PD-ABF-877
82325

INCREASING THE AVAILABILITY OF DIETARY VITAMIN A TO UNDER-SIX-YEAR-OLDS THROUGH NATURAL, PLANT, FOOD-SOURCES OF PROVITAMIN A (PROVITA)

5th PROGRESS REPORT
JANUARY - APRIL, 1992

May 1992

the International Eye Foundation
7801 NORFOLK AVENUE ■ BETHESDA, MARYLAND 20814 ■ (301) 986-1830 ■ FAX (301) 986-1876 ■ Telex 67 30496 IEF UR

INCREASING THE AVAILABILITY OF DIETARY VITAMIN A TO UNDER-SIX-YEAR-OLDS THROUGH NATURAL, PLANT, FOOD-SOURCES OF PROVITAMIN A (PROVITA)

5th PROGRESS REPORT
JANUARY - APRIL, 1992

Submitted by:

Jack Blanks, Director of Programs
IEF Headquarters

John Barrows, Child Survival/Vitamin A Coordinator
IEF Headquarters

Noel W. Solomons, M.D., Scientific Coordinator
CeSSIAM

Gustavo Hernandez-Polanco, M.D., Program Director
NCBD-IEF

May, 1992

the International Eye Foundation

7801 NORFOLK AVENUE ■ BETHESDA, MARYLAND 20814 ■ (301) 986-1830 ■ FAX (301) 986-1876 ■ Telex 6730496 IEF UR

TABLE OF CONTENTS

I. PROGRAM SUMMARY 1
A. Project Components 1
B. Personnel 1

II. FOURTH PROGRESS REPORT ACTIVITIES FROM JANUARY THROUGH APRIL, 1992 1
A. Headquarters 1
B. Guatemala 2
i. Component #1 2
ii. Component #2 3
iii. Component #3 4
iv. Component #4 6

III. APPENDICES 11

1. Schedule of Activities
2. List of Personnel Involved in ProvitA during the present reporting period
3. Report on Teaching Site-Visit by Dr. Dan Bankson
4. Report on the Training Experience of Licda Isabel Ramirez at UC at Davis
5A. Report on Activities in Guatemala in Component #1 by Licda Ma Eugenia Romero (English version)
5B. Report on Activities in Guatemala in Component #1 by Licda Ma Eugenia Romero (Spanish version)
6. Report on Vitamin A Assays on Four Additional Plant Species at NCSU
7. Correspondence with Dr. Steven Schwartz
8. Draft of Manual (Spanish version)
9AB Report on Activities in Component #3
10. Report on Vitamin A Assays of Three Varieties of Sweet Potatoes at NCSU
11. Report of Activities in Component #4 by Lic Hector Gamero (Spanish version)
12. Draft of Abstract for submission to IVACG '93

I. PROGRAM SUMMARY

The following is the Fifth Progress Report for the collaborative IEF-NCBD-CeSSIAM project "Increasing the Availability of Dietary Vitamin A to Under-Six-Year-Olds through Natural, Plant Food-Sources of Provitamin A." (ProvitA), covering the four-month period of January-April, 1992.

A. Project Components

The following report will describe activities under each of the project components with supporting documents cited as appendices.

The four components of the project are identified as:

1) Capacitating the laboratory at CeSSIAM in analysis of human plasma for retinol concentrations (HPLC);

2) Chemical analysis for total vitamin A activity of important selected plant foods;

3) Effecting food-distribution intervention with important selected plant foods, and;

4) Evaluating the biological and behavioral impact within household units of the food intervention

The schedule of events is attached as Appendix 1, Schedule of Activities.

B. Personnel

The persons contributing during this time period are listed in Appendix 2, List of Persons Involved.

II. FOURTH PROGRESS REPORT ACTIVITIES FROM JANUARY THROUGH APRIL, 1992.

A. Headquarters

* Transfer of project funds to Guatemala for CeSSIAM-related components (#1,2,4) and IEF-related component (#3) for expenses through the reporting period.

* Mr. John Barrows and Mr. Jack Blanks met with Dr. Steven Schwartz, Department of Food Sciences of the North Carolina State University to discuss the completed sub-contract between IEF and NCSU (for the analysis of provitamin A in plants) and possible future collaborative projects.

* Mr. John Barrows facilitated communication between CeSSIAM-Guatemala and Dr. Dan Bankson of the Fred Hutchinson Cancer Center in Seattle, WA, to discuss consulting arrangements for component #1. Mr. John Barrows also facilitated communication between CeSSIAM-Guatemala and Dr. Steven Schwartz of the Department of Food Sciences of the North Carolina State University, to discuss consulting arrangements for component #2.

* Mr. John Barrows attended the meeting of the Carotene Interaction Group (CARIG) and of the American Institute of Nutrition (AIN) during the FASEB week in Anaheim, CA on April 5th through 8th, and was able to discuss details of ProvitA with the personnel attending including: Dr. Noel W. Solomons; Dr. Gustavo Hernandez-Polanco; Dr. Jesus Bulux; Dra. Carmen Yolanda Lopez; and Licda. Isabel Ramirez.

* Mr. Jack Blanks met with Licda Kena Saenz de Tejada, Dra Marylena Arita, Dr. Gustavo Hernandez-Polanco, and Dr. Noel W. Solomons about their distinct roles in the ProvitA project during his visit to Guatemala in April 1992.

* Mr. Jack Blanks and Mr. John Barrows of IEF Headquarters, Dr. Noel W. Solomons, Scientific Coordinator of CeSSIAM met with Dr. Frances Davidson, Office of Nutrition and Mr. Richard M. Seisman, Director of the Office of Nutrition, on April 28 to discuss IEF activities in Guatemala.

B. Guatemala

i. Component #1: Capacitating the laboratory at CeSSIAM the analysis of human plasma for retinol concentrations (HPLC)

* Teaching Site-Visit to Guatemala by Dr. Dan Bankson: Dr. Dan Bankson visited Guatemala from March 29 to April 5 as the second phase of on-site visits to Guatemala by experts in analytical chemistry related to retinol levels in plasma. (The former visit had been conducted by Dr. Frank Morrow) The details of the visit are found in Appendix 3. The consultant resolved some issues of preventive maintenance, reviewed the procedures for programming and calibration of the HPLC machine. During his stay, Dr. Bankson along with Licda Romero and Licda Ramirez were able to analyze and calculate a back-log of stored plasma samples. At the solicitation of the IEF-Honduras project, Licda Ingrid Guisela Ordonez de Rivera of the Government of Honduras laboratory accompanied the Guatemalan laboratory analysts in the training sessions toward the aim of developing a routine for the analysis of pending plasma samples from the baseline survey of the IEF project in Tegucigalpa.

* Attendance by Licda Isabel Ramirez at CARIG and FASEB: On April 4th, Licda Ramirez travelled to Anaheim, California, USA to attend the IV meeting of the Carotene Research Interaction Group (CARIG) which was held on Sunday, April 5 and to attend sessions related to micronutrient nutrition and international nutrition at the meeting the American Institute of Nutrition (April 6 to 9) as part of the F.A.S.E.B. week.

* Training Experience for Licda Isabel Ramirez at the University of California, Davis: On Sunday, April 12, Licda Ramirez travelled from Anaheim to Davis, California. Prof. Bo Lonnerdal had arranged for a three-week, intensive training period in HPLC from a U.S. laboratory perspective under the auspices of the Program of International Nutrition within the Department of Nutrition at the University of California at Davis. The training extended from April 13 through the 30th. (For Licda Isabel Ramirez's report, see Appendix 4). While in Davis, CA, Licda Ramirez was instructed in HPLC methods for retinoids by Ms. Greeniw Hu of the Nutrition Research Unit of the Medical School and for carotenoids by Ms. Marjorie Haskell in the Department of Nutrition.

* Routine Maintenance of the Beckman HPLC in Guatemala: Prior to, and subsequent to, the visit of Dr. Dan Bankson, the procedures of routine maintenance, as well as a trouble-shooting visit by Ing. Jorge Perez, were undertaken for the Beckman "Gold System" HPLC at CeSSIAM in the Hospital de Ojos y Oidos. A narrative of the activities and the response to the training visit of Dr. Bankson are included in the Appendices 5 and 6, prepared by Licda Ma Eugenia Romero.

Lessons Learned

* Although the CeSSIAM laboratory is now able to analyze plasma for retinol, CeSSIAM technicians need to develop a "track record" in routine HPLC analysis on blood for retinol. It is quite feasible for CeSSIAM to initiate quantification of alpha-tocopherol using the current HPLC system. Establishment of a system for carotenoid analysis is not feasible given current financial, technical, and staff constraints.

* Additional attention should be made to the routine maintenance of the HPLC system. The purchase of a set of tools and spare parts needs to be investigated.

Planned Activities for Sixth Reporting Period (May-Aug, 1992)

* The laboratory is now in operational condition. During the next trimester, the laboratory (Licdas Romero and Ramirez) will continue to analyze occasional plasma samples that emanate from vitamin A-related projects of CeSSIAM.

* The staff of Component #1 will be involved in the field collection and laboratory processing of the blood samples to be collected in the three hamlets of Santa Rosa as part of the Final Close-Out Activities of Component #4.

ii. Component #2: Chemical analysis for total vitamin A activity of important selected plant sources

* Attendance by Dra Carmen Yolanda Lopez at CARIG and FASEB: On April 4th, Dra Carmen Yolanda Lopez travelled to Anaheim, California, USA to attend the IV meeting of the Carotene Research Interaction Group (CARIG) which was held on Sunday, April 5 and to attend sessions related to micronutrient nutrition and international nutrition at the meeting of the American Institute of Nutrition (April 6 to 9) as part of the F.A.S.E.B. week. She financed the trip out of her own personal funds, such was her interest in gaining experience at these scientific events.

* Analysis of Four Indigenous Plants of Guatemala: The laboratory of Dr. Steven Schwartz of North Carolina State University's Department of Food Science participated in the summer of 1991 in the chemical analysis of carrots, sweet potatoes and the green herb, "quilete," for provitamin A activity. Dra. C.Y. Lopez had processed a limited number of stabilized samples of 18 additional carotene-containing plants and they had been delivered and stored frozen in Raleigh, NC. In Dr. Schwartz's lab, Peruvian student, Ana Maria Garcia, has undertaken analyses of four additional species: 1) **hierba buena** (spearmint); 2) **puntas de guisquil** (tender shoots of chayote); 3) **Osh-Malanga** (a wild green of Alta Verapaz) and 4) scallions. The results of these analyses are provided in Appendix 6 entitled "Analysis of Provitamin A Content in Guatemalan Vegetables" which has been

analyzed and evaluated both in Headquarters in Bethesda and in CeSSIAM in Guatemala. These data are interesting, as they indicate the high content of provitamin A carotene in spearmint. The results must be considered provisional and preliminary, since only two valid samples of each species were available. This coming summer, five to six stabilized samples of each of these species -- and 14 others -- will be subjected to definitive provitamin A assays.

* Contractual Arrangements for Additional Plant Provitamin A Assays: The contractual arrangements between the I.E.F. and the North Carolina State University for purchasing of services of analysis of 18 Guatemalan carotene-containing plants of interest to the food system of rural Guatemala have been made. Appendix 7 is correspondence relevant to the development of that contract.

* Draft Manual on Field Collection of Plants for Vitamin A Analysis: Dr. Carmen Yolanda Lopez advanced the drafting of the manual on collection of plants for provitamin A analysis in Spanish. Appendix 8 contains the up-dated draft of the document entitled: "Manual Tecnico-Metodologico para la Preparacion de Materiales de Plantas para Analisis Quimico de Actividad de Vitamina A con la Determinacion de Provitamina A de Fuentes Alimenticias Populares".

Planned Activities for Sixth Reporting Period (May-Aug, 1992)

* Analysis of Additional Species of Guatemalan Carotene-rich Plants: In the coming trimester, the 18 remaining Guatemalan plants will be collected, stabilized and frozen during the last week of June by staff members of CeSSIAM directed by C.Y. Lopez. The specimens will be hand-carried to Raleigh, NC at the end of June by Mr. John Barrows of HQ Staff, I.E.F. and Dr. Lopez of the CeSSIAM staff. Through the aforementioned contractual arrangements, Prof. Schwartz and his laboratory staff will undertake the quantitative assay for provitamin A activity.

* Finalization of the Spanish Version of the Manual and Drafting and Editing of the English Version of the Manual: During the next trimester, the document entitled: "Manual Tecnico-Metodologico para la Preparacion de Materiales de Plantas para Analisis Quimico de Actividad de Vitamina A con la Determination de Provitamina A de Fuentes Alimenticias Populares" (Appendix 8) will be edited and finalized, and it will begin to take the form of its English language translation, to be entitled: Technical and Methodological Manual for the Preparation of Plant Tissue for Chemical Analysis for Vitamin A Activity through the Determination of Provitamin A in Common Sources of Vegetable Origin."

iii. Component #3: Effecting food distribution intervention with important selected plant foods

This component is directed by Dr. Gustavo Hernandez-Polanco out of the IEF administrative office in Guatemala City. This component is administratively separate from the other three components of ProvitA, which are based in CeSSIAM. Anthropologist, Lieda Guisela Leche is the field coordinator, assisted by two promoters, Mr. Edgar Amilcar Ortiz and Mr. Juan Carlos Martinez, and a staff of local women who serve as weighers and packers of the individual household "food baskets" in the intervention hamlets.

* Mr. Jack Blanks and Mr. John Barrows of IEF Headquarters met with Dr. Gustavo Hernandez-Polanco and Licda Guisela Leche, IEF-Guatemala about activities of component #3 during their visit to Guatemala in January, 1992. Part of the discussion concerned implementation, budget considerations, and possible extended project activities after the intervention ends.

* Distribution of the produce continues as previously outlined in Progress Report #4 (September-December). In the early mornings of Tuesday and Friday of each week produce is received in the parking lot of the Robles Hospital from the producers. The produce is weighed and packed following a table that determines at a glance the required amount of carrot, sweet potato, and "quilete" (RE by weight) required for 1-12 individuals.

* Produce is then transported to Santa Rosa for distribution at both aldeas (El Naranjo and El Teocinte). Distribution follows a distribution list constructed from the census completed earlier in 1991. Administrative duties are scheduled for Monday and follow-up visits to households are made on Wednesdays and Thursdays. The distribution began on October 15th 1991 and will continue for a 12 month period. The January and February Field Reports including the packing and distribution schedules are found in Appendix 9A-B.

Lessons Learned

* The chemical analysis of fresh sweet potato by the laboratory of Dr. Steven Schwartz of NCSU (Appendix 10) has implications for the quantitative impact of the distribution of vitamin A-sources in the two intervention hamlets. Because the production of actual sweet potato (variety 387) from the ICTA fields at La Fragua, Zacapa had not begun in June, 1991, when Dra. C.Y. Lopez went to Raleigh, NC with plant tissue specimens, we approximated typical yellow-pulp sweet potatoes with samples purchased at produce counters of supermarkets in the capital. These varieties (see: 3rd Progress Report, Appendix 5A) had an average provitamin A content of 470 RE per 100 g fresh, wet weight, and this was used as our benchmark value to index portion-sizes for the "food baskets" in the intervention hamlets. As can be seen in the present assays (Appendix 10, this Report), which represent the actual sweet potatoes that are being used in the field distribution, the provitamin A content is 70 RE per 100 g fresh, wet weight. The actual sweet potatoes being distributed, therefore, have 1/7th of the vitamin A activity estimated. In the 33 g of sweet potato per day that is contained in a ration, the delivery of vitamin A is 23 RE, rather than the previously estimated 150 RE. The total daily ration of quilete, carrot and sweet potato contains 323 RE, instead of 450 RE. The amount of the Zacapa sweet potato that would actually be needed to deliver 450 RE over three days would be 650 g per eligible participant.

* From close contact with professionals of the Guatemalan Institute of Agricultural Science and Technology (ICTA), in the process of their providing carrots and sweet potato to the ProvitA project, we learned of their overall interest in new varieties of sweet potato and in the extension of the production of this crop. These contacts, primarily with Lic Axel Esquite and Luis Maria Soto, led to the consortium of individuals which developed within I.E.F. (with CeSSIAM and NCSU) the project: "Development of a Vitamin A-Rich Weaning Food and Child Cereal from Dried and 'Instantized' Sweet Potato Buds."

Planned Activities for Sixth Reporting Period (May-Aug, 1992)

* The distribution of the plant products in El Teocinte and El Naranjo is programmed to continue in an uninterrupted manner until the end of August, 1992.

iv. Component #4: Evaluating the biological and behavioral impact within household units of the food intervention.

This component continued to be supervised by Dr. Ivan Mendoza during the temporary absence of Dr. Jesus Bulux. The primary field investigators are Lic Hector Gamero, research nutritionist of the CeSSIAM staff, and Dra. Marylena Arita, the IEF "Carrigan Fellow" in Hypovitaminosis A and Epidemiology from Honduras.

* Dr. Bulux travelled to Guatemala from March 14 to 18 as part of a combined journey to Guatemala and Honduras. On March 16 and 17, he worked with Dr. Mendoza and Lic Gamero on the issues of data-entry and data-analysis of Component #4.

* Dra. Arita was loaned from the ProvitA project to the IEF Honduras activities from March 16 to 25. The purpose of her travel to San Pedro Sula was two-fold: 1) She combined with Dr. Bulux in a techni[illegible]l workshop organized by the IEF Honduras office to train field workers in the application and in[illegible]tation of the advanced conjunctival impression cytology technique for assessing vitamin A status i[illegible] field on March 18 and 19, and then continued the training sessions by herself from March 23 and 24; and 2) She attended the "Regional Conference on Nutrition Problems and the Importance of Vitamin A" sponsored by MAMA, The Ministry of Health of Honduras, and IEF-Honduras in San Pedro Sula.

* Data-Reduction and Data Entry: It was realized that the collection of raw dietary data in the field had advanced far faster than the reduction of that data (to quantitative portion sizes) and its introduction into computer files. In consultation with Lic Humberto Mendez, a private consultant in computer systems analysis, a system of data reduction for the 24 hr recall interviews and food-frequency questionnaire was developed that would be compatible with the analytical software. During most of the trimester, Lic Gamero and Dra. Arita, did the manual calculations on the data sheets, completing the interviews from the baseline series (July - August, 1991). Also, the database, nutrient calculations and statistical software were made "user-friendly" on the PC 286 at CeSSIAM which is especially dedicated to the ProvitA diet calculations. Mr. Mendez was instrumental in making the software operational and training the staff of CeSSIAM in its use.

* Planning of the Follow-up Field Activity: As planned in the design and calendar, there would be two interval mini-surveys to evaluate the intrahousehold distribution and dietary behavior with regard to the offering of yellow, orange and green edible plants and in relation to formats in El Teocinte (whole family), El Naranjo (eligible preschoolers) and Don Gregorio (control). This was done by way of stratifying a subsample of the community for 24-hr recall interviews on a specific day of the week, equally represented Sunday through Saturday. During this trimester, the randomized mapping was accomplished in preparation for the second, and final, interval survey in May.

* Discussions on the Anthropological Data-Collection in the Final Close-out Field Activity: The baseline and the final full-scale community surveys in the three Santa Rosa communities include anthropological, dietary, and biological (blood) surveys. The anthropological data-collection proceeds with the participation of the Field Methods course for the undergraduate anthropology students in the bachelor's course in anthropology at the Universidad del Valle, Guatemala. The data-collection is under the field supervision of Licda Eugenia Saenz-de-Tejada, now the Director of the Vitamin A Training Unit of the IEF/NCBD. Details concerning the number of students available in the course this year, their assignment among the different communities, their training and standardization, etc., was discussed by Lic Gamero, Licda Saenz-de-Tejada, and Dr. Mendoza.

* Abstract Drafting: Lic Gamero in conjunction with Dr. Jesus Bulux, Dra Arita, Eugenia Saenz De-Tejada, Guisela Leche, Dr. Hernandez-polanco, and Dr. Solomons drafted an abstract for submission to the Nutrition Foundation IVACG Secretariat for the upcoming XV IVACG Meeting to be held in Africa February, 1993. The abstract can be found as Appendix 12.

Lessons Learned

* With a preliminary analysis of the data three-months into the food distribution, we begin to get a quantitative picture of the use of the plants. Given the stratified format for choosing the sample, which included equal proportions of the population interviewed on each day of the week. Our foods are distributed on two days of the week. Hence, if 100% of the foods were consumed, and eaten within one day of their arrival in the home, we would expect them to be reported on 2 of 7 interview opportunities or 28.5% of interviews. For the green herb, quilete, the 28% and 25% "mentions" in the distribution villages approximates a 100% household response-rate. For the carrots and the sweet potato, the reported intakes were no greater than in the non-intervention village of Don Gregorio.

* With the completion of the consultancy from Lic H. Mendez, we now have a quantitative and realistic idea of how much precoding by hand will be needed prior to the entry of the food-frequency and 24-hr recall data from the four interval surveys of the three communities of Santa Rosa. The conclusion is that it will take substantial staff time.

Planned Activities for Sixth Reporting Period (May-Aug, 1992)

* Submission of Abstract for IVACG 1993: The draft abstract will be edited and refined, and submitted to the IVACG Secretariat by May 8th, for consideration for programming in the 1993 IVACG meetings in Africa.

* Second Follow-up Field Activity: In the month of May, a repeat of the field activity in which subsamples of the populations from the full-distribution hamlet (El Teocinte), from the under-six eligibility only hamlet (El Naranjo), and from the control, no intervention hamlet (Don Gregorio) are targeted for rapid interviews will be conducted. This will consist of 24-hr dietary intake recalls for preschool children and mother/ caretakers.

* Final Close-Out Field Activity: The final close-out field activity is to be a replica of the initial baseline field activity of June through August, 1991. It will be conducted during comparable calendar dates in 1992, and will have: 1) an anthropological data-collection component (conducted by students from the Universidad del Valle on their "field research" elective under the guidance of

Licda. Kena Saenz de Tejada); 2) a dietary data-collection component (conducted by Lic Hector Gamero and Dra. Marylena Arita); and 3) a biological sample component (in which plasma samples for retinol and B-carotene are drawn by the laboratory staff and physicians of CeSSIAM).

* Data-Entry: The dietary data from the initial field trial, conducted in July and August of 1991 have now been reduced to expressions of portion size and are compatible with the computer program to calculate individual nutrient intakes for the subject-days covered in the food-frequency and 24-hr recall interviews. It is hoped to obtain supplemental labor for the mechanical process of entering the data into the computer data-files during the next trimester.

III. APPENDICES

the International Eye Foundation
7801 NORFOLK AVENUE ■ BETHESDA, MARYLAND 20814 ■ (301) 986-1830 ■ FAX (301) 986-1876 ■ Telex 6730496 IEF UR

SCHEDULE OF ACTIVITIES
Sept. 1990 - Nov. 1992
(English)

COMPONENT	1990				1991												1992										
	SEPT.	OCT.	NOV.	DEC.	JAN.	FEB.	MAR.	APR.	MAY	JUNE	JULY	AUG.	SEPT.	OCT.	NOV.	DEC.	JAN.	FEB.	MAR.	APR.	MAY	JUNE	JULY	AUG.	SEPT.	OCT.	NOV.
DEVELOPMENT OF PLASMA RETINOL ANALYSIS CAPACITY	-Theoretical and practical courses on HPLC -Mounting of the C-SSIAM HPLC -Visit to HPLC facilities in Guatemala City					Interlaboratory standardization of method with USDA-HNRC		Logistic preparations for survey of biological indices		Blood sampling for the baseline field survey.		No. Becerra, to US analytical training (Boston)		Maintenance and routine analyses				Maintenance and routine analyses Elaboration of procedures manual		Logistic preparation for survey of biological indices		Blood sampling for second field survey		Miss Becerra to US analytical training (Boston)		Data analyses Final report.	
PLANT VITAMIN A ANALYSIS FOR FOOD TABLES	-Literature review of analytical methodology -HPLC courses (annual) -Contacts with local and international institutions							Analysis in USA of carrots, sweet potato, "quilete" and other herbs		Support of the baseline field survey		Dr. Lopez to the US laboratory for analysis of vegetables and plants						Elaboration of a procedures manual for collection of plants for analysis. ? Possible final trip for analyses of vegetables and plants.				Support of the second field survey					
PLANT DISTRIBUTION INTERVENTION	-Discussions with Dr. Hernandez-Palomo. -Elaboration of procedures manual. -Refining of procedures.					Select and contact communities and leaders. Complete inter-institutional arrangements		Receive and register vehicle	Standardization of the intervention logistics.			Routine distribution of household allotments of plant foods.						Routine distribution of household allotments of plant foods.								Inventory and final accounting.	
EVALUATION OF THE BIOLOGICAL AND BEHAVIORAL IMPACT OF THE DISTRIBUTION	-Collection of general information about the communities for the study.					Selection and contact communities and leaders	Generation and standardization of dietetic and anthropometric instruments.			Baseline dietary and anthropological survey.		Coding and entry of the dietary and anthropology data.		Followup dietary interviewing.				Followup dietary interviewing.		Coding and entry of dietary and anthropology data.		Final dietary and anthropological survey.		Data entry, analysis and elaboration of final reports.			

IVACG (Ecuador) — SLAM (P.Rico)

SCHEDULE OF ACTIVITIES
Sept. 1990 - Nov. 1992
(Spanish)

	COMPONENTE:	1990				1991												1992										
		SEPT.	OCT.	NOV.	DIC.	ENE.	FEB.	MAR.	ABR.	MAYO	JUN.	JUL.	AGOS.	SEPT.	OCT.	NOV.	DIC.	ENE.	FEB.	MAR.	ABR.	MAYO	JUN.	JUL.	AGO.	SEPT.	OCT.	NOV.
1	DESARROLLO DE CAPACIDAD DE ANALISIS DE RETINOL PLASMATICO POR HPLC	Curso teorico sobre HPLC Montaje de HPLC local Curso práctico de HPLC Visitas a HPLC en la ciudad de Guatemala.					Calendarización de actividades con el laboratorio de USDA-HNRC		Preparación de logística de encuesta biológica.		Encuesta hematológica basal.		Isabel: Boston. Entrenamiento en análisis.		Mantenimiento del HPLC y análisis rutinarios.			Mantenimiento y análisis rutinarios Elaboración de manual de procedimientos.		Preparación logística de segunda encuesta biológica.		Segunda encuesta hematológica		No. Eugenia: A Boston para entrenamiento en análisis		Manejo de datos. Informe final.	
2	ANALISIS DE VITAMINA A EN PLANTAS	Revisión bibliográfica de metodología. Curso de HPLC Contactos institucionales locales e internacionales					Logística y recolección de muestras para análisis		Análisis (USA) de zanahoria, camote, quilete y otras plantas.		Apoyo a la Encuesta.		Análisis de verduras y hojas en laboratorio de USA.					Elaboración de manual de procedimientos para la recolección de plantas para análisis. Viaje final (?)				Apoyo a la encuesta.			Elaboración de informe final		
3	INTERVENCION DISTRIBUCION DE FUENTES DE PROVITAMINA A	Discusiones con Dr. Hernandez-Palomo. Elaboración de Manual de Procedimientos. Refinamiento del Manual				Selección, contacto con comunidades y líderes. Completar arreglos con instituciones.			Recibir vehículo	Estandarización de la logística de intervención.			Inicio de distribución de alimentos					Distribución de alimentos								Inventario final contabilidad		
4	EVALUACION DEL IMPACTO BIOLOGICO Y CONDUCTUAL DE LA INTERVENCION.	Recolección de información general sobre comunidades para el estudio.				Selección y contacto con comunidades y sus líderes.		Generación y estandarización de instrumentos de evaluación dietética y antropológica.		Preparación logística.	Encuesta basal dietética y antropológica.		codificación y entrada de datos de la evaluación dietética.		encuesta dietética de seguimiento			encuesta dietética de seguimiento		Codificación y entrada de datos de las encuestas de seguimiento.		Encuestas Dietética y Antropológica finales			Entrada de datos, análisis y elaboración de informe final.		

IVACG (Ecuador) — SLAM (Puerto Rico)

Appendix #2
List of Persons Involved

PERSONS CONTRIBUTING
TO THE ACTIVITIES OF PROVITA
DURING THE FIRST TRIMESTER OF 1992

BETHESDA, MARYLAND

Jack Blanks, MA, Director of Programs, HQ Staff, IEF
John Barrows, MPH, Child Survival-Vitamin A Coord., HQ Staff, IEF
Laine Isaacson, MA, Program Assistant, HQ Staff, IEF

GUATEMALA

Noel W. Solomons, MD, CeSSIAM
Jesus Bulux, MD, CeSSIAM
Gustavo Hernandez-Polanco, MD, IEF-Guatemala
Guisela Leche, IEF-Guatemala
Isabel Ramirez, CeSSIAM
Ma Eugenia Romero, CeSSIAM
Hector Gamero, CeSSIAM
Marylena Arita, MD IEF-Honduras
Eugenia Saenz-de-Tejada, IEF-Guatemala
Ivan Mendoza, MD, CeSSIAM

SEATTLE, WASHINGTON

Dan Bankson, MSc, PhD, Fred Hutchinson Cancer Research Center

RALEIGH, NORTH CAROLINA

Steven Schwartz, PhD, North Carolina State University

APPENDIX 3

Visit to the Center for Studies of Sensory Impairment, Aging and Metabolism (CeSSIAM) by International Eye Foundation Consultant, Dr. Daniel Bankson

Guatemala City, CA
March 30 - April 4, 1992

VISIT GOALS:

1. To assess the laboratory in terms of equipment and supplies.
2. To review the qualifications of the laboratory personnel.
3. To advise on repair and maintenance issues.
4. To determine quality control needs.
5. To assess the feasibility of up-grading training and machinery to allow for future CeSSIAM ability to conduct retinol and carotene analysis.

PERSONNEL DESCRIPTION AND RECOMMENDATIONS:

Present for most of the 5 day laboratory visit were:

Lic. Isabel de Ramirez
Lic. Maria Eugenia Romero
Dr. Ingrid Giscela Ordonez de Rivera

Dr. Bankson agrees with Dr. Morrow's assessment of the technical abilities of the CeSSIAM staff. They are enthusiastic but still are limited by the amount of time they can spend in the HPLC lab. Beginning April 1, 1992 Lic. Romero began working full time for CeSSIAM but still must divide her time between the HPLC and the Shigella Project. Because Lic. de Ramriez directs the hosptial clinical laboratories and most of her work load is in the morning, she should be available to work with the HPLC in the afternoons. Therfore Lic. Romero, with Dr. Solomons help, should arrange to staff the laboratory in the mornings. By working as a team these two laboratorians could help to make routine HPLC analysis at CeSSIAM a reality. With the help of Dr. Solomons or a laboratory consultant, realistic weekly goals must be made for the lab. Daily entries should be made in a bound notebook to aid in the transfer of information between lab workers and to document trouble-shooting and the performance of controls and standard curves. Levy-Jennings plots should be made for serum pools and modified Westgard rules should be instituted. Dr. Bankson left 2 pamphlets and 1 book on HPLC for the CeSSIAM laboratory staff to use when trouble shooting. Once the calculations are understood and routinely performed then the laboratorians should set up the integrator for automated sample concentration determinations.

DAILY ACCOMPLISHMENTS AND OTHER RECOMMENDATIONS:

Dr. Bankson arrived on the evening of March 30, 1992. Almost one year after the visit of the last HPLC consultant, Dr. Frank Morrow, who visited CeSSIAM on April 11, 1992. On Monday March 31, 1992 Dr. Bankson arrived at the CeSSIAM laboratory. The HPLC had undergone maintenance in the prevous week during which a new pre-column had been installed. Dr. Rivera arrived from Honduras in the mid-morning. We reviewed general HPLC techniques and a decision was made not to invest time in customizing a "black-box" integrator program for CeSSIAM use. In this way the staff could first become adept in performing the necessary calculations by hand. A statistical function calculator with linear regression capability was borrowed. The CeSSIAM staff require a calculator that can perform these calculations.

Standard solutions had last been made during Dr. Morrow's visit. Early HPLC runs showed these standards to be severly degraded. So the first project was to make new standards (see Apppendix 1). We first made "concentrated standards" using the CeSSIAM analytical balance. (The balance needs to be calibrated once or preferably twice a year with certified weights). Dilutions of 1:100 were made to obtain "working standards". (There is an inadequate supply of stoppered flasks. An assortment of 5, 10, 25, 100, 250 ml flasks with ground glass stoppers should be purchased as back up for the ones that exist now.) In the early afternoon Dr. Bankson drove across town to the Bonin Laboratories where the absorbances of the dilute "working standard" solutions were determined. Back at CeSSIAM calculations were performed that showed that the concentrations of the solutions obtained by weighing were approximately 20% greater than the concentrations obtained by ultraviolet absorbance readings.

On Tuesday March 31, 1992 we spent virtually the entire day attending to several problems that were eventuallly traced to the inadequate degassing of the methanol mobile phase solvent. The HPLC grade methanol was found to be heavily contaminated with large particles that in the past probably contributed to the problems with the pump check valves. Routine filtering of HPLC solvents must be instituted to avoid costly down time. The design of the solvent reservoir inlet filters causes trapping of air and contributes to the sporadic appearance of air bubbles in the solvent lines. These filters were removed which helped in removing bubbles from the system but increased the risk of pump back pressure build up from clogged check valves. This day of trouble shooting could have been greatly facilitated by having adequate tools in the laboratory. There is no CeSSIAM laboratory tool kit. The laboratory requires a small bench top cabinet with many small drawers in which to place the following items:

1. 1 roll of "HPLC grade" teflon tape to wrap around the threads of the HPLC fittings. The teflon tape borrowed from the hospital maintenance people was dissolved by the HPLC solvents.

2. An assortment of Philips and slot head screw drivers.

3. 1 vice that can be clamped to the bench top so that fittings can be stabilized when necessary.

4. 1 set of small files for making fittings and for scoring the glass vials in which some of the standards are stored.

5. 1 hammer

6. 1 sheet of emery cloth for sanding down the HPLC tubing.

7. An assortment of HPLC fittings including: male and female endfittings, ferrules, high pressure small-bore stainless steel tubing,;

In addition the lab also requires

8. A magnetic stirring plate/heater and an assortment of teflon coated stir bars for aiding in the degassing of solvents

9. 1 metal ring stand and an assortment of clamps to secure the degassing reservoir while it is being subjected to vacuum.

10. A dependable UV/visible spectrophotometer so that staff don't have to spend 1 afternoon a week travelling to another laboratory .

11. A solvent filtering bottle. There is a Millipore filtering device but the lab requires an Erlenmeyer Filtering Flask, preferably of at least 1000 ml, and several solvent resistant corks that fit the flask. The cork will need to be bored out with a multiple-sized cork borer. One or two holes should be made for the insertion of the filtering stem or the vacuum attachment.

Note: The lab requires repair or replacement of the the P-1000 pipetman.
The lab requires a whole new HPLC back pressure regulator.
The lab requires a black-out drape for the chromatography laboratory. The clinical lab has an adequate drape.

On Wednesday April 1, 1992 we pooled patient samples to make a serum pool that can be aliquoted in the future and stored in a -70 C freezer for use as control specimens, I wrote up a general procedure for the laboratory personnel to follow. With a method to use we ran replicates of the serum pool and performed calculations by hand. The HPLC ran well and the calculated value for the serum pool was in the normal range for serum retinol concentration.

On Thursday April 2, 1992 Lic. Maria Eugenia Romero and Dr. Ordonez de Rivera performed reproducibility studies using 2 different amounts of serum (100 ul or 300 ul). These studies are described in the Appendix. Although precision was very good at approximately 2% CV, each set of 4 samples appeared to have an obvious outlier. Therefore, it would be adviseable to perform all analyses in duplicate, at least until there is a history of successuful singlicate testing by the CeSSIAM laboratory. At the end of the day we decided to make a push to analyze all the Shigella project study samples that were available.

On Friday April 3, 1992 all 4 of us worked sporadically on running the 47 serum samples in duplicate with standards. Dr. Ordenez de Rivera left at 1:00 PM to return to Honduras. Lic. Isabel de Ramirez stayed with us until after 9:00 PM. She left to finish preparations for a flight to Los Angeles in the morning. Lic. Maria Eugenia Romero stayed with me until midnight when the last sample was finished.

On Saturday April 4, 1992 the calculations were completed but Dr. Bankson did not have a chance to go over the calculational strategy in detail. Details of the calculations are found in the Appendix. The remainder of Saturday was spent writing up the report.

Dr. Bankson left Guatemala City during the morning of Sunday April 5, 1992.

FURTHER FINDINGS AND RECOMENDATION:

Dr. Morrow's report was referred to and Dr. Bankson was in general agreement with his findings. Important changes in the last year are described below.

1. The lab now has access to a -20 degree C freezer where standards and samples can be stored. The clinical laboratory refrigerator/freezer is inadequate for the long term storage of any samples. The serum pool did not freeze in the 24 hours that it was first put into the freezer section. The freezer section should be thawed to remove adherent ice which would allow the freezer to reach colder temperatures.

2. CeSSIAM is fortunate to have a former employee, Mr. Jorge Perez, now working at Bonin Laboratories. His laboratory has a sophisticated UV/visible spectrophotometer that was used to measure working standard absorbances. The Spectronic 100 referred to by Dr. Morrow is still not able to measure absorbance in the ultraviolet range. The CeSSIAM staff and Jorge Perez have concluded that this spectrophotometer is not usable for UV measurements and its repair does not appear to be straight forward.

3. In response to III 5. of Dr. Morrow's report. If CeSSIAM had aluminum foil with which to wrap standard vials then it would not need to obtain "special" amber glass storage vials.

4. The CeSSIAM laboratory staff are not re-using disposable supplies. I applaude them on being watchful of costs.

5. CeSSIAM should consider inclusion of THBQ, a synthetic antioxidant, inorder to preserve retinol in extracted samples,

6. Dr. Bankson didn't have time to initiate an experiment to determine whether the HPLC detector could be used as a UV spectrophotometer. If this was possible then the purchase of a UV visible spectrophotometer could be delayed. A correlational study between the HPLC detector and the Bonin Laboratory spectrophotometer would have to be performed. The pathlength of HPLC detector is important to know to make the correct calculations.

THE FUTURE FOR THE CeSSIAM HPLC LABORATORY:

The CeSSIAM staff need to establish a track record in performing HPLC analyses on blood for retinol. It would be relatively simple for them to initiate quantitation of alpha-tocopherol in these same samples using the current HPLC system. The set up and establishment of a system for carotenoid analysis is another leap ahead. There would need to be a considerable investment in equipment which would include such things as another detector, a column jacket, and a constant temperature waterbath. The run times for carotenoid analysis could vary from 10 to 30 min depending upon whether one wants to measure retinol or other compounds simultaneously. Training by a CeSSIAM laboratorian in a laboratory emphasizing carotenoid analysis would be essential.

Enthusiastically submitted,

Daniel D. Bankson

Daniel D. Bankson, S.M., Ph.D, DABCC
Associate, Fred Hutchinson Cancer Research Center,
Seattle, WA
Assistant Director, Clinical Chemistry, VA Medical Center
Seattle, WA

CC. Noel Solomons, M.D., CeSSIAM
John Barrows, M.PH., IEF

APPENDIX:

HPLC ANALYSIS OF PLASMA OR SERUM AT CESSIAM

Many of the HPLC methods used to measure vitamin A are modifications of the procedure described by Bieri et al 1978 and similarily by Driskell etal 1982 and many others.

CAUTION:
The procedure described in this addendum is specific for the needs of the CeSSIAM analytical laboratory. It may be modified depending upon the availability of supplies and equipment and the amount of blood available for analysis.

Briefly, plasma or serum is precipitated with an equal volume of ethanol containing an internal standard (retinyl acetate). The sample is vortexed and extracted with 1 to 2 volumes of hexane. Two extractions are generally preferable to one. The vitamin A partitioned into the hexane is removed to a second tube and evaporated by gentle flushing with nitrogen gas using low heat (approximately 37 degrees C). The dried vitamin A is resuspended in mobile phase (100% methanol), vortexed for one minute and microfuged to pellet any particulate that might occlude the HPLC tubing, column or flow cell.

The CeSSIAM system consists of:
1 Beckman 166 variable wavelength UV detector
1 Beckman 427 Integrator
1 Beckman 116 programmable solvent module
1 Rheodyne 7125 manual injector (an autosampler is available but is not used because of the greater maintenance needs)

PREPARATION OF STANDARDS: "concentrated standards" (approximately 1 mg/mL) and "working standards" (approximately 0.01 mg/mL):
[Note these weights need not be exact because absorbance readings provide the "exact" concentrations (see spectrophotometric determinations)

CONCENTRATED STANDARDS: 1 mg/100mL solutions of retinyl acetate (RAC, internal standard) and retinol (ROH) are made up using HPLC grade (or absolute) ethanol. Ground glass stoppered flasks are required to maintain standard integrity.

The CeSSIAM analytical balance, displaying to 0.1 mg, was adequate to weigh out both retinoids:

10 mg of RAC was diluted to 100 ml with ethanol; 5 mg of ROH was diluted to 50 ml with ethanol. These standards have the approximate retinyl acetate and retinol concentrations of 1 mg/mL and are stored at 20 C or lower. They are thought to be stable for approximately 1 month.

WORKING STANDARDS:
"Working standards" are prepared from the 1 mg/mL "concentrated standard" solutions described above. These standards are used for standard curve generation. The working standard is a 1:100 dilution of the "concentrated" standard.

For RAC, the working standard was prepared by adding 0.25 mL of standard to a 25 ml stoppered flask and diluting to 25 mL. Similarly, 0.1 mL of the 1 mg/mL ROH standard is added to a 10 ml stoppered flask and diluted with ethanol to the calibrated mark.

It is crucial that the dispensing of the 0.25 mL and 0.1 mL above be performed accurately and precisely so that between-day standard curves are reproducible if and when generated. The P-200 pipetman (there are 2 in the laboratory) may accurately dispense these small amounts providing that they are checked routinely (say monthly) by weighing the amount of water it dispenses using the analytical balance. The P-1000 pipetman is currently non-functional and requires repair. This was disadvantagous because it necessitated pipetting 0.125 mL of RAC twice which magnified the pipeting error for the RAC but not the ROH. To equalize the error at this stage, (not an ideal approach since error minimization for all steps is the most desireable option) one could pipet 0.05 mL twice for the generation of the ROH working standard.

STANDARD CURVES;

Eventually, standard curve generation will not be part of the daily routine. Standard curves need only be generated if a control pool is running more than 2 standard deviations (SD) away from the mean. The incorporation of Westgard rules of quality control into this aspect of the work would improve the quality of the results generated. (Note: Very few research labs have a consistent quality control program.) The concentration of a pooled serum sample should be run as a control every time samples are analyzed. Levy-Jennings plots, that provide for the plotting of control concentrations over time, should be used for easy tracking of deviations from the mean and therefore allow for early corrective intervention.

The working standard concentrations MUST be verifed spectrophotometrically inorder to determine the concentration of the 100 fold more concentrated "concentrated standard". Ideally, the concentration of the working standard should be determined at weekly intervals (as it is stable only for one week) or when consistent deviation of the control(s) warrants the generation of a new standard curve. However, as in the case of CeSSIAM, where there is no onsite UV spectrophotometer, one could probably assume correctly that the -20 degree C

freezer-maintained "concentrated standard" is stable over a 30 day period and that no "significant" error results from the 1:100 dilution. These are assumptions and the ideal would be to have a more accessible UV/visible spectrophotometer to measure the working standard absorbance whenever it is generated. (There are several low end choices in the range of $2,000 to $5000 US and even less if purchased as a demo or reconditioned model).

PURIFICATION OF STANDARDS OR ESTIMATION OF IMPURITY:

Determining the concentration of a standard is not enough. The purity of the standard must be guaranteed. Retinol and retinyl acetate are not sold as pure compounds. Purity may be at 70% and lower if the compounds have been stored for a long time or mishandled. There are two ways to work with unpure compounds. The first method is the preferred of the two as it involves the purification of the retinoid from all but those compounds that both co-elute and have UV absorbance.

1. Concentrated solutions (say, 1:10 dilution of the "concentrated standard" may be chromatographed and the central portion of the dominant peak collected after it elutes from the HPLC, concentrated or diluted as appropriate, and the absorbance of the solution taken at 325nm (for ROH) or 328 nm (for RAC).

2. An alternate procedure was used here at CeSSIAM because of the short time available for accomplishing all our goals. I don't believe that precision was affected. There may be some small (but unknown) effect on accuracy.

The working standard is chromatographed and the percentage of non-retinoid but UV absorbing material is subtracted from the total UV absorbance (For example consider this hypothetical example: The total UV absorbance from the elution of 5 peaks is 100,000 area units. The one dominant peak, with 93,000 area units, is assumed to be the retinoid while the other 4 peaks totalling 7,000 units are due either to contaminants or to ethanol absorbance. Ethanol absorbance can be taken into account by injecting pure ethanol and measuring the total UV absorbance that results, in this case say that amount is 2,000 units. Therefore, the contaminating (non-ethanol) absorbance is 5,000 area units and the retinold may be considered to be 95% pure. Therefore, absorbance measurements must also be corrected by multiplying the calculated concentration by 0.95. (Note: the mobile phase in the CeSSIAM method is 100% methanol and the ethanol that is the solvent for the retinoids elutes with the solvent front; ethanol is used at many labs to dissolve ROH and RAC because extinction coefficients for these two compounds are available from the literature.)

19

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF RETINOID WORKING STANDARD CONCENTRATIONS:

Ing. Jorge Perez, Laboratory Director at the Bonin Laboratories in Guatemala City, was kind to allow us the use of his Perkin Elmer 3B Scanning UV/Visible Spectrophotometer. Scans of the working standards between 400 nm and 190 nm showed the characteristic retinoid profiles. Ethanol was also scanned. The absorbances of retinol at 325nm and RAC at 328 nm were used to calculate the concentrations of the working standards. After taking the absorbance due to ethanol alone into account the net absorbance for RAC was [0.163 - 0.028 = 0.135]; for ROH [0.215 - 0.028 = 0.187].

Using Beer's Law, A=E c l;
where A = absorbance;
E = absorbtion coefficient (that is the absorbance of a 1% solution of pure compound, which is eq uivalent to the absorbance of a 1 g/100mL solution);
c is the concentration of the compound in g/100mL and;
L is the pathlength of the cuvette in centimeters.

Therefore,
For ROH: A=EcL
OD ROH in ETOH at 325 =0.215

A= 0.215; E=1780 g cm /100 ml; c=?, L= 1 cm
0.215 - (0.0283) etoh OD = 1780 (c) (1)
c= 0.1867/1780
c= 0.000105 g/100 mL or 105 ug/100ml
[purity of ROH = 90.1% (by chromatography)]
therefore 105 x 0.901 = 94.5 ug/ml

For RAC:
E at 328= 1510
OD = 0.163 - (0.0283) etoh OD = 0.1387
0.1387 = 1510 (c) (1)
c= 0.1387/1510
c= 0.00009185 g/100 mL or 91.8 ug/100 mL
(purity of RAC = 90.1% (by chromatography)
therefore 91.85 x 0.901 = 82.8 ug/dl

CHROMATOGRAPHY:

See chromatograms in the laboratory for characteristics of the peaks.

At a mobile phase (100 % methanol) flow rate of 1.5 ml/min retinol elutes after 3.3 min and retinyl acetate after 4.3 min. There is good separation of the peaks. The peaks are monitored by measuring absorbance at 325 nm and the run currently is stopped manually at approximately 5 minutes. Injections can be made every 5 min. or at 12/hr. This does not take into account the significant time spent in preparing the samples for injection. labelling tubes, preping the HPLC, etc.

The integrator reports the retention time and areas of "significant" peaks. [Note that the integrator is standardized by making the LEVEL as close to 1000 mV as possible (via autozeroing of the detector) and by utilizing the peak threshold command (PT) at the beginning of the day. The peak threshold setting is a function of the baseline noise of the chromatogram seen by the integrator over 50 seconds. Low baseline noise is indicated by a low PT number, near 12, high noise by a high PT setting near 200. The CeSSIAM integrator from tuesday to thursday assigned a PT number of about 40. On Friday the noise was at 60 units. It is important to set the PT so that only peaks will be integrated and not noise.]

WITHIN-RUN AND BETWEEN-RUN VARIABILITY:

Lic. Ma Eugenia Romero and Dr. Ingrid Giscela Ordonez de Rivera generated the following results by repeatedly measuring a pooled serum sample.

INVESTIGATOR A: (used 300 ul serum samples)
AM analyses: mean: 35.0 +/- 0.7 (SD); N=3; CV=2%
PM analyses: mean: 37.6 +/- 0.8 (SD); N=3; CV=2%

Note: One result was discarded in each set because they were outliers. The total N in both the morning and afternoon runs was four.

INVESTIGATOR B: (used 100 ul serum samples)
AM analyses: mean: 35.4 +/- 0.7 (SD); N=3; CV=2%
PM analyses: mean: 37.8 +/- 4.1 (SD); N=4; CV=11%

Note: One result was discarded in the morning run.

Because of these results Dr. Bankson decided that it was necessary to run all experimental samples in duplicate and accept them only if they were in "reasonable" agreement. Otherwise the sample must be rerun.

THE ANALYSIS OF THE SHIGELLA PROJECT SAMPLES:

Because the system was working so well we planned to run 47 serum samples in duplicate on the last day of Dr. Bankson's visit. Preparation for running the samples began at 7:00 AM. We estimated that, at 6 minutes per chromatogram for each injection and with an anticipated total injection number of 120 samples, it would take us 12 hours just to inject the samples. As of this writing we are in our 15th hour and it will probably take us 2 more hours for a total of 17 hours to finish up all the work.

CALCULATIONS:

The main advantage of the described assay is that retinyl acetate as the internal standard corrects for volume losses. The standard curve describes the relationship between the ratio of the areas of ROH/RAC on the y-axis and the weight ratio of ROH/RAC onthe x-axis.

Standard Curve Data Generated on 4/3/92

etoh 2899 area (note 0.1 aufs)
roh 27684
rac 24021

ROH/RAC:

Vol. ratio	Peak Area ratio	Wt ratio
0.1/1	.102	0.114
0.1/1	.119	0.114
0.1/1	.129	0.114
0.1/1	.118	0.114
0.1/1	.120	0.114
0.5/1	.609	0.57
0.5/1	.613	0.57
1/1	1.214	1.14
1/1	1.208	1.14
2/1	2.597	2.28
2/1	2.650	2.28
	Y	X

We can generate the standard curve using the above data
Retinol concentration = 0.945 ug/ml
Retinyl acetate concentration = 0.828 ug/ml
given that the equation for a line is defined as Y=mx+b
the above data result in
r= 0.99918 (r^2 = 0.998)
m(slope) 1.149
b(intercept) 0.030

In our curve the area ratio = slope x wt ratio + b
therefore,
area ratio - b/ slope = wt ratio
since we know that the concentration of retinyl acetate is 0.828 ug/ml we can solve for the wt of retinol in the wt ratio

area ratio - (-0.03) / 1.149 = wt ratio

e.g. for sample 2b from April 4/92:
area of ROH =26944
area of RAC =84432
therefore, the area ratio of ROH/RAC = 0.32, can be inserted into the equation to determine the wt ratio

0.32 - (-0.03) /1.149 = 0.3046
0.3046 = wt ROH/wt RAC

In our procedure we kept the proportions the same as yesterday but reduced the volumes. We had to do this because very little serum was available.

We used 70 ul serum, 35 ul RAC, 35 ul ETOH, and extracted 2x with 140 ul of hexane

We resuspended the sample in 70 ul of methanol prior to injection onto the 10 ul sample loop.

Therefore, 35 ul RAC x 0.83 ug/ml x 1 mL/1000 ul = 0.0291 ug

0.0291 ug of RAC was added to the original sample

Therefore, 0.3046 x 0.0291 = 0.0089 ug ROH

This is the amount in 70 ul of serum
0.0089 ug /70 ul = 0.000127 ug/ul = 12.7 ug/100ml

A full listing of all sample area ratios and the calculated concentration of retinol is not attached to this report.

APPENDIX 4

ACTIVITIES REPORT. Trip to UC Davis.

To: Dr. Noel Solomons
Mr. John Barrows

From: Isabel de Ramirez.

Date: from April 5th to April 29, 1992.

From April 5th to April 9th we went to FASEB attending the activities primarily about B-carotenes.

From April 13th to April 29th I went to UC Davis.

1. There, I worked in Dr. B. Lonnedal's lab (Vitamin and Mineral Core Lab) with Retinol samples by HPLC.

   The first day I observed Greeni Hu, MS, who is in charge of Retinol and Mineral samples. She explained the technic to me.

   After that she gave me the opportunity to run several samples; you may see the chromatograms.

   They are working with Waters 600 HPLC. It has a different Integrator than the Beckman System Gold.

   We made the Linearity procedure for Vitamins A and E by HPLC also.

2. I talked with Marjorie Haskell, MS. She is a PhD student, and she showed me her techic, which is a little different than what we use in our lab. She has better resolution with the standard. She gave me several notes to use in our lab.

3. The last week, Dr. Wahed, Head of Biochemestry & Nutrition in the International Center for Diarrhoeal Disease Research in Bangladesh was at Davis. He is also interested in Vitamin A, and we worked together in the lab.

   He presented a seminar, and I attended it.

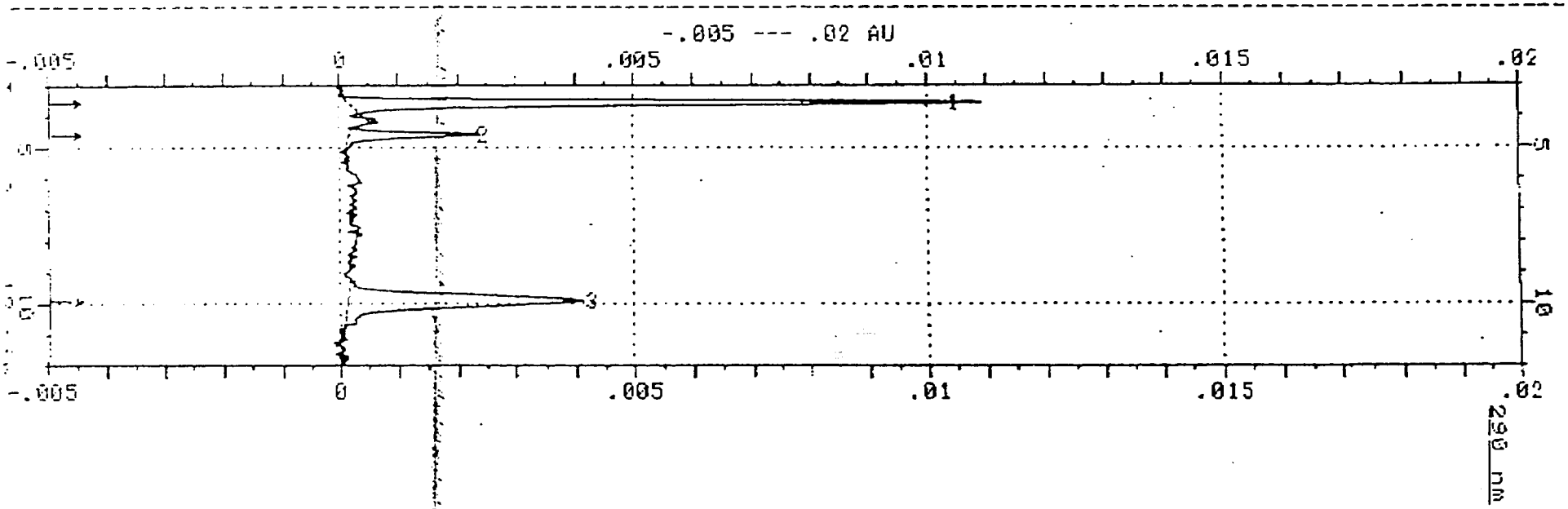
4. I used the UC Davis Library to see different publications about vitamins and other topics.

Finally, I just want to say thank you for this opportunity, and we hope that we can return the favor by doing our best job.

Sincerely,

Isabel

04-22-1992	14:07:05	Slope	.00005 AU/min	Sample name	100/1000
ampling time	61 msec *4	Drift	.002 AU/min		
ense	high 4	Height	.0004 AU	Column	mm ID * mm
esolution	3 nm	Width	.003 min	Packing material	
ime range	3 --- 12 min	Min. area	.00005 AU*min	Mobile phase	
rterval	1 sec	Time double	30 min	Flow rate	ml/min
moothing	15 points	Minus peak	OFF	Pressure	
-scale	.025 AU/FS	Paper speed	5 mm/min	Baseline	3 --- 12 min



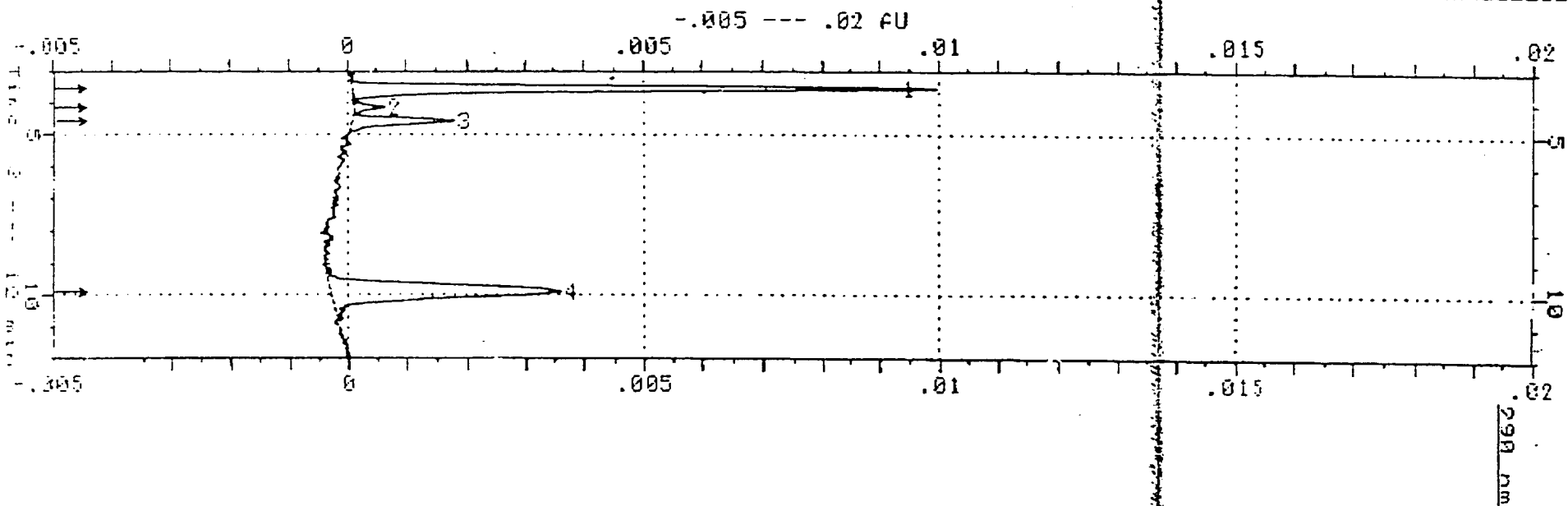
Report File RET20.D 3

290 nm

No.	Retention time	Height [AU]	Left time	Right time	Area [AU*min]	Area [%]	Mark
1	3.56	0.0101	3.30	4.23	0.001968	47.809	I
2	4.60	0.0020	4.35	5.18	0.000426	10.340	I
3	9.91	0.0039	9.23	11.17	0.001722	41.851	I

25

Waters 990	Integrator	File RET21.DT3			Waters
04-22-1992	14:21:01	Slope	.00005 AU/min	Sample name	90/900
Sampling time	61 msec *4	Drift	.002 AU/min		
Sense	high 4	Height	.0004 AU	Column	mm ID * mm
Resolution	3 mm	Width	.003 min	Packing material	
Time range	.3 --- 12 min	Min. area	.00005 AU*min	Mobile phase	
Interval	1 sec	Time double	30 min	Flow rate	ml/min
Smoothing	15 points	Minus peak	OFF	Pressure	
Y-scale	.025 AU/FS	Paper speed	5 mm/min	Baseline	3 --- 12 min



Report File RET21.DT3

290 nm

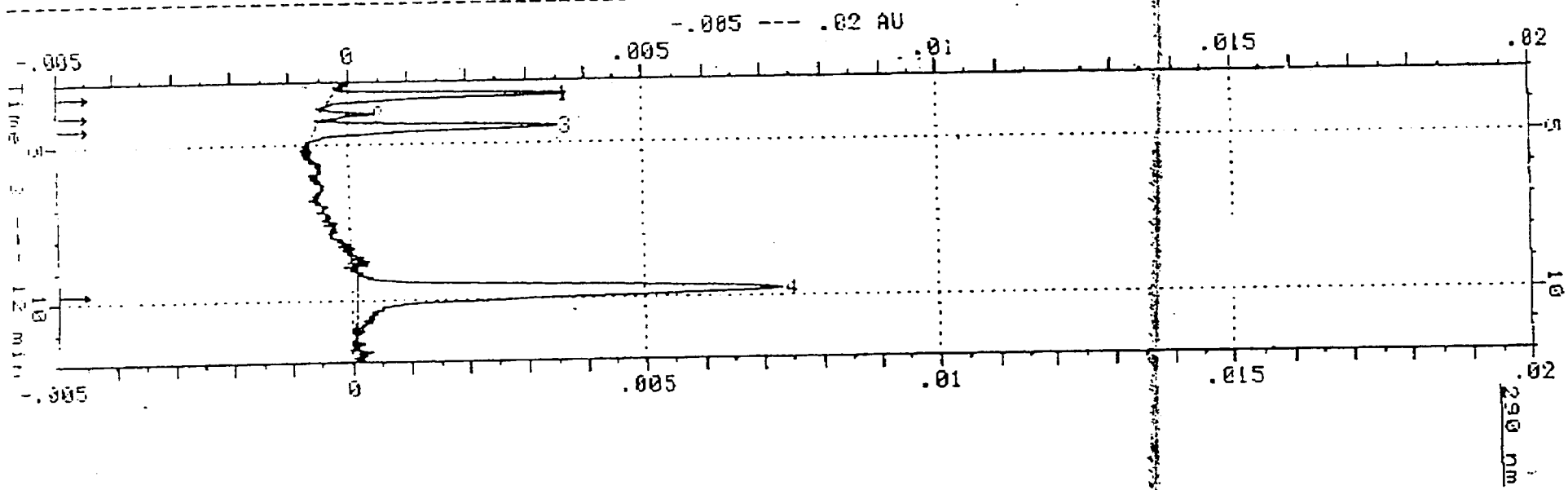
No.	Retention time	Height [AU]	Left time	Right time	Area [AU*min]	Area [%]	Mark
1	3.55	0.0092	3.08	4.02	0.001314	44.330	I
2	4.15	0.0005	4.00	4.28	0.000083	2.051	I
3	4.58	0.0016	4.37	5.33	0.000372	9.198	I
4	9.89	0.0038	9.03	10.81	0.001778	43.921	I

26

Waters 21508 9111

Waters 21508 9111

Waters 990	Integrator	File RET9.DT3			Waters
04-21-1992	12:40:33	Slope	.00005 AU/min	Sample name	std 2
Sampling time	61 msec #4	Drift	.002 AU/min		
Sense	high 4	Height	.0004 AU	Column	mm ID * mm
Resolution	3 mm	Width	.003 min	Packing material	
Time range	3 --- 12 min	Min. area	.00005 AU*min	Mobile phase	
Interval	1 sec	Time double	30 min	Flow rate	ml/min
Smoothing	15 points	Minus peak	OFF	Pressure	
Y-scale	.325 AU/FS	Paper speed	5 mm/min	Baseline	3 --- 12 min



Report File RET9.DT3

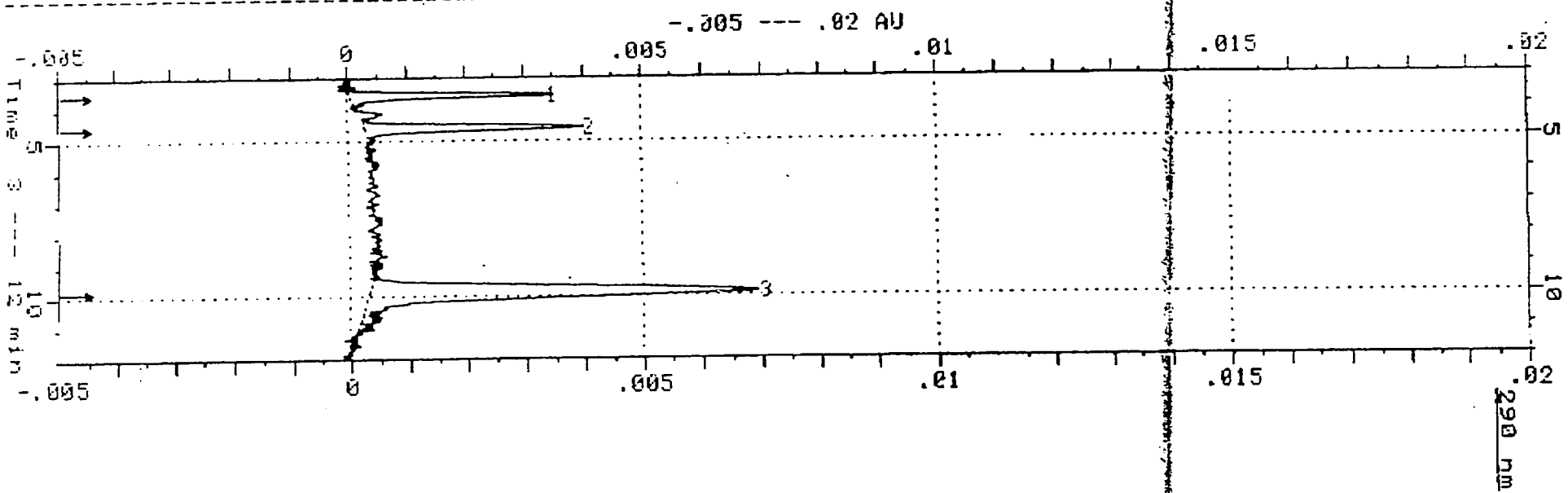
290 nm

No.	Retention time	Height [AU]	Left time	Right time	Area [AU*min]	Area [%]	Mark
1	3.47	0.0037	3.22	3.94	0.000735	14.471	I
2	4.07	0.0007	3.91	4.31	0.000112	2.211	I
3	4.49	0.0040	4.26	5.19	0.000925	18.219	I
4	9.75	0.0072	9.10	11.10	0.003307	65.099	I

27

21508 9111 Waters 21508 9111 Waters

Waters 990	Integrator	File RET10.DT3			Waters
04-21-1992	12:53:32	Slope	.00005 AU/min	Sample name	std 3
Sampling time	61 msec *4	Drift	.002 AU/min		
Sense	high 4	Height	.0004 AU	Column	mm ID * mm
Resolution	3 mm	Width	.003 min	Packing material	
Time range	3 --- 12 min	Min. area	.00005 AU*min	Mobile phase	
Interval	1 sec	Time double	30 min	Flow rate	ml/min
Smoothing	15 points	Minus peak	OFF	Pressure	
Y-scale	.025 AU/FS	Paper speed	5 mm/min	Baseline	3 --- 12 min



Report File RET10.DT3

290 nm

No.	Retention time	Height [AU]	Left time	Right time	Area [AU*min]	Area [%]	Mark
1	3.57	0.0032	3.20	4.04	0.000570	13.651	
2	4.60	0.0036	4.35	5.09	0.000752	13.009	
3	9.85	0.0065	9.38	11.21	0.002853	68.340	

28

21508 9111 Waters 21508 9111 Waters

APPENDIX 5A

REPORT OF PROVITA PROJECT

COMPONENT I (HPLC), JANUARY-APRIL 1992

I. INTRODUCTION:

In this period we had four important events: repairmen and maintenance of the HPLC system, the training with Dr. Bankson in Guatemala, the first determination os plasmatic retinol in a group of samples of the Shigella project of CESSIAM, and the trip of Lic. Isabel de Ramirez to Davis University, California for to get experience on the determination of retinol by HPLC.

II. REPAIRMEN AND MAINTENANCE OF THE HPLC SYSTEM:

On January 22, we detected some problems in the system solvents delivery because there were a lot of bubbles in the lines of the solvents. We proceeded to degassing the methanol used for the flow and to purge the system for to eliminate all the air bubbles that would can to pass to the cell detector. After this we observed that backpressure of the system had been decreased around 20% of the pressure that we input. Making an analysis of the possible troubleshooting we decided that the problem was in the check valve of the pump and because of this we called to Ing. Jorge Perez for his assesory.

The Ing. Perez came the same day to evaluate de problem. he proceeded to isolate the troubleshooting following the next steps:

1. Degassing the solvent.

2. To disconnect the column (in this case must not be pressure for to probe that the problem isn´t here.

3. To revise the filter valve check, but here we had the problem that we don´t have the necessary tool for to open the valve. This tool is necessary because we must to check if the piston isn´t adhered to the head pump, broken or whit air bubbles.

4. To check the filter valve and here we met an obstruction that Ing. Perez retired.

5. We tried again the backpressure and this had been increased in around 10-15%.

Ing. Perez indicated to us that for to be sure that there isn´t a problem in the check valve he needed two tools, one for to open the valve and other for to open the column, but in Guatemala he knew that only one person who can be borrow them and because of that the maintenance was stop until he would can to get the tools.

On February 27, Ing. Perez called for to say that he had the tool but because of the trip of Licda. de Ramirez and Licda Romero for the next week the maintenance was dated for march 10. On march 10. the ing./ Perez finished the maintenance of all the system.

The Ing. Perez said that the pressure decreased around 5% because the column hasn´t enough packing inside and he asked for a list of accessories that he consider necessary for the next

maintenance of the system. The diagnosis of the Ing. Perez was that the HPLC is in excellent conditions for to work and that we can to optimize our procedure if we can get one shorter column than we have actually. And about the packing of the column he said that if we don´t get a replacement he can to use the packing of a precolumn that we have in CESSIAM lab (this will be more expensive that to buy the packing).

II. VISIT OF Dr. DANIEL BANKSON TO CESSIAM:

The Dr. Bankson arrived to Guatemala in march 29 and we began to work with him on monday 30 around the 8:30 am, checking the HPLC system function and over all the function of the integrator. Around the 11:00 am the Dra. Ingrid Ordones de Rivera arrived to the CESSIAM lab and se incorporated to the work. This day we were working on the preparation of a calibration curve, the Dr. Bankson explained to us the principles of the calibration curve, we revised the Bieri method for determination of plasmatic retinol and the method used for Dra. de Rivera in Honduras. At the afternoon when all the standars were ready for to be measured in a UV-spechtrophotometer, the Dr. Bankson, Lieda de Ramirez and Dra de Rivera went to the Bonnin lab where Ing. Perez borrowed one spechtrophotometer. After that we ran the work standars at different dilution in the HPLC for to get the area ratio of retinol/retinolacetate. With the area ratio and the weigh of standars the Dr. Bankson taught to us how to calculate the weigh ratio, to use the Beer's law for to get the factor for to calculate the retinol concentration in a sample.

On Monday we prepared a pool of sera using the sera of hospital biochemical lab proof of this day.

The next day (March 31) we prepared 8 samples from the sera pool, four to this for to use the Bieri´s method modified that Dr. Morrow taught to us and the others for to be run with the method of Dra. de Ordones´s lab. At the afternoon we had some problems because we lost the backpressure regulator, and there were a lot of problems with the air bubbles but Dr. Bankson made some recommendation about our method of degassing the sample and we got to eliminate the problem of air bubbles, but the backpressure was instable so we decided to make a phone consult to Ing. perez for to know his opinion. He said that the backpressure regulator isn´t so important for to work and he gave to us a serial of steps for to eliminate the problem, because in his opinion there was air in the pump. We followed the instruction and we eliminated the instability in the system. We injected our samples and the Dr. Bankson did the calculation of the concentration of retinol, regression coefficient, standard deviation and variation coefficient (CV) and next he explained to us how to do all this calculation.

The results were interesting to us because the cv of this year wasn´t different of the cv we got one year ago, and because the method used in Honduras use only 100 ul of plasma, 100ul of standard and 100 ul of hexane while we use 300 ul of plasma, 300 ul of standard and 600 ul of hexane. We thought that the result

would can be different but we didn´t do statistical proofs for to determine if the results were significant different or not.

On April 2, we again prepared 4 samples from the sera pool each one but for duplicated and we made the same of the past day. Dr. Bankson calculated the cv again.

On April 3, we decided to run 47 samples of the Shigella project of CESSIAM. We began around the 8:00 am and we injected the last sample at 11:40 pm. W didn´t find any problem with the HPLC system in all that time of work. All the samples were ran in duplicated because some inconsistent results that we had in the past two days.

On April; 4, the Dr. Bankson made his report for International Eye Foundation about his visit to Guatemala.

This four days of work was very good for us, we learnt a lot about HPLC because we have a little experience now with the HPLC and because the Dr. Bankson is a very good teacher, and he wasn´t interested in that we learnt more about the programs of the integrator that can do all the calculation but that we be able of to do all the calculation, and to understand it of in the future to do modification to the system. Now we aren´t standarised with another laboratory in USA but we're able of to resolve better our problems with the HPLC and we know that our results may be comparable to the results from Honduras. For other side the Dr.

Bankson gave to us some bibliography about HPLC that will be helpful to us because we don't have any bibliography for his consult in CESSIAM lab. The Dr. Bankson did technical suggestions for to improve our methods for HPLC like to by a system of filtration for the solvents that now w know was the cause of the decrease of the pression in the pump because the solvents are very contaminated. He suggested that we use red light for to work the plasma retinol too because to work the plasma without light may be the cause of that the last batch of plasmas that we did had a lot of inconsistences. We worked with the curtain closed, and only the light of one lamp behind to us, so on the evening was very hard to see the numbers of the tubes.

APPENDIX 5B

REPORTE DEL PROYECTO PROVITA

COMPONENTE I (HPLC), ENERO-ABRIL 1992

I. INTRODUCCION:

En este trimestre en el componente I de PROVITA tuvimos varios eventos importantes: reparacion y mantenimiento preventivo del CLAP, el entrenamiento con el Dr. Bankson en Guatemala, la primera determinacion de retinol plasmatico en muestras de un proyecto de CESSIAM y el viaje de Lic. de Ramirez a la Universidad de Davis para recibir entrenamiento en HPLC .

II. REPARACION Y MANTENIMIENTO PREVENTIVO DEL SISTEMA HPLC .

En enero 22 detectamos algunos problemas en el sistema de solventes debedo a la presencia de gran cantidad de burbujas de aire en las lineas de solventes. Procedimos a desgasificar el metanol y purgamos el sistema para elimar todas las burbujas de aire que podrian pasar a la celda del detector. Despues de esto observamos que la presion del sistema habia disminuido al rededor del 20% del valor de presion que nosotros indicabamos al sistema. Haciendo un analisis de los posibles problemas, decidimos que probablemente la falla se localisaba en la valvula de cheque de la bomba y decidimos llamar al Ing. Jorge Perez para que nos ayudara.

El Ing. Perez vino el mismo dia a evaluar y aislar el problema segun el siguiente procedimeitno:

1. Desgasificar el solvente
2. Desconectar la columna (en este caso no debe haber presion y

si la hay indica que el problema se encuentra en la columna)

3. Revisar las valvulas de chequeos, pero aqui tuvimos el problema de que no tenemos las herramientas necesarias para abrir la valvula y verificar si el piston esta pegado, roto o con burbujas de aire.

4. Chequear el filtro de la valvula y aqui encontramos gran cantidad de desechos que obstruian el filtro, pero fueron retirados por el Ing. Perez.

5. Probamos de nuevo la presion y esta habia incrementado en alrededor del 10-15% con respecto a los valores bajos que habiamos obtenido antes.

En Ing. Perez nos indico que para estar seguros de que no habia problema con la valvula de cheque, necesitaba dos herramientas, una para abrir la columna y otra para abrir la valvula pero que en Guatemala el solo conocia a una persona quien podia prestarlas y el proceso del mantenimiento se detuvo hasta que pudieramos conseguirlas.

En febrero 27. el Ing. Perez llamao diciendo que habia conseguido las herramientas, pero debido al viaje de las licdas de Ramires y Romero. fijamos el 10 de marzo para continuar con el mantenimiento. En esa fecha se finalizo el trabajo.

El Ing. Perez dijo que la presion seguiria con un deficit de presion de 5% debido a que la columna no tiene suficiente empaque y nos indico una lista de accesorios que el considera necesarios

para el proximo mantenimiento del equipo o que debemos tener por que en cualquier momento son necesarios.

El diagnostico del Ing. Perez fue que el HPLC esta en exelentes condiciones para trabajar y que podemos optimisar nuestro procedimiento si podemos conseguir una columna mas corta de la que usamos actualmente y que si no conseguimos empaque para la columna podemos sacrificar una de las pre-columnas que tenemos en el laboratorio pero esto es mas caro que comprar nuevo empaque).

II. VISITA DEL Dr. DANIEL BANKSON A CESSIAM:

El Dr. Bankson llego a Guatemala el dia 29 de marzo y comenzamos a trabajar el lunes 30 al rededor de las 8:30 am, chequeando el sistema CLAP sus funciones y sobre todo las funciones del integrador. Cerca de las 11:00 am llego la Dra. Indrid Ordones de Rivera y se incorporo al trabajo. Este dia estuvimos trabajando en la preparacion de la curva de calibracion, el Dr. Bankson nos explico los principios del uso de dicha curva y revisamos el procedimiento del metodo de Bieri para determinacion plasmatica de retinol y lo comparamos con el metodo usado por la Dr. de Rivera en Honduras. Por la tarde cuando los standars estaban ya preparados el Dr. Bankson, licda de Ramirez y Dra de Rivera fueron al laboratorio de Bonnin, donde Ing. Perez nos presto un espectrofotometro UV para determinar las extinciones de los standars. Despues de eso corrimos los standars a diferentes diluciones en el CHPLC para obtener la proporcion de area del retinol al acetato de retinol y con ellas calcular la proporcion de peso por medio de la ley de Beer y asi

obtener el factor para calcular la concentracion de retinol en la muestra.

El martes preparamos un pool de sueros usando sueros que ese dia se extrajeron de pacientes del hospital para pruebas bioquimicas.

Preparamos 8 muestras a partir del pool de sueros, 4 para correrlas segun el metodo de Bieri modoficado que el Dr. Morrow nos enseno y otras 4 para correrlos con el metodo usado por la Dra. de Rivera. Por la tarde tuvimos algunos problemas debido a que perdimos el regulador de "backpressure"; el Dr. Bankson nos hizo algunas recomendaciones conrespecto a nuestro metodo de desgasificacion y logramos eliminar todo el aire de las lineas de solvente pero la presion continuo siendo inestable por lo que decidimos llamar al Ing. Perez y hacerle una consulta telefonica sobre el problema. El dijo que el regulador de presion no era importante para trabajar y nos dio una serie de pasos para eliminar otra posible fuente de error (aire en la cabeza de la bomba). Seguimos sus instrucciones y eliminamos la inestabilidad del sistema. Inyectamos nuestras muestras y el Dr. Bankson hizo los calculos de las concentraciones de retinol, coeficientes de regresion, desviacion standar y coeficiente de variacion (cv) y luego nos explico como obtener todos estos calculos.

Los resultados fueron interesantes porque el cv de este ano no fue muy diferente del que obtuvimos hace un ano, y debido a que el metodo usado en el laboratorio de la Dra de Rivera utiliza

solo 100 ul de plasma, 100 ul de standar y 100 ul de hexano, mientras que nosotros usamos 300 ul de plasma y de standar y 600 ul de hexano. Pensabamos que los resultados serian muy diferentes debido a que es mas dificil hacer la extraccion del retinol cuando solo se usan 100 ul pero no fue asi.

El dia 2 de abril preparamos otras 4 muestras a partir del pool de sueros pero en duplicado y repetimos el procedimiento del dia anterior.

El dia 3 de abril decidimos correr 23 muestras (en duplicado) del proyecto Shigella de CESSIAM. Comenzamos al rededor de las 8:00 am y terminamos de inyectar la ultima muestra a las 11:40 pm. No tuvimos ningun problemas con el sistema HPLC en todo ese tiempo de trabajo.

Estos cuatro dias de trabajo fueron muy beneficiosos para nosotros, aprendimos mucho a cerca de CLAP por que ahora tenemos un poco de mas experiencia con esta metodologia y por que el Dr. Bankson es muy buen profesor y no estuvo interesado en que nosotros aprendieramos como usar los programas del integrador que puede hacer todos los calculos, sino que fueramos capaces de hacer todos los calculos y entenderlos por completo para que en el futuro al hacer modificaciones en el procedimiento pudieramos variar nuestros calculos. Ahora no estamos estandarizados con otro laboratorio en USA pero somos mas capaces de resolver nuestros problemas con el HPLC y sabemos que nuestros resultados

son comparables a los de la Dra. de Rivera en Honduras a pesar de que nuestros metodos son diferentes. Por otro lado el Dr. Bankson nos proporciono un poco de bibliografia a cerca de CLAP que nos sera de gran ayuda por que no tenemos donde consultar dudas. El Dr Bankson hizo algunas sugerencias tecnicas para mejorar nuestros metodos para HPLC , como usar sistema de filtracion para los solventes ya que ahora sabemos que el no filtrarlos fue la causa de la obstruccion del filtro de la valvula debido a que los solventes aunque son grado HPLC estan muy contaminados. Tambien sugirio que usemos luz roja para trabajar los plasmas por que en esta ocacion trabajamos sin luz con las cortinas cerradas y al atardecer era muy dificil poder leer los numeros en los tubos.

APPENDIX 6

Analysis of Provitamin A Content in Guatemalan Vegetables

Report to International Eye Foundation
Bethesda, MD

And

Dr. Noel Solomon
CeSSIAM

April 1992

Prepared by:
Ana Maria Garcia and Steven J. Schwartz
North Carolina State University

Introduction:
Samples from CeSSIAM of native Guatemalan vegetables were analyzed to determine their provitamin A content. Specifically, three treatments each of Puntas de Guisquil, Hierba Buena, Scallions, and Osh-Malanga were shipped for analysis. The treatments consisted of fresh tissue, a 2 minute blanch, and a 5 minute blanch all followed by freezing for shipment. The samples were kept frozen (-18° C) until analysis was performed.

Experimental:
For Puntas de Guisquil, Osh-Malanga and Scallions, two extractions for each treatment were performed. However, for Hierba Buena, only one extraction at the 2 minute and one at the 5 minute blanch treatments were performed. Fresh samples of Hierba Buena were not extracted because of decomposition during frozen storage. All the scallion samples were only top portions of the vegetable and did not include bulb or white portions.

Moisture analysis, extraction and HPLC procedures, and preparation of standards were performed following the procedures reported previously.

Results and Discussion:
Of all the provitamin A carotenoids identified, only β-carotene was present in significant quantities. Alpha carotene was also found but only in trace quantities. Table 1 and 2 shows the average values and standard deviations for the content of β-carotene in the vegetables.

"Hierba Buena" had the highest values for β-carotene (132-141 ug/g, wet weight). The other three vegetables were similar but much lower in carotene content (21.9 - 54.1 ug/g, wet weight). In all four vegetables the fresh samples had the lowest value for β-carotene. The β-carotene content doubled from fresh to the 2 minute blanched samples for "Scallions" and increased as much as 3 to 5 times for "Osh-Malanga" and "Puntas de Guisquil", respectively. There are several reasons for the decrease of β-carotene content from 2 minute to 5 minute blanching. For example a longer heat treatment allows for larger amounts of solids to leached from the vegetable to the blanching water. Also, a longer exposure time to a high temperature will modify the carotene and accelerate degradation. The low β-carotene content of fresh samples could be attributable to the fact

that these samples had not received any thermal treatment. Thus, the enzymes were still active to degrade the carotenoids and therefore the values reported for fresh samples are inaccurate and serve only as an indicator for the extent of decomposition. In fact, all the data is from vegetables that were stored for several months and should not be viewed as absolute vitamin A indicators; but, rather as an indicator for approximate values.

The deviation within extractions is attributable to precision variations in the method of analysis (see the appendix data table). Between extractions, the variations in β-carotene is most likely a measure of nonhomogenicity of the samples. For example, "Osh-Malanga" is a vegetable similar to collards with leaves and thick stems.

Comparing the RE (retinol equivalent) values of American raw "Scallions" (3.99 (Adams, 1975)) with those from Guatemala (3.29-3.52) the latter had slightly lower RE values. For "Osh-Malanga" the RE values from blanched samples were 5.90-6.84 for 2 minute treatment and 3.66-4.98 for 5 minute. In comparison, a RE value in cooked collards (leaves and stems) has been reported at 5.39 (Adams, 1975). While "Hierba Buena" has the highest provitamin A value in comparison to the other vegetables in this report, it is probably not a major source for vitamin A in the diet due to it's low use level.

Reference:

Adams, C.A. "Nutritive Value of American Food." Ag. Handbook No. 456, US Printing Office: Washington, D.C., Nov. 1975.

Table 1. Average wet weight data.

Sample	Treatment	Average (µg/g) ß-carotene	Std. Dev. (µg/g) ß-carotene	Average Retinol Equivalents
Puntas de Guisquil				
	Fresh	10.0	0.5	1.7
	2 Minutes	38.2	3.3	6.4
	5 Minutes	25.9	4.7	4.3
Hierba Buena				
	2 Minutes	141.1	2.8	23.5
	5 Minutes	132.4	0.8	22.1
Osh-Malanga				
	Fresh	31.1	15.0	5.2
	2 Minutes	51.0	1.7	8.5
	5 Minutes	52.7	3.1	5.9
Scallions Fresh	Fresh	20.5	0.8	3.4
	2 Minutes	37.6	2.9	6.3
	5 Minutes	28.4	2.6	4.7

Table 2. Average dry weight data.

Sample	Treatment	Average (µg/g) ß-carotene	Std. Dev. (µg/g) ß-carotene	Average Retinol Equivalents
Puntas de Guisquil				
	Fresh	112.0	5.4	18.7
	2 Minutes	503.8	43.4	84.0
	5 Minutes	331.9	59.6	55.3
Hierba Buena				
	2 Minutes	924.8	18.3	154.1
	5 Minutes	865.3	5.3	144.2
Osh-Malanga				
	Fresh	269.4	129.9	44.9
	2 Minutes	545.8	18.7	91.0
	5 Minutes	492.3	29.2	82.0
Scallions Fresh	Fresh	226.2	9.2	37.7
	2 Minutes	469.8	36.5	78.3
	5 Minutes	326.9	29.6	54.5

Table 3. Percent Solids

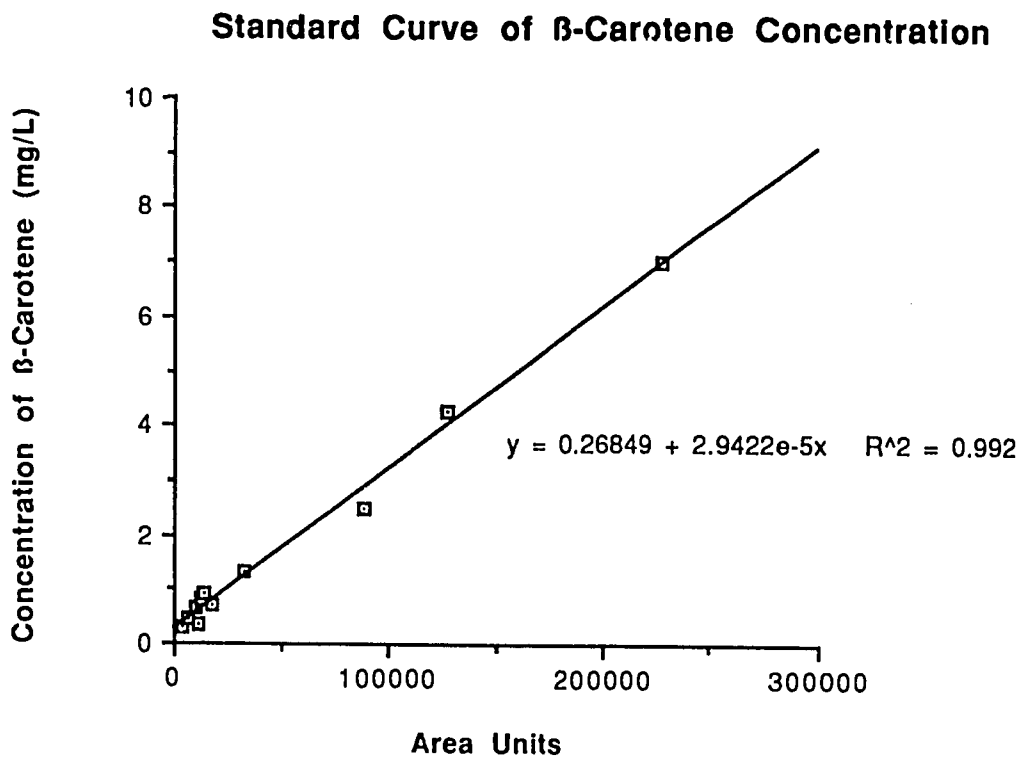
Sample Name	Treatment	Replicate Number	Solids (%)	Average	Standard Deviation
Puntas de Guisquil					
	Fresh	a	9.0	9.0	0.0
		b	9.0		
	2 min	a	7.4	7.6	0.3
		b	7.8		
	5 min	a	7.4	7.9	0.6
		b	8.3		
Scallions					
	Fresh	a	9.1	9.1	0.1
		b	9.0		
	2 min	a	7.8	8.0	0.3
		b	8.2		
	5 min	a	9.1	8.7	0.6
		b	8.3		
Hierba Buena					
	2 min	a	15.6	15.3	0.4
		b	15.0		
	5 min	a	15.6	15.3	0.4
		b	15.0		
Osh-Malanga					
	Fresh	a	12.1	11.6	0.8
		b	11.0		
	2 min	a	9.2	9.4	0.2
		b	9.5		
	5 min	a	10.8	10.7	0.1
		b	10.6		

Appendix

1- Graph of β-carotene concentration versus absorbance units

2- Sample calculations

3- Data table


Standard Curve of ß-Carotene Concentration
Concentration of ß-Carotene (mg/L)
10
8
6
4
2
0
0
100000
200000
300000
Area Units
y = 0.26849 + 2.9422e-5x R^2 = 0.992

Sample Calculation:

b carotene standard curve

y = 2.685e-1 + 2.942e-5x y = concentration (mg/1)
x = area

(y mg/1)*(100 ml)*(1 1/1000 ml)*(1000 ug/1 mg)*(1/#g in sample)
=ug carotene per gram sample

y mg/1 * (100 ug/#g in sample)

y = conc. in mg/1 found from std. curve

for dry weight #g = % solids * 5 g sample
for wet weight #g = 5 g

for Retinol equivalents 6 ug carotene = 1 RE

wet weight

Sample	Replicate Number	Solids (%)	ß-carotene (area)	ß-carotene (mg/l)	ß-carotene (ug/g)	Average (ug/g)	Std. dev (ug/g)	RE (ß-carotene)	Exp. Average (µg/g)	Exp. Std. Dev. (µg/g)	Average RE (ß-carotene)
Puntas de Guisquil											
Fresh	a	9.0	6955	0.473	9.462	9.626	0.232	1.604	10.028	0.488	1.671
			7512	0.490	9.790						
	b		8746	0.526	10.516	10.429	0.123	1.738			
			8451	0.517	10.343						
2 min	a	7.6	60179	2.039	40.779	41.059	0.396	6.843	38.218	3.295	6.370
			61131	2.067	41.339						
	b		50566	1.756	35.123	35.377	0.359	5.896			
			51430	1.782	35.631						
5 min	a	7.8	28856	1.117	22.349	21.983	0.518	3.664	25.918	4.657	4.320
			27611	1.081	21.616						
	b		39586	1.433	28.662	29.854	1.685	4.976			
			43635	1.552	31.045						
Hierba Buena											
2 min	a	15.3	226330	6.927	138.543	141.134	2.793	23.522	141.134	2.793	23.522
			235761	7.205	144.092						
			230113	7.038	140.768						
5 min	a	15.3	214964	6.593	131.855	132.425	0.806	22.071	132.425	0.806	22.071
			216901	6.650	132.995						
Osh-Malanga											
Fresh	a	11.5	24163	0.979	19.588	17.889	1.487	2.981	31.087	14.993	5.181
			22619	0.934	18.679						
			19355	0.838	16.758						
			18967	0.827	16.530						
	b		80591	2.639	52.790	44.284	7.605	7.381			
			73493	2.431	48.613						
			54909	1.884	37.678						
			55551	1.903	38.056						
2 min	a	9.3	77559	2.550	51.006	52.207	1.698	8.701	50.962	1.742	8.494
			81641	2.670	53.408						
	b		75183	2.480	49.608	49.718	0.156	8.286			
			75557	2.491	49.828						
5 min	a	10.7	74500	2.460	49.206	49.784	0.817	8.297	52.651	3.128	5.850
			76464	2.518	50.361						
	b		85113	2.773	55.450	54.085	2.803	9.014			
			86891	2.825	56.497						
			83138	2.714	54.288						
			76025	2.505	50.103						
Scallions											
Fresh	a	9.0	24779	0.997	19.950	19.771	0.253	3.295	20.459	0.836	3.410
			24172	0.980	19.593						
	b		27262	1.071	21.411	21.147	0.374	3.524			
			26364	1.044	20.883						
2 min	a	8.0	60026	2.034	40.689	39.876	1.151	6.646	37.553	2.918	6.259
			57260	1.953	39.062						
	b		52707	1.819	36.383	35.231	1.629	5.872			
			48792	1.704	34.079						
5 min	a	8.7	37137	1.361	27.221	26.695	1.522	4.449	28.421	2.571	4.737
			39018	1.416	28.328						
			32851	1.235	24.700						
			35964	1.327	26.531						
	b		46750	1.644	32.878	30.148	2.270	5.025			
			43776	1.556	31.128						
			38467	1.400	28.004						
			39449	1.429	28.582						

Dry weight

ß-carotene (ug/g)	Average (ug/g)	Std. dev. (ug/g)	RE (ß-carotene)	Exp. Average (µg/g)	Exp. Std. Dev. (µg/g)	Average RE (ß-carotene)
105.689	107.519	2.588	17.920	112.005	5.448	18.667
109.350						
117.459	116.490	1.371	19.415			
115.521						
537.539	541.231	5.221	90.205	503.781	43.435	83.963
544.923						
462.980	466.330	4.739	77.722			
469.681						
286.161	281.471	6.633	46.912	331.862	59.628	55.310
276.781						
367.001	382.254	21.570	63.709			
397.506						
906.663	924.820	18.334	154.137	924.820	18.276	154.137
942.978						
921.230						
861.532	865.255	5.266	144.209	865.255	5.266	144.209
868.978						
169.758	155.036	12.887	25.839	269.416	129.942	44.903
161.884						
145.240						
143.261						
457.510	383.797	65.910	63.966			
421.314						
326.546						
329.819						
546.293	559.155	18.190	93.193	545.826	18.657	90.971
572.018						
531.319	532.498	1.667	88.750			
533.676						
460.065	465.467	7.640	77.578	492.277	29.243	82.046
470.870						
518.452	505.682	26.211	84.280			
528.233						
507.586						
468.455						
220.610	218.635	2.793	36.439	226.240	9.241	37.707
216.660						
236.766	233.844	4.132	38.974			
230.923						
509.004	498.825	14.396	83.137	469.774	36.507	78.296
488.645						
455.132	440.724	20.377	73.454			
426.315						
313.113	307.059	17.511	51.176	326.916	29.569	54.486
325.844						
284.105						
305.174						
378.174	346.774	26.113	57.796			
358.046						
322.114						
328.761						

APPENDIX 7

North Carolina State University

College of Agriculture and Life Sciences
Department of Food Science

Box 7624
Raleigh, NC 27695-7624
(919) 737-2951

April 17, 1992

Dr. John Barrows
International Eye Foundation
7801 Norfolk Ave., Suite 200
Bethesda, MD 20814

Dear John:

As we discussed, we are able to assist you in identifying and quantitating the provitamin A carotenoids present in Guatemalan plants subjected to various treatments. The scope of work will involve developmental research to insure appropriate extraction procedures are quantitative followed by the development and use of high performance liquid chromatography (HPLC) for the separation and measurement of individual provitamin A carotenoids. The projected costs to conduct this project entitled "**Provitamin A Carotenoids in Guatemalan Plant Foods**" are outlined as follows:

Personnel: technical assistance	4,000
Supplies: (HPLC columns, solvents, filters, glassware, carotenoid standards, etc.)	3,000
Travel	300
Departmental overhead	1,000
Total	8,300

As you know, the individual who will complete this project (Ni Luh Puspitasari-Nienabar; Sari) will be with us from Bogor Agricultural University, Indonesia. The salary funds will provide support for Sari during the summer project. Travel funds from Indonesia to the U.S. and return have been provided by Bogor Agricultural University Inter-University Center in Food & Nutrition. The travel fund request listed above is to provide partial support for Sari to attend the Institute of Food Technologists meeting in New Orleans from June 20-24. This meeting will allow Sari to present some of her work conducted as a staff member in Indonesia as well as to interact with other scientists working in the carotenoid and provitamin A field. Your support in funding this training and research activity is most appreciated.

The terms of this project would be finalized by signed memorandum of agreement. It should be realized that the University financial contribution to completion of this project is more than the funding support requested.

Please call if you have any questions.

Sincerely,

Steven J. Schwartz, Ph.D.
Associate Professor

SJS/mem

APPENDIX 8

MANUAL TECNICO-METODOLOGICO PARA LA PREPARACION DE MATERIALES DE PLANTAS PARA ANALISIS QUIMICO DE ACTIVIDAD DE VITAMINA A CON LA DETERMINACION DE PROVITAMINA A DE FUENTES ALMENTICIAS POPULARES.

Este manual presenta en forma ordenada y sistemática los distintos procedimientos básicos para el análisis de muestras de vegetales como fuente natural de provitamina A y los cuidados necesarios para su preservación y reproducibilidad.

Encargada: Dra. Carmen Yolanda López Palacios.

Centro de Estudios en Sensoriopatías, Senectud, Impedimentos y Alteraciones Metabolicas -CeSSIAM- Guatemala, Centro América.

INTRODUCCION:

Considerando que la deficiencia de vitamina A continúa siendo un serio problema de salud pública para la mayoria de los países en desarrollo, es de urgente necesidad adquirir más información sobre toda fuente, efectiva o en potencial, de este nutriente. Las provitaminas A (Carotenoides que pueden ser biologicamente transformados en vitamina A) contenidas en alimentos de origen vegetal, proporcionan la mayor parte de la vitamina A ingerida y a un precio más bajo que las fuentes de origen animal con vitamina A preformada (retinol, éster de retinilo, retinal, 3-deshidroretinol y ácido retinoico).

I. VITAMINA "A" EN NUTRICION Y DIETA:

A. Fuentes alimenticias de vitamina A

La vitamina A se encuentra difundida ampliamente en fuentes naturales de alimentos y casi todas las comunidades tienen acceso a alguna fuente silvestre o cultivada. En la region existe una gran variedad de plantas cuyas hojas, flores, frutos y raíces podrían ser utilizadas como fuente de provitamina A en forma cruda o cocida. Según la composición de las provitaminas A, los alimentos de origen vegetal pueden dividirse en tres grupos principales: 1) aquellos en los cuales el valor de vitamina A es debido casi exclusivamente al b-caroteno ejem: verduras foliares, batata dulce, arverjas, brócoli, mango etc; 2) los que tienen el Alfa y Beta-caroteno como principales contribuyentes ejem. zanahoria, algunas variedades de calabazas y aceite de palma; y 3) aquellos que la criptoxantina y Beta-caroteno son los principales carotenoides activos ejem. marañon, melocoton, nispero etc. Conjuntamente algunas otras provitaminas pueden estar presentes pero es tan poca concentración que no afectan significativamente el valor de vitamina A.

B. Funciones fisiológicas de la vitamina A

La vitamina A es un elemento nutritivo esencial para las funciones fisiológicas normales relacionadas con la visión, en cuanto a la formación de la rodopsina, que es necesaria para la visión de baja liminosidad y su función en el mantenimiento de la diferenciación, la integridad de las células epiteliales, su efecto directo sobre la respuesta inmunológica y el crecimiento. El equilibrio fisiológico de la vitamina A a nivel celular varia desde

la deficiencia clínica evidente hasta la toxicidad.

C. Deficiencia de vitamina A como problema de salud pública

Por muchos años la preocupación sobre la deficiencia de vitamina A se fundamentó en las repercuciones clínicas y funcionales de las formas severas sobre la visión; así mismo, las acciones para prevenir y controlar la carencia tuvieron como objetivo fundamental la prevención de las alteraciones oculares, especialmente la ceguera irreversible, en grupos de población expuestos a deficiencia clínicamente manifiesta, especialmente en países del sudeste asiático y de Africa, y en algunas áreas de América Latina. Sin embargo, las investigaciones epidemiológicas de la última década han puesto de manifiesto la importancia de la deficiencia subclínica de vitamina A y sus implicaciones en la morbilidad y mortalidad de los niños. Los resultados de estudios experimentales no solo han confirmado la relación entre la deficiencia sub-clínica y el mayor riesgo de morbilidad y mortalidad en la niñez, sino tambien la factibilidad de disminuir dichos riesgos mediante intervenciones especificas. Por consiguiente, la importancia de la vitamina A como un problema de salud pública no está ahora restringida a las alteraciones oculares ocacionadas por las formas severas, sino que se extiende a las formas marginales menos severas pero más frecuentes, debido a sus implicaciones para la salud y la supervivencia infantil. Estas repercuciones son evidentes en poblaciones con grados leves o moderados de la deficiencia no manifiestos clinicamente y que están expuestas a una alta incidencia de infección, especialmente de enfermedades diarreicas y respiratorias agudas. A pesar de no ser

reconocida como un grave problema de salud pública debido a la ausencia de manifestaciones clínicas obvias, la deficiencia marginal o sub-clínica de vitamina A puede contribuír en forma notable a las altas tasas de morbilidad y mortalidad infantil por enfermedades infecciosas. La epidemiología de la deficiencia de vitamina A pone de manifiesto el hecho de que el problema a nivel de salud pública existe dentro de un ambiente de privación social, économica y ecológica. Tiende a agruparse geográficamente dentro de este ambiente y a ser estacional, alcanzando cifras máximas durante los periodos de escasez de alimentos y después de elevaciones enla incidencia de enfermedades diarreicas y otras enfermedades infecciosas; Se ha demostrado que la lactancia materna proporciona protección. La forma de deficiencia que resulta en pérdida de la vista afecta a menudo a los niños de 1 a 3 años de edad, poco después de haber sido destetados y alimentados con dietas que prácticamente no incluyen alimentos que contienen vitamina A y que frecuentemente tienen un bajo contenido de grasa. La deficiencia de vitamina A afecta tambien a los niños preescolares de mayor edad, pero resulta menos frecuentemente en pérdida de la visión, excepto cuando hay desnutrición calórico-proteica concomitante; se ven afectados por manifestaciones oculares mucho más leves de ceguera nocturna y manchas de Bitot, pero existen pocos datos sobre la forma en que la hipovitaminosis A influye en su salud y en el riesgo de mortalidad. Otras consecuencias para la salud en la deficiencia subclinica estan asociadas con retardo en el desarrollo y con dificultad en el aprovechamiento biológico del hierro, contribuyendo por tanto a la anemia por deficiencia de hierro. El

efecto de la deficiencia de vitamina A sobre la incidencia, duración y gravedad de las infecciones entéricas y sistémicas sigue siendo confuso en la actualidad, excepto en lo que respecta al sarampión; la hipovitaminosis A contribuye a la ceguera y mortalidad asociadas con esta enfermedad, especialmente en Africa. Desde el punto de vista de salud pública en Guatemala se han reconocido cuatro grandes problemas nutricionales que requieren atención inmediata: la desnutrición proteico- energética, el bocio endémico, las anemias nutricionales especialmente la debida a deficiencia de hierro y la deficiencia de vitamina A.

D. Métodos Diagnósticos:

No hay ningún método no invasivo que permita hacer una evaluación adecuada de la deficiencia marginal o subclínica de vitamina A como problema de salud pública. Entre los métodos disponibles figuran la determinación del nivel de la vitamina en plasma, concentraciónes séricas del PER (proteína de enlace de retinol), dilución de isotopos para la estimación de reservas corporales totales, la respuesta a una dosis relativa (RDR), la citología de impresión conjuntival (CIC) y una evaluación dietética rápida basada en la frecuencia habitual de consumo de alimentos que contienen vitamina A. La combinación de dos o más métodos proporciona la estimación más confiable de la magnitud del problema subclínico; Las reservas hepáticas si permiten determinar niveles corporales, pero la mayoría de las personas no están dispuestas a permitir la toma de biopsias tisulares para fines evaluativos sin vinculos directos con estados patológicos.

E. Intervenciones de Salud:

Entre las distintas intervenciones posibles para el tratamiento y control del problema, se ha hecho incapié en la distribución periodica (a intervalos de 4 a 6 meses) de un suplemento de vitamina A concentrado, generalmente 200.000 UI (60.000 microgramos). Esta intervención es apropiada para el tratamiento de las lesiones oculares y para el control en las zonas en las cuales existe una infraestructura que pueda asegurar la entrega sistemática de servicios (mediante programas generales o focalizados) a las poblaciones más vulnerables, lo cual ha resultado ser muy dificil en varios países. La fortificación de alimentos comunes con vitamina A, aunque potencialmente atractiva en los casos en que existe una infraestructura adecuada de entrega, no ha podido mantenerse sistemáticamente por razones técnicas o políticas. Están recibiendo una atención renovada los enfoques horticolas (huertos familiares, comunales, escolares) dirigidos a aumentar el acceso a los alimentos ricos en vitamina A, complementados con enfoques educativos encaminados a aumentar su utilización enla alimentación del destete y de los niños en edad preescolar.

Una preocupación inmediata muy importante es concientizar a los ministerios e infraestructuras de salud pública del gobierno, las agencias de financiación nacionales e internacionales, las organizaciones no gubernamentales y otras entidades que trabajan en la salud pública. Ha de educárseles a cerca de un estado adecuado de vitamina A para la prevención de la ceguera en la niñez, y para la supervivencia y la salud infantil. Se necesitan urgentemente campañas de concientización, asi como esfuerzos encaminados a

mejorar la nutrición en vitamina A mediante programas de intervención localmente apropiados y auto-sostenidos

II. NATURALEZA QUIMICA DE LOS CAROTENOIDES COMO PIGMENTOS:

A. Rol y funciones de los carotenoides en las plantas:

Los carotenoides son compuestos poliénicos, liposolubles, responsables de atrayentes colores que se extienden del amarillo al rojo, caracteristicos de muchos alimentos de origen vegetal. Químicamente estos se dividen en dos grupos: los hidrocarbonos y los derivados oxigenados. Los miembros del primer grupo son universalmente conocidos como carotenos, mientras que los segundos son llamados xantofilas.

B. Actividad de Pro-vitamina "A" a partir de los carotenoides:

Desde el punto de vista nutricional, los carotenoides pueden ser activos o inactivos, dependendiendo de su grado de saturacion, ciclaje, oxidación y/o adición de carbonos ó sustracción del carbono basico. Para que un carotenoide tenga actividad vitaminica, es necesario que posea, por lo menos, la mitad de la molécula de B-caroteno; o sea, un anillo de B-ionona no substituido y la cadena lateral poliénica de once carbonos. Asi, los carotenos gama, delta y licopeno, y las xantofilas zeinoxantina, luteina y violaxantina, son todos carotenoides inactivos. Por otro lado, los carotenos alpha-caroteno, B-criptoxantinas poseen aproximadamente la mitad de la actividad del B-caroteno. Siendo algunos carotenos inactivos y algunas de las xantofilas activas.

Al efectuar la conversión de provitamina para actividad de vitamina A los valores son comunmente expresados como equivalentes de

retinol (ER) o unidades internacionales (UI) por 100 gramos, siendo el primero preferido. Por definición, 1 ER es igual a 1 ug de retinol, o 6 ug de B-caroteno, o 12 ug de otros carotenoides activos. La unidad internacional, por su lado, es una décima parte del ER, de forma que 1 UI es igual a 0.6 ug de B-caroteno, 3.33 UI actividad de retinol y 10 UI de vitamina A, como actividad derivada del B-caroteno. Estas equivalencias adoptadas por recomendación de un comité de expertos de la FAO/WHO, presuponen que apenas 1/3 del B-caroteno es absorbido en el intestino y que, además existe una eficiencia de converción posterior del 50%. de esa forma, la biodisponibilidadtotal del B-caroteno resulta igual a 1/6 de la del retinol. Los resultados de los análisis deben continuar siendo referidos en términos de contenido de provitamina A por unidad de peso, paralelamente con el valor vitamínico A aproximado para poder más tarde efectuar cálculos actualizados.

C. Perceverancia de los carotenoides in vivo y en vitro:

Existen varios factores que dificultan la obtención de datos confiables sobre provitamina A. 1) El gran número de carotenoides naturales; 2) que las muestras de alimentos pueden variar ampliamente, tanto cuantitativa como cualitativamente; 3) solamente algunos carotenoides son precursores de la vitamina A y las actividades son diferentes; y 4) por el hecho de ser compuestos altamente insaturados, el deterioro por isomerización y oxidación puede fácilmente ocurrir durante el análisis.

Los carotenoides son alterados y destruidos por acidos y bases, acción enzimatica de la lipoxigenaza, la luz, el oxigeno y otros metales como el iodo.

III. INTERPRETACION DE ESTUDIOS ETNOGRAFICOS DE PATRONES DE USO DE PLANTAS PARA LA ALIMENTACION:

Encuestas Dietéticas:

Entrevistas realizadas con cuestionarios de preguntas abiertas, los cuales se realizan en mercados (comerciantes), escuelas (maestros y alumnos), agricultores, agrónomos etc. Asi mismo pueden hacerce recordatorios de 24 horas y frecuencia de consumo de 7 días con las amas de casa con el proposito de identificar los alimentos de origen vegetal consumidos en el área su frecuencia y estacionalidad.

IV. IDENTIFICACION TAXONOMICA DE ALGUNAS ESPECIES DE PLANTAS:

Identificación:

Mediante visitas a la comunidad, mercados, huertas familiares y escolares, caminatas etnobotánicas para la descripción del tipo de cultivos o malezas y su distribución por zonas ecológicas.

Colección de Muestras:

La cual puede realizarse diretamente del lugar de producción o de comercialización, directamente en fresco o secas.

Las colectas deben prácticarse en todas partes, de la localidad, jardines, huertas, campos de cultivo, praderas, bosques y matorrales, ruinas y lugares abandonados, orillas de los caminos y rocas, cienagas y corrientes de agua de los rios y playas de mar. Cada localidad debe ser visitada durante las diversas estaciones, pues cada una de ellas ofrece distintas plantas en floración, las cuales deben colectarse, ya que la clasificación de las plantas esta basada principalmente en la estructura de la flor y del fruto.

La importancia de tener registro de plantas por muestras representativas desecadas (herborizadas) de determinada región se puede apreciar en el reglón económico, pues nos ahorra tiempo y dinero ya que podemos conocer la flora que nos interes sin necesidad de visitar la región. Tambien se puede utilizar un herbario para estudios etnobotánicos, ecográficos, etc. Sirviendo de referencia a su determinación botánica facilitada por la comparación de plantas colectadas en el campo.

Herborización:

Técnica de secamiento de plantas recolectadas guardadas en un herbario, que es la colección de plantas secadas destinadas a los estudios de botánica. La mayoria de paises actualmente poseen herbarios de mayor o menor importancia a donde acude la gente interesada en el ramo para formarse una idea clara de la organización de los vegetales. Gran parte de esos herbarios son puramente regionales, es decir formados con las plantas de la flora de un pais o región. Un ejemplar botánico, es una planta o parte de la misma que ha sido secada y generalmente prensada entre papeles absorbentes, bajo presión moderada y que está acompanada de una etiqueta, en la cual consta información relacionada con la planta y su habitat. La preparación de los ejemplares es muy simple, pero deben ser cuidadosamente seleccionados y preparados, ya que estos serviran de referencia para futuros estudios y comparaciones. Al colectar los ejemplares, además de hojas, siempre deben tener flores y/o frutos para poderlos clasificar.

En Guatemala existen los siguientes herbarios: El del Centro de Estudios Concervacionistas (CECON), conocido mundialmente con

las siglas U.S.C.G. asi como los herbarios de la Universidad de San Carlos de Guatemala en la Escuela de Biología de la Facultad de CC.QQ y Farmacia y el de la Facultas de Agrónomia en la Ciudad Universitaria. El herbario del Instituto Nacional Forestal (INAFOR), y el herbario del museo Nacional de Ciencias Naturales.

Recolección de Especies:

Para recolectar plantas el equipo a usar es bastante sencillo y consiste en: Tijeras de podar, cuchillo para campo, bolsas plásticas, hojas de block (para anotar: lugar, fecha y nombre del colector; lo cual se coleca junto con la planta a prensar), una libreta de notas, una prensa portatil provista de hojas de papel periódico, láminas de cartón corrugado, un altimetro, una lupa, una cámara fotográfica, un pequeño botiquin con medicinas de primeros auxilios y cuando se piensa colectar plantas espinosas es muy util llevar guantes gruesos. Cuando se quieren colectar muestras de árboles altos es necesario utilizar una herramienta llamada "guacamaya ó guaca", que consiste en una cuchilla asida a un mango de madera ó de aluminio.

Prensa portátil: Es el auxiliar más importante dentro de todo el équipo. La prensa más simple consiste en un par de regillas hechas de madera dura fuertemente atadas por correas para poder prensar entre ambas regillas las hojas de papel absorvente, periódico y carton corrugado que separan entre si las plantas que han sido colectadas. Las plantas deben ser bien distendidas para que las hojas no se doblen ni se traslapen demasiado y que las flores muestren todas sus partes florales. El objeto del prensado es que las plantas dentro de las hojas de papel pierdan agua y se

conserven sin perder sus caracteristicas principales , de tal forma que puedan reconocer sus orgános florales y vegetativos con un aspecto lo más semejante al que tienen en la naturaleza.

Selección y Preparación de Ejemplares:

Se procurará obtener una parte significativa del tallo con hojas, flores y frutos (si fuere posible), cuando los tallos sean muy largos se doblarán en forma de V,N ó W segun sea necesario; para que quepan en el pliego de cartulina de tamaño estandarizado, si a pesar de todo no caben, se recogerá una rama florida de 15 pulgadas de largo ó mejor el vertice de la hierba y algunas hojas o rama del tallo especialmente cuando sean aquellas polimorfas; si los tallos son muy gruesos pueden hendirse en su parte media para reducir su espesor.

- Frutos o bulbos grandes: Deben ser secados al aire libre sin prensar, colgándolos en un lugar caliente, para luego ser agregados a su número de colección.
- Frutos macizos y tuberosos: Deben ser cortados en secciones del grueso de una mitad o de un cuarto de pulgada y secados en la prensa. En los ejemplares de frutos, deberán haber notas indicando su tamaño, forma, color, textura etc., cuando frescos.
- Flores grandes, gruesas y jugosas: Deben ser conservadas en frascos de vidrio transparentes con una solución de formol al 10%, los cuales son acompañados por notas detalladas acerca del color, olor, si son solitarias o se encuentran en inflorescencias y de que tipo son éstas.
- Plantas extremadamente suculentas: Son resistentes a métodos ordinarios de desecación, y si no se matan rápidamente contuniarán

creciendo aun dentro de la prensa, pierden sus hojas alargando sus tallos adquiriendo una apariencia anormal; para impedir esto lo más recomendable es bañar las plantas en alcohol al 25% o con agua hiervierdo durante un minuto o menos. Es aconsejable agregar al agua hirviendo un poco de sal común ó bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), para que el color verde de las plantas permanezca.

- Frutos y Semillas: Se recogerán por separado, además de los recogidos con la rama; y se guardarán en cubiertas de papel, sí son secos y pequeños; si son grandes y voluminosos se concervarán los frutos dentro de frascos con una solución de formol al 10%.

Desecación de Plantas (Prensado):

Las plantas recogidas se secan prensandolas entre papel absorbente (periódico), para ello se utiliza ya sea la caja prensa, siendo la más práctica y recomendable. Se procede colocando entre los pliegos que guardan las plantas, de una hasta cuatro hojas de papel periódico o cartón corrugado de manera de formar una pila en que se alternen los unos con los otros y que se sujeta a la presión. Conviene al tercer dia cambiar el papel periódico de las plantas y todos los dias o alternos por lo menos poner la prensa al sol unos minutos, en general al octavo dia las plantas, salvo las carnosas, estarán lo sufucuentemente secas para poder ingresar al herbario.

Es necesario que las plantas sequen lentamente, a la sombra y no directamente al sol en un lugar fresco y ventilado, ya que el sol y calor artificial aplicado directamente sobre las plantas frescas pueden resultar ejemplares muy quebradizos.

Montaje definitivo: Ya secas las plantas deben ser fijadas con

cinta de papel engomado sobre cartulinas que miden 41.7 X 28.7 cms. Este es el tamano estandar de papel de montaje que la mayoria de herbarios usa, y en el ángulo derecho inferior se coloca la etiqueta que lleva la información sobre la planta montada.

Datos necesarios: En el montaje de los ejemplares es necesaria cierta información acerca de los mismos, la cual es anotada en una etiqueta pegada en la cartulina en la parte inferior derecha, y los datos anotados son los siguientes: fecha, localidad exacta de colecta, altitud, nombre comun de la planta, nombre del colector y la clasificación cientifica.

Estos son los datos minimos requeridos antes de agregar el ejemplar al herbario, pero es conveniente que el coleccionista acompane notas sobre las plantas y su habitat.

Concervación del herbario: Para evitar que el herbario sea atacado y afectado por polilla y hongos, se aconseja: mantener en los estantes con herbarios, sustancias de olor fuerte y penetrante, siendo las más recomendables la naftalina, el alcanfor y el borax. La más usada es la naftalina ya que actua como agente secador y fungicida, esta ayuda a la desecación de las plantas y retarda el enmohecimiento y desarrollo de bacterias, además ahuyenta los insectos.

Clasificación Botánica:

Nos permite conocer los caracteres de las diferentes familias de las plantas, sino tambien de los generos y las múltiples formas y variedades de las especies.

V. PRINCIPALES METODOS ANALITICOS PARA LA IDENTIFICACION Y

CUANTIFICACION DE LOS CAROTENOIDES DE ALIMENTOS NATURALES:

A. Cromatografía Líquida de Alta Presión -HPLC-:

Es la técnica considerada como la más avanzada en la actualidad, sin embargo, aún necesita ser patronizada en varios aspectos antes que pueda ser usada rutinariamente para la determinación de provitamina A. La mayor parte de los métodos utilizan columnas de fase inversa (RPC18); Se sospecha que la silica promueva degradación de los carotenoides dentro de la propia columna. Las fases móviles más comunes son combinaciones de acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, tetrahidrofurano, metanol y hexano usados isocráticamente. La elución co gradientes requiere largos periodos de reestablecer el equilibrio después de cada corrida, aún cuando el tiempo puede ser reducido a 10 minutos. Las muestras de alimentos suelen requerir el cambio frecuente del material de las precolumnas, o de su lavado con matanol y cloruro de metileno/hexano.

Varias son las ventajas enumeradas para los métodos por HPLC: 1) rapidez; 2) simplicidad; 3) reproducibilidad; 4) menor exposición al oxigeno, luz, adsorbente y solvente; 5) exactitud; 6) separación eficiente y 7) sensibilidad. Observando la literatura con atención, sin embargo nótase que ningún método de HPLC fué todavia aceptado de forma general, permaneciendo asi esta poderosa técnica apenas en potencial dentro del área. En los paises en desarrollo permanecerá todavía el problema del alto costo del instrumento y su manutención. La cuantificación en HPLC puede ser problematica ya que requiere tanto de resolución óptima y de correcta calibración con patrones adecuados. Como los carotenoides

poseen diferentes coeficientes de absortividad y máximos de absorción en longitudes de onda diferentes, la normatización interna y el calculo de los picos del cromatograma en porcentaje del área total son datos que conducen a errores númericos. La calibración con un patron externo presenta algunos problemas ya que la constante inyección de patrones confiables se hace necesaria. Solamente el alpha y beta-carotenos son encontrados en el comercio y además de eso se encontro una variación en el trans B-caroteno de 0.6 a 88.7% entre 6 de los distribuidores más importantes, lo que evidencia que sufren una rápida degradación después de abierto el recipiente sellado. Las soluciones patrón deben ser usadas recién preparadas, tener su concentración verificada por espectrofotometria y su pureza por TLC. Los patrones para otras provitaminas, como no se encuentran en el comercio, son obtenidos de fuentes naturales y purificados por OCC o, alternativamente colectadas después de repetidas operaciones de HPLC.

Una ventaja obvia del HPLC sobre la cromatografía en columna abierta es la mayor reproducibilidad de la separación. Con la OCC esto depende principalmente de la habilidad del técnico en rellenar la columna y visualizar las bandas de color.

B. Cromatografia de Columna Abierta:

Método tradicional usado para separar carotenoides es la cromatografia descendiente en columna con flujo por gravedad y auxiliado con trompa de vacio, recientemente llamada Cromatografía en columna abierta (OCC), es el método clásico usado para determinar la composición de carotenoides de alimentos. La separación es acompañada y las fracciones se cuantifican en el

espectrofotómetro.

Un método ampliamente usado para determinar el contenido de provitamina "A" es el método 43-014 de la AOAC, introducido en su forma actual para "carotenos en plantas" en 1955. Este comprende la extracción acetona/hexano, filtración, lavado (5 veces) con agua y aferición del volumen con hexano. La solución es aplicada en una columna de MgO activado: Hyflosupercel. Los "carotenos" son eluidos en el sistema acetona/hexano, la absorbancia medida a 436 nm y el resultado expresado en mg de B-caroteno en U.I.

Si bien su simplicidad lo hace muy atrayente, el método ha sido bastante criticado por no ser apropiado para determinar provitamina A en alimentos, en especial en ciertos productos vegetales el valor de vitamina A seria ampliamente superestimado. Otras posibles fuentes de error en el método de la AOAC pueden deberse a que se pide un volumen fijo de solvente de extracción, no llevando en cuenta la variación que existe entre muestras de diverso tenor de carotenoides; el trabajar con carotenoides exige que la extracción de la muestra sea repetida hasta obtenerse un extracto incolor, por otro lado el método mide la absorbancia a 436 nm que no es el máximo de absorbción del B-caroteno. Los absorventes encontrados comercialmente suelen variar en su capacidad adsortiva y la más pequeña cantidad de impurezas puede alterar el poder de elución del solvente.

C. <u>Confirmación de la identidad de las provitaminas</u>:

Obviamente que para la cuantificación segura de las provitaminas es necesario que haya primero una identificación conclusiva, para los carotenoides ya conocidos, la identificación

conclusiva puede darse mediante la combinación conciente de parámetros tradicionales como el comportamiento cromatográfico, espectro de absorción y reacciones químicas especificas. Datos cromatográficos (orden de elución en OCC, tiempos de retención en HPLC y valor de Rf y co-cromatografía por TLC) proporcionan las primeras indicaciones sobre la identidad más nunca deberian ser usados como único criterio; El aspecto visible permanece como el medio de diagnóstico más accesible al investigador, su valor se fundamenta en la interacción de la luz con la cadena poliénica conjugada y otras características estructurales. El tipo, localización y número de grupos funcionales en las xantofilas puede ser confirmado con las reacciones especificas para los grupos. Los carotenos alpha, gamma y beta-caroteno y B-zeacaroteno, poseedores de actividad porvitaminica "A", y los inactivos delta y teta-caroteno y el licopeno puede ser distinguidos por sus espectros de absorbción visible.

Gran parte de la inexactitud de los datos hoy día existentes es debida no a las técnicas analíticas en sí, sinó a la aplicación inadecuada de las mismas y a la interpretación errónea de los resultados.

VI. PROCEDIMIENTO PARA COLECCION Y PROCESAMIENTO DE MATERIALES DE PLANTAS EN EL CAMPO:

A. Recolección de la Muestra:

Se procede a recolectar la muestra de las diferentes áreas de la parcela o cultivo, sin tener predilección por determinada característica como el tamaño,el color etc. Teniendo presente el

dictamen de los agricultores a cargo o bien nuestro propio criterio, para saber si el vegetal esta ya en condiciones de ser consumido como alimento. Esto no quiere decir necesariamente que la parte comestible del vegetal haya llegado a su madurez, pues las condiciones en que es usado y la forma culinaria en que se prepara son impuestas por las costumbres de la comunidad.

Tambien puede comprarse en un mercado local, casa particular o de un vendedor ambulante, en este caso se selecciona la muestra de las diferentes partes del puesto de venta o del recipiente en que esta recolectada o acarreada. Generalmente un promedio de 600 gramos es suficiente para efectuar las estabilizaciones, y se anotan todos los datos que el vendedor pueda darnos.

Se prefiere efectuar las colectas en horas de la mañana, a fin de obtener las muestras de vegetales lo más fresco posible y que no se afecten por la acción de los rayos solares en las horas más fuertes del dia y se deshidraten más rápido. Por lo que se sugiere efectuar la colecta a la misma hora del dia y lo más temprano que sea posible, manteniendo los vegetales colectados a la sombra o en recipientes ventilados.

Si se obtienen las muestras de un supermercado o tienda, tenemos que serciorarnos que los vegetales sean lo más fresco posible y que no hayan estado almacenados por mucho tiempo, o sufridos cambios bruscos de temperatura, humedad, luz y oxigeno ya que esto afecta grandemente su composición vitaminica. A simple vista el vegetal debe lucir fresco, con una textura adecuada, color brillante y grado de hidratación óptimo antes de efectuar la recolección de muestras para análisis.

B. <u>Anotación de Datos</u>:

Para este fin se hace uso de una hoja especial de records, cuadernos de trabajo o cuestionarios de identificación (ficha recolectora de datos) en los cuales se anota la fecha, hora de la recolección de la muestra, número correlativo y codigo o clave de análisis para el laboratorio; El nombre comun ó vulgar usado en la comunidad para cada uno de los vegetales en particular, clasificación botánica y nombre en ingles. El sitio o lugar de la colecta y el sitio de origen de la planta (aldea, finca, municipio, departamento, país etc.) Se anota la parte de la planta colectada, por ejempo: raíz, tallos, hojas, flores, fruto o enteras; El precio de la muestra por unidad de venta: manojo, unidad, onzas, libras etc. Peso de la muestra en gramos (total comprado) o peso bruto, el peso neto ó porción comestible para calcular el porcentaje de desgaste o tara. Se prefiere trabajar en base a 100 gramos de porción comestible para el análisis de laboratorio o en sus equivalentes cuando es necesrio para los calculos finales.

Se buscan y se anotan otros datos disponibles, siempre que tengan algun interés práctico, por ejemplo: la frecuencia de lluvias en la localidad (medida en pulgadas), calidad del terreno, altitud, clase de fertilizantes utilizados para mejorar los cultivos o plagicidas, si existe un sistema de irrigación o cualquier otra modificación efectuada, para lo cual es necesario ponerse en contacto con personas que conoscan de cultivos, como agricultores, agrónomos etc. Asi como de los usos locales de las plantas como alimento para lo cual se entrevista a jefes de cocina o amas de casa.

C. Tratamiento Mecánico de la Muestra:

Si se esta trabajando en una aldea o cacerio, se improviza un lugar adecuado para trabajar la muestra, para mejores resultados se selecciona una pieza con ventilación e iluminación adecuadas, escrupulosamente limpia. En una mesa de buen tamaño se instala el equipo portatil. Antes de tratar la muestra es de mucho interes para los archivos de la institución fotografiarla con pelicula de color.

Procedimiento:

a) Se pesa la muestra tal como fue recogida, sin lavar ni quitar partes que por cualquier circunstancia no se comen, se anota este peso (bruto) en la hoja de records, representa el total comprado.

b) Seguidamente se selecciona la parte comestible, si en esta parte seleccionada entran pericarpio u hojas, se lavan perfectamente en agua corriente para quitar toda sustancia que pueda alterar los datos finales, se enjuagan en agua destilada y se dejan secar a la sombra en la mesa de trabajo, por una o dos horas, otra forma es estilarlas en coladores o escurridores de plástico y ejercerles una lijera presión con toallas de papel absorvente para eliminar el exceso de liquido, una vez bien seca la muestra se hace una segunda pesada total o dato de rendimiento (peso neto) que representa la porción comestible.

c) Se efectua el cálculo de porcentaje de desgaste, pesando el material que sobro o porción no comestible y se relaciona con el total comprado o peso bruto.

D. Procedimiento de Estabilización:

Se describe si los materiales para la muestra estan crudos, es

decir en fresco o si se les efectuo algun procedimiento para estabilización enzimática que consiste en la aplicación del método de blanqueado al vapor por 2 v 5 minutos para lo cual se pesan 100 gramos de muestra peso neto o porción comestible en fresco (crudo), previamente se pone a hervir agua hasta los 2/3 inferiores de una olla de peltre o acero inoxidable y se lleva a ebullición, luego en la parte superior de la olla se coloca un colador de sedazo conteniendo la muestra del vegetal, sin que tome contacto con el agua solamente que reciba el vapor por el tiempo definido de 2 y 5 minutos tapado, luego se retira e inmediatamente se sumerge en un recipiente conteniendo agua fría con algunos cubos de hielo y se deja enfriar por 5 minutos, se saca y se deja estilar en un colador de plástico o se le hace una lijera presión con toallas de papel absorvente para quitarle el exceso de liquido, luego se pesa nuevamente la muestra post blanqueado, para anotar los cambios en ganancia o perdida de agua.

E. Empaque y Sellado:

La muestra ya estabilizada o bien el material en fresco ya pesado se coloca dentro de bolsas plásticas de polietileno esteriles, con cierre hermético, debidamente rotuladas utilizando un marcador de tinta permanente para su identificación.

F. Saponificación:

Es una técnica utilizada para eliminar las clorofilas, lipidos indeseables e hidrolizar ésteres de carotenoides. Pero se sabe que existe un porcentaje de perdida de los carotenoides en la aplicacion de ésta técnica. No obstante en un estudio comparativo de seis procedimientos de saponificación, fué comprovado que tanto

las pérdidas cuantitativas como la formación de artefactos (isomeros cis y epoxicarotenoides) ocurren y su incidencia aumenta con la temperatura y la concentración de KOH. La magnitud de la degradación vario para diferentes carotenoides, siendo las provitaminas considerablemente más resistentes que la luteína, la violaxantina y neoxantina. Las pérdidas de carotenoides se reducen realizando la saponificación en frío (temperatura ambiente) y en atmósfera de nitrogeno o en la presencia de pirogalol. Con muestras que contengan apocarotenales, debe asegurarse la eliminación previa de toda la acetona, pues cualquier reciduo se condensará aldólicamente con esos carotenoides formando metil cetonas.

VII. TRANSPORTACION DE LAS PLANTAS PARA ANALISIS DE LABORATORIO:

A. Manejo, transporte y almacenaje de todas las plantas:

Inmediatamente se colocan dentro de hieleras de duroport o de plástico con cierre hermético, preferiblemente con hielo seco, a fín de mantener una alta temperatura para que se congelen en menor tiempo y se mantienen así para su transporte al laboratorio respectivo para el análisis; luego se transfieren al frizer o cuartos congelados a una temperatura de menos 20 grados centigrados hasta el momento de su extracción y análisis.

Debemos de reducir al mínimo el tiempo entre la colecta y el almacenaje defínitivo, no debiendo exeder de 48 horas, para asegurarnos del buen estado de las muestras, y en una a dos semanas realizar todas las extracciónes, principalmente de las muestras en fresco que han sido congeladas unicamente ya que se continua la degradación de los carotenoides por la acción enzimática de la

lipoxigenaza por lo que es importante mantener la cadena del frío hasta el momento de su análisis.

B. Requerimientos de entrada para el transporte de plantas:

VIII. DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN EL LABORATORIO:

En razon de la conocida inestabilidad de los carotenoides, medidas de precaución deben ser tomadas rutinariamente en el laboratorio. Entre estas merecen destacar: 1) el uso de solventes de grado análitico o destilados, libres de impurezas destructivas (ejem. éter etílico y tetrahidrofurano libres de peróxidos, cloroformo libre de ácido); 2) protección contra la luz y el calor (ejem. trabajandose con poca luz y evitándose el calentamiento; 3) tiempos de análisis cortos; 4) aplicación de atmosferas inertes (ejem. cambiando el aire del recipiente por nitrogeno; y 5) utilización de agentes antioxidantes y neutralizantes ($MgCO_3$).
Una sistemática recomendable es análizar las muestras inmediatamente después de recibidas y proseguir hasta el fin, sin interrupción.

1. Reactivos:

2. Procedimiento de Extracción:

3. Manejo de Extractos Químicos:

El almacenamiento de extractos o fracciones, aún que sea a baja temperatura, produce degradación de los carotenoides. La presencia de carotenoides cis- y epoxi-derivados son un buén indice de que los cuidados para evitar la isomerización y oxidación.

4. Inyección y condiciones del HPLC para el análisis:

Determinación de humedad:

Procedimiento:

Se pesa una cápsula secadora de aluminio en una balanza análitica y luego se pesa una alícuota de la muestra en la cápsula. Se transfiere a un horno de vacío y se seca por 12 horas entre 60 y 70 grados centigrados, con no más de 100 nm. de mercurio de vacío. Para mantener el vacio indicado anteriormente se permite la entrada de aire. Se transfiere la cápsula a un desecador y se pesa tan pronto como llegue a la temperatura ambiente. Se repite el procedimiento de desecación al vacio hasta lograr un peso constante.

Cálculos: Exceptuando el caso en que la muestra contenga apreciables cantidades de aceites volátiles,la pérdida de peso durante la desecación representa la humedad.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso de la muestra} \times 100}{\text{Peso de la muestra.}}$$

IX. CONSIDERACIONES EN LA VARIABILIDAD DEL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN LAS PLANTAS:

Aún con un método químico correcto a su disposición, el químico analitico debe enfrentar dos problemas más: 1) La variación natural entre lotes diferentes del mismo alimento y 2) los factores de converción para transformar el contenido de provitamina en valor vitaminico o actividad de vitamina A.

Está demostrado que la composición de carotenoides varia en funcion de factores tales como el tipo de cultivar, estado de maduración, composición del suelo, clima, parte de la planta utilizada, duración de la pos-cosecha, condiciones de almacenamiento etc., haciendo que el muestreo sea de particular importancia para un resultado confiable. Datos obtenidos de muestras de lote único, por tanto, son de dudosa validez y en nuestra opinion, informacionea adicionales sobre variedad de cultivar, estado de maduración, parte análizada etc. deben complementar los resultados.

A. Variabilidad Genética:

B. Variabilidad Regional:

C. Variabilidad Estacional:

X. GIAS PARA SU AUTO-EVALUACION:

Bibliografía:

Alba Nidia Perez H. "Apuntes sobre Técnicas de Herborización" Centro de Estudios Concervacionistas (CECON), Facultad de Ciencias Quimicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; Serie de Educación Ambiental No.4; Junio de 1,987.

Rodriguez-Amaya D.B; Amaya-Farfan J. Estado actual de los métodos análiticos para determinar provitamina "A".

ISTI-VITAL Taller regional sobre estrategias para mejorar el estado de vitamina A en América Latina y el Caribe. Jun/1990.

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 7 th. edition, pp. 320. Washington D.C.

Anexos:

1. Equivalentes de retinol y sus interacciones dietéticas en unidades de vitamina A.

2. Metodologia para estudios etnográficos de plantas de uso local y regional en la dieta.

3. Metodologia para la identificación taxonómica de las especies de plantas.

4. Requerimientos de documentación para el ingreso de materiales de plantas a Estados Unidos y Canada.

5. Consideraciones matemáticas para la estimación del número de muestras con respecto a los factores de variabilidad inter-especie.

APPENDIX 9

REPORTE DE ACTIVIDADES DEL MES DE ENERO DE 1,992
INTERNATIONAL EYE FOUNDATION
PROYECTO: PROVITAMINA "A"

REUNION CON DIRECTORES DE PROYECTO PROVITA:

Estuvieron presentes Dr. Gustavo Hernández Polanco (Director del programa NCBD-IEF), Dr. Noel Solomons (Coordinador científico NCBD-CeSSIAM), Sr. John Barrows (Coordinador de Vitamina "A" IEF), posteriormente Sr. Jack Blanks (Director de programas IEF), Guisela Leche (Directora de campo).

La directora de campo respondió a los cuestionamientos solicitados por el Dr. Solomons y el Sr. Barrows en relación al avance del proyecto en el componente de intervención.

Informó además, sobre los cambios efectuados según el documento original del componente # 3.

En términos generales, las madres de familia de los hogares participantes, acuden al centro de empaque de su comunidad, por los tres vegetales debidamente pesados (labor previa de las empacadoras).

Las bolsas donde se encuentra el producto, se utilizan básicamente para empacar, procurando que las usuarias del mismo, no las lleven por la dificultad que implica su recuperación.

Por lo tanto, se despacha pasando los vegetales y la hierba al recipiente de quien recibe.

La directora de campo hizo saber sobre el control de pesos y variabilidad en cuanto a los vegetales, especialmente la hierba (quilete).

Se hizo referencia a los resultados que se van obteniendo y la manera de registrarlos, lo que da detalle a cada una de las actividades de campo.

Todo el equipo de trabajo tiene funciones específicas, las que fueron detalladas en su oportunidad.

Por parte de los directores locales, se determinó que el sobrante de zanahoria y camote quedara para uso exclusivo del Comité Nacional Pro-Ciegos y Sordomudos de Guatemala.

El Sr. John Barrows solicitó un informe, puntualizando el contenido de su interes:

a) Contactos iniciales con las autoridades.
b) Justificación verbal del proyeto de intervención.
c) Reporte de actividades.
d) En anexos, mapas de los centros de empaque.
e) En la misma sección, contenido del mensaje educativo.
f) Otros.

80

RESULTADOS DEL TRABAJO DE CAMPO:

En enero continuaba la standarización de pesos por vegetales y hierba para cada una de las aldeas.

Los centros de empaque recibían en cada entrega las siguientes totalidades:

El Naranjo: 20 libras de zanahoria, 80 de camote y 80 de quilete.

El Teocinte: 65 libras de zanahoria, 255 de camote y 260 de quilete.

El peso por cada bulto (3 cajas y/o costales conteniendo zanahoria, 4 de camote y 5 de quilete) se tomó con una balanza "romana".

Este tipo de balanza es utilizada en las aldeas para compra-venta de café y otros granos. Una de sus partes tiene capacidad por mayor para 150 libras y la otra por menor para 50 libras.

Se definió un cuaderno de control en el que se efectuaban registros por totalidad de pesos, así como utilidad, sobrante y desperdicio.

Se prestó mayor atención al quilete, ya que éste según su ciclo de desarrollo variaba ostensiblemente (dada su longitud y estado). Las cantidades a utilizar fueron cambiando, hasta obtener la aproximación más exacta.

Por ejemplo, un bulto de 96 libras contenía 85 manojos. El tamaño de éstos oscilaba entre menos de 80 y más de 100 cms. de longitud, lo que implicaba pesos diferentes para cada manojo.

Por desperdicio se tomaba la hoja caida tanto en la mesa al pesar, como en el suelo al empacar y el tallo en la parte sin hojas a cortar.

Dos ejemplos que ilustran la forma como se explicaba el desperdicio es:

a) El Naranjo: 31 libras (28 de tallo, 2 de hoja caida en la mesa y 1 para envolver -hoja de plátano-).

b) El Teocinte: 41 libras (37 de tallo, 3 de hoja caida en el suelo y 1 en la mesa).

Dado el desperdicio, -especialmente si la hoja estaba más desarrollada y caía con mayor facilidad- se decidió hacer un aumento para cada unidad familiar.

En El Naranjo se aumentaron 2 onzas por estar incluidos sólo los sujetos menores de 6 años de edad, y en El Teocinte 1 onza ya que participaba todo el grupo familiar.

Lo anterior implicó un aumento de 27 libras aproximadamente.

En relación a la hierba mencionada, también se prestó atención a su humedad y posterior deshidratación.

Fue notoria la diferencia entre el quilete "tierno" y el "sazón". Los sacos generalmente contenían manojos de diferentes tablones y en esto se notaba la variedad antes mencionada.

Hasta la fecha se pretendía recibir un promedio de 475 libras de quilete, siendo difícil para el proveedor llegar a la aproximación exacta.

81

En cuanto a la zanahoria, puede indicarse, que en el transcurso del proceso de trabajo, ésta fue decreciendo, lo que facilitó su manejo para peso y empaque.

Por su parte, las amas de casa, han mostrado preferencia por una zanahoria completa -aunque pequeña- más que por una fracción de alguna grande.

El camote por el contrario, ofrecía mayor dificultad para establecer el peso exacto, oscilaba entre onzas y libras, lo que implicaba notoria variedad.

Con respecto al sobrante de los vegetales y la hierba, se procedió a un uso racional, no relacionándolo con las familias intervenidas.

Para llevar un control adecuado, se procedió a la revisión de las boletas del censo, obteniendo el listado de las familias e individuos no participantes.

Tanto promotores como empacadoras hicieron diferentes entregas, las que se fueron anotando, tratando de cubrir a toda la población (comunidades de intervención).

En dos ocasiones también se distribuyó sobrante en la aldea "Potrerillos" perteneciente a Santa Cruz Naranjo, y que anteriormente fuera objeto de un estudio nutricional por parte de CeSSIAM.

En la aldea El Naranjo, se entregó especialmente quilete a los emigrantes, que se encontraban en esta región por la cosecha del café.

Se continuó durante el mes entregando sobrante, con el objetivo de que toda la población de las comunidades intervenidas se relacionaran con el producto.

De esa manera se fueron desvaneciendo algunos temores iniciales en cuanto a su consumo y "posibles consecuencias".

El sobrante en general, fue destinado los días martes para El Naranjo y viernes para el Teocinte, en cada una de las semanas.

El control de entregas continuó en los cuadernos respetivos.

Tanto promotores como empacadoras se vieron involucrados en el reconocimiento de las familias que recibian producto.

Los primeros hicieron las observaciones y entrevistas indicadas (sólo casos especiales).

Encargándose la directora de campo de supervisar en detalle los puntos anteriores.

Guisela M. Leche K.
Directora de Campo
Fundación Internacional del Ojo

82

LUGAR: ALDEA "EL NARANJO"

EMPAQUE: MARTES Y VIERNES

FECHA: 31 de enero de 1,992

DISTRIBUCION: MARTES, MIERCOLES, VIERNES y SABADO

No	ACTIVIDADES	MES: ENERO																															OBSERVACIONES
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1	Entrega centro de empaque 80 (PM)*			x																													80 = A **
	Entrega centro de empaque 3 (AM)				x																												18 = A
	Entrega a domicilio 15 (AM)				x																												
2	Entrega centro de empaque 87 (PM)							x																									87 = A
	Entrega centro de empaque 6 (AM)								x																								11 = A
	Entrega a domicilio 5 (AM)								x																								
3	Entrega centro de empaque 81 (PM)										x																						81 = A
	Entrega centro de empaque 2 (AM)											x																					17 = A
	Entrega a domicilio 15 (AM)											x																					
4	Entrega centro de empaque 89 (PM)														x																		89 = A
	Entrega centro de empaque 3 (AM)															x																	11 = A
	Entrega a domicilio 6 (AM)															x																	
5	Entrega centro de empaque 78 (PM)																	x															78 = A
	Entrega centro de empaque 12 (AM)																		x														20 = A
	Entrega centro de empaque 8 (AM)																		x														

OBSERVACIONES GENERALES:

(*) Ejemplo 1: Entrega en centro de empaque a 80 personas por la tarde, 3 que fueron entregadas en el siguiente dia y 15 en casas de personas que no acudieron a traer producto.

(**) La letra A significa que las bolsas no fueron entregadas para llevar a las casas.

LUGAR: Aldea "EL NARANJO"

FECHA: 31 de enero de 1,992

No	ACTIVIDADES	MES: ENERO																															OBSERVACIONES
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
6	Entrega centro de empaque 92 (PM)																					x											92 = A
	Entrega centro de empaque 3 (AM)																						x										6 = A
	Entrega a domicilio 3 (AM)																						x										
7	Entrega centro de empaque 80 (PM)																								x								80 = A
	Entrega centro de empaque 14 (AM)																									x							18 = A
	Entrega a domicilio 4 (AM)																									x							
8	Entrega centro de empaque 80 (PM)																												x				80 = A
	Entrega centro de empaque 11 (AM)																													x			18 = A
	Entrega a domicilio 7 (AM)																													x			
9	Entrega centro de empaque 81 (PM)																															x	81 = A

OBSERVACIONES GENERALES:

LUGAR: ALDEA "EL TECOMINTE"

EMPAQUE: MARTES Y VIERNES

FECHA: 31 de enero de 1,992

DISTRIBUCION: MARTES, MIERCOLES, VIERNES y SABADO

No	ACTIVIDADES	MES: ENERO																															OBSERVACIONES
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1	Entrega centro de empaque 179 (PM)			x																													221 = A
	Entrega centro de empaque 5 (AM)				x																												
	Entrega a domicilio 37 (AM)				x																												
2	Entrega centro de empaque 199 (PM)							x																									221 = A
	Entrega centro de empaque 2 (AM)								x																								
	Entrega a domicilio 20 (AM)								x																								
3	Entrega centro de empaque 189 (PM)										x																						221 = A
	Entrega centro de empaque 3 (AM)											x																					
	Entrega a domicilio 29 (AM)											x																					
4	Entrega centro de empaque 192 (PM)														x																		221 = A
	Entrega centro de empaque 5 (AM)															x																	
	Entrega a domicilio 24 (AM)															x																	
5	Entrega centro de empaque 200 (PM)																	x															221 = A
	Entrega centro de empaque 2 (AM)																		x														
	Entrega a domicilio 19 (AM)																		x														

OBSERVACIONES GENERALES:

LUGAR: Aldea "EL TEOCINTE"

FECHA: 31 de enero de 1,992

No	ACTIVIDADES	MES: ENERO																															OBSERVACIONES
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
6	Entrega centro de empaque 192 (PM)																					x											221= A
	Entrega centro de empaque 5 (AM)																						x										
	Entrega a domicilio 24 (AM)																						x										
7	Entrega centro de empaque 197 (PM)																								x								221 = A
	Entrega centro de empaque 3 (AM)																									x							
	Entrega a domicilio 21 (AM)																									x							
8	Entrega centro de empaque 199 (PM)																												x				221 = A
	Entrega centro de empaque 12 (AM)																													x			
	Entrega a domicilio 10 (AM)																													x			
9	Entrega centro de empaque 207 (PM)																															x	221 = A

OBSERVACIONES GENERALES:

REPORTE DE ACTIVIDADES DEL MES DE FEBRERO DE 1,992
INTERNATIONAL EYE FOUNDATION
PROYECTO: PROVITAMINA "A"

DESARROLLO DEL TRABAJO DE CAMPO:

El mecanismo de trabajo continuó de la siguiente manera:

En el parqueo del Comité Nacional Pro-Ciegos y Sordomudos de Guatemala, a las 8:00 horas se ha recibido el producto vegetal de vitamina "A".

El martes de cada semana acude el encargado de la producción de zanahoria, llevando además el camote. El viernes sucede a la inversa.

Un transportista de San Juan Sacatepequez llega al mismo lugar, lleva el quilete.

Uno de los promotores (se turnan por semana), recibe el producto, trasladándolo al pick up NISSAN del proyecto PROVITAMINA "A".

Posteriormente se viaja a las aldeas de intervención.

Se pesa en El Naranjo, dejando para esa comunidad 20 libras de zanahoria, 80 de camote y 100 de quilete.

Luego se recorren unos 3 kms. más para llegar a El Teocinte, donde se dejan 65 libras de zanahoria, 255 de camote y 275 de quilete.

Quedando un sobrante, que en este mes se destinó para la población no intervenida de la dos comunidades.

Una vez las empacadoras tienen la totalidad de su producto, proceden a pesar para cada unidad familiar.

Según la tabla: base de datos (pesos), los números de personas que más se manejan en El Naranjo son de 1 a 3, y en El Teocinte de 3 a 7.

Cada bolsa de empaque tiene un número de orden y uno que indica la cantidad de miembros por familia, lo que facilita el proceso de trabajo.

En El Naranjo una empacadora pesa zanahoria y camote, la otra recibe, adjunta la bolsa de acuerdo al orden correspondiente, posteriormente se cambia la función con respecto al quilete.

En El Teocinte simultáneamente una empacadora pesa zanahoria y camote, otra quilete, las dos empacadoras restantes reciben y ordenan una mayor cantidad de bolsas,en relación a la otra aldea.

Finalizando el trabajo, se procede a la entrega del producto, despachándolo a la persona que recibe en su propia bolsa.

En ocasiones se ha despachado de forma inmediata, si el material para empacar ha llegado tardíamente.

$1

De esta forma (ver cuadros adjuntos) queda un día para empaque y distribución, en el segundo también se distribuye, repartiendo a domicilio las bolsas que no fueron recogidas.

Inicialmente las madres de familia llegaban a los centros de empaque por su producto, posteriormente hijos de las mismas acudían por él.

Continuó el control detallado en los cuadernos de información sobre entrega del producto, uno por comunidad.

Hasta la fecha el registro en El Naranjo lo llevaba el promotor y en El Teocinte una de las empacadoras

OBSERVACIONES Y RESULTADOS EN LOS CENTROS DE EMPAQUE:

Los días martes y viernes de cada semana, la directora de campo se ha dedicado a la observación directa en los centros de empaque para:

a) Ver en las balanzas los pesos adecuados para cada unidad familiar, de acuerdo a la tabla de datos.

b) No permitir en cada peso un excedente de más de 1 o 1.5 onzas, en casos necesarios sólo para zanahoria y camote, dada la limitante que se presenta al partir los vegetales.

c) Observar el ordenamiento de todo el proceso de peso y empaque.

d) También que la entrega sea en forma ordenada, pidiendo a las personas receptoras llevar su bolsa para poder llenar con su producto.

Algunos que reciben sus vegetales -niños especialmente- no llevan bolsa, en ocasiones se les ha deslizado una parte del conjunto, o bien comen la zanahoria en el trayecto a su domicilio.

Hacia el final de la jornada, se dedica un tiempo para platicar con las empacadoras y promotores sobre las diversas eventualidades, tratando de mejorar el mecanismo de trabajo.

Se exponen limitantes con las soluciones adecuadas para la comunidad donde se interviene.

Las sugerencias por parte de la directora de campo han sido mejor acatadas en el equipo del Naranjo, por lo que los resultados son aceptables.

Esto ha implicado mayor permanencia de la misma en El Teocinte, insistiendo sobre los aspectos que deben realizarse a cabalidad.

Lo anterior implicó que la directora de campo decidiera cambios en esa comunidad en cuanto a:

a) Suspensión de labores por parte de una empacadora que también se encargaba del reparto a domicilio.

b) Cambio de centro de empaque, el anterior funcionaba en fines de semana y días festivos como expendio de licor "cantina", al respecto no se manifestaron prejuicios por parte de los receptores del producto.

88

Sin previo aviso a los pobladores fue efectuado el cambio, del anterior lugar a la casa del promotor del proyecto.

Los vecinos se dieron cuenta inmediatamente, por encontrarse a corta distancia del anterior centro de empaque, también corrió la voz por transmisión individual.

El nuevo centro de empaque se encuentra ubicado en el área céntrica de la aldea, le circunda un molino para masa y una tienda grande con artículos de primera necesidad.

Por lo tanto, la gente acudió de igual manera a este lugar, incluso se comentó sobre su mejor accesibilidad.

De esta forma, quedaron establecidas nuevas bases, como un horario definido, efectuando las entregas de 5:00 a 7:30 p.m., y al día siguiente a temprana hora, cuando las amas de casa inician sus labores.

Se acordó no entregar más de una bolsa con producto a personas que llevaran a vecino(s), exceptuando los casos reconocidos cuando cohabitan una casa (familia extendida) y comparten la misma cocina.

En el caso de El Naranjo, la situación difería en varios aspectos. El producto era pesado con prontitud por las pocas cantidades a manejar, existía un horario específico para la distribución de ambos días.

El centro de empaque continuaba funcionando en el lugar más céntrico de la comunidad, circundándole tiendas que suministran artículos básicos y un molino para masa.

SOBRANTE DE LOS TRES VEGETALES:

Con el propósito de cubrir a toda la población de las comunidades intervenidas, se continuó con la distribución de este sobrante. (Ver anexo: listados).

Terminándose dicha actividad el miércoles 5 en El Naranjo y el sábado 8 en El Teocinte; de esta manera la primera entrega de zanahoria y camote para el Comité Pro-Ciegos y Sordomudos de Guatemala se realizó a partir del miércoles 12 de febrero.

El concepto que implicaba deshacerse del quilete en las mismas aldeas resultó inadecuado, por lo que se buscó otro mecanismo para diluirlo.

En base al listado de personas no intervenidas y de aquellas que no compartieran la misma cocina de las que recibían producto, se procedió a la entrega, chequeando a los receptores.

La entrega generalmente consistía en un manojo de la hierba, y se le dio prioridad -dadas las pocas libras de sobrante- a personas ancianas, viudas, niños deficientes de salud mayores de 7 años y otros casos especiales.

El proyecto: Construcción de carretera de Barberena a los municipios de Nueva Santa Rosa y Santa Cruz Naranjo, se inauguró oficialmente el 31 de enero de 1,992.

Esto implicó determinados cambios en las comunidades del proyecto Provita.

39

Trabajadores de la construcción, miembros de "SIGMA" y "Dirección General de Caminos", y habitantes de áreas circunvecinas solicitaban el quilete, reconociéndolo como una hierba de gran valor.

Los trabajos de construcción - aun frente al centro de empaque- no impidió la interrupción de recoger el producto, sólo que algunas madres de familia impidieron que fueran sus hijos, por temor a la movilización de las máquinas.

PRIORIDAD DEL QUILETE:

Independientemente de que a nivel popular se le conoce como alimenticio, reportaron algunas entrevistadas que también posee propiedades medicinales. Notorio interés por esta hierba.

La cantidad en libras a emplear constantemente resultó variable, deduciéndose básicamente de su tamaño.

Por ejemplo, a un manojo con longitud de 100 cms. de hoja grande y tallo grueso, se le quitaba la parte de éste que no tenía hojas, lo que medía 25 cms. con un peso de 7 onzas.

Dada la demanda del quilete, se dejó sobrante en otra área con el propósito de que la gente lo reconociera en forma independiente al centro de empaque.

Fueron los promotores los encargados de organizar esta actividad.

REUNIONES CON EQUIPO DE TRABAJO:

Estas fueron efectuadas periódicamente para comentar sobre el avance del proyecto en cuanto a su distribución y encontrar nuevas posibilidades de mejoramiento en cuanto al trabajo.

La directora de campo recibía constantemente la información solicitada.

Con promotor de El Naranjo y empacadora de El Teocinte, se siguió efectuando el registro de cantidades recibidas, empaque, distribución y entrega a domicilio, así como control de utilidad, sobrante y desperdicio.

En la segunda quincena de este mes, se tenía disponible los datos concernientes a niños recién nacidos, por lo que se agregaría el contenido de 1 persona más a los casos especiales, considerando 3 meses de edad como la apropiada para consumir estos vegetales, expresado por las mismas madres de familia, lo que es propio en estas comunidades.

14 niños por agregar en la aldea El Naranjo y 27 en El Teocinte, datos que fueron agregados en las observaciones de las boletas de censo: # de sujeto, sexo y fecha de nacimiento.

Se planificó sobre las visitas domiciliarias, indicando el contenido del mensaje educacional.

90

Los criterios para efectuar las visitas domiciliaras, se priorizaron de la siguiente forma:

a) Madres con niños recién nacidos de fams. participantes.
b) Personas que no recogen en centro de empaque.
c) Personas que reciben por vecino.
d) Personas que reciben por reparto a domicilio.
e) Familias pendientes de boleta.

Se entrevistaron señoras a quienes constantemente se les lleva el producto a su casa, argumentaron razones como: dificultad para salir por tener hijos de muy corta edad en casa, embarazo, lejanía , problemas de salud.

NOTA: Resultados de entrevistas serán expuestos en el siguiente informe de actividades.

Guisela M. Leche R.
Directora de Campo
Fundación Internacional del Ojo

91

N O T A :

Borrador que contiene lista de familias no intervenidas.

En términos generales indica la cantidad de veces que recibieron el producto (zanahoria, camote y quilete).

En ésta no se encuentra incluido el equipo de trabajo.

"EL NARANJO"

No. Familia	FAMILIAS QUE NO SON FAVORECIDAS CON EL PRODUCTO PROYECTO VITAMINA "A".	M	R	J	TOTAL
03	Patricia de Páz.....		1		1
04	Claudia Revolorio.....	1			1
05	Dionisia Canúz Guzmán.....	1			1
07	Delfina Osorio.....	1			1
10	Nery Elizabeth Mejía.....	1			1
11	Miguel Revolorio.....		1		1
12	Angel López.....		1		1
14	Agustina Hernández.....	1	2		3
15	Estela Aquino.....	1	1		2
16	Gregoria Aquino.....	1			1
18	Martha Batres.....		2		2
19	Arnulfa Quel.....	1	2		3
25	Rosa Etelvina Solares.....	1			1
26	María Dolores Ortíz.....		1	3	4
27	Esperanza Arrecis Hernández.....		3		3
31	Lucia Santos.....	1			1
32	Lorenzo Lechuga.....	1			1
35	Virgilio Alvarez.....		2	4	6
36	Esperanza Solaños Escalante.....	2	1		3
41	Albertina Ortíz Martínez.....	1	1	1	3
42	Arnoldo López Marroquín.....	1			1
44	José Felix Alvarez.....	1	2	2	5
47	María Luisa Yol.....	1	2	1	4
48	Claudia Quel Estrada.....	2	5		7
50	Javier Donis Lémus.....	1			1
54	Lucrecia Mendoza.....	3	3		6
57	José Revolorio de la Rosa.....			2	2
58	Paula Avila.....	1			1
62	José Bernardo Avila.....			4	4
63	Mirna Leiva Gómez.....		3		3
64	María Luz Cruz.....	1			1
66	Elsa de la Rosa Lepena.....	3	1		4
68	María Izabel Galeano.....	1			1
70	Pedro Valenzuela.....	1			1
74	Antonia Santana Yumán.....	1			1

No. en	No. Familia	FAMILIAS QUE NO SON FAVORECIDAS CON EL PRODUCTO PROYECTO VITAMINA "A".	M	R	J	TOTAL
6.	7c	Rosalía del Carmen Olivares.....	1	3		4
7.	80	Abelina Cristina Osorio.....	1			1
8.	81	Ramón Valenzuela.....	1	1		2
9.	82.	Felípa de Jesús Gómez.....	1			1
0.	86	Martha Oliva Santos.....	1			1
1.	93	Felíza Revolorio.....	1			1
2.	94	Pedro Revolorio.....	1			1
3.	95	Felixito Revolorio.....	1			1
4.	97	Judith Alvarez de Revolorio.....	1		1	2
5.	100	María del Socorro Bolaños.....	1			1
6.	101	Piedad Revolorio Bolaños.....	1			1
7.	103	Fernando Soto.....				1
8.	104	Paulino Osorio.....			1	1
9.	105	Piedad del Carmen Revolorio.....	1			1
0.	107	Agustina de Paz Díaz.....	1			1
1.	108	Desiderio Corado Barillas.....	1			1
2.	109	Mayra Aracely Oscal Pirul.....	1			1
3.	110	Calixto Barillas.....	1			1
4.	113	Juan Bautista Contreras.....	1			1
5.	115	Bonifasio López Donis.....	1			1
6.	116	Izabel Gaitán.....	1			1
7.	118	Manuel María López Marroquín.....	1			1
8.	120	Gregoria Marroquín Revolorio.....	1			1
9.	123	Bisita Izabel López Valenzuela.....	1			1
0.	125	Elicio Pérez Teque.....	1			1
1.	128	Paula de Jesús Paniagua.....		2.		2
2.	130	Clemente Antonio Estrada.....	1			1
3.	132	María Izabel Aguilar.....	1			1
4.	133	Agapita Bolaños.....	1			1
5.	134	Damiana Barillas Donis.....	1		1	2
6.	137	Gregoria Zapeda Chávez.....		10		10
7.	139	Felipa Guzmán Santana.....	1			1
8.	141	Emiliana Salazar.....		3		3
9.	143	Diecías Aguilar.....	1			1
0.	146	Cruz Juárez.....	1			1

No. orden	No. Familia	FAMILIAS QUE NO SON FAVORECIDAS CON EL PRODUCTO PROYECTO VITAMINA "A".	M	R	J	TOTAL
71.	148	María Antonia Alvarez.....	1			1
72.	149	Reina de Jesús Aguilar.....	1			1
73.	151	Eulalio Alvarez Flores.....	1			1
74.	153	Victoria Zapeda.....		10		10
75.	154	Feliza Aguilar.....	1			1
76.	155	Luz María Yúmán.....	1			1
77.	160	Angela Soto.....	1			1
78.	163	Josefa Aguilar.....	1	1		2
79.	165	Juventina Mejía López..... ...		1		1
80.	168	María de Jesús Lanuza.....	1			1
81.	170	Josefina Paniagua Lanuza.....		1		1
82.	172	Marcos del Cid Escobar.....	1			1
83.	173	José Vicente Del Cid.....	1			1
84.	175	Juana Santos.....	1			1
85.	177	Betzabé Contreras.....	1			1
86.	179	María Simona Mejía.....	1			1
87.	181	Domingo Sanjay.....	1			1
88.	183	Dienel García M.....	1			1
89.	185	Francisco Santos Santos.....	1			1
90.	186	Juan F. Monroy.....	1			1
91.	188	Fabio Pérez Morales.....	1			1
92.	190	Alfonso Rivera Reyes.....			2.	2
93.	191	Fidelia Chávez Barrientos.....			1	1
94.	194	Alejandra Barillas Gil.....	2.			2
		OTROS: Emigrantes del Quiché y Huehuetenango durante el período de cosecha				

LISTA DE FAMILIAS NO BENEFICIADAS CON PROYECTO DE VITAMINA "A"

Nº	NOMBRE	FECHA DE ENTREGA				CANTIDAD.
1-	Eustaquio de la Rosa					
2-	Daniel Franco			1		1
3-	Gilberta Lopez.	1	2			3
4-	Otilia Campos Ortiz.	1				1
5-	Rosaura Ramirez.	1				1
6-	Vidalia Aguirre	1 1	3			5
7-	Jesus Hernández.	1				1
8-	Abigail Franco	2	1			3
9-	Elisa Ortiz Mejia	1				1
10-	Lucila France	2				2
11-	Florencia Mejia S.	2				2
12.	Maclovia Sian.	1				1
13-	Vitalino Ortiz.	1 1	1			3
14-	Lidia Ortiz.	1				1
15-	Estela Franco.	1				1
16-	Alberto Valenzuela	1				1
17-	Saturnina Ramirez.	1				1
18.	Carmen Alvarez	1				1
19-	Ines Ortiz.	1				1
20-	Francisca Ortiz, de M	1				1
21.	Luis Ortiz.	1	3			4
22-	Dolores Castellanos	1				1
23-	Felisa Santos Martinez	1				1
24-	Berta Alvarez.	1 2				3
25-	Bernardina Mejia	1				1
26-	Guadalupe Rodriguez (mujer)	1 2				3
27-	Aura Franco	1				1
28-	María Franco	1 1				2
29-	Arcadio Franco.	1 1				2
30-	Saturnina Santos.	3 3				6
31-	Ofelia Santos.	1 1				2
32-	Cita Santos	1 1				2
33-	Catalina Solares.	1 1				2
34-	Otilia Santos	1 2				3
35-	Victoria Solares.	1 1				2
36-	Ofelia Orantes.	1 1				2
37-	Rosaura Avila	1				1
38-	Margarita Dávila	1 1				2
39-	Audelia Blanco.	1 2				3
40-	María Olimpia Ortiz.	1				1
41-	Celestina Franco.	1				1
42-	Lilian Franco	1 3				4
43-	Claudia Campos Rodas.	1 3				4
44-	Gregorio Mayen	1 1				2
45-	Mariano Dávila.	1 3				4
46-	Elodia Ortiz.	1 2				3
47-	Domingo Castellanos	2 2				4
48-	Enrique Franco.	1				1
49-	Ana Maria Salazar.	1 2				3
50-	Hermelindo Ortiz. B.	2 2	2			6

Nº	NOMBRE	FECHA DE ENTREGA Ed	Isu	Rosa	Miri	Mary	CANTIDAD
51							
51-	Fransisco Ortiz S.	1	2	1			4
52-	Sotera Castellanos.	1	3				4
53-	Graciela Lara.	4	1	2			7
54-	Piedad Ortiz.	2	1	2			5
55-	Elvia Ortiz.			1			1
56-	Demetria Pineda.	2	1				3
57-	Mercedes Rafael.	1					1
58-	Juan Ortiz.	2		2	2		6
59-	Catalina Lemus.			2			2
60-	Santos Moreira.		1	4	1		6
61-	Zeila Betancourth.			2			2
62-	Jesus Hernández.			3	1		4
63-	Albertina Lemus.				1		1
64-	Virginia Alvarez.			2	1		3
65-	Catalina Lopez.		1	3	1		5
66-	Viviana Meda.			2	1		3
67-	Ambrocia Guillen				1		1
68-	Esperanza Contreras.		1	3	1		5
69-	Cecilio Meda.			2			2
70-	Luisa Castellanos.		1	2	4		7
71-	Eloisa Santos.		1	3	2		6
72-	Barbara Turcios.		1	4	2		7
73-	Apolonia Romero.		1	3	2	1	7
74-	José Luis Mayen.		1		1		2
75-	Santiago Carrillo.		1		1		2
76-	Georgina Ortiz.		1	1	1		3
77-	Marcos Castellanos (mujer)		1	2		2	5
78-	María Ramire,.		1	2	1	2	6
79-	Eulalia Ortiz.					2	2
80-	Epifania Ramirez.			3			3
81-	Bertila Navarro.			3			3
82-	Natalia Rodas.		2	1		2	5
83-	Georgina Ramirez.		1				1
84-	Margarita Lopez.		1				1
85-	Bernardina Cazún.			1		1	2
86-	María Luisa Ramirez.			1			1
87-	Viviano Blanco.		1				1
88-	Odilia Betancourth.	1	2	2			5
89-	Sabina Ramirez.	1		2			3
90-	Diega Mayén.			1			1
91-	Luciano Ramirez.			1			1
92-	Elsa Mejía.		1				1
93-	María Dolores Mejía			2			2
94-	Timotea Morales.		1				1
95-	Zenaida Jolón.			2			2
96-	Nemecio Hernández.	1		2			3
97-	Desiderio Dávila.	1					1
98-	Nicolasa Herrera.	1		2			3
99-	Ignacia Mayen.		2	2			4
100-	Eulalia Hernández.	1		2			3

a1

Nº	NOMBRE	FECHA DE ENTREGA						CANTIDAD
		Ed	Isa	Rosa	Marion	Mary		
101	Petronila Bacc	1						1
102	Victoria Mejia	1						1
103	Fransisca Fajardo.	1						1
104	Imelda Valenzuela	1						1
105	Medarda Franco	1						1
106	Dora Morales.	1						1
107	Olimpia Solis	1						1
108	Josefa Monroy			2				2
109	Clara Hernández.	1						1
110	Engracia Ramirez.			2				2
111	Nicolás Ortiz.	1						1
112	Clara Luz Perez.		5	3				8
113	Rosa Albina Lopez.	1	2					3
114	Jesús Dávila (mujer)							1
115	Nicolás Ortiz.							1
116	Amalia Castellanos							1
117	Isabel Santos Martinez.							1
118	Narcisa Donis.							1
119	Fidelia Ortiz.							1
120	Olivia Castellanos.							1
121	Olivia del Aguila.							1
122	Maximiliano Franco.							1
123	Mirtala Guzman.							1
124	Felisa Castellanos.							1
125	Ubaldo Salazar.							1
126	Adilia Yanes Mejía							1
127	Gertrudis Hernández.							1
128	Alberto Castellanos.							1
129	Marta Mejía G.							1
130	Veda Mejía.							1
131	Clemente Turcios.							1
132	Susana Ortiz							1
133	Alberto Calderón							1
134	Merlinda Turcios.							1
135	Paulina Castellanos.							1
136	Ursula Guillén.							1
137	Agripina Hernández.			1				1
138	Natividad Rodas.			1				1

LUGAR: ALDEA "EL NARANJO"

EMPAQUE: MARTES Y VIERNES

FECHA: 29 de febrero de 1,992

DISTRIBUCION: MARTES, MIERCOLES, VIERNES y SABADO

No.	ACTIVIDADES		MES: FEBRERO																														OBSERVACIONES
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1	Entrega centro de empaque	12 (AM)	x																															17 = A
	Entrega a domicilio	5 (AM)	x																															Continua secuencia de enero
2	Entrega centro de empaque	93 (PM)				x																												93 = A
	Entrega centro de empaque	2 (AM)					x																											5= A
	Entrega a domicilio	3 (AM)					x																											
3	Entrega centro de empaque	92 (PM)							x																									92 = A
	Entrega centro de empaque	3 (AM)								x																								6 = A
	Entrega a domicilio	3 (AM)								x																								
4	Entrega centro de empaque	81 (PM)												x																				81 = A
	Entrega centro de empaque	0																																18 = A
	Entrega a domicilio	18 (AM)													x																			
5	Entrega centro de empaque	59 (PM)															x																	59 = A
	Entrega centro de empaque	21 (AM)																x																40 = A
	Entrega a domicilio	19 (AM)																x																
6	Entrega centro de empaque	38 (PM)																			x													38 = A
	Entrega centro de empaque	36 (AM)																				x												61 = A

OBSERVACIONES GENERALES:

(*) Se adiciono 1 familia por no encontrarse en su comunidad durante el censo efectuado.

LUGAR: Aldea "EL NARANJO"

FECHA: 29 de febrero de 1,992

	No	ACTIVIDADES	MES: FEBRERO																															OBSERVACIONES
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
		Entrega a domicilio 25 (PM)																			x													
	7	Entrega centro de empaque 28 (PM)																					x											28 = A
		Entrega centro de empaque 47 (AM)																						x										71 = A
		Entrega a domicilio 24 (PM)																						x										
**	8	Entrega centro de empaque 42 (PM)																									x							42 = A
		Entrega centro de empaque 45 (AM)																										x						58 = A
		Entrega a domicilio 13 (PM)																										x						
	9	Entrega centro de empaque 27 (PM)																												x				27 = A
		Entrega centro de empaque 42 (AM)																													x			73 = A
		Entrega a domicilio 31 (PM)																													x			

OBSERVACIONES GENERALES:

(**) Se adiciono 1 familia por no encontrarse en su comunidad cuando se efectuo el censo.

A partir del miercoles 19 se continuo con la distribucion durante la mañana, efectuando las entregas a domicilio despues del medio dia.

100

LUGAR: ALDEA "EL TEOCINTE"

FECHA: 29 de febrero de 1,992

EMPAQUE: MARTES Y VIERNES

DISTRIBUCION: MARTES, MIERCOLES, VIERNES y SABADO

No	ACTIVIDADES	MES: FEBRERO																															OBSERVACIONES
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1	Entrega centro de empaque 2 (AM)	x																															
	Entrega a domicilio 12 (AM)	x																															Continua secuencia de enero
2	Entrega centro de empaque 198 (PM)				x																												221 = A
	Entrega centro de empaque 0					x																											
	Entrega a domicilio 23 (AM)					x																											
3	Entrega centro de empaque 199 (PM)							x																									221 = A
	Entrega centro de empaque 0								x																								
	Entrega a domicilio 22 (AM)								x																								
4	Entrega centro de empaque 201 (PM)											x																					221 = A
	Entrega centro de empaque 0												x																				
	Entrega a domicilio 20 (AM)												x																				
5	Entrega centro de empaque 205 (PM)														x																		186 = A
	Entrega centro de empaque 0															x																	27 = B
	Entrega a domicilio 16 (AM)															x																	8 = C
6	Entrega centro de empaque 197 (PM)																		x														197 = A
	Entrega centro de empaque 0																			x													20 = B

OBSERVACIONES GENERALES:

LUGAR: Aldea "EL TEOCINTE"

FECHA: 29 de febrero de 1,992

No	ACTIVIDADES	MES: FEBRERO																															OBSERVACIONES
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
	Entrega a domicilio 24 (AM)																			x													4 = C
7	Entrega centro de empaque 166 (PM)																					x											221 = A
	Entrega centro de empaque 25 (AM)																						x										
	Entrega a domicilio 30 (AM)																						x										
8	Entrega centro de empaque 198 (PM)																									x							219 = A
	Entrega centro de empaque 10 (AM)																										x						2 = B
	Entrega a domicilio 13 (AM)																										x						
9	Entrega centro de empaque 198 (PM)																												x				216 = A
	Entrega centro de empaque 12 (AM)																													x			5 = B
	Entrega a domicilio 11 (AM)																																

OBSERVACIONES GENERALES:

102

APPENDIX 10

Analysis of Provitamin A Content in Guatemalan Sweet Potatoes

Report to International Eye Foundation
Bethesda, MD

And

Dr. Noel Solomons
CeSSIAM

March 1992

Prepared by:
Ruth H. Watkins and Steven J. Schwartz
North Carolina State University

Introduction:

Samples from CeSSIAM of three varieties of sweet potatoes and one variety of sweet potato buds were analyzed to determine the provitamin A content. The only significant provitamin A compound in sweet potatoes is β-carotene. The goals were to find the β-carotene content of these samples, convert β-carotene values into retinol equivalents and to compare the differences between the three sweet potato varieties. Likewise, the provitamin A value of the bud product was determined and will be used to evaluate the storage stability of β-carotene in the bud.

Experimental:

The fresh sweet potatoes were harvested and blanched (less than 24 hours from harvest) for 5 minutes. One-hundred grams each of 14 samples were quick frozen on dry ice and shipped to this lab for analysis. The samples contained three varieties: 4 "pale", 4 "pigmented" and 6 "less pale" samples. The samples were separated visually upon arrival into their respective classes. The samples numbered 4 and 6 were not of the same "less pale" color as the other four samples in this variety but were labeled as "less pale" because they were slightly darker than the "pale" variety. Samples were combined into extraction pairs of like variety. In total, seven blanched sample extractions were performed. The buds arrived in six bags and two extractions from each bag were performed.

The extraction procedure for the blanched tissue followed that of the previously reported method. The method for extracting the buds was altered to include more water to make the initial puree. Thirty grams of buds were added to 130 mL of water and blended to make a puree from which the 10 grams for extraction was taken.

The HPLC and moisture analysis procedures followed the previous procedure.

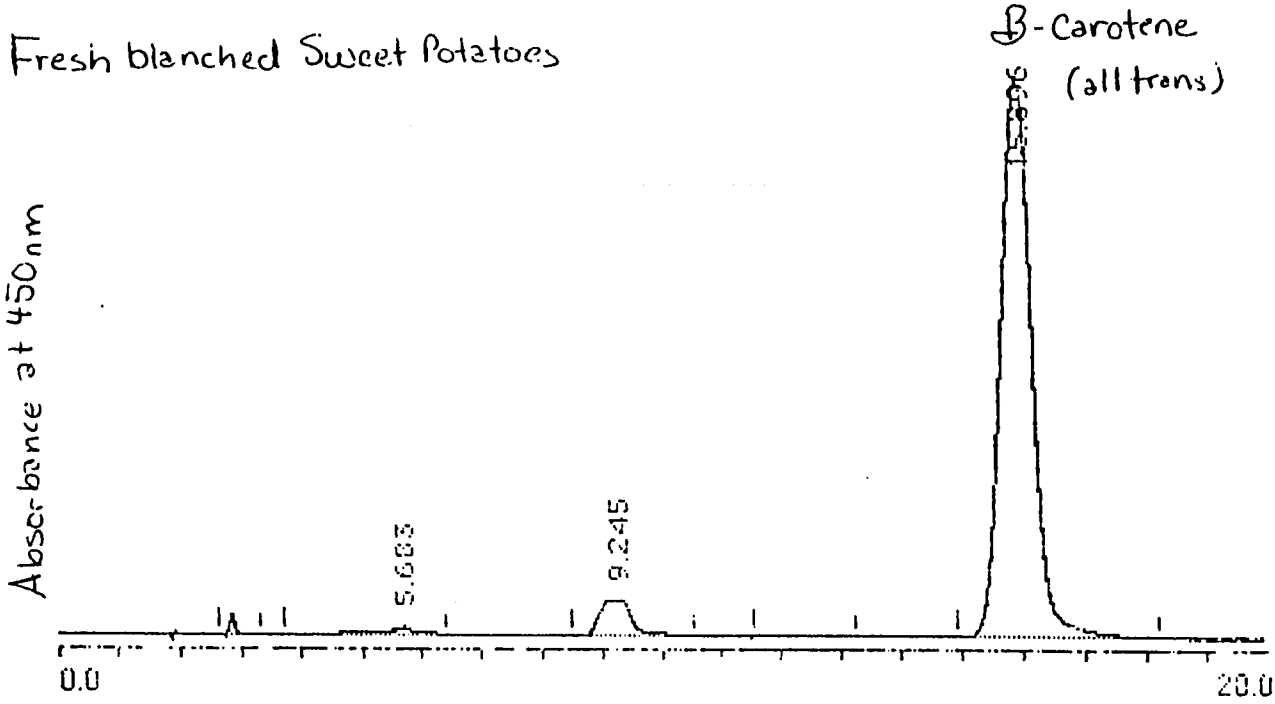
Results and Discussion:

The provitamin A carotenoid, β-carotene, is found in abundance in sweet potatoes. The predominant form of β-carotene in the blanched and bud samples was the all-trans form. However, during the thermal process for producing buds, significant quantities of the cis isomers were formed. This conformational change can be seen in the differences noted in the enclosed chromatogram. This isomeric change does not affect the calculation for provitamin A activity. But, studies have shown that isomerization of the all-trans to the cis isomers reduces the biological availability of β-carotene as a precursor to vitamin A (Zechmeister, 1949 and Sweeny and Marsh, 1971).

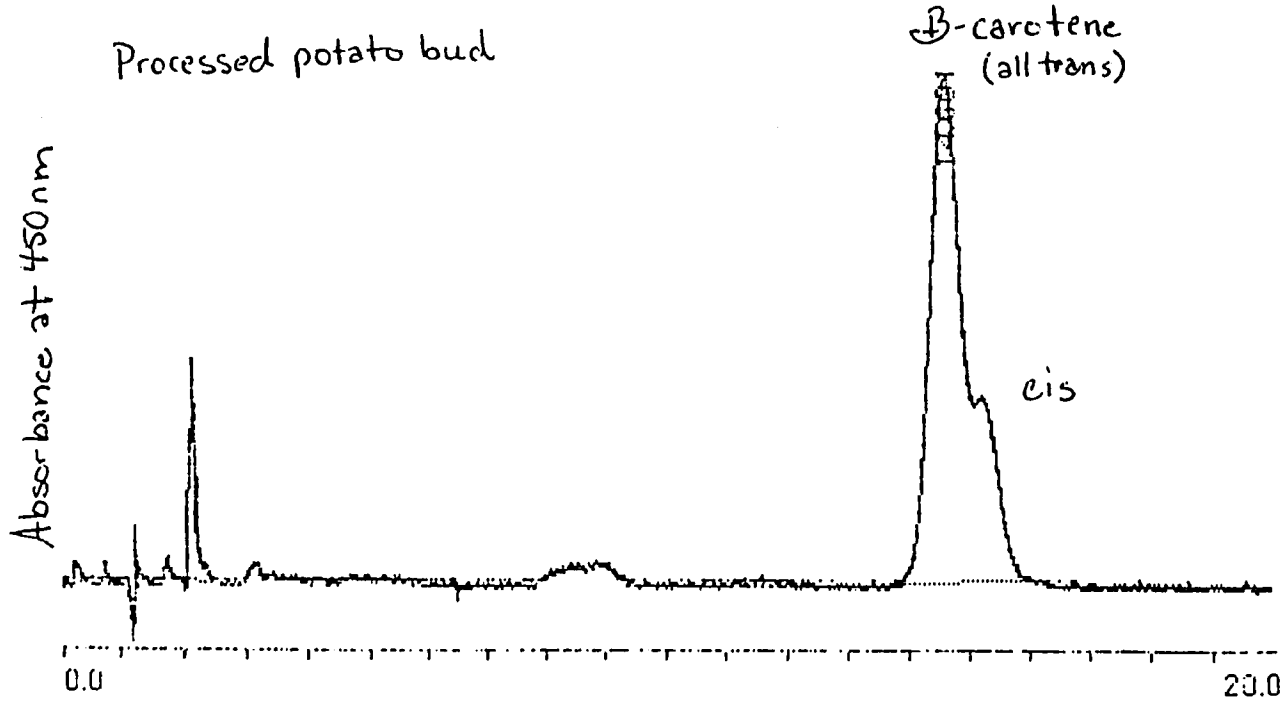
The concentration of β-carotene and RE (retinol equivalent) value of the sweet potato and bud samples are shown in table 1. The comparison of the RE in blanched samples versus the processed buds is on a dry weight basis. The percent remaining moisture in the processed buds was very low and outside the range of measurement with the current method. Therefore, it was assumed that the moisture content was 0% in the buds. The total RE in the buds was higher than that found in the pale samples (improved variety intense orange color produced by ICTA in La Fragua, Zacapa) and slightly higher than the less pale samples (variety purple peel and yellow pulp from San Miguel Duenas, Sacatepequez, Antigua). The pigmented samples (387 variety produced by ICTA in La Fragua, Zacapa) had the highest RE of all the samples.

The standard deviation between samples of the same variety was highest for the less pale samples. This was due, in part, to the inclusion of samples 6 and 4. This pair of sweet potatoes more closely resembled the pale variety than the less pale variety. The lowest standard deviation was between the the two samples of the pale variety. The standard deviation was acceptable for the buds and showed little variation between the six sample bags. The pigmented samples also had a high standard deviation. Previous work also showed high variability between samples. This variation

Fresh blanched Sweet Potatoes



Processed potato bud



may be due to may factors including: experimental error, crop location, climate (rainfall), and between plant differences.

In summary, the pigmented variety of sweet potato had the highest provitamin A content and the RE was higher in this variety than in the typical American variety (44.3 RE as compared to 8.8 RE (Adams, 1975)). The other two varieties and the bud had lower RE values. Raw data and calculation procedures can be found in the Appendix.

References

Adams, C.A. 1975. "Nutritive Value of American Foods". Ag. Handbook No. 456. US Printing Office, Washington, DC.

Sweeny, J.P. and Marsh, A.C. 1971. Effect of Processing on Provitamin A in Vegetables. J. A. Diet. Assoc. 59:238-243.

Zechmeister, L. 1949. Stereoisomeric Provitamins A. Vitamin. Horm. 7:57-81.

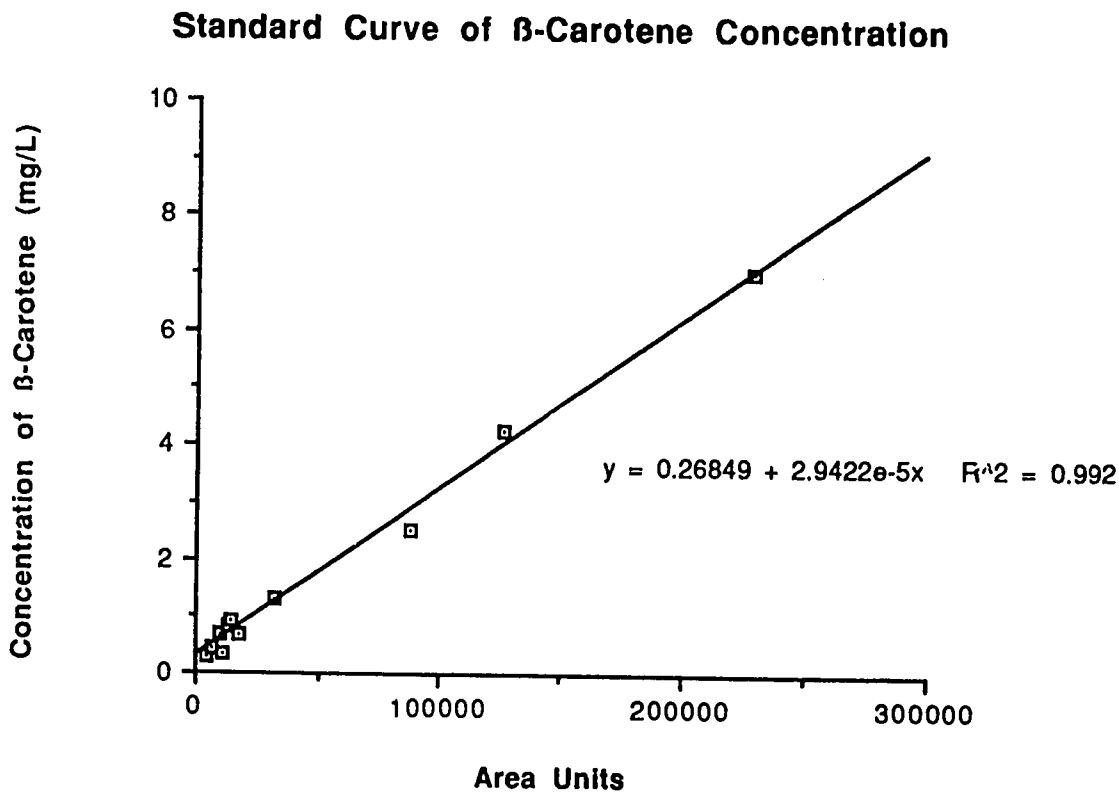
Comparison of RE Values Between Processed and Blanched Samples

Bud Sample Number	ß-carotene µg/g Bud	Retinol Equivalent Per Gram of Bud
1	59.2	9.9
1	55.4	9.2
2	57.2	9.5
2	54.5	9.1
3	58.9	9.8
3	60.5	10.1
4	62.8	10.5
4	61.8	10.3
5	50.5	8.4
5	50.5	8.4
6	57.7	9.6
6	60.9	10.1
Average	57.5	9.6
Stnd. Dev.	4.1	0.7

Blanched Sample Number	ß-carotene µg/g Blanched Dry Weight	Retinol Equivalent Per Gram Dry Wt.	ß-carotene µg/g Blanched Wet Weight	Retinol Equivalent Per Gram Wet Wt.
1 and 15	38.2	6.4	10.6	1.8
8 and 10	33.6	5.6	10.6	1.8
6 and 4	15.4	2.6	4.7	0.8
Average	29.1	4.8	8.7	1.4
Stnd. Dev.	12.1	2.0	3.4	0.6
18 and 19	12.8	2.1	4.6	0.8
20 and 24	13.0	2.2	4.2	0.7
Average	12.9	2.1	4.4	0.7
Stnd. Dev.	0.1	0.0	0.3	0.1
27 and 28	1306.2	217.7	239.9	40.0
25 and 26	971.8	162.0	291.2	48.5
Average	1139.0	189.8	265.5	44.3
Stnd. Dev.	236.5	39.4	36.3	6.0

Appendix

1- Concentration curve for β-carotene versus absorbance units
2- Sample calculations for conversion of absorbance unit to RE
3- Table for moisture content of blanched sweet potato samples
4- Table for β-carotene and RE values for blanched sweet potatoes
5- Table for moisture content of bud samples
6- Table for β-carotene and RE value of bud samples


Standard Curve of ß-Carotene Concentration
Concentration of ß-Carotene (mg/L)
10
8
6
4
2
0
0
100000
200000
300000
Area Units
y = 0.26849 + 2.9422e-5x R^2 = 0.992

111

Conversion of β-Carotene to Retinol Equivalents:

Sample calculation: y= concentration of ß-carotene (mg/L)

x= area units from the dynamax integration

$y=2.6849*10^{-1} + 2.9244*10^{-5}$ (x)

mg/L to μg/g sample used 50 mL total sample extraction volume.

1 Retinol Equivalent= 6 μg β-carotene

Moisture Calculations for Blanched Sweet Potatoes

Guatemala # San Miguel	Blanched wt. grams	Original Wt. grams	During blanch H20 + grams	Avg added grams	Wet wt. grams	Dry wt. grams	% solids from puree	Avg Wet wt. grams
1	103.0	100.0	3.0	1.5	9.9	1.3	13.4	9.9
15	100.0	100.0	0.0	1.5	9.9	1.4	14.0	
8	102.0	100.0	2.0	1.0	9.9	1.6	16.1	10.5
10	100.0	100.0	0.0	1.0	11.0	1.7	15.2	
6	100.0	100.0	0.0	1.0	9.4	1.4	14.8	9.5
4	102.0	100.0	2.0	1.0	9.6	1.5	15.7	
Improved								
18	102.0	100.0	2.0	2.0	10.2	1.6	16.2	9.6
19	102.0	100.0	2.0	2.0	9.1	1.8	19.3	
20	100.0	100.0	0.0	1.0	9.5	1.4	15.0	9.8
24	102.0	100.0	2.0	1.0	10.2	1.7	16.7	
Variety 387								
28	104.0	100.0	4.0	3.0	10.0	1.0	9.6	9.8
27	102.0	100.0	2.0	3.0	9.6	0.8	8.2	
26	102.0	100.0	2.0	1.0	9.2	1.4	15.8	8.3
25	100.0	100.0	0.0	1.0	7.4	1.0	13.6	

Note: The sweet potato samples were combined into pairs for preparation of puree and extraction. For example, 1 and 15 were combined and so forth.

Moisture Calculations for Blanched Sweet Potatoes

Guatemala # San Miguel	Avg Dry wt. grams	1/2=wet tissue grams	Minus H2O added from blanch	% solid of tissue	Wet Wt (g) for extraction	Wet Adjusted for Blanch gain (g)	Dry extraction weight grams
1	1.4	4.9	4.9	27.8	5.0	4.9	1.4
15							
8	1.6	5.2	5.2	31.6	5.0	5.0	1.6
10							
6	1.4	4.7	4.7	30.8	5.0	5.0	1.5
4							
Improved							
18	1.7	4.8	4.7	36.0	5.0	4.9	1.8
19							
20	1.6	4.9	4.9	32.1	5.0	5.0	1.6
24							
Variety 387							
28	0.9	4.9	4.8	18.4	5.0	4.9	0.9
27							
26	1.2	4.1	4.1	30.0	5.0	5.0	1.5
25							

ß-carotene Concentration in Blanched Sweet Potatoes

Sample # San Miguel	ß-carotene µg per Gram of wet tissue	ß-carotene µg/g (dry)	Retinol Equivalents Per Gram of Wet tissue	Retinol Equivalents Per Gram of Dry tissue
1	10.640	38.227	1.773	6.371
15				
8	10.627	33.586	1.771	5.598
10				
6	4.742	15.399	0.790	2.567
4				
	Average 8.670 Standard Deviation 3.401	Average 29.071 Standard Deviation 12.065	Average 1.445 Standard Deviation 0.567	Average 4.845 Standard Deviation 2.011
Improved				
18	4.611	12.806	0.769	2.134
19				
20	4.164	12.965	0.694	2.161
24				
	Average 4.388 Standard Deviation 0.316	Average 12.885 Standard Deviation 0.113	Average 0.732 Standard Deviation 0.053	Average 2.148 Standard Deviation 0.019
Variety 387				
28	239.911	1306.206	39.985	217.701
27				
26	291.187	971.803	48.531	161.967
25				
	Average 265.549 Standard Deviation 36.258	Average 1139.005 Standard Deviation 236.459	Average 44.258 Standard Deviation 6.043	Average 189.834 Standard Deviation 39.410

ß-carotene Concentration in Blanched Sweet Potatoes

Sample # San Miguel	Wet Adjusted for Blanch gain (g)	Dry extraction weight grams	Absorbance units (sucessive duplicates)	Average Abs. units	ß-carotene mg/L (wet)
1	4.9	1.4	26235	26495.0	1.048
15			26755		
8	5.0	1.6	26271	26631.5	1.052
10			26992		
6	5.0	1.5	6845	6831.5	0.469
4			6818		
Improved					
18	4.9	1.8	6319	6234.5	0.452
19			6150		
20	5.0	1.6	4826	4886.5	0.412
24			4947		
Variety 387					
28	4.9	0.9	777392	781826.0	23.271
27			786260		
26	5.0	1.5	959112	970670.5	28.828
25			982229		

Moisture Calculations for Buds

Bud bag #	reconstit. grams	added H2O mL	extraction grams	Grams of Buds in extraction	Buds for %H2O grams	water added mL	Wet weight grams
1	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.3
1	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.1
2	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	9.4
2	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.0
3	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	9.5
3	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.3
4	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.1
4	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.5
5	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.6
5	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.9
6	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	9.6
6	30.0	130.0	10.0	1.9	9.0	30.0	10.4

% wet weight of the flake	Avg wet wt grams	Dry weight grams	Avg dry wt grams	% solids	% moisture	Avg % moisture	dry weight of extraction sample
2.4	2.4	2.5	2.4	100.0	0.0	0.0	1.9
2.3		2.4					
2.2	2.2	2.2	2.3	100.0	0.0	0.0	1.9
2.3		2.4					
2.2	2.3	2.3	2.4	100.0	0.0	0.0	1.9
2.4		2.5					
2.3	2.4	2.4	2.5	100.0	0.0	0.0	1.9
2.4		2.5					
2.4	2.5	2.5	2.6	100.0	0.0	0.0	1.9
2.5		2.6					
2.2	2.3	2.3	2.3	100.0	0.0	0.0	1.9
2.4		2.3					

Concentration of ß-carotene in Sweet Potato Buds

Bag #	Flake wt. for extraction (g)	Absorbance units sucessive duplicates	Average Abs. units	ß-carotene mg/L	ß-carotene µg/g bud	Retinol Equivalent Per Gram of Bud
1	1.9	65648.0	66353.0	2.221	59.219	9.870
1	1.9	67058.0				
1	1.9	60242.0	61500.0	2.078	55.412	9.235
1	1.9	62758.0				
2	1.9	63165.0	63725.0	2.143	57.158	9.526
2	1.9	64285.0				
2	1.9	60621.0	60395.5	2.045	54.545	9.091
2	1.9	60170.0				
3	1.9	66085.0	65963.0	2.209	58.913	9.819
3	1.9	65841.0				
3	1.9	67836.0	67950.0	2.268	60.472	10.079
3	1.9	68064.0				
4	1.9	70273.0	70904.0	2.355	62.790	10.465
4	1.9	71535.0				
4	1.9	69845.0	69672.5	2.318	61.824	10.304
4	1.9	69500.0				
5	1.9	55434.0	55235.0	1.894	50.496	8.416
5	1.9	55036.0				
6	1.9	64530.0	64359.0	2.162	57.655	9.609
6	1.9	64188.0				
6	1.9	68945.0	34472.5	1.283	34.206	10.148
6	1.9	68014.0				
					Average 55.699 Standard Deviation 7.935	Average 9.688 Standard Deviation 0.601

118

APPENDIX 11

REPORTE DE ACTIVIDADES
COMPONENTE DE EVALUACION

Meses de enero-abril
Hector Gamero y Marylena Arita

INFORME DE PROVITA
COMPONENTE DE EVALUACION. Período enero-abril

Actividades Realizadas

1. Codificación de Encuestas Dietéticas

Esta actividad consistió en la codificación de unas 500 encuestas con datos de dieta de las tres comunidades en estudio; provenientes de la linea basal y de la primera etapa de seguimiento). Tomando como base la Tabla de Composición de alimentos, que con propósitos de analisis de dieta se ha incluido en paquete estadistico SAS; se elaboró una lista resumen con los códigos de los principales alimentos reportados; la misma se completó con aquellos itemes que aparecieron con menor frecuencia en las encuestas de campo.

2. Listas de Pesos de Alimentos y Preparaciones

Para contar con un archivo de medidas que facilitara e hiciera válido el manejo de la información recolectada, se completó la lista de pesos de alimentos y preparaciones, que se habia iniciado durante el periodo correspondiente a la encuesta dietética basal. Tal actividad consistió en la determinación de pesos por medio de balanza dietética electrónica(la misma que se utilizó en el período basal), de aquellos alimentos y preparaciones que fueron reportados con menos frecuencia a nivel de los hogares encuestados, o que por alguna razón no se lograron pesar dentro de estos mismos hogares en aquella oportunidad. En esta lista (apéndice 1 y 2) se incluyen los pesos de la mayoria de los utensilios que se utilizaron como recursos auxiliares para las entrevistas de campo.

3. Conversión de la Información Dietética Recolectada a Unidades de Peso (gramos). (encuestas de linea basal)

Esta actividad se realizó en dos fases:

a. Revisión de Documentos de Recolección de Datos de Dieta y Entrevistas con Profesionales Expertos en la Materia

En esta primera fase se revisaron varios documentos, entre los cuales el de mayor utilidad fue la Guia Metodológica Para Realizar Encuesta Familiares de Consumo de Alimentos, de la Lica Maria Teresa Menchú, profesional del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Asi mismo resulto de mucho provecho las entrevistas que al respecto se sostuvieron con el Lic. Humberto Mendez, jefe del centro de cómputo del INCAP.

b. Proceso Manual de Conversión a Gramos:

Con las bases de la fase anterior se hizó el proceso manual de conversión de las cantidades de alimentos reportados a la unidad de peso elegida, que en esta ocasión fue gramos. Esta actividad tuvo una duración de tres semanas y se realizó con todos los detalles y especificaciones que requieren los datos de dieta. Este trabajo se hizo para 170, 86 y 32 encuestas de las comunidades

del Teocinte, El Naranjo y Don Gregorio, respecrtivamente.

Es necesario aclarar que previamente se hicieron varios intentos para que esta actividad fuera realizada por la computadora; pero tomando en cuenta lo específico de los cálculos y la toma de decisiones que algunas veces requiere este proceso, se determinó hacerlo en forma manual. Esto en cuanto se refiere a los datos del Recordatorio de 24 Horas, ya que los correspondientes al instrumento de Frecuencia de Consumo de Siete Dias de Vitamina A, se trabajarán desde el inicio por computadora.

4. Entrada de Datos y Formación de Archivos en la Computadora

Esta actividad tambien se llevó a cabo en dos fases:

a. Diseño del Programa de Entrada de Datos.

El programa de entrada de datos fue hecho en Epi Info, por el Lic. Humberto Mendez, profesional contratado para proporcionar asesoria en este campo. En forma previa se realizaron varias sesiones de trabajo con el Lic. Mendez, para establecer la metodologia de trabajo. Durante estas sesiones se hicieron pruebas preliminares con número pequeño de formularios y se tomaron decisiones sobre la forma y conveniencia de incluir la información presente en los mismos.

b. Entrada de Datos.

Esta es la actividad que estamos desarrollando en la actualidad. La semana recien pasada se hicieron varios ejercicios de prueba para determinar y corregir las fallas más freuentes en relación a la entrada de datos. De esta manera pretendemos garantizar la calidad de los archivos que serviran de base para el analisis posterior de la información recolectada. Estimamos que con dedicación exclusiva podriamos estar concluyendo esta actividad en un periodo máximo de dos semanas.

5. Planificación de la segunda Encuesta de Seguimiento

Tambien durante este periodo se llevaron a cabo las actividades de planificación de la segunda encuesta de seguimiento. Tales actividades incluyeron: a) revisión de las listas originales, donde estan consignados los hogares testigos y no testigos de las tres comunidades en estudio; b) distribución aleatoria de los hogares que serán encuestados en esta segunda ronda y c) contacto con las comunidades y actividades de logistica.

6. Tabulación Manual de Algunos Datos de La Primera Encuesta de Seguimiento .

Para tener datos que mostraran la tendencia del consumo o incorporación a la dieta del hogar de los alimentos de la intervención, se hizo una tabulación manual de los formularios de la primera encuesta de seguimiento. Esto se hizo sobre la base de las veces que las madres mencionaron el consumo de quilete, zanahoria y camote, dentro de las preparaciones que fueron registradas en el formulario de recordatorio de 24 horas. Estos datos aparecen en el cuadro resumen del apéndice 3.

Apëndice 1

PROVITA

PESOS DE ALIMENTOS
(en gramos)

1. Tomate	grande	78
	mediano	40
	pequeño	26
2. Papa		190
		115
		40
3. Cebolla		50
		38
		10
4. Tallo de cebolla	mediano	28
	pequeño	11
5. Zanahoria		180
		100
		30
6. chile pimiento		60
		28
		22
7. Pepino		370
		265
		240
8. Remolacha		210
		120
		70
9. Guisquil		500
		340
		170
10. Aguacate		220
		180
		110
11. Guicoyito		310
		250
		130

12. Pepitoria		396 298 200
13. Miltomate	1/2 lb =	230
	1 u =	4
14. Rábanos	1 manojo (19 u) =	195
	1 u =	10
	1 manojo (hojas) =	75
15. Berro	1 manojo (Q.0.35) =	170
16. Chipilin	1 manojo (Q.0.25) =	190
17.Quilete	1 manojo (Q.0.20) =	100
18. Bledo	1 manojo (Q.0.) =	125
19. Yuca		--- 70 35
20. Ejote	1/2 lb =	220
21. Chile jalapeño		16
22. Limones		50 32 26
23. Repollo	1 unidad (Q.0.35) =	242
24. Huevos	1 unidad =	56

25. Banano		86 70 50
26. Majunche		130 104 74
27. Morado, Ingerto y Criollo		65 50 37
28. Manzano		40
29. durazno		-- 46 --
30. Manzana		-- 80 36
31. Queso	1 cuarterón (Q.5.00) = 720 1/2 cuarterón (Q.2..50) = 360 1 pedacito = 38	
32. Crema de finca	1/2 lb. = 1 v. = 8 Oz. = 240 (Q.3.60)	
Crema ilgua	1 v.= 1 bolsita = 8 Oz. = 240 (Q.1.60)	
33. Longaniza	= 40	
34. Salchicha	= 22	
35. Tortillas	= 37	

124

36. Pan francés	(Q.0.16)	=	42
	(Q.0.10)	=	17
37. Pan dulce	(Q.0.16)	=	36
	(Q.0.10)	=	21
	2 x (Q. 0.25)	=	34
	rosca	=	11
	champurrada	=	17
38. Galleta		=	20
39. Ricitos		=	16
40. Ajo		=	1
41. Pollo		=	2.5 lbs
42. Gallina		=	3.5 lbs

Apéndice 2

PROVITA
COMPONENTE DE EVALUACION

MEDIDAS Y PESOS DE ALIMENTOS Y PREPARACIONES

FORMULARIO F24HSCN

CODIGO	ALIMENTO		UNIDAD DE MEDIDA	GRAMOS
202	Frijol Crudo	1	1 libra	460
		2	1/2 libra	230
		3	1/4 libra	115
515	Arroz Crudo	1	1 libra	460
		2	1/2 libra	230
		3	1/4 libra	115
596	Aceite	1	1 chon # 12	140
		2	1 chon # 13	40
		3	1 cda # 14	30
		4	1 octavo	
		5	1 copita	70
		6	1 cda # 15	7
		7	1 cta # 16	3
602	Margarina	1	1 barra	115
		2	1/2 barra	57
		3	1/4 barra	28
		4	1 cda # 15	16
		5	1 cta # 16	5
597	Manteca de Cerdo	1	1 lb	460
		2	1/2 lb	230
		3	1/4 lb	115
		4	1 chon # 12	130
		5	1 chon # 13	45
		6	1 cda # 14	60
		7	1 cda # 15	16
		8	1 cta # 16	6
603	Mayonesa	1	1 cda # 15	23
		2	1 cta # 16	8
001	Crema espesa	1	1 v	230
		2	1/2 v	115
		3	1 cda # 15	23
		4	1 cta # 16	8
002	Crema rala	1	1 v	
		2	1/2 v	
		3	1 cda # 15	15
		4	1 cta # 16	5

016	Queso fresco	1	1	lb		460
		2	1/2	lb		230
		3	1	oz		28
01	Queso duro	1	1	lb		460
		2	1/2	lb		230
		3	1	oz		28
		4	1	cda	# 15	12
		5	1	cta	# 16	6
023	Requesón	1	1	lb		460
		2	1/2	lb		230
		3	1	oz		28
		4	1	cda	# 15	14
		5	1	cta	# 16	7
007	Leche en polvo	1	1	cda	# 15	10
		2	1	cta	# 16	3
		3	1	medida		
005	Leche de vaca Liquida	1	1	v	# 9	210
		2	1	v	# 10	265
		3	1	v	# 11	340
		4	1	tz	# 1	210
		5	1	cda	# 15	6
		6	1	cta	# 16	3
612	Incaparina en polvo	1	1	tz		100
		2	1	cda	# 15	12
		3	1	cta	# 16	4
511	Harina de trigo	1	1	cda	# 15	10
		2	1	cta	# 16	4
		3	1	cda	# 14	38
611	Café de cosecha o bolsa	1	1	bolsita		26
		2	1	cda		6
		3	1	cta		2
		4	1	cda	# 14	26
		5	1	chon	# 13	22
		6	1	tz	# 1	80
		7	1	tz	# 2	68
623	Café soluble	1	1	cda		4
		2	1	cta		2
		3	1	bolsita		
686	Toki	1	1	cda	# 15	14
		2	1	cta		6
		3	1	bolsita		

686	Fresco esencia	1	1	v	# 10	265
		2	1	tz	# 1	180
		3	1	cda	# 15	6
		4	1	cta		3
574	Azucar	1	1	tz#	1	170
		2	1	cda		16
		3	1	cta		6
		4	1	cda	# 14	58
		5	1	chon	# 12	160
		6	1	chon	# 13	46
578	Panela	1	1	tz	# 1	110
		2	1	cda	# 15	10
		3	1	cda	# 16	5
		4	1	chon	# 13	30

PREPARACIONES

001

001	Frijoles cocido	1	1	chon	# 12	184
		2	1	chon	# 13	70
		3	1	cda	# 14	90
		4	1	cda	# 15	24
		5	1	cta	# 16	10
		6	1	tz	# 1	170
		7	1	tz	# 2	160
		8	1	tz	# 3	210
		9	1	tz	# 4	210
		10	1	tz	# 5	290
		11	1	pto	# 7	260
		12	1	pto	# 8	330
002	Frijoles colados	1	1	chon	# 12	180
		2	1	chon	# 13	60
		3	1	cda	# 14	70
		4	1	cda	# 15	20
		5	1	cta	# 16	8
		6	1	tz	# 2	150
		7	1	tz	# 3	200
003	Frijoles volteados	1	1	cda	# 14	80
		2	1	cda		24
		3	1	cta		10

004	Caldo de frijoles	1	1	Chon	# 12	180
		2	1	Chon	# 13	58
		3	1	cda	# 14	36
		4	1	cda	# 15	6
		5	1	cda	# 16	3
		6	1	tz	# 1	180
		7	1	tz	# 2	150
		8	1	tz	# 3	200
		9	1	tz	# 5	280
005	Arroz frito	1	1	Chon	# 12	130
		2	1	Chon	# 13	40
		3	1	cda	# 14	50
		4	1	cda		13
		5	1	cta		7
		6	1	tz	# 2	90
		7	1	tz	# 3	112
		8	1	tz	# 4	122
		9	1	pto	# 7	135
006	Chao min	1	1	Chon	# 12	104
		2	1	Chon	# 13	40
		3	1	Cda	# 14	60
		4	1	cda		30
		5	1	cta		8
		6	1	tz	# 3	140
		7	1	tz	# 2	105
		8	1	tz	# 5	190
007	Hilachas	1	1	Chon	# 12	150
		2	1	Chon	# 13	50
		3	1	Cda	# 14	65
		4	1	cda		30
		5	1	cta		10
		6	1	tz	# 3	200
		7	1	tz	# 2	150
		8	1	tz	# 5	280
008	Ensalada rusa	1	1	Chon	# 12	110
		2	1	Chon	# 13	36
		3	1	cda	# 14	70
		4	1	Cda		26
		5	1	cta		10
		6	1	tz	# 2	100
		7	1	tz	# 3	135
		8	1	tz	# 5	190

009	Ensalada de repollo	1	1 cda	#	14	35
		2	1 Chon	#	13	24
		3	1 cda			9
		4	1 cta			5
		5	1 tz	#	2	65
		6	1 tz	#	3	90
		7	1 tz	#	5	120
010	Ensalada de repollo con mayonesa	1	1 cda	#	14	50
		2	1 chon	#	13	40
		3	1 cda	#	15	9
		4	1 cda	#	16	7
		5	1 tz	#	2	90
		6	1 tz	#	3	120
		7	1 tz	#	5	170
011	Ensalada de pepino con tomate	1	1 Chon	#	13	58
		2	1 cda	#	14	68
		3	1 cda			32
		4	1 tz	#	2	110
		5	1 tz.	#	3	150
		6	1 tz	#	5	220
012	Caldo de res o Pollo sin verduras ni carne	1	1 Chon	#	12	180
		2	1 Chon	#	13	60
		3	1 cda	#	14	36
		4	1 cda			6
		5	1 cta			3
		6	1 tz	#	3	230
		7	1 tz	#	4	230
		8	1 tz	#	5	280
013	Caldo de res o pollo con verduras	1	1 Chon	#	12	240
		2	1 Chon	#	13	76
		3	1 cda	#	14	48
		4	1 cda			8
		5	1 cta			4
		6	1 tz	#	2	200
		7	1 tz	#	3	270
		8	1 tz	#	4	270
		9	1 tz	#	5	2800
014	Caldo con hojas (quilete, chipilin)	1	1 taza	#	3	230
		2	1 taza	#	4	220
		3	1 tz	#	5	270
		4	1 Chon	#	12	200
		5	1 Chon	#	5	70
015	Guacamol	1	1 cda	#	14	74
		2	1 cda			20
		3	1 cta			12

016	Dulce de camote	1	1	tz	# 1	120
		2	1	tz	# 3	160
		3	1	tz	# 4	160
		4	1	tz	# 5	200
017	Atol de incaparina	1	1	v	# 9	240
		2	1	v	# 10	300
		3	1	v	# 11	400
		4	1	tz	# 1	
018	Atol de plátano mosh con leche 0 atol de masa	1	1	v	# 9	210
		2	1	v	# 10	265
		3	1	v	# 11	340
		4	1	tz	# 1	210
019	Quilete frito	1	1	tz	# 3	110
		2	1	tz	# 4	110
		3	1	tz	# 5	140
		4	1	chon	# 12	80
		5	1	chon	# 13	30
		6	1	cda	# 15	12
		7	1	cta	# 16	6
020	Picado de Guisquil con huevo tomate y aceite	1	1	tz	# 1	150
		2	1	tz	# 2	120
		3	1	tz	# 5	220
		4	1	cda	# 14	58
		5	1	chon	# 12	150
		6	1	chon	# 13	50
		7	1	cda	# 15	20
		8	1	cta	# 16	8

Apéndice 3

REPORTE DEL CONSUMO DE ALIMENTOS DE LA INTERVENCION
EN LAS TRES COMUNIDADES DEL ESTUDIO

ALIMENTOS	COMUNIDADES		
	EL TEOCINTE	EL NARANJO	DON GREGORIO
Quilete	21 (28%)	16 (25%)	0 (0%)
Zanahoria	4 (5%)	1 (2%)	2 (11%)
Camote	2 (3)	5 (8%)	0 (0%)

* Datos de la primera encuesta de seguimiento.

APPENDIX 12

CHANGE IN CONSUMPTION PATTERNS OF YELLOW (SWEET POTATO), ORANGE (CARROT) AND GREEN (QUILETE) CAROTENE-SOURCES IN RURAL COMMUNITIES OF GUATEMALA WHEN THE PRODUCTS ARE DISTRIBUTED GRATIS ON A SEMI-WEEKLY BASIS.

[1]JESUS BULUX, [1]HECTOR GAMERO, [1,2]MARYLENA ARITA, [2,3]EUGENIA SAENZ-DE-TEJADA, [2]GUISELA LECHE, [1,2]GUSTAVO HERNANDEZ-POLANCO, and [1]NOEL W. SOLOMONS. [1]Center for Studies of Sensory Impairment, Aging and Metabolism (CeSSIAM), Guatemala, [2]International Eye Foundation, Guatemala, Honduras, and Bethesda, Maryland, USA, 20814, and [3]Universidad del Valle, Guatemala.

Whereas intervention programs based on chemical forms of vitamin A such as retinyl palmitate in capsules or fortified on sugar or monosodium glutamate are recognized as temporary measures in the solution of national problems of hypovitaminosis A, increasing consumption of the vitamin from food sources is considered to be the enduring and sustainable. One model is the promotion of home, school and community gardens with horticultural projects of carotene-rich foods. Questions about the intrahousehold distribution of food sources place in doubt the efficiency and efficacy of plant sources reaching the most vulnerable target subjects, the under-six-year-old children. In low-income populations of the Santa Rosa province, in which prior studies had shown low intakes of plant sources of vitamin A in preschoolers (Zizza CA et al, FASEB J 1990;4(3):A787) a system of twice-weekly distribution of isoprovitaminic portions of sweet potato (Ipomoea batata) carrots (Daucus carota S.), and quilete (Solanum americanum S.) was established in village A (to received 450 RE per day per household member), in village B (to receeive 450 RE per per preschool member), with no distribution to control village C. A baseline evaluation of frequency of intake of carotene sources, of 24-hour recall of a day's intake, and of cultural beliefs and practices regarding foods was conducted. three months later, stratified, selected 24-h recalls revealed a participation (percent of households mentioning recent intake) of 3%, 5%, and 28% respectively, in mentions for the specific yellow, orange, and green plants in village A; 8%, 2%, and 25%, in village B; and 0%, 11%, and 0%, in control village C among preschoolers. A definitive impact on consumption of the green herb with the distribution program is detected.