,38033	48,45126	100,32%	49,33
<b>M2</b>	35,1078	32,6091	35,89781	43,49465	47,47805	101,31%	48,25
<b>M3</b>	36,6806	34,6414	38,19057	46,54887	46,15957	94,22%	48,73
<b>M4</b>	34,6764	32,158	39,390635	47,98044	47,91206	101,94%	48,39
<b>M5</b>	37,0881	35,8742	39,028046		46,17833	101,26%	44,49
<b>Promedio</b>	35,91	34,32	38,68	45,85	47,24	1,00	47,84
<b>Desviación Estándar</b>	1,02	1,88	1,83	1,90	1,03	0,03	1,92
<b>% Recuperación</b>	81,62%	78,00%	87,90%	94,93%	97,80%	2,07%	99,04%
<b>Sesgo</b>	8,09	9,68	5,32	2,45	1,06	47,30	0,46

## 8. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Selectividad:

**Prueba t para 2 muestras suponiendo varianzas desiguales**

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5,02657799	0,31709982
Varianza	0,04985952	0,00233415
Observaciones	8	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	58,5679195	
P(T<=t) una cola	4,0111E-12	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954804	
P(T<=t) dos colas	8,0223E-12	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600414	

## Repetibilidad & Reproducibilidad: ANOVA de un factor

### Nivel bajo

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	12,26184804	4,08728268	0,000796442		
Columna 2	2	8,138527218	4,069263609	0,033132432		
Columna 3	3	12,00118568	4,000395225	0,00061182		
Columna 4	3	11,9936454	3,997881802	0,002993889		
Columna 5	3	11,94501322	3,981671075	0,003945061		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,025	4,000	0,006	1,138105802	0,39807624	3,633088511
Dentro de los grupos	0,050	9,000	0,006			
Total	0,075	13,000				

### Nivel medio

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	6	263,3357266	43,88928777	5,63350247		
Columna 2	6	266,5086614	44,41811024	8,53080074		
Columna 3	6	261,4037129	43,56728548	2,77704693		
Columna 4	4	176,3965692	44,09914229	1,10745097		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,279	3,000	0,760	0,15536696	0,92486073	3,15990759
Dentro de los grupos	88,029	18,000	4,891			
Total	90,309	21,000				

### Nivel alto

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	5	260,877823	52,1755646	5,92963538		
Columna 2	5	260,1336575	52,0267315	11,04844547		
Columna 3	5	264,868446	52,9736892	5,571290545		
Columna 4	5	263,8390426	52,76780851	24,69232674		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3,123	3,000	1,041	0,088136047	0,965527612	3,23887152
Dentro de los grupos	188,967	16,000	11,810			
Total	192,090	19,000				

### Robustez: Prueba F

	7	6	5	4	3	2	1
<b>M1</b>	36,0092	36,310689	40,877549	45,38033	48,45126	100,32%	49,33
<b>M2</b>	35,10777	32,60909	35,89781	43,49465	47,47805	101,31%	48,25
<b>M3</b>	36,68055	34,641418	38,19057	46,54887	46,159574	94,22%	48,73
<b>M4</b>	34,67644	32,157976	39,390635	47,98044	47,912057	101,94%	48,39
<b>M5</b>	37,08815	35,874188	39,028046		46,178329	101,26%	44,49
<b>Varianza (SB<sup>2</sup>)</b>	1,04	3,52	3,36	3,60	1,07	0,00	3,68
<b>Varianza método estándar (SA<sup>2</sup>)</b>	4,243338	4,2433376	4,2433376	4,243338	4,2433376	4,243338	4,24333761
<b>Fcal</b>	1,244903	1,8297244	1,7915606	1,848032	1,2515625	1,000239	1,86738307
<b>c</b>	2						
<b>n</b>	27	27	27	26	27	27	27
<b>GLN (c-1)</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>GLD (n-c)</b>	25	25	25	24	25	25	25
<b>Fteórico <math>\alpha= 0,05</math></b>	5,6864	5,6864	5,6864	5,7166	5,6864	5,6864	5,6864

## 9. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**Selectividad:** La prueba T student indica que la muestra A y la muestra B son muestras estadísticamente diferentes.

**Límite de detección:** El %R teórico fue  $\approx 9.4\%$  que equivale a un  $\approx 0.46\%$ AR. El % R real fue  $60.87\%$  que equivale a  $2.98\%$ AR. El porcentaje de almidón resistente obtenido es mayor que el valor teórico.

**Límite de cuantificación:** El %R teórico fue  $\approx 16.3\%$  que equivale a un  $\approx 0.80\%$ AR. El % R real fue  $83.44\%$  que equivale a  $4.02\%$ AR. El porcentaje de almidón resistente obtenido es mayor que el valor teórico.

**Linealidad:** Las gráficas evidencian una pendiente positiva porque se observó que los valores en el eje x (mg/ml) incrementan al igual que los valores del eje y (abs). Adicional,  $R^2$  tuvo un ajuste  $0.9982$  el cual es cercano a 1, es decir que las predicciones de concentración son totalmente fiables.

**Intervalo de trabajo:** El rango de trabajo propuesto está en el rango  $2\% - 64\%$ . El experimento mostró un rango de  $3.91 - 58.92$ . A nivel alto se realizó una disolución previa a la disolución del almidón resistente

**Exactitud:** El nivel bajo y medio tuvieron una recuperación entre  $98-101\%$

**Precisión:** Todos los datos de la prueba F en los tres niveles son menores que F crítico es decir que realmente los datos provienen de un mismo grupo de mediciones, esto es, que la media es similar. La repetibilidad y reproducibilidad es menor a nivel bajo y solo en reproducibilidad a nivel medio

**Robustez:** El resultado estadístico F, en todos los resultados, es menor que el F crítico, por lo tanto, estadísticamente no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula. El proceso puede ser considerado como robusto. El proceso puede ser considerado como robusto, sin embargo, las variables # 3 hasta # 7 son escenarios a controlar para no afectar la calidad del ensayo.

## 10. Cuadro resumen [desempeño, objetivos, resultados, conclusión]

<b>Parámetro de desempeño</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusión</b>
<b>Selectividad</b>	tcal > t crítico entonces hay diferencia significativa a un nivel de confianza de 95%	tcal: 58,57 tcrítico:1.86	Cumple
<b>Límite de Detección</b>	%AR: 1 y R min 50%	%AR: 2.98, R: 60.87%	No cumple
<b>Límite de cuantificación</b>	%AR: 2 y R min 70%	%AR: 4.02, R: 83.44%	No cumple
<b>Linealidad</b>	$R^2 \geq 0.991$	$R^2=0.9983$	Cumple
<b>Intervalo de trabajo</b>	2 % - 64 % AR R min 70%	4.02% - 50.98 %AR	No cumple
<b>Exactitud</b>	98-101 %	Nivel bajo: 100.79% Nivel medio: 98.90% Nivel alto: 83.64%	Cumple Cumple No cumple

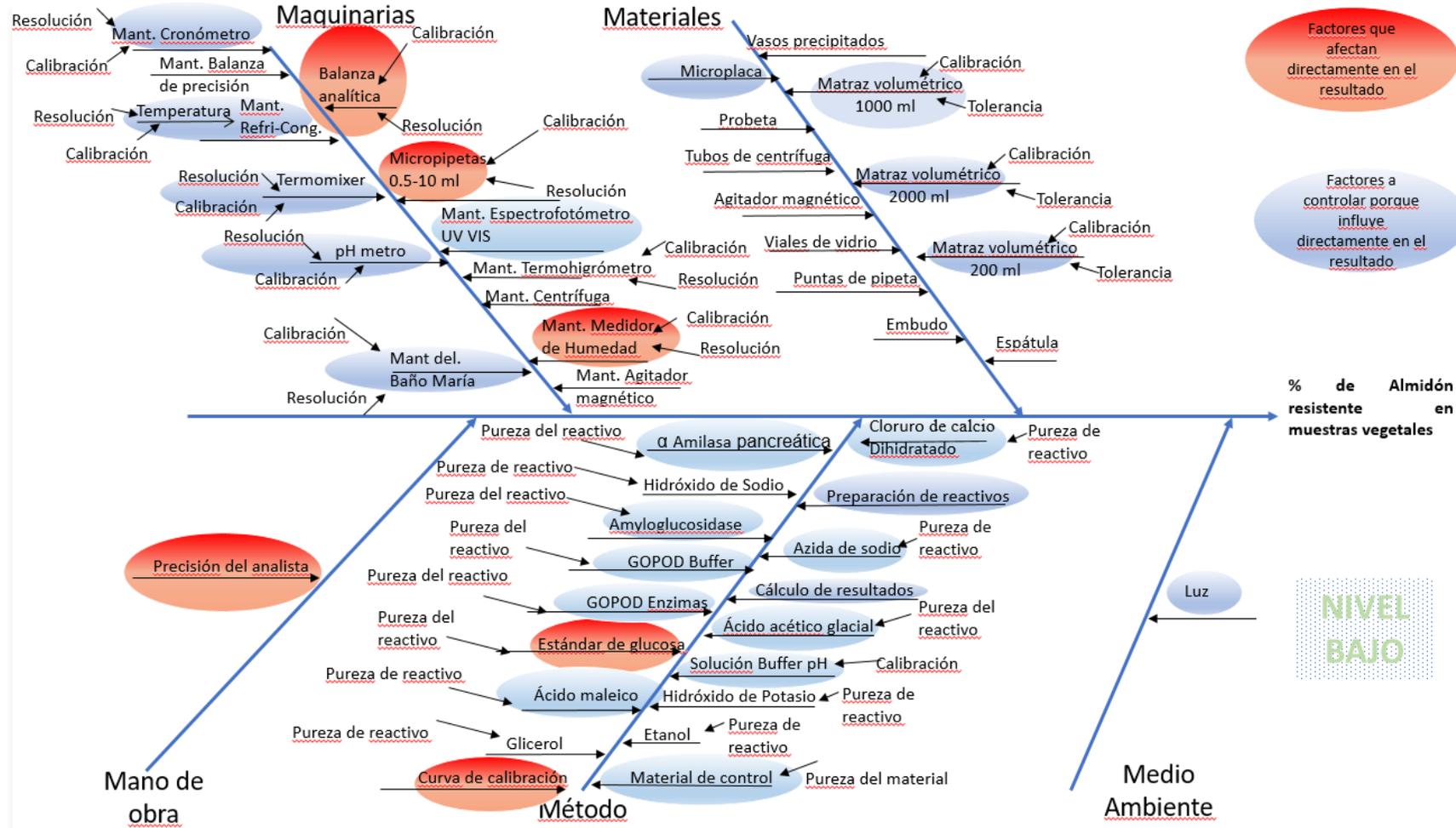
<b>Repetibilidad</b>	<b>Nivel bajo</b>		
	% RSDr: máx 2.42 %	% RSDr: 1.85%	Cumple
	<b>Nivel medio</b>		
	% RSDr: máx 3.18 %	% RSDr: 5.03 %	No cumple
	<b>Nivel alto</b>		
	% RSDr: máx 4.20 %	% RSDr: 6.55 %	No cumple
<b>Reproducibilidad</b>	<b>Nivel bajo</b>		
	% RSDr: máx 4.58%	% RSDr: 1.89%	Cumple
	<b>Nivel medio</b>		
	% RSDr: máx 8.47%	% RSDr: 4.71%	Cumple

	Nivel alto		
	% RSDR: máx 5.94%	% RSDr: 6.06%	No cumple
<b>Robustez</b>	<p><b>Prueba F</b></p> <p>Si <math>F_{cal} \leq F</math> entonces el proceso puede ser considerado robusto.</p>	<p>1.- <math>F_{cal} = 1.79</math>, <math>F = 5.69</math></p> <p>2.- <math>F_{cal} = 1.51</math>, <math>F = 5.69</math></p> <p>3.- <math>F_{cal} = 1.23</math>, <math>F = 5.69</math></p> <p>4.- <math>F_{cal} = 1.77</math>, <math>F = 5.72</math></p> <p>5.- <math>F_{cal} = 1.72</math>, <math>F = 5.69</math></p> <p>6.- <math>F_{cal} = 1.77</math>, <math>F = 5.69</math></p> <p>7.- <math>F_{cal} = 1.17</math>, <math>F = 5.69</math></p>	Cumple

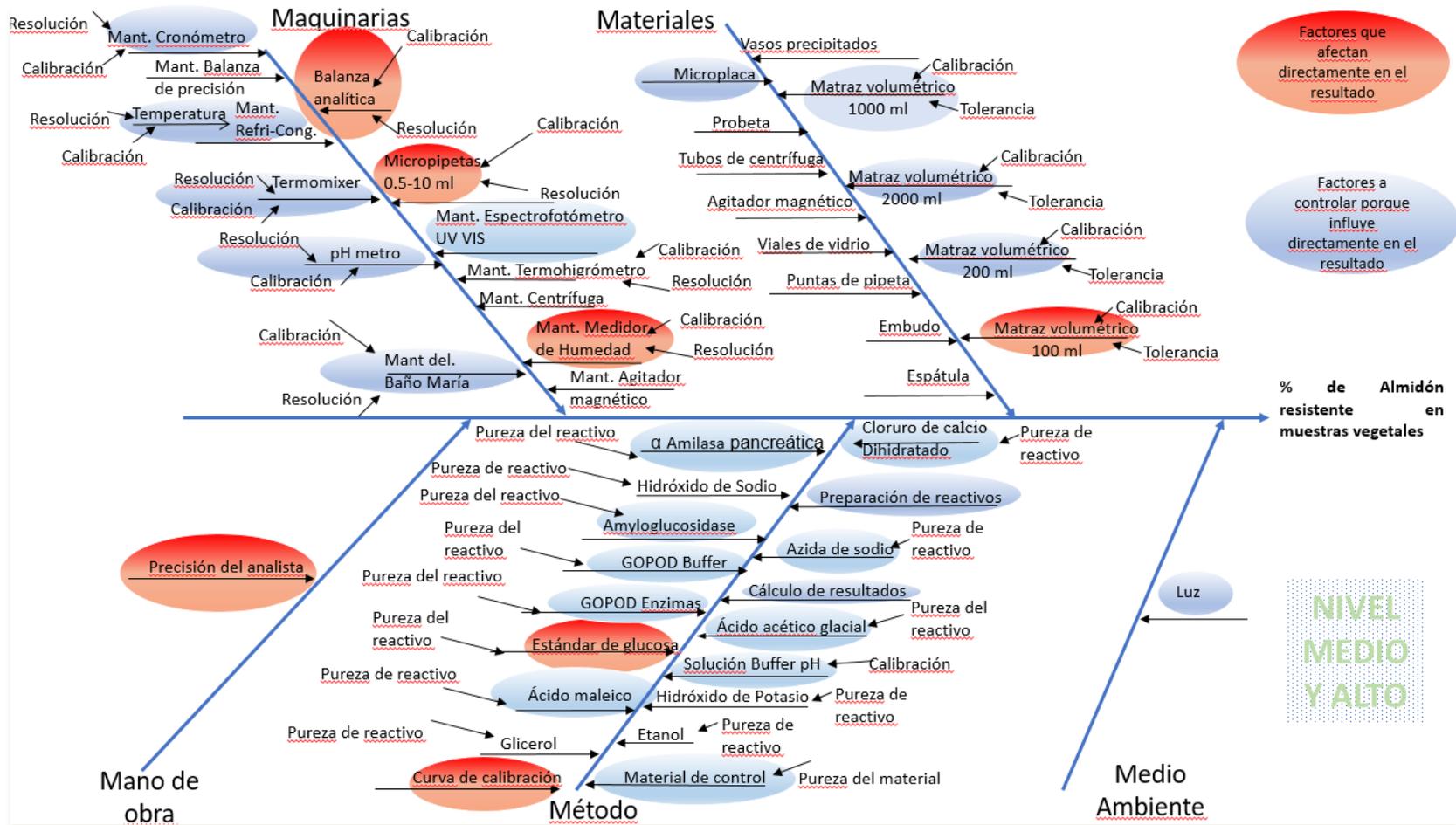
## 11. IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES

- Diagrama de Ishikawa

# Nivel bajo



## Nivel medio y alto



○ Cálculo de Incertidumbre: Tabla de estimación por nivel

Nivel bajo

Parámetro: RS	Porcentaje:	4,02									
Abreviatura: U (incertidumbre), R (resolución), T (tolerancia)											
MANO DE OBRA	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	INCERTIDUMBRE			DISTRIBUCIÓN			U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>	
			Tipo	U-R-T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)				
	Personal	-	A	-	-	-	2	0,081796571	0,020347408		
<b>TOTAL</b>									<b>0,020347408</b>		

MÉTODO (Pureza)	Fuentes que afectan mis resultados	Pureza teórica	Tipo	Pureza real	Divisor Rango Tolerancia	DISTRIBUCIÓN		U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>
						Tipo	Denominador (Divisor)		
	Estándar de glucosa 1 mg/ml	100	B	99,4	0,6	Triangular	2,449489743	0,244948974	0,00244948
<b>TOTAL</b>									<b>0,00244948</b>

MÉTODO (Calibración)	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	INCERTIDUMBRE			DISTRIBUCIÓN			U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>
			Tipo	U-R-T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)			
	Curva de calibración	4,02	A	-	-	-	-	0,023719124	0,00590028	
<b>TOTAL</b>									<b>0,00590028</b>	

Maquinarias (Resolución)	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	INCERTIDUMBRE			DISTRIBUCIÓN			U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>
			Tipo	U-R-T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)			
	Balanza analítica (gramos)	220	B	0,0001	2	Rectangular	1,732050808	2,88675E-05	1,31216E-07	
	Micropipetas 0,5-10 ul	10	B	0,01	1	Rectangular	1,732050808	0,005773503	0,00057735	
	Micropipetas 10-100 ul	100	B	0,1	1	Rectangular	1,732050808	0,057735027	0,00057735	
	Micropipetas 100-1000 ul	1000	B	1	1	Rectangular	1,732050808	0,577350269	0,00057735	
	Micropipeta 30-300 ul	300	B	0,2	1	Rectangular	1,732050808	0,115470054	0,0003949	
	Micropipetas 1-10 ml	10	B	0,01	1	Rectangular	1,732050808	0,005773503	0,00057735	
	Medidor de humedad °C	200	B	1	2	Rectangular	1,732050808	0,288675135	0,001443376	
	Medidor de humedad g	70	B	0,001	2	Rectangular	1,732050808	0,000288675	4,12393E-06	
<b>TOTAL</b>									<b>0,004141932</b>	

Maquinarias (calibración)	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U-R-T	Divisor Rango Tolerancia	DISTRIBUCIÓN		U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>
						Tipo	Denominador (Divisor)		
	Balanza analítica (gramos)	0,1	B	0,000082	2	Normal	2	0,000041	0,00041
	Micropipetas 0,5-10 ul	10	B	0,01	1	Normal	2,04	0,004901961	0,00490196
	Micropipetas 10-100 ul	100	B	0,13	1	Normal	2,01	0,064676617	0,00646766
	Micropipetas 100-1000 ul	1000	B	1,3	1	Normal	2	0,65	0,00065
	Micropipeta 30-300 ul	300	B	0,55	1	Normal	2,08	0,264423077	0,0008141
	Micropipetas 1-10 ml	10	B	0,013	1	Normal	2,02	0,006435644	0,000643564
	Medidor de humedad °C	130	B	0,96	2	Normal	2	0,48	0,003692308
	Medidor de humedad g	10	B	0,00082	2	Normal	2	0,00041	0,000041
<b>TOTAL</b>									<b>0,007455245</b>

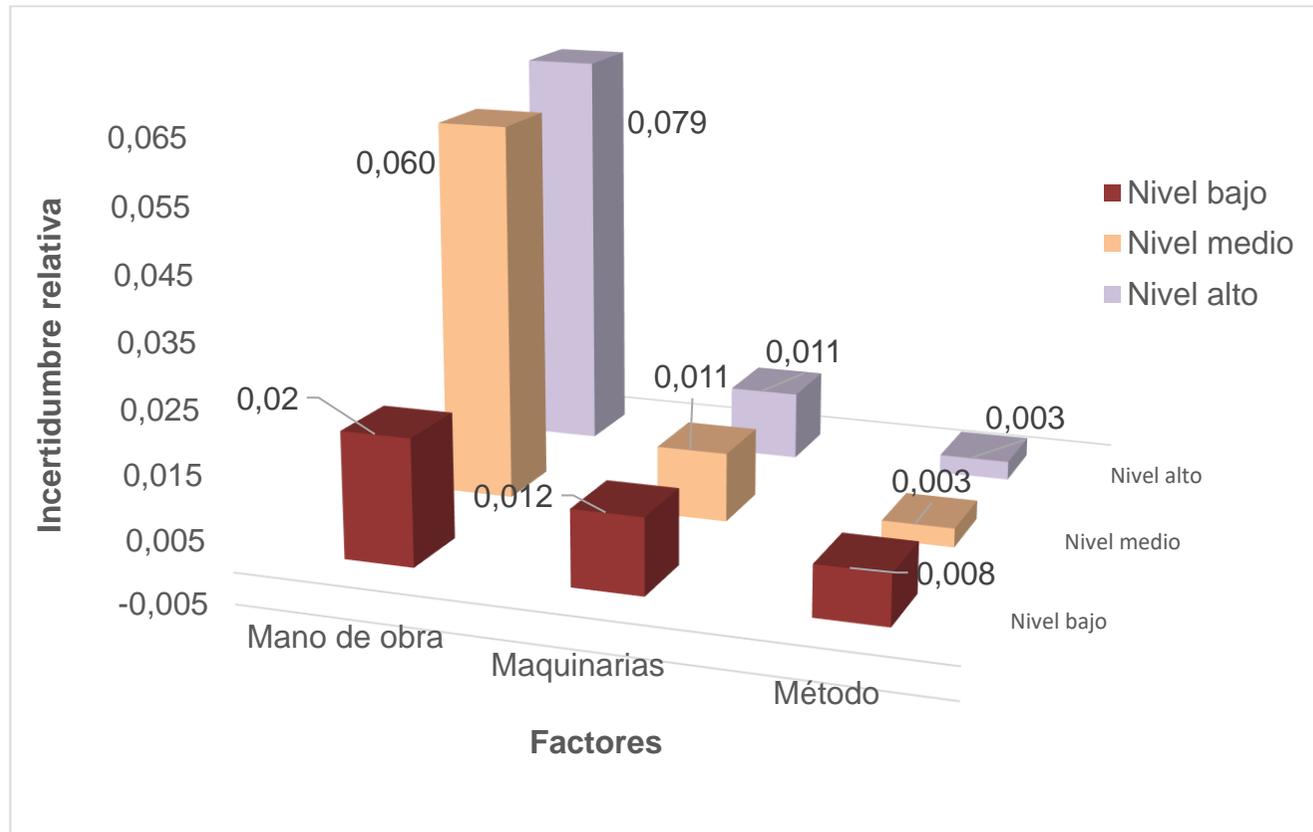
## Nivel medio

Parámetro: RS	Porcentaje:	43,98																				
Abreviatura: U (incertidumbre), R (resolución), T (tolerancia)																						
			INCERTIDUMBRE				DISTRIBUCIÓN															
MANO DE OBRA	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U-R-T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>jyx</sub>													
	Personal	-	A	-	-	-	2	2,644759667	0,060130246													
	<b>TOTAL</b>																					
									0,060130246													
			INCERTIDUMBRE				DISTRIBUCIÓN															
MÉTODO (Calibración)	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U-R-T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>jyx</sub>													
	Curva de calibración	43,98384864	A	-	-	-	-	0,021137785	0,000480581													
	<b>TOTAL</b>																					
									0,000480581													
			INCERTIDUMBRE				DISTRIBUCIÓN															
MÉTODO (Pureza)	Fuentes que afectan mis resultados	Pureza teórica	Tipo	Pureza real	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>jyx</sub>													
	Estándar de glucosa 1 mg/ml	100	B	99,4	0,6	Triangular	2,44548723	0,244948974	0,00244548													
	<b>TOTAL</b>																					
									0,00244548													
			INCERTIDUMBRE				DISTRIBUCIÓN															
Maquinarias (Resolución)	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U-R-T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>jyx</sub>													
	Balanza analítica (gramos)	220	B	0,0001	2	Rectangular	1,732050808	2,88675E-05	1,31216E-07													
	Micropipetas 10-100 µl	100	B	0,1	1	Rectangular	1,732050808	0,057735027	0,00057735													
	Micropipetas 100-1000 µl	1000	B	1	1	Rectangular	1,732050808	0,577350269	0,00057735													
	Micropipeta 30-300 µl	300	B	0,2	1	Rectangular	1,732050808	0,115470054	0,0003849													
	10	10	B	0,01	1	Rectangular	1,732050808	0,005773503	0,00057735													
	Medidor de humedad °C	200	B	1	2	Rectangular	1,732050808	0,288675135	0,001443376													
	Medidor de humedad g	70	B	0,001	2	Rectangular	1,732050808	0,000288675	4,12393E-06													
<b>TOTAL</b>																						
									0,003564582													
			INCERTIDUMBRE				DISTRIBUCIÓN															
Materiales de laboratorio	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U-R-T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>jyx</sub>													
	Matriz volumétrica 100 mL-tolerancia (mL)	100	B	0,1	2	Rectangular	1,732050808	0,028867513	0,000288675													
	<b>TOTAL</b>																					
									0,000288675													
			INCERTIDUMBRE				DISTRIBUCIÓN															
Materiales de laboratorio	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	Incertidumbre	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>jyx</sub>													
	Matriz volumétrica 100 mL-tolerancia (mL)	100	B	0,0082	2	Normal	2	0,0041	0,000041													
	<b>TOTAL</b>																					
									0,000041													

## Nivel alto

Parámetro: %RS	Porcentaje:	52,49																
Abreviatura: U (incertidumbre), R (resolución), T (tolerancia)																		
			INCERTIDUMBRE					DISTRIBUCIÓN										
MANO DE OBRA	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U- R- T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>									
	Personal	-	A	-	-	-	2	4,170438394	0,079458189									
<b>TOTAL</b>																		
			INCERTIDUMBRE					DISTRIBUCIÓN										
MÉTODO (Calibración)	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U- R- T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>									
	Curva de calibración	52,46594845	A	-	-	-	-	0,019341723	0,000368512									
<b>TOTAL</b>																		
			INCERTIDUMBRE					DISTRIBUCIÓN										
MÉTODO (Pureza)	Fuentes que afectan mis resultados	Pureza teórica	Tipo	Pureza real	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>									
	Estándar de glucosa 1 mg/ml	100	B	99,4	0,6	Triangular	2,449489743	0,244948974	0,00244949									
<b>TOTAL</b>																		
			INCERTIDUMBRE					DISTRIBUCIÓN										
Maquinarias (Resolución)	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U- R- T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>									
	Balanza analítica (gramos)	220	B	0,0001	2	Rectangular	1,732050808	2,88675E-05	1,31216E-07									
	Micropipetas 10-100 ul	100	B	0,1	1	Rectangular	1,732050808	0,057735027	0,00057735									
	Micropipetas 100-1000 ul	1000	B	1	1	Rectangular	1,732050808	0,577350269	0,00057735									
	Micropipeta 30-300 ul	300	B	0,2	1	Rectangular	1,732050808	0,115470054	0,00038499									
	Micropipetas 1-10 ml	10	B	0,01	1	Rectangular	1,732050808	0,005773503	0,00057735									
	Medidor de humedad °C	200	B	1	2	Rectangular	1,732050808	0,289875136	0,001443376									
	Medidor de humedad g	70	B	0,001	2	Rectangular	1,732050808	0,000288675	4,12393E-06									
<b>TOTAL</b>																		
			INCERTIDUMBRE					DISTRIBUCIÓN										
Maquinarias (calibración)	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U- R- T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>									
	Balanza analítica (gramos)	0,1	B	0,00082	2	Normal	2	0,000041	0,00041									
	Micropipetas 10-100 ul	100	B	0,13	1	Normal	2,01	0,084678617	0,000846786									
	Micropipetas 100-1000 ul	1000	B	1,3	1	Normal	2	0,65	0,00065									
	Micropipeta 30-300 ul	300	B	0,55	1	Normal	2,08	0,284423077	0,00088141									
	Micropipetas 1-10 ml	10	B	0,013	1	Normal	2,02	0,008435644	0,000843564									
	Medidor de humedad °C	130	B	0,96	2	Normal	2	0,48	0,003892308									
	Medidor de humedad g	10	B	0,0082	2	Normal	2	0,00041	0,000041									
<b>TOTAL</b>																		
			INCERTIDUMBRE					DISTRIBUCIÓN										
Materiales de laboratorio	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	U- R- T	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>									
	Matraz volumétrico 100 ml Tolerancia (ml)	100	B	0,1	2	Rectangular	1,732050808	0,028867513	0,000288675									
<b>TOTAL</b>																		
			INCERTIDUMBRE					DISTRIBUCIÓN										
Materiales de laboratorio	Fuentes que afectan mis resultados	Capacidad máxima	Tipo	Incertidumbre	Divisor Rango Tolerancia	Tipo	Denominador (Divisor)	U <sub>i</sub>	U <sub>ijx</sub>									
	Matraz volumétrico 100 ml Tolerancia (ml)	100	B	0,0082	2	Normal	2	0,0041	0,000041									
<b>TOTAL</b>																		

○ **Histograma de factores**

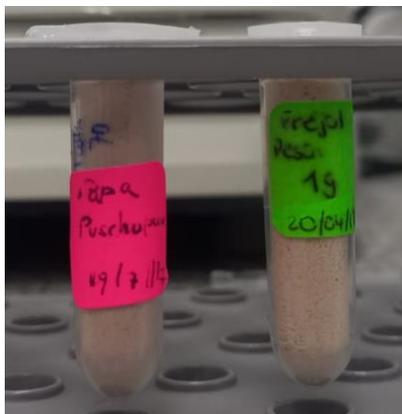


**ANEXO D**  
**Equipamiento usado en el laboratorio**

## Materiales de referencia



## Muestras de matrices vegetales



## Parte del equipamiento usado en el laboratorio



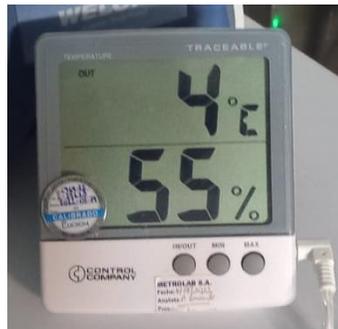
Termomixer



Baño María



Balanza analítica



Termohigrómetro



Centrifugadora



Espectrofotómetro

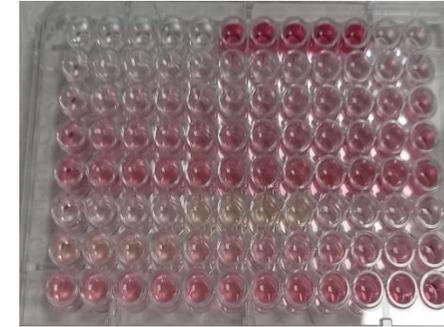
## Secciones del ensayo analítico en el laboratorio



Disolución del almidón resistente



Muestras incubadas



250 ul de glucosa a diferentes diluciones

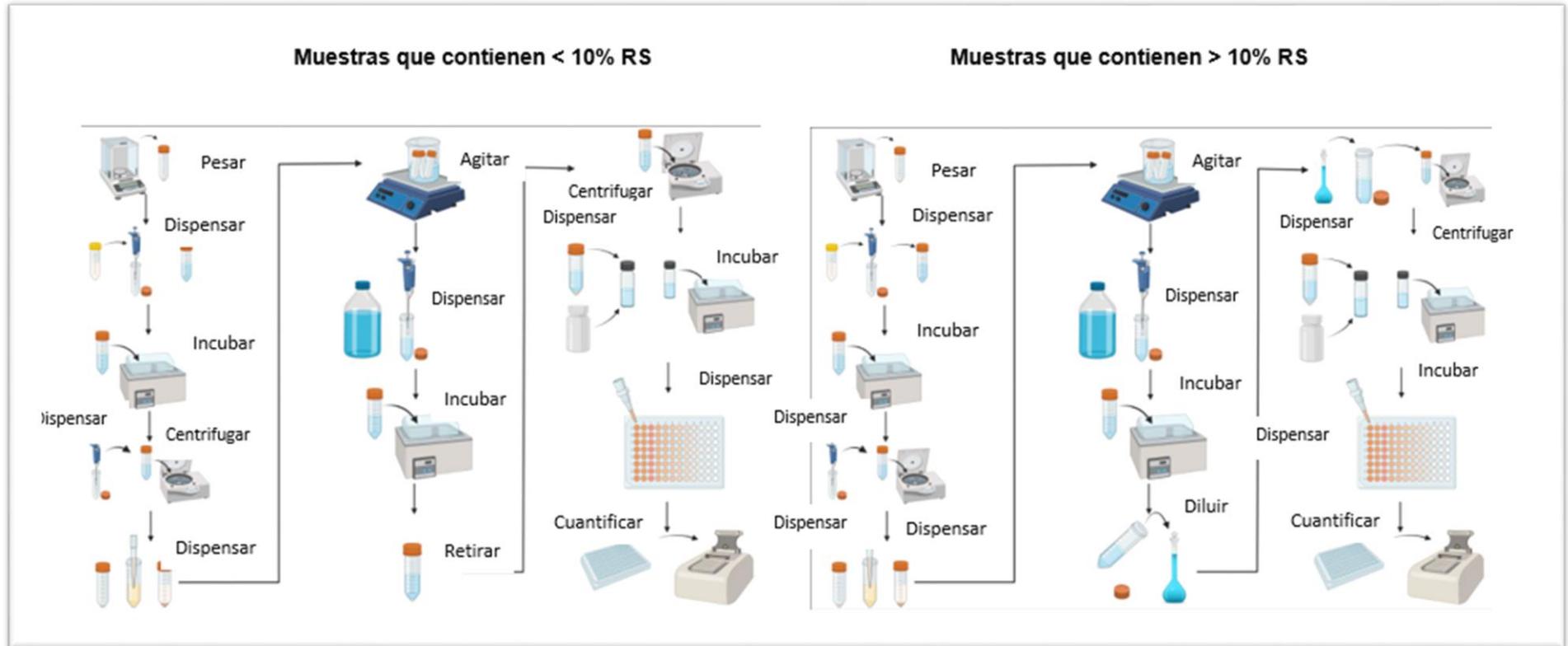
## Soluciones de trabajo



Tampones de Buffer

**ANEXO E**  
**Flujograma del método analítico**

## Práctica experimental



$$\text{Almidón resistente (g/100 g muestra)} = \Delta A \times F \times 10.3/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = \Delta A \times F/W \times 9.27$$

$$\text{Almidón resistente (g/100 g muestra)} = \Delta A \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 = \Delta A \times F/W \times 90$$

