

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



***“DETERMINACIÓN DE MINERALES Y ÁCIDO FÍTICO POR HPLC-RI EN
CEREALES INFANTILES”***

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre **Universidad Central de
Venezuela** por la Br. Dilia Carolina
Caripà Bravo, para optar al título de
Licenciada en Química.

Tutora: Dra. Rosa Amaro.

Caracas, Octubre de 2008

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado:

“DETERMINACIÓN DE MINERALES Y ÁCIDO FÍTICO POR HPLC-RI EN CEREALES INFANTILES”. Presentado por la Br. Dilia Carolina Caripá Bravo, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por el Reglamento de Trabajo Especial de Grado de la Escuela de Química.

Dra. Rosa M. Amaro F.
(Directora)

Prof. Mercedes Mosqueda
(Jurado)

Prof. Luis Gómez
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios y a la Virgen por acompañarme y cuidarme en cada paso de mi vida.

A mí querida madre Xiomara por darme todo su amor, por su apoyo incondicional, por todos sus sacrificios y por darme la oportunidad de estudiar. Te quiero mucho mamita, gracias por ser tan especial.

A mi papa Antonio por sus consejos.

A mi hermanito Rafael por su cariño y compañía a lo largo de mi vida, por apoyarme y ayudarme en todo momento. Gracias Rafa por tu apoyo incondicional, te quiero muchísimo.

A mi esposito querido Alejandro, por brindarme su amor, compañía y confianza, por darme mucho animo para seguir adelante y por estar siempre dispuesto a ayudarme. Te amo amor de mi vida.

A mi abuelita Vicenta, por sus bendiciones y buenos deseos, por su ayuda en todo momento. Te quiero abuelita.

A mi familia, por estar siempre pendiente de mí y de mi carrera, a mi tía Yalitzza, a mi prima Raymar, a mi tía Margarita, a mi tío Cheo.

A la Universidad Central de Venezuela por abrirme sus puertas y formarme como profesional.

Al CDCH por el financiamiento de esta tesis con el proyecto N° PG 03-12-5132-2008 II.

A mi tutora la Prof. Rosa Amaro por la orientación que me brindo durante el desarrollo de este proyecto, por sus observaciones y enseñanzas, gracias por su cariño y por ser tan especial.

Al Centro de Química Analítica (CQA) de la Facultad de Ciencias, por darme la oportunidad de realizar mi T.E.G en sus instalaciones. A los profesores que conforman este centro, en especial al Prof. Gustavo Pérez, al Prof. Luis Gómez, y al Prof. José Chirinos por su asesoría y apoyo durante el transcurso de mi tesis.

A todos mis compañeros del CQA: Cesar, Mercedes, Raymundo, David, Manuel, Luisa, Yorbin, Jaime. En especial a Juan Pablo, a Katy y a Dario por brindarme su amistad y ayuda incondicional.

A mis grandes amigas Gleidys, Ana y Keyla, con quienes compartí momentos malos y buenos durante la carrera. Las quiero amigas.

A mis amigos Jonathan y Jhonny, por su buen humor, por su cariño y apoyo siempre.

Gracias a todos los que de una u otra forma han estado conmigo en este largo proyecto.

Gracias Totales.....

RESUMEN

El ácido fítico se encuentra en las semillas de cereales, leguminosas, oleaginosas y frutos secos. Desde el punto de vista nutricional, es necesario mantener una dieta equilibrada, variada y completa para garantizar el desarrollo saludable de las personas, especialmente en los niños. De esta manera, los cereales son esenciales en la alimentación infantil ya que proporcionan al infante proteínas, minerales, vitaminas, etc, sin embargo, el ácido fítico presente en los mismos inhibe la absorción del hierro, calcio y zinc al formar complejos insolubles, lo que hace necesario el consumo moderado de los cereales en la alimentación infantil.

Por otra parte, algunos investigadores han planteado que los bajos porcentajes de recuperación en el análisis de ácido fítico en cereales infantiles por la técnica de HPLC-RI están atribuidos al alto contenido de metales en los mismos, a diferencia de los cereales sin procesar, sin embargo, también se ha presentado bajos porcentaje de recuperación para esta técnica con el uso de metodologías deficientes en el tratamiento de muestras.

El propósito de esta investigación fue determinar si los problemas en la cuantificación del ácido fítico en cereales infantiles por la técnica HPLC-RI están asociados a las etapas de pretratamiento de muestras o a la presencia de alto contenido de metales típicos de estas muestras, para ello se realizó el estudio de ácido fítico en algunos cereales de bebe por HPLC-RI empleando la metodología planteada por Hernández. Además se determinó las concentraciones de hierro, calcio y zinc de los cereales seleccionados por EAA, para realizar la correlación de metal-fitato con respecto a sus efectos en el % recuperación del fitato.

Se encontró que los % de recuperación para el análisis de IP_6 en cereales infantiles por el método propuesto son muy bajos (47- 57) %, y que estos valores no solo están relacionados con un alto contenido mineral en el cereal, sino que para muestras como el trigo partido # 1 donde el contenido de metales es bajo, también se encuentra un bajo % de recuperación (70%). La diferencia de este último trigo con el estudiado por Hernández, el cual obtuvo % de recuperación entre 90-92%, fue su menor contenido de IP_6 y su tamaño de grano partido mucho más pequeño, lo que requiere el uso de un paso adicional de filtración tanto en esta muestra como en la de los cereales infantiles.

Estos resultados demuestran que el método HPLC-RI no puede ser utilizado para el análisis de ácido fítico en cereales infantiles, aún cuando algunos autores lo siguen usando libremente.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Estructura química, propiedades.....	5
2.2. Distribución, localización y contenido.....	8
2.3. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).....	9
2.3.1. Cromatografía de Reparto.....	10
2.3.1.1. Cromatografía en fase normal.....	11
2.3.1.2. Cromatografía en fase inversa.....	12
2.3.2. Aplicaciones de la cromatografía de reparto.....	12
2.3.3. Formación de Derivados.....	13
2.3.4. Cromatografía de pares iónicos.....	13
2.3.5. Detectores.....	14
2.3.5.1. Detectores de Absorbancia.....	14
2.3.5.1.1. Detectores de absorbancia ultravioleta con filtros.....	15
2.3.5.1.2. Detectores de absorbancia UV con monocromadores....	15
2.3.5.2. Detectores de índice de refracción.....	16
2.3.5.3. Detectores de Conductividad.....	17
2.4. Espectroscopia de Absorción Atómica en Llamas.....	18
2.4.1. Tipos de Atomizadores utilizados en Espectroscopia Atómica.....	18
2.4.2. Métodos de introducción de la muestra.....	19
2.4.2.1. Introducción de las muestras en disolución.....	19
2.4.2.1.1. Nebulizadores neumáticos.....	19
2.4.2.1.2. Nebulizadores ultrasónicos.....	19
2.4.2.1.3. Vaporizadores electrotérmicos.....	20
2.4.2.1.4. Técnicas de generación de hidruros.....	20
2.4.2.2. Introducción de muestras sólidas.....	20

2.4.3. Técnicas de atomización de la muestra.....	21
2.4.4. Instrumentación para absorción atómica.....	22
2.4.5. Aplicaciones de Espectroscopia de Absorción Atómica.....	23
2.5. Liofilización.....	24
2.5.1. Etapas de la liofilización.....	25
2.5.2. Ventajas de la técnica de liofilización.....	26
2.5.3. Desventajas.....	26
2.5.4. Aplicaciones.....	26
3. ANTECEDENTES.....	27
4. OBJETIVOS.....	32
4.1. Objetivo General.....	32
4.2. Objetivos Específicos.....	32
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
5.1. Análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica en Llamas.....	33
5.1.1. Equipos.....	33
5.1.1.1. Espectrofotómetro.....	33
5.1.1.2. Liofilizador.....	34
5.1.1.3. Mufla.....	34
5.1.2. Reactivos.....	35
5.1.3. Patrones.....	35
5.1.4. Otros suministros.....	36
5.1.5. Metodología Experimental.....	37
5.1.5.1. Secado de la muestra.....	37
5.1.5.2. Digestión de las muestras (método de Ceniza).....	37
5.1.5.3. Determinación por Espectroscopia de Absorción Atómica.....	38
5.2. Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).....	39
5.2.1. Equipos.....	39
5.2.1.1. Bomba.....	39
5.2.1.2. Puerto de Inyección.....	39

5.2.1.3. Columna.....	40
5.2.1.4. Detector.....	41
5.2.1.5. Sistema de adquisición de datos.....	42
5.2.1.6. Ultrasonido de punta.....	43
5.2.1.7. Rota-evaporador.....	43
5.2.2. Reactivos.....	44
5.2.3. Otros suministros.....	45
5.2.4. Soluciones empleadas.....	46
5.2.5. Fase móvil.....	47
5.2.6. Metodología Experimental.....	48
5.2.6.1. Secado de la muestra.....	48
5.2.6.2. Contaminación de las muestras.....	48
5.2.6.3. Extracción del ácido fítico.....	48
5.2.6.4. Pre- concentración del ácido fítico y eliminación del HCl.....	49
5.2.6.5. Determinación por HPLC-RI.....	49
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	50
6.1. Contenido mineral en las muestras de cereales por EAA.....	50
6.1.1. Cereal de trigo Cerelac.....	50
6.1.2. Trigo partido # 1.....	62
6.1.3. Cereal de Arroz Nestum.....	66
6.1.4. Cereal de Maíz Nestum.....	71
6.2. Contenido de Ácido Fítico en las muestras de cereales por HPLC-RI.....	75
6.2.1. Estudios Preliminares.....	75
6.2.1.1. Determinación de las condiciones de trabajo.....	75
6.2.1.2. Eliminación de Grasas.....	77
6.2.1.3. Extracción del ácido fítico.....	79
6.2.2. Determinación del ácido fítico y porcentaje de recuperación.....	81
6.2.2.1. Cereal de trigo Cerelac.....	81
6.2.2.2. Trigo partido # 1.....	86

6.2.2.3. Cereal de Arroz Nestum.....	90
6.2.2.4. Cereal de Maíz Nestum.....	93
7. CONCLUSIONES.....	98
8. RECOMENDACIONES.....	99
9. BIBLIOGRAFÍA.....	100
10. ÁPENDICE.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nº 1. Aplicaciones características de la cromatografía de reparto.....	12
Tabla Nº 2. Atomizadores.....	18
Tabla Nº 3. Condiciones de trabajo.....	50
Tabla Nº 4. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de Cerelac.....	51
Tabla Nº 5. Contenido de Fe en la muestra de Cerelac.....	51
Tabla Nº 6. Prueba estadística: Contraste de Significación.....	52
Tabla Nº 7. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de Cerelac.....	53
Tabla Nº 8. Promedio del contenido de Fe en la muestra de Cerelac.....	53
Tabla Nº 9. Comparación de métodos.....	54
Tabla Nº 10. Condiciones de trabajo.....	55
Tabla Nº 11. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de Cerelac.....	56
Tabla Nº 12. Contenido de Ca en la muestra de Cerelac.....	56
Tabla Nº 13. Prueba estadística: Contraste de Significación.....	57
Tabla Nº 14. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de Cerelac.....	58
Tabla Nº 15. Promedio del contenido de Ca en la muestra de Cerelac.....	58
Tabla Nº 16. Comparación de métodos.....	59
Tabla Nº 17. Condiciones de trabajo.....	60
Tabla Nº 18. Valores obtenidos de Zn para diferentes muestras de Cerelac.....	60
Tabla Nº 19. Contenido de Zn en la muestra de Cerelac.....	61
Tabla Nº 20. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de trigo.....	62
Tabla Nº 21. Contenido de Fe en la muestra de trigo partido # 1.....	62
Tabla Nº 22. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de trigo.....	63
Tabla Nº 23. Contenido de Calcio en la muestra de trigo partido # 1.....	63
Tabla Nº 24. Valores obtenidos de Zn para diferentes muestras de trigo.....	64
Tabla Nº 25. Contenido de Zn en el trigo partido # 1.....	64
Tabla Nº 26. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de Arroz.....	66

Tabla N° 27. Contenido de Fe en la muestra de Cereal Arroz Nestum.....	66
Tabla N° 28. Prueba estadística: Contraste de Significación.....	67
Tabla N° 29. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de Arroz.....	68
Tabla N° 30. Contenido de Ca en la muestra de Arroz Nestum.....	68
Tabla N° 31. Prueba estadística: Contraste de Significación.....	69
Tabla N° 32. Valores obtenidos de Zn para diferentes muestras de Arroz.....	70
Tabla N° 33. Contenido de Zn en el Arroz Nestum.....	70
Tabla N° 34. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de Maíz.....	71
Tabla N° 35. Contenido de Fe en la muestra de Maíz.....	71
Tabla N° 36. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de Maíz.....	72
Tabla N° 37. Contenido de Ca en la muestra de Maíz.....	72
Tabla N° 38. Valores obtenidos de Zn para diferentes muestras de Maíz.....	73
Tabla N° 39. Contenido de Zn en la muestra de Maíz.....	73
Tabla N° 40. Concentración experimental de los metales en las muestras.....	74
Tabla N° 41. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en Cerelac 1	81
Tabla N° 42. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en Cerelac 2	83
Tabla N° 43. Área promedio obtenida para las muestras de cerelac contaminadas.....	84
Tabla N° 44. Porcentaje de recuperación del ácido fítico en la muestra de Cerelac.....	84
Tabla N° 45. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en el trigo 1	86
Tabla N° 46. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en el trigo 2	87
Tabla N° 47. Área promedio obtenida para las muestras de trigo contaminadas.....	89
Tabla N° 48. Porcentaje de recuperación del ácido fítico en la muestra de Trigo.....	89
Tabla N° 49. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en Arroz 1	90
Tabla N° 50. Área promedio obtenida para la muestra de arroz contaminada.....	91

Tabla N° 51. Porcentaje de recuperación del ácido fítico en la muestra de Arroz.....	92
Tabla N° 52. Áreas promedio obtenidas para las muestras de maíz contaminadas.....	95
Tabla N° 53. Porcentaje de recuperación del ácido fítico en la muestra de Maíz.....	95
Tabla N° 54. Porcentaje de recuperación del IP ₆ en las muestras analizadas.....	96
Tabla N° 55. Contenido de metales, ácido fítico y % de recuperación en las muestras analizadas.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido fítico y sus interacciones con minerales y proteínas.....	6
Figura 2. Superficie de la sílice hidrolizada.....	10
Figura 3. Reacción de formación de los siloxanos.....	11
Figura 4. Celda del detector ultravioleta en HPLC.....	14
Figura 5. Esquema de un detector diferencial de índice de refracción.....	16
Figura 6. Procesos que tienen lugar durante la atomización.....	21
Figura 7. Componentes del instrumento de absorción atómica.....	22
Figura 8. Espectrofotómetro de llama: diseño de haz sencillo.....	23
Figura 9. Espectrofotómetro de llama: diseño de doble haz.....	23
Figura 10. Pasos del proceso de liofilización.....	25
Figura 11. Espectrofotómetro de absorción atómica GBC.....	33
Figura 12. Liofilizador.....	34
Figura 13. Mufla.....	34
Figura 14. Bomba isocrática.....	39
Figura 15. Puerto con una válvula de inyección.....	40
Figura 16. Columna cromatográfica PRP-1.....	41
Figura 17. Detector de índice de refracción.....	41
Figura 18. Procesador de datos.....	42
Figura 19. Ultrasonido de punta.....	43
Figura 20. Rotaevaporador.....	43

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma Nº 1. Solución patrón hidrolizada de ácido fítico.....	76
Cromatograma Nº 2. Muestra de Cerelac sin extracción con hexano.....	77
Cromatograma Nº 3. Muestra de Cerelac extraída con hexano.....	78
Cromatograma Nº 4. Muestra de Cerelac extraída con el ultrasonido de punta por 2 min.....	79
Cromatograma Nº 5. Muestra de Cerelac extraída con el ultrasonido por 2 horas.....	80
Cromatograma Nº 6. Muestra de Cerelac 1 sin contaminar.....	82
Cromatograma Nº 7. Muestra de Cerelac 2 sin contaminar.....	83
Cromatograma Nº 8. Muestra de trigo 1 sin contaminar.....	87
Cromatograma Nº 9. Muestra de trigo 2 sin contaminar.....	88
Cromatograma Nº 10. Muestra de arroz sin contaminar.....	91
Cromatograma Nº 11. Muestra de Maíz 1 sin contaminar.....	93
Cromatograma Nº 12. Muestra de Maíz 2 sin contaminar.....	94

1. INTRODUCCIÓN

El ácido fítico es un constituyente de los alimentos con actividad antinutricional, debido a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales y proteínas, convirtiéndolos en no asimilables por el organismo bajo condiciones fisiológicas, causando de esta forma deficiencia de minerales en los humanos, especialmente en los grupos de alto riesgo como los lactantes, niños, mujeres embarazadas y ancianos (1). Sin embargo, se han reportado efectos positivos del ácido fítico sobre la salud:

- Es indispensable para una dieta humana sana y equilibrada, debido a su acción inhibidora de la cristalización de sales cálcicas, tales como: fosfatos y oxalatos, evitando por tanto la formación de depósitos minerales patológicos, como por ejemplo: los cálculos renales (2).
- Los fitatos disminuyen los niveles de glucosa en la sangre, con los consiguientes efectos beneficiosos en el control de la diabetes (2).
- A causa de su capacidad antioxidante, el ácido fítico puede ejercer una destacable acción protectora ante el cáncer de mama y de colon (3).
- Otro efecto beneficioso es la reducción de la concentración de colesterol, evitando problemas cardiovasculares (3).

Adicionalmente, el ácido fítico y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo en semillas de cereales y leguminosas. Sin embargo, en esta forma el fósforo no está disponible para el hombre y los animales monogástricos, debido a que éstos no están provistos de suficientes fosfatasas endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato (4). Es por ello, que se ha creado la necesidad de desarrollar estrategias para una mejor utilización del elemento en estas especies. Entre ellas, se encuentra la incorporación en el alimento de fitasas exógenas, cuya importancia radica por un lado, en la disminución de los efectos antinutricionales del ácido fítico y por otro, en mejorar la utilización del fósforo presente como fitatos, disminuyendo la incorporación de fuentes inorgánicas y en consecuencia, la reducción de la contaminación sustancial.

Por otro lado, es necesario señalar la relevancia de una adecuada combinación de alimentos, a fin de tener una correcta ingestión de todos los nutrientes que son esenciales para el organismo, especialmente en aquellos grupos de la población donde el impacto de altas concentraciones de fitato puede ser más serio. Este es el caso de los niños, cuyos requisitos minerales son particularmente críticos (5).

Los cereales son muy importantes en la alimentación infantil. Desde el punto de vista nutricional, los cereales proporcionan energía en forma de hidratos de carbono de absorción lenta, proteínas, minerales, vitaminas principalmente tiamina y ácidos grasos esenciales, pero a su vez el alto contenido de ácido fítico en los cereales inhibe la absorción del hierro, del zinc y otros elementos, al formar complejos insolubles a pH fisiológico, lo que hace necesario el consumo moderado de los mismos en la alimentación infantil, junto con un suministro adicional de estos elementos (6).

Durante el período de lactancia, la dieta de un infante es basada en harinas de cereales, así como también en las fórmulas de leche de bebé y muy especialmente la lactancia materna. Por consiguiente, las propiedades negativas de los fitatos,

particularmente en la biodisponibilidad de los minerales pueden tener un efecto en la salud durante este primer período (5), ya que los minerales son por lo menos tan importantes como las vitaminas, para lograr el mantenimiento del cuerpo en perfecto estado. Pero como el organismo no puede fabricarlos, debe utilizar las fuentes exteriores de los mismos, como son los alimentos, los suplementos nutritivos, la respiración y la absorción a través de la piel, para poder asegurar un adecuado suministro de ellos.

Considerando que:

- Las deficiencias potenciales de zinc y hierro en infantes esta asociado con los porcentajes bajos de crecimiento, y además pueden afectar muchos procesos bioquímicos y psicológicos, respectivamente.
- El ácido fítico se encuentra en alto porcentaje en granos enteros, en la capa celular de la aleurona. Sin embargo, los productos procesados de los mismos no siempre contienen estas grandes cantidades de ácido fítico, ya que el proceso de molienda para remover la capa de aleurona, o el tratamiento térmico en presencia de fitasas activas, disminuye su contenido.
- El uso general de cereales a base de soya es de gran interés alimenticio, sin embargo, el contenido de fitato es típicamente alto en productos elaborados a base de soya.
- Y el conocimiento del contenido de fitato en los diferentes cereales infantiles, permite un mejor control en su suministro en las diferentes etapas de desarrollo del infante.

Se hace importante el desarrollo de métodos confiables que permitan cuantificar el contenido de ácido fítico en cereales infantiles.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estructura química, propiedades

El ácido fítico (IP_6) es una molécula con seis grupos ortofosfato, de nombre químico myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5,6-hexaquis (dihidrogeno fosfato). A pH neutro y al que normalmente presentan los alimentos, es una molécula cargada negativamente y por tanto muy reactiva, por lo que presenta una elevada capacidad para formar complejos, o unirse a especies cargadas positivamente como: cationes o proteínas. La interacción del ácido con los cationes puede ocurrir a través de un solo grupo fosfato, con dos grupos fosfatos de una misma molécula, o con grupos fosfatos de distintas moléculas de ácido fítico (4).

El grado de interacción entre el ácido fítico y las proteínas es dependiente del pH, de la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con los minerales a un pH dado. A bajo pH, se produce una fuerte interacción electrostática entre los grupos amino terminales de las proteínas, y los ésteres fosfatos aniónicos del IP_6 , formándose un complejo binario. A pH intermedio, se forma un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca (II) o el Mg (II) (Figura 1). Esta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo imidazol desprotonado de la histidina, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos. A pH elevado, la interacción entre las proteínas y el IP_6 disminuye, los complejos ternarios se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta a pH elevado (4).

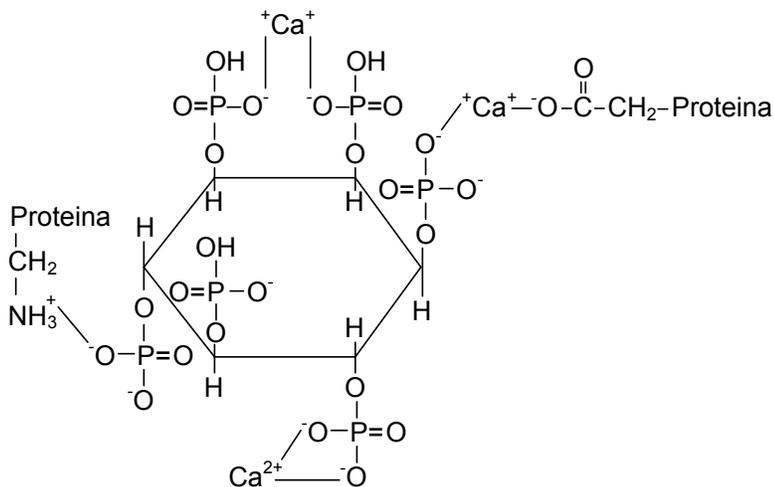


Figura 1. Estructura del ácido fítico y sus interacciones con minerales y proteínas.

En la semilla el ácido fítico se encuentra como una mezcla de sales de varios cationes, como: K, Mg, Ca, Mn, Zn y Fe, llamados fitatos. El término fitina se ha empleado para definir la mezcla de sales de Ca y Mg del ácido fítico (4).

La insolubilidad del ácido fítico es la principal causa de su comportamiento antinutricional y de sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, como se indicó anteriormente es importante considerar que la solubilidad de las sales de IP_6 varía con el pH, ya que el grado de protonación de los grupos fosfatos que no se han unido a los metales está relacionado con este parámetro (4).

Durante el procesamiento y digestión de los alimentos, el ácido fítico puede ser degradado a myo-inositol pentafofato (IP_5), tetra- (IP_4), tris- (IP_3), bis- (IP_2), monofosfatos (IP). Solo el IP_6 e IP_5 tienen un efecto negativo en la biodisponibilidad de los minerales, los otros productos de hidrólisis formados tienen poca capacidad para unirse a los minerales, o los complejos formados son más solubles (7).

Esta degradación se puede producir por hidrólisis enzimática o no enzimática:

- La hidrólisis enzimática usualmente ocurre en el tracto gastrointestinal de las personas, o durante el procesamiento de los alimentos, por la acción de las fitasas (myo-inositol hexafosfato fosfohidroxilasas), ya sea que provengan de plantas o de origen microbiano, o ambos. Estas enzimas son capaces de hidrolizar el ácido fítico presente en los vegetales, liberando de forma secuencial hasta 6 grupos ortofosfatos plenamente disponibles para los monogástricos (8). Las fitasas hidrolizan únicamente los fitatos en solución, por lo que su actuación requiere humedad en el medio y unas condiciones determinadas de pH y temperatura que son variables según el tipo de fitasa.
- Las fitasas están presentes de forma natural en numerosos cultivos de bacterias y hongos, así como en ciertos granos. También están presentes en el tracto intestinal de todos los animales, debido bien a la ingestión de plantas que las contienen, bien a la producción por la microflora intestinal o bien a la producción enzimática endógena por la mucosa u órganos secretores.
- La hidrólisis no enzimática generalmente se produce cuando los alimentos son calentados o tratados con ácidos fuertes.

Con la remoción de los grupos fosfatos del anillo inositol por cualquiera de estas vías, disminuye la capacidad de enlazar los minerales, lo que resulta en un aumento de la biodisponibilidad de los mismos.

2.2. Distribución, localización y contenido.

El ácido fítico se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal. En la mayoría de las plantas una gran proporción de fósforo (80%) está presente en forma de fitato, especialmente en aquellas semillas en las que se encuentra en concentraciones elevadas, desde 1-7%. El contenido de fitato en los alimentos puede variar con las condiciones de cultivo, madurez, tipo, variedad y fracción del grano que se muele (1). Así, en las semillas de cereales, oleaginosas y leguminosas los niveles de ácido fítico son elevados y constituyen el mayor porcentaje (60-82%) del fósforo total, varias raíces y tubérculos presentan cantidades moderadas de IP_6 , siendo el fósforo fítico el 21-25% del total, mientras que en verduras las cantidades de IP_6 encontradas son muy pequeñas (4).

En cereales el fósforo fítico constituye el 64-85% del P total, localizándose la mayoría del IP_6 en aleuronas celulares. Los niveles de IP_6 (g/100g) encontrados en el arroz entero (*Orize sativa*) oscilan desde un 0,86-0,99%, localizándose el 80% del fitato en la capa externa del salvado, en el trigo (*Triticum aestivum*) la localización es similar a la del arroz y su contenido es mayor (1,13%), en el maíz (*Zea mays*) el IP_6 representa de 0,77-0,99%, y de este más del 90% se encuentra en el germen. En el sorgo (*Sorghum vulgare*) se han encontrado valores de 0,82-0,96% siendo los niveles de IP_6 mayores en las especies coloreadas. En la cebada (*Hordeum vulgare*) y en la avena (*Avena sativa*) los niveles de IP_6 obtenidos son del 0,99% y 0,77% respectivamente (4).

2.3. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía (del griego **chroma** que significa “color”, y **graphein** que significa “escribir”) es un poderoso método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia (9).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), fue desarrollada a mediados de los años setenta y mejorada rápidamente con el desarrollo de nuevos empaques de columna y la conveniencia adicional de detectores en línea.

La HPLC es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son: su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia, tales como: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, plaguicidas, antibióticos, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (9).

De acuerdo con el tipo de interacción que se produce entre la fase estacionaria y el soluto, la cromatografía de líquidos se puede clasificar en:

1. Cromatografía de Reparto.
2. Cromatografía de Adsorción o Cromatografía líquido-sólido.
3. Cromatografía Iónica.
4. Cromatografía de Exclusión por Tamaño.

En este trabajo solo se describe en detalle la cromatografía de reparto, dado que esta técnica es de interés en esta investigación.

2.3.1. Cromatografía de Reparto

La cromatografía de reparto ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizada, se puede subdividir en: líquido-líquido y cromatografía de fase unida químicamente, donde la diferencia entre estas técnicas radica en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del relleno (9).

En la actualidad, los métodos de fase unida químicamente son los que predominan debido a las desventajas de los sistemas líquido-líquidos. Una de ellas es la pérdida de fase estacionaria por disolución en la fase móvil, por otra parte, el problema de la solubilidad de la fase estacionaria imposibilita el uso de los rellenos de fase líquida en la elución con gradiente (9).

En cromatografía de reparto, los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida, o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 μm . La superficie de la sílice totalmente hidrolizada por calentamiento con HCl 0.1M durante uno o dos días, está constituida por grupos silanol químicamente reactivos (Figura 2).

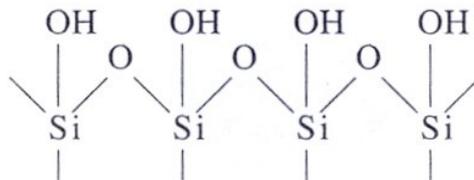


Figura 2. Superficie de la sílice hidrolizada.

Los recubrimientos de fase unida químicamente más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano (Figura 3).

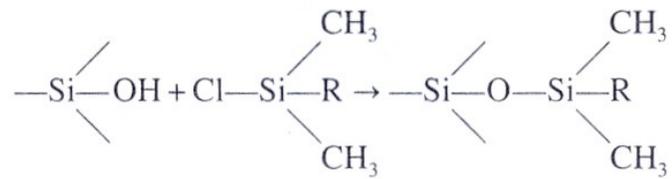


Figura 3. Reacción de formación de los siloxanos.

Por otra parte, para obtener buenas separaciones con cromatografía de reparto en un tiempo razonable, las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria se deben armonizar cuidadosamente (9).

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto:

2.3.1.1. Cromatografía en fase normal: inicialmente la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad, tales como: agua o el trietilenglicol soportadas sobre partículas de sílice o alúmina, y como fase móvil se empleaba un disolvente relativamente apolar como el hexano o el iso-propileter. Por razones históricas, a este método se le conoce como cromatografía en fase normal. En donde el componente menos polar se eluye primero debido a que es más soluble en la fase móvil, y un aumento de la polaridad de dicha fase aumenta el tiempo de elución.

En cuanto a los rellenos comerciales de fase normal unida químicamente, el R en la estructura del siloxano (Figura 3) es un grupo funcional polar, como es el caso de los grupos ciano (-C₂H₄CN), diol (-C₃H₆OCH₂CHOHCH₂OH), amino (-C₃H₆NH₂) y los dimetilaminopropil (-C₃H₆N(CH₃)₂). Las polaridades de estos materiales de relleno varían en un gran intervalo, siendo el tipo ciano el menos polar y el tipo amino el más polar (9).

2.3.1.2. Cromatografía en fase inversa: es la más ampliamente utilizada, en esta la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, en donde el grupo R del siloxano (Figura 3) es una cadena C₈ (n-octilo), o una cadena C₁₈ (n-octadecilo) y la fase móvil es relativamente polar como: el agua, metanol, o el acetonitrilo. Por contraste, en los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución (9).

2.3.2. Aplicaciones de la cromatografía de reparto

La cromatografía de reparto con fases unidas químicamente tiene aplicación en diversos campos, para el análisis de materiales de consumo e industriales, tales como los que se presentan en la tabla N° 1:

Tabla N° 1. Aplicaciones características de la cromatografía de reparto.

Campo	Mezclas típicas
Fármacos	Antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos.
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos.
Productos de alimentación	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos.
Productos de la industria química	Aromáticos condensados, tensioactivos, propulsores, colorantes.
Contaminantes	Pesticidas, herbicidas, fenoles, PCB.
Química forense	Drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos.
Medicina clínica	Ácidos biliares, metabolitos de drogas.

2.3.3. Formación de Derivados

En algunos casos es conveniente transformar los componentes de una muestra en unos derivados, antes de la separación cromatográfica (Reacción Pre-columna), en donde la muestra derivada se inyecta en la columna. Por otro lado, las reacciones Post-columna se llevan a cabo después de la separación cromatográfica, en donde el eluyente de la columna HPLC se mezcla con un reactivo antes de que entre al detector. Este tratamiento puede ser necesario para:

- (1) Reducir la polaridad de las especies y de este modo poder utilizar columnas de reparto y no de adsorción o de intercambio iónico.
- (2) Aumentar la respuesta del detector y, por tanto, la sensibilidad para todos los componentes de la muestra.
- (3) Aumentar la selectividad de la respuesta del detector para determinados componentes de la muestra (9).

2.3.4. Cromatografía de pares iónicos

La cromatografía de pares iónicos o de formación de parejas de iones, es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa, que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. La fase móvil está constituida por: una disolución tampón acuosa que contiene un disolvente orgánico como: metanol o acetonitrilo, y un compuesto iónico que aporta un ión de carga opuesta a la del analito, para formar una pareja de iones, que en conjunto forma una especie neutra que es retenida por el relleno de la fase inversa. La mayoría de los contraiones poseen grupos alquilo, que

mejoran las características de retención del par iónico resultante sobre la fase estacionaria no polar (9).

2.3.5. Detectores

2.3.5.1 Detectores de Absorbancia

Son detectores que responden a una propiedad del soluto, en este caso a la absorbancia en el UV.

Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, en los que uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad. El cromatograma consiste en una representación del logaritmo del cociente de las dos señales detectadas en función del tiempo. También se utilizan instrumentos de un solo haz (9).

La figura 4 muestra el esquema de una celda de flujo en forma de Z, para las medidas de la absorbancia de los efluentes de una columna cromatográfica. La utilización de cubetas de este tipo está restringida a presiones no mayores de unos 600 psi (9).

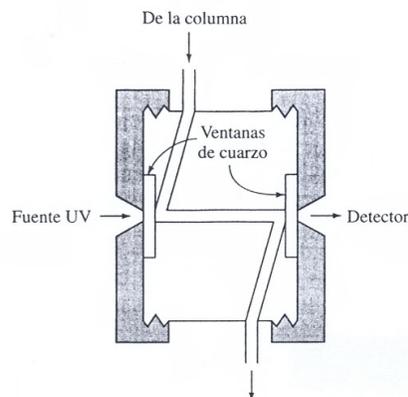


Figura 4. Celda del detector ultravioleta en HPLC.

Existen dos tipos de detectores de absorbancia:

2.3.5.1.1. Detectores de absorbancia ultravioleta con filtros

Los detectores de absorción UV más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. Lo más común en estos casos es aislar la líneas intensa a 254 nm por medios de filtros, en algunos equipos también se pueden utilizar las líneas a 250, 313, 334, 365 nm empleando otros filtros, para aquellos solutos que absorben a alguna de estas longitudes de onda.

Las fuentes de deuterio o de filamento de wolframio con filtros de interferencia también proporcionan una forma sencilla de detectar las especies absorbentes que eluyen de la columna (9).

2.3.5.1.2 Detectores de absorbancia ultravioleta con monocromadores

Consisten en un espectrofotómetro de barrido con una red entre sus componentes ópticos. Algunos se limitan a la radiación ultravioleta, mientras que otros abarcan la radiación ultravioleta y la visible. Se pueden elegir varios modos operacionales, el cromatograma completo a una sola longitud de onda o alternativamente, cuando los picos que eluyen están suficientemente separados en el tiempo, se puede elegir distinta longitud de onda para cada pico. En este caso, debe emplearse el control por ordenador para seleccionar la mejor longitud de onda para el compuesto eluido (9).

2.3.5.2. Detectores de índice de refracción

La figura 5 muestra el esquema de un detector diferencial de índice de refracción, en el que el disolvente en su camino hacia la columna pasa a través de una mitad de la cubeta y el eluyente de la columna pasa por la otra mitad. Los dos compartimientos están separados por una placa de vidrio, montada a un ángulo tal que si las dos soluciones difieren en el índice de refracción se produce una desviación del haz incidente. El desplazamiento resultante del haz con respecto a la superficie fotosensible del detector provoca una variación de la señal de salida, la cual una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma (9).

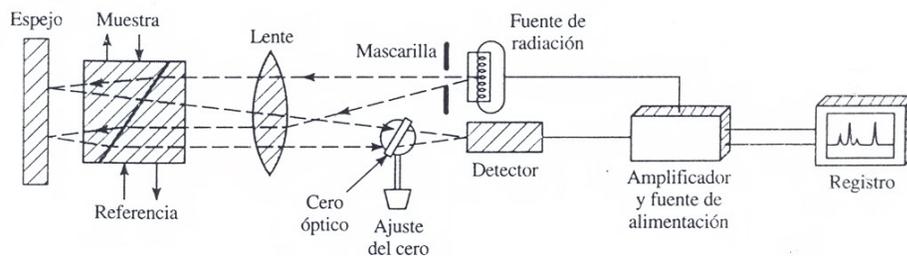


Figura 5. Esquema de un detector diferencial de índice de refracción.

Los detectores de índice de refracción tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Sin embargo, son muy sensibles a los cambios de flujo y temperatura, se han de mantener a una temperatura constante en unas pocas milésimas de grado centígrado. No son tan sensibles como la mayoría de los otros detectores (9).

2.3.5.3. Detectores de Conductividad

Son un tipo de detector electroquímico, que tienen una elevada sensibilidad, son universales para las especies cargadas y, como norma general, responde de una forma predecible a los cambios de concentración. Además, dichos detectores son sencillos, baratos de fabricación y mantenimiento, son robustos y de prolongada duración (9).

2.4. Espectroscopia de Absorción Atómica en Llamas

La espectroscopia es un término general para la ciencia, que trata de las distintas interacciones de la radiación con la materia.

En la espectroscopia de absorción atómica, los elementos presentes en una muestra se convierten en átomos o iones elementales en estado gaseoso, por medio de un proceso denominado atomización, de esta manera se mide la absorción ultravioleta/visible de las especies atómicas en el vapor y esta se puede relacionar con la concentración del analito en la muestra. La precisión y la exactitud de los métodos atómicos dependen de forma crítica de las etapas de la atomización, y del método de introducción de la muestra en la zona de atomización (9)

2.4.1. Tipos de Atomizadores utilizados en Espectroscopia Atómica

Tabla N° 2. Atomizadores

Tipo de atomizador	Temperatura de atomización característica °C
Llama	1700-3150
Vaporización electrotérmica (ETV)	1200-3000
Plasma de argón de acoplamiento inductivo (ICP)	4000-6000
Plasma de argón de corriente continua (DCP)	4000-6000
Plasma de argón inducido por microondas (MIP)	2000-3000
Plasma de descarga luminiscente (GD)	No térmico
Arco eléctrico	4000-5000
Chispa eléctrica	-

2.4.2. Métodos de introducción de la muestra

El objetivo del sistema de introducción de la muestra en la espectroscopia atómica es transferir una parte reproducible y representativa de la muestra a uno de los atomizadores citados en la tabla N° 2 con una elevada eficacia. La facilidad con la que se alcanza este objetivo depende en gran medida del estado físico y químico del analito y de la matriz de la muestra (9).

2.4.2.1. Introducción de las muestras en disolución

Las disoluciones se introducen generalmente en el atomizador por uno de los siguientes métodos:

2.4.2.1.1. Nebulizadores neumáticos

En un análisis por espectroscopia atómica, las muestras generalmente se disuelven en un medio acuoso, y se introducen en el atomizador por medio de un nebulizador que transforma el líquido en una fina niebla o aerosol. El tipo más común es el nebulizador de tubo concéntrico, en el que la muestra líquida es aspirada a través de un capilar, y se hace pasar una corriente de gas a elevada presión alrededor del capilar (Efecto Venturi). Este proceso se denomina aspiración. El gas a elevada velocidad rompe el líquido en finas gotitas de distinto tamaño, que son conducidas al atomizador (9).

2.4.2.1.2. Nebulizadores ultrasónicos

La muestra se bombea sobre la superficie de un cristal piezoeléctrico, generando aerosoles más densos y homogéneos que los nebulizadores neumáticos (9).

2.4.2.1.3. Vaporizadores electotérmicos

Es un evaporador situado en una cámara cerrada, donde una pequeña muestra líquida o sólida se sitúa sobre un conductor, como un filamento de tántalo o una barra de carbono. Una corriente eléctrica evapora la muestra rápida y completamente mezclándose con el argón, el cual transporta la muestra vaporizada al atomizador (9).

2.4.2.1.4. Técnicas de generación de hidruros

Es un método para introducir muestras que contienen arsénico, antimonio, estaño, selenio, bismuto y plomo en un atomizador, para ello se genera un hidruro volátil el cual es arrastrado a la cámara de atomización por un gas inerte (9).

2.4.2.2. Introducción de muestras sólidas

En el caso de muestras difíciles de disolver, se han propuesto diversos métodos que permiten introducir la muestra sólida o en forma de polvo, estas técnicas son menos reproducibles y están más sujetas a errores:

1. Inserción directa de la muestra
2. Vaporizadores electotérmicos
3. Ablación por arco y chispa
4. Ablación por láser
5. Técnica de la descarga luminiscente

2.4.3. Técnicas de atomización de la muestra

➤ Atomización con llama

En un atomizador de llama, la disolución de la muestra es nebulizada mediante un flujo de gas oxidante, mezclado con el gas combustible, y se transporta a una llama donde se produce la atomización. Una secuencia compleja de procesos encadenados tiene lugar en la llama:

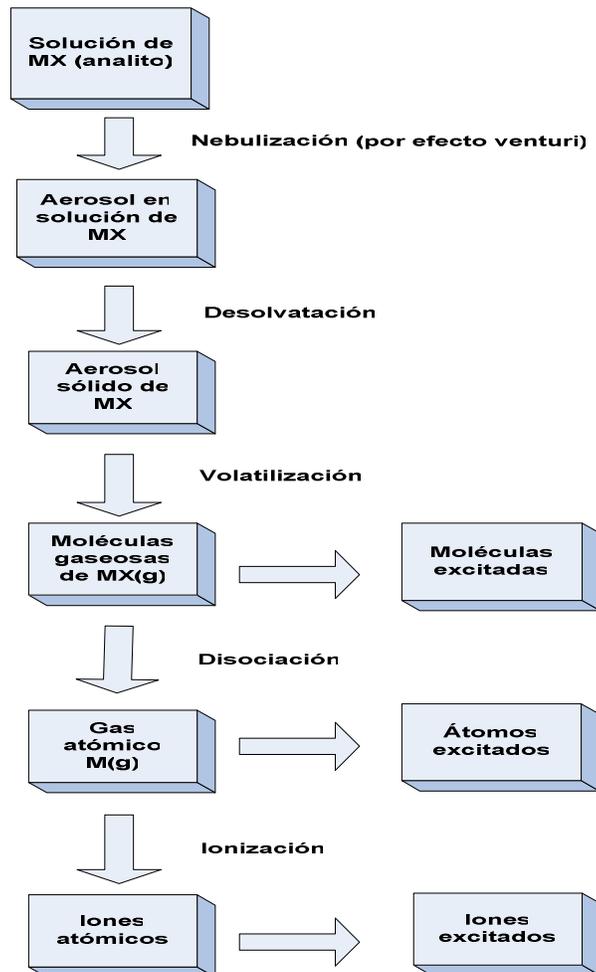


Figura 6. Procesos que tienen lugar durante atomización.

Otros tipos de atomización:

- Atomización electrotérmica
- Atomización por descarga luminiscente
- Atomización por generación de hidruros
- Atomización en vapor frío

2.4.4. Instrumentación para absorción atómica

Los instrumentos para espectroscopia de absorción atómica (AAS) consiste en una fuente de radiación (Lámpara de cátodo hueco ó Lámpara de descarga sin electrodos), una zona de muestra, un selector de longitud de onda (monocromadores ultravioleta/ visible), un detector (tubos fotomultiplicadores), un procesador de la señal y de la lectura de salida. La zona de muestra en los instrumentos de absorción atómica es el atomizador que contiene la muestra gaseosa atomizada (Figura 7).

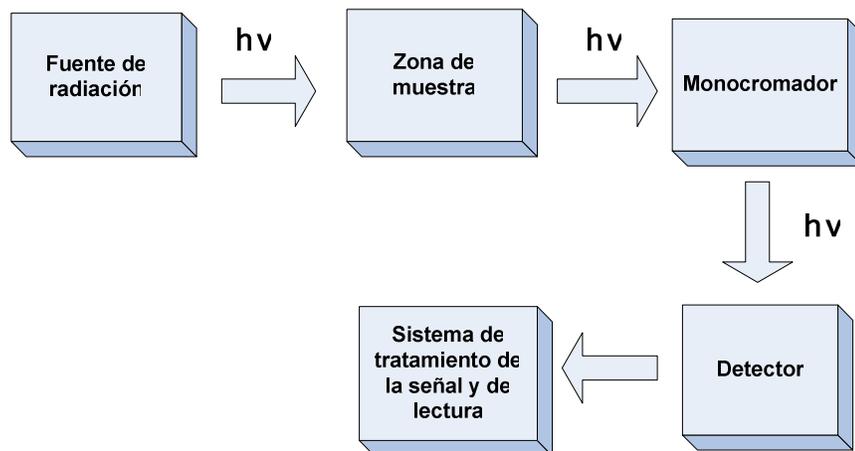


Figura 7. Componentes del instrumento de absorción atómica.

Los espectrofotómetros disponibles comercialmente tienen diseños de haz sencillo y de doble haz (9) (Figura 8 y 9 respectivamente).

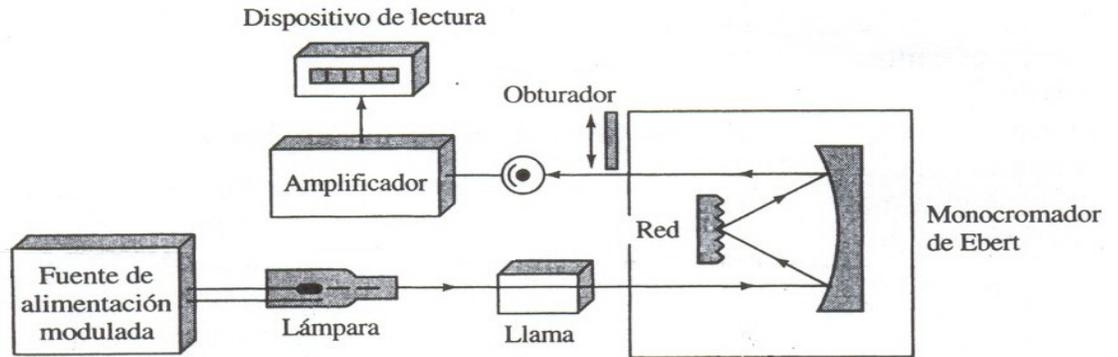


Figura 8. Espectrofotómetro de llama: diseño de haz sencillo.

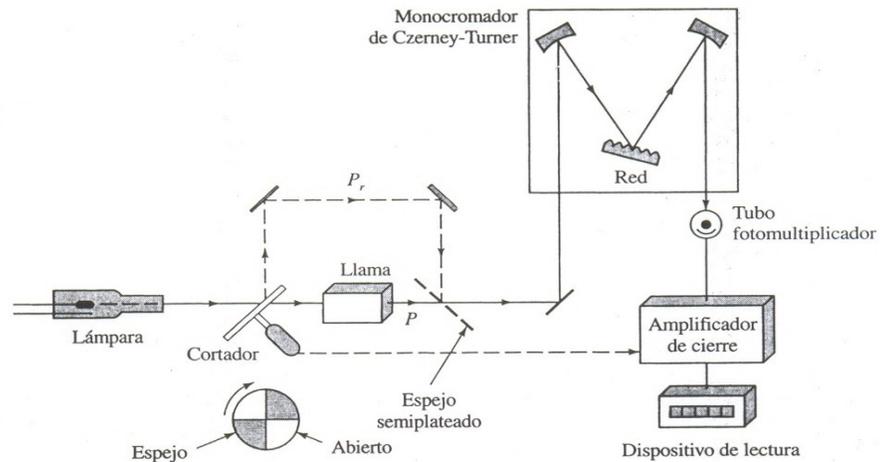


Figura 9. Espectrofotómetro de llama: diseño de doble haz.

2.4.5. Aplicaciones de Espectroscopia de Absorción Atómica

La Espectroscopia de Absorción Atómica constituye un medio sensible para la determinación cuantitativa de más de 60 elementos metálicos en muestras analíticas (9).

2.5. Liofilización

Es un proceso utilizado para la eliminación de agua, mediante una deshidratación al vacío y a muy bajas temperaturas, es utilizado principalmente en la industria alimenticia y farmacéutica (10).

La liofilización es un proceso en el que se congela la muestra, y una vez congelado se introduce en una cámara de vacío para remover el agua por sublimación. Mediante diversos ciclos de congelación-sublimación se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original (10).

Es una técnica bastante costosa (debido a la lentitud relativa del proceso de sublimación, al gasto energético involucrado en la congelación y al mantenimiento de la baja presión) y lenta comparada con los métodos tradicionales de secado, pero permite obtener productos de una mayor calidad, ya que al no emplear calor, evita en gran medida las pérdidas nutricionales (11).

El secado convencional hace que el material se contraiga, dañando las células. Sin embargo, en el proceso de liofilización, los componentes sólidos son retenidos en su lugar por el hielo rígido, la sublimación del hielo deja espacios vacíos, preservando así la integridad de la estructura biológica y química del producto (10).

Como proceso industrial la liofilización se desarrolló en los años 50 del siglo XX, pero sus principios eran ya conocidos y empleados por los incas. El procedimiento ancestral consistía en dejar durante la noche que los alimentos se congelaran por la acción del frío de los Andes, y gracias a los primeros rayos del sol de la mañana y la baja presión atmosférica de las elevadas tierras andinas se producía la sublimación del agua que se había congelado, este proceso es conocido como liofilización natural (10).

2.5.1. Etapas de la liofilización

Se realiza a temperaturas inferiores a la solidificación total, es decir, el producto debe estar congelado a temperaturas entre 10 y 15 °C por debajo de su temperatura eutéctica para evitar la formación de coágulos de agua (12).

Congelación inicial: es una operación previa y obligatoria. El tiempo de duración depende de varios factores como la cantidad, concentración y naturaleza propia del producto.

Sublimación o secado primario: es la etapa en la que la mayor parte del agua libre pasa a vapor, generalmente a bajas presiones.

Desecación o secado secundario: en el cual la humedad residual ligada al material sólido es extraída, se lleva a cabo a una temperatura inferior a la de desnaturalización del producto y se logra una humedad final con valores inferiores al 1% (12).

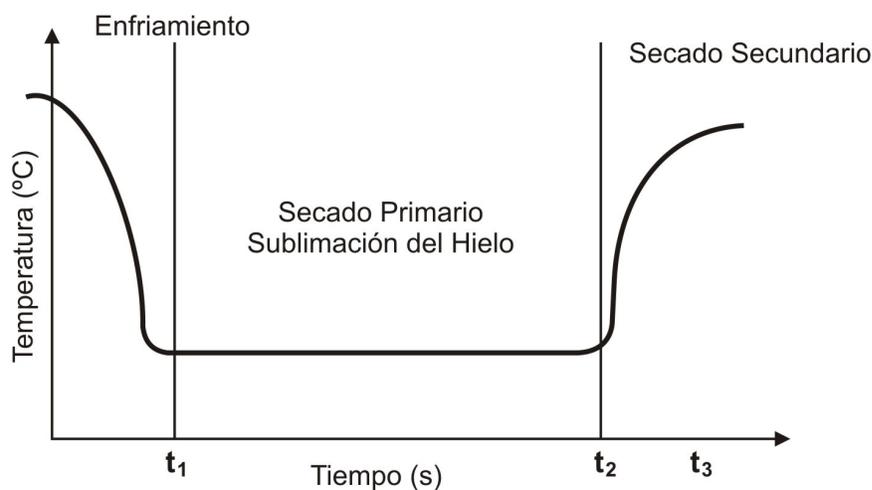


Figura 10. Pasos del proceso de liofilización

2.5.2. Ventajas de la técnica de liofilización

1. La temperatura a la que es sometida el producto está por debajo de aquella en la cual muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.
2. Debido a la baja temperatura de trabajo, la pérdida de componentes volátiles es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.
3. Se eliminan los fenómenos de oxidación dado que se trabaja a alto vacío.
4. La gran porosidad del producto facilita con rapidez su rehidratación por adición de agua o del solvente adecuado.
5. Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado, constituyendo un producto de larga estabilidad (12).

2.5.3. Desventajas

La mayor desventaja del proceso de liofilización es el costo energético y el tiempo empleado en el proceso de secado (12).

2.5.4. Aplicaciones

La liofilización es ampliamente usada para la conservación del plasma sanguíneo y productos alimenticios. También es de uso frecuente en productos sensibles al oxígeno, a la humedad y a las altas temperaturas, tales como: cepas de microorganismos, vacunas, sueros, antibióticos, vitaminas, aminoácidos, enzimas, hormonas y en implantes de huesos (13).

3. ANTECEDENTES

Dado que el ácido fítico no tiene un espectro de absorción característico y por tanto, no existen técnicas específicas para su identificación, su determinación ha constituido un problema analítico durante mucho tiempo. Hasta 1980, el ácido fítico era determinado exclusivamente a través de métodos no específicos de precipitación o de preconcentración por intercambio iónico. En la actualidad, aunque algunos de los métodos anteriores siguen vigentes, el empleo de procedimientos en los que se incluyen cromatografía de fase reversa e iónica se perfilan como los más adecuados, por tener la posibilidad de separar los diferentes inositoles fosfato.

Recientemente se han realizado diversas investigaciones sobre el estudio de los fitatos en cereales, entre ellos infantiles, los cuales sirvieron de referencia para la realización del presente trabajo:

Lehrfeld (1994) estudió las ventajas y desventajas de separar y cuantificar el ácido fítico y algunos inositoles fosfato menores en cereales y granos modificando la metodología propuesta en su trabajo de 1989 (1). Para ello empleo una columna de fase inversa (PRP-1) en modo de par iónico, y un detector de índice de refracción. En primera instancia evaluó la extracción de ácido fítico con un ultrasonido de punta por 2 min y por agitación mecánica por 2 horas, encontrando el mismo resultado para ambas extracciones. Luego 2,5 mL del extracto fue diluido con agua (1/10) y pasado a través de una columna SAX, la cual fue lavada con 2 mL de agua y los inositol fosfatos fueron eluidos con 2 mL de HCl 2M. Posteriormente el extracto fue secado en un rota evaporador y el residuo fue redisoluelto en la fase móvil, la solución fue centrifugada a 14000 rpm por 6 min, para remover cualquier material suspendido antes de la inyección dentro del HPLC. Además comparó tres sistemas de elución: Fase Móvil A, sistema a base de metanol. Fase Móvil B, a base de acetonitrilo y la Fase Móvil C que era un sistema a base de metanol optimizado, obteniendo menor tiempo de elución para la

fase móvil B. Estos autores evalúan diferentes tipos de cereales y reportan que este método puede ser aplicado a muestras con bajo contenido de ácido fítico siempre y cuando se aumente la masa de muestra a ser extraída (14).

Brooks y Lampi (2001) compararon dos métodos comunes de HPLC con respecto a su capacidad para medir concentraciones de inositol fosfato en cereales infantiles, los cuales son: la cromatografía en fase reversa por par iónico con detección por índice de refracción, y la cromatografía de intercambio iónico con detección por absorbancia. Se encontraron grandes diferencias en los contenidos de IP₃, IP₄, IP₅ e IP₆ entre los dos métodos: la HPLC por par iónico dio valores entre 14 a 190 veces más bajos de IP₆ que los obtenidos por el otro método. Estos autores concluyen que el bajo porcentaje de IP₆ encontrado junto con las diferencias entre los mismos, sugiere que algún componente de los cereales infantiles afecta estos resultados dependiendo del método. Una experimentación adicional sugirió que un exceso de minerales (aproximadamente 11mg/g de calcio y 0.3 mg/g de hierro) en estas muestras, se une al fitato. Este problema puede ser único para muestras con bajo contenido de IP₆ y alto contenido mineral, ya que este inconveniente no se presentó con el salvado de trigo. Estos autores sugieren que la HPLC intercambio iónico es el mejor método para determinar el contenido de los inositol fosfatos en cereales infantiles, aunque este método presenta poca sensibilidad para el IP₃ y IP₄. Otro aspecto importante es la reducción del contenido de grasa en las muestras ya que este interfiere en el proceso cromatográfico (15).

Febles y col. (2001) emplearon el método propuesto por García-Villanova para la determinación del contenido de ácido fítico en las harinas de cereales, basado en la titulación complejométrica del exceso de hierro (III) obtenido luego de la precipitación de los fitatos con el hierro, utilizando el ácido sulfosalicílico como indicador del punto final de la titulación. Diferencias significativas fueron observadas para diferentes tipos de harinas infantiles, la mayoría de las muestras estudiadas indican que el contenido de

ácido fítico era más alto de 20 mg/g, mientras que en las harinas libres de gluten era menor de 5 mg/g (16).

Park y col. (2006) determinaron los niveles de ácido fítico en alimentos infantiles, para ello compararon el método espectrofotométrico de la AOAC con los métodos cromatográficos GC-FID y HPLC-RI. La determinación por HPLC fue desarrollada por el método de Lee y Abendroth (1983) (19) con algunas modificaciones. Inicialmente redujeron el contenido de grasa en las muestras, para ello 5g de la misma fueron tratadas dos veces con cloroformo – etanol (2:1). Posteriormente la muestra sólida fue extraída con HCl 0.5M. Luego 10 mL del extracto fue pasado dentro de una columna de intercambio iónico, donde el fosfato inorgánico fue eluido con NaCl 0.1 M, mientras que el ácido fítico retenido fue eluido con HCl 2N. El HCl fue removido usando un secado en frío, el residuo seco fue redisoluto en 10 mL de la fase móvil, para su posterior análisis por HPLC. Encontraron que el valor determinado espectrofotométricamente mostró niveles más altos de ácido fítico. Dado que se ha reportado que el método fotométrico puede sobreestimar el contenido de IP₆ al medir todos los inositol fosfatos como ácido fítico, realizaron contaminación de las muestras con IP₆ para verificar los resultados y encontraron que los porcentajes de recuperación de los métodos cromatográficos son más bajos (72-79) % al método de la AOAC (94-102) % (17).

Hernández Luis (2006) evaluó las diferentes etapas del pre-tratamiento de muestras de trigo para el análisis de ácido fítico por HPLC-RI y empleó como fase móvil 5% metanol, 0.28% hidróxido de tetraetilamonio y ácido fórmico para llevar el pH a 4,3. Para el secado de la muestra comparó los métodos de secado por estufa y por liofilización, concluyendo que este último era el más adecuado ya que no produce degradación del ácido fítico. La extracción del ácido fítico se realizó con 10 mL de HCl 0.5M, con el uso de un ultrasonido de punta, luego las muestras fueron centrifugadas y el residuo en un caso fue lavado con 5 mL de HCl y recolectando esta agua, y en otro

caso se desecha el residuo sin lavar, encontrando mejores resultados cuando se lava el residuo. Luego evaluó la preconcentración del ácido fólico en el cartucho amino, concluyendo que no se producen pérdidas significativas del analito en este paso. Por último para la selección del sistema de eliminación del solvente de extracción, comparó el sistema del horno de vidrio con el del rotaevaporador siendo este último el que produce menores pérdidas del ácido fólico. Con la metodología propuesta obtiene un porcentaje de recuperación entre 90 y 92% (19).

Sanny Chan y col. (2007) analizaron los cereales y legumbres consumidos por los niños indoneses de 6-12 meses de edad, en donde las concentraciones de hierro, zinc y calcio fueron determinadas por Espectroscopia de Absorción Atómica en Llamas, mientras que para el estudio de los inositol fosfatos (hexa, penta, tetra) emplearon la técnica de HPLC y detección RI. Además compararon los efectos del procesamiento y preparación de los alimentos sobre la concentración de los minerales y fitatos en los productos seleccionados (20). Para el estudio de los fitatos, 0.5g de las muestras secas pulverizadas fueron extraídos con 5mL de HCl 0.67M. Luego de remover el solvente de extracción, los extractos secos fueron reconstituidos con 1 mL de agua destilada y analizados por HPLC siguiendo el método de Hotz (2001). Estos autores encontraron que los cereales tienen concentraciones de Zn, Ca, Fe y ácido fólico más bajas que en las legumbres.

Dado que existe alguna inconfluencia en que los bajos porcentajes de recuperación obtenidos para el análisis de ácido fólico en cereales infantiles tiene su origen en el método de tratamiento de muestra o en el alto contenido mineral de las mismas, se realizó una evaluación de la recuperación de ácido fólico en algunos cereales de bebe empleando el método propuesto por Hernández (19). La selección de los cereales estudiados se relacionó con las diferencias en las concentraciones de fitato y metales en los mismos. Para asegurar el efecto de la concentración de los metales Ca, Fe, y Zn sobre el contenido de fitato en las muestras se realizó la determinación de

los mismos en los cereales evaluados por Espectroscopia de Absorción Atómica en Llamas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Determinación de Fe, Ca, Zn y ácido fólico en cereales infantiles por el método HPLC-RI.

4.2. Objetivos Específicos

- Selección de cereales infantiles con diferentes porcentajes de Fe, Ca, Zn y ácido fólico.
- Selección de un método adecuado de digestión de los cereales para el análisis de Fe, Ca, Zn por EAA.
- Análisis de Fe, Ca, Zn en los cereales seleccionados.
- Determinación del contenido de ácido fólico en los cereales infantiles.
- Determinación de los porcentajes de recuperación de ácido fólico en los cereales infantiles por la técnica HPLC-RI.
- Evaluación de los resultados.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica en Llamas

5.1.1. Equipos

5.1.1.1. Espectrofotómetro

El espectrofotómetro que se utilizó para el análisis de Absorción Atómica en Llamas es:

- Equipo: Espectrofotómetro de absorción atómica GBC, Modelo AVANTA.
- Fuente: Lámpara de cátodo hueco para cada elemento.
- Detector: Fotomultiplicador.
- Tipo de instrumento: de haz sencillo (Figura 11).



Figura 11. Espectrofotómetro de absorción atómica GBC.

5.1.1.2. Liofilizador

Para el secado de las muestras se empleó un liofilizador marca LABCONCO (Figura 12).



Figura 12. Liofilizador.

5.1.1.3. Mufla

Para la calcinación de las muestras se empleó una mufla marca Ney 2-160. Serie II (Figura 13).



Figura 13. Mufla.

5.1.2. Reactivos

- Ácido nítrico al 65% p/p, de la Casa Sigma-Aldrich.
- Ácido clorhídrico al 37% p/p, de la Casa Sigma-Aldrich.
- Cloruro de potasio al 99.5% de pureza, de la compañía J.T.Baker Inc.
- Sal de Morh $((\text{NH}_4)_2 [\text{Fe} (\text{SO}_4)_2] \cdot 6 \text{H}_2\text{O})$ al 99% de pureza.
- Carbonato de calcio al 99.9% de pureza.
- Granallas de zinc al 99.99% de pureza.
- Agua destilada obtenida del sistema de destilación Barnstead, modelo MP-3A.

5.1.3. Patrones

- Solución madre de Fe 1000 ppm (preparada a partir de la sal de Morh).
- Solución madre de Ca 1000 ppm (preparada a partir del carbonato de calcio).
- Solución madre de Zn 1000 ppm (preparada a partir de las granallas de Zinc).

5.1.4. Otros suministros

- ***Cereales Infantiles***

Los cereales analizados fueron:

-Cereal de Arroz, marca: Nestum.

-Cereal de Maíz, marca: Nestum.

-Cereal de Trigo “Cerelac”, marca: Nestle.

- ***Otros cereales***

-Cereal de Trigo partido # 1, marca: Miduchy.

5.1.5. Metodología Experimental

5.1.5.1. Secado de la muestra

Durante el análisis puede haber absorción o liberación de agua dependiendo de la humedad del ambiente, dado que esto modifica la composición química de los sólidos se procedió a secar las muestras al comienzo del análisis.

Se empleó el secado por liofilización, para ello se pesaron cuatro replicas de 10g de cada cereal y se llevaron a peso constante por dicho método.

5.1.5.2. Digestión de las muestras (Método de Ceniza)

Se tomaron cuatro replicas de cada cereal liofilizado de $(5,0000 \pm 0,0001)$ g y se convirtieron en cenizas de color gris claro por calentamiento en la mufla a 450 °C, por 48 horas aproximadamente. Durante la calcinación (transcurridas 24 horas) se añadió a las muestras unas gotas de ácido nítrico al 65% p/p para disolver el carbón libre presente y se continuo con el proceso. Posteriormente las muestras se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se disolvieron en 8 mL de HCl al 37% p/p, finalmente se trasvasaron a balones aforados y se enrasaron con agua destilada al volumen correspondiente. (Ver Apéndice en la sección 10.1.1).

5.1.5.3. *Determinación por Espectroscopia de Absorción Atómica en Llamas (EAA).*

Las concentraciones de calcio, hierro, y zinc presentes en los cereales infantiles se determinaron por EAA. Para ello se optimizaron los parámetros instrumentales como: la longitud de onda, ancho de banda espectral, voltaje del detector, intensidad de la lámpara de cátodo hueco, relación combustible / oxidante y altura de observación de la llama, correspondientes a cada elemento de tal manera de obtener la mayor sensibilidad para cada uno de ellos.

5.2. Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)

5.2.1. Equipos

El sistema HPLC que se utilizó consta de los siguientes componentes:

5.2.1.1. Bomba

Una bomba isocrática de HPLC, marca HP modelo 1100 (Figura 14).



Figura 14. Bomba Isocrática.

5.2.1.2. Puerto de Inyección

Un puerto con una válvula de inyección, marca RHEODYNE 7725i, con un lazo de inyección de 20 μ L (Figura 15).

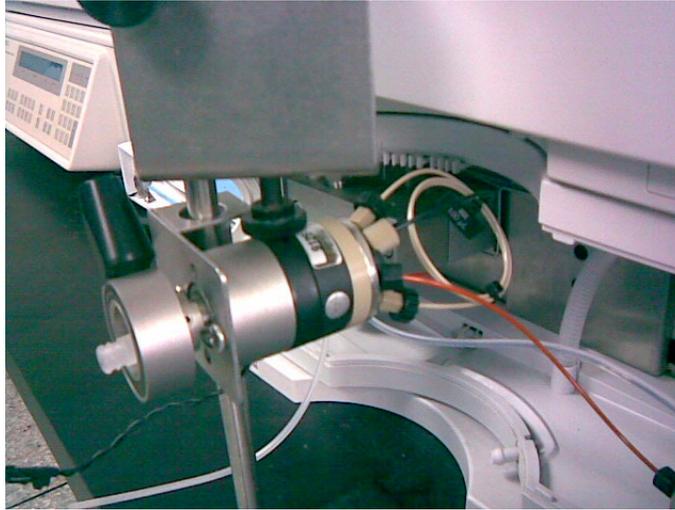


Figura 15. Puerto con una válvula de inyección.

5.2.1.3. Columna

Una columna tipo PRP-1 de la casa Hamilton, de 5 μm de diámetro de partícula y dimensiones de 150 x 4,6 mm.

Diferentes autores han reportado que la cuantificación del ácido fítico empleando columnas de acero inoxidable ha traído inconvenientes, debido a la tendencia que tiene el analito de absorberse en este material, es por ello que la columna, el lazo de inyección y todas las conexiones son elaboradas con un material polimérico externo resistente a la presión, poliéter éter cetona (PEEK) para solventar este problema (Figura 16).

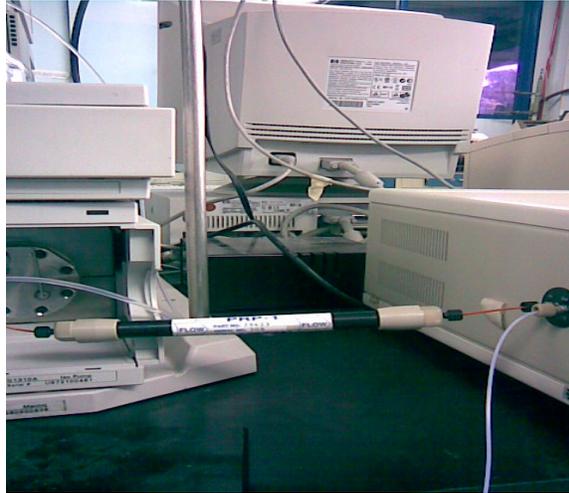


Figura 16. Columna cromatográfica PRP-1.

5.2.1.4. *Detector*

Un detector de Índice de Refracción, marca HP-1047A, con un intervalo de temperatura desde 30 hasta 50 °C y un rango de sensibilidad desde 32×10^{-5} RIU (baja sensibilidad) a $1/64 \times 10^{-5}$ RIU (alta sensibilidad) para la salida del registrador (Figura 17).



Figura 17. Detector de índice de refracción

5.2.1.5. Sistema de adquisición de datos

La salida analógica del detector es conectada a una tarjeta electrónica y los datos fueron procesados en un software llamado EZCHROM (Figura 18).



Figura 18. Procesador de datos.

Otros equipos

5.2.1.6. Ultrasonido de punta

Para la extracción del ácido fítico se utilizó un ultrasonido de punta (Figura 19).



Figura 19. Ultrasonido de punta.

5.2.1.7. Rota-evaporador

Para eliminar el solvente de extracción se empleó un rota-evaporador marca BUCHI, modelo R-1100 (Figura 20).



Figura 20. Rotaevaporador.

5.2.2. Reactivos

- **Estándares**

-Sal dodecasodica de ácido fítico hidratada (ácido inositol hexafosfórico), con un porcentaje de pureza del 85% de la casa SIGMA-ALDRICH.

-Sal dipotasica de ácido fítico (ácido inositol hexafosfórico), con un porcentaje de pureza del 95% de la casa SIGMA-ALDRICH.

- **Resina**

-Resina de intercambio catiónico tipo AG 50W-X4 entre 50-100 mesh de H⁺ de la casa Bio-Rad.

- **Fase móvil**

-Metanol al 99.9% de pureza, grado HPLC de la Compañía Burdick & Jackson.

-Hidróxido de Tetraetilamonio al 20% en solución acuosa de la Casa Merck - Schuchardt.

-Ácido fórmico al 85% de pureza de la Casa Sigma - Aldrich.

-Agua desionizada de 18 MΩ-cm de resistividad, tomada de un sistema agua nanopure, marca BARNSTEAD.

- **Otros Solventes**

- Hexano al 99,9 % de pureza, grado HPLC de la Compañía Burdick & Jackson.

5.2.3. Otros suministros

- **Filtro**

Para eliminar las partículas suspendidas en los extractos de los inositoles fosfatos se emplearon filtros de celulosa MFS25 de la casa MFS Advantec MFsinc.

- **Cartucho de extracción**

Se utilizó un cartucho amino sep-Pack de intercambio aniónico (Waters division of millipore).

5.2.4. Soluciones empleadas

Para determinar las condiciones de trabajo bajo las cuales se realizó la separación cromatográfica del ácido fítico y sus inositoles menores, se emplearon las siguientes soluciones:

- **Solución patrón de ácido fítico de ≈ 28.051 ppm a partir de la sal al 85% de pureza.**

Para ello se pesaron (4.6797 ± 0.0001) g de la sal dodecasódica de ácido fítico hidratada, se disolvieron en la mínima cantidad de agua desionizada y posteriormente con el propósito de intercambiar los iones de sodio por protones, se mezclaron con aproximadamente 5g de resina de intercambio catiónico, luego se agitó manualmente por 10 min. Por último, se filtró la solución con un embudo tallo corto con lana de vidrio. El filtrado se recogió en un balón de 100 mL y se enrasó a este volumen con agua desionizada.

- **Solución patrón de ácido fítico de 1.122 ppm.**

Se tomó una alícuota de 2 mL de la solución madre de ácido fítico de 28.051 ppm y se enrasó a 50 mL en un balón aforado con la fase móvil a utilizar.

- **Hidrólisis del ácido fítico.**

La hidrólisis del ácido fítico se realizó tomando una alícuota de 50 mL de la solución de IP_6 de 28.051 ppm, se colocó en un balón de 100 mL, y se calentó con reflujo a 95 °C durante 10 horas. Posteriormente se trasvasó a un balón de 100 mL y se enrasó a este volumen con agua desionizada.

Luego de obtener la mezcla de los inositoles fosfatos, se tomó una alícuota de 4 mL de la solución anterior, se colocó en un balón de 50 mL y se enrasó a este volumen con la fase móvil utilizar.

Los patrones utilizados para contaminar las muestras y para la curva de calibración se prepararon a partir de la sal de ácido fítico al 95% de pureza.

- ***Solución madre de ácido fítico de 6.011 ppm a partir de la sal al 95% de pureza.***

Para preparar esta solución patrón se pesó (0,3529±0,0001) g de la sal dipotásica de ácido fítico al 95% de pureza y se disolvió con agua desionizada calentándola en un baño de agua a 35 °C. Finalmente se trasvasó la solución a un balón de 50 mL y se enrasó a este volumen. Para evitar la degradación de la solución se mantuvo en la nevera.

5.2.5. Fase móvil.

Las fases móviles utilizadas fueron:

- Fase móvil A: compuesta por 5% metanol, 0.07% hidróxido de tetraetilamonio y ácido fórmico hasta llevar el pH a 4.3.
- Fase móvil B: formada por 5% metanol, 0.10% hidróxido de tetraetilamonio y ácido fórmico hasta obtener un pH de 4.3.
- Fase móvil C: compuesta por 5% metanol, 0.14% hidróxido de tetraetilamonio y ácido fórmico hasta alcanzar un pH de 4.3.

5.2.6. Metodología Experimental

5.2.6.1. Secado de la muestra

Se empleó el secado por liofilización, para ello se pesaron dos replicas de 5g de cada cereal y se llevaron a peso constante por dicho método.

5.2.6.2. Contaminación de las Muestras

Se pesaron cuatro replicas de cada cereal liofilizado de $(1,0000 \pm 0.0001)$ g, dos de estas muestras fueron contaminadas con 1 mL de una solución madre de ácido fítico 6.000 ppm y se dejaron secar a temperatura ambiente durante un día.

5.2.6.3. Extracción del ácido fítico

Cada muestra de trigo se extrajo con 10 mL de HCl 0,5 M empleando un ultrasonido de punta, el cual se mantuvo encendido por 2 min, con una potencia de 25 watts y una frecuencia de 20 KHz, mientras que las muestras de arroz, maíz y cerelac se colocaron en el ultrasonido durante 2 horas. Luego se procedió a centrifugar cada solución durante 10 min a 3400 rpm, el sobrenadante se decanto a un balón de 25 mL y seguidamente el residuo de cada tubo de centrifuga se mezcló con 5 mL HCl 0,5 M para realizar el lavado del mismo, para esto, se agitó la suspensión de forma mecánica con la ayuda de la punta del ultrasonido. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas, el sobrenadante se combinó con el anterior y luego fue llevado a enrase con agua desionizada. Por ultimo, las muestras de cerelac, arroz y maíz fueron filtradas antes de preconcentrar los inositoles fosfato, empleando un manifold y filtros de nylon.

5.2.6.4. Pre- concentración del ácido fítico y eliminación del HCl.

Para las muestras de trigo se colocaron 5 mL de las soluciones de extracción en una jeringa de 25 mL (las muestras de maíz, arroz y cerelac se colocaron 10 mL), y se llevó a un volumen de 25 mL con agua desionizada, luego se pasaron a través de un cartucho amino de intercambio aniónico (el cual fue previamente activado con inyecciones sucesivas de 10 mL de H₂O desionizada, 10 mL HCl 0.5 M, HCl 2M y H₂O desionizada nuevamente), con el fin de retener el ácido fítico y sus inositoles fosfatos menores, los cuales fueron eluidos con HCl 2M y se recogieron en balones. Finalmente estas muestras fueron rotaevaporadas a sequedad y el residuo fue redissuelto en 2 mL de fase móvil.

5.2.6.5. Determinación por HPLC-RI

Una vez redissuelto el residuo, se inyectó por triplicado en el cromatógrafo para su análisis por HPLC-RI.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Contenido mineral en las muestras de cereales por EAA.

6.1.1. Cereal de trigo Cerelac

Determinación de Fe por el Método de Calibración Directa

En la siguiente tabla se presentan las condiciones instrumentales óptimas para la determinación de hierro en la muestra:

Tabla Nº 3. Condiciones de trabajo

Parámetros Instrumentales	Valores óptimos
Corriente de la lámpara	7 mA
Longitud de onda	248.3 nm
Ancho de banda	0.2 nm
Rango óptimo de concentración	2-9 ppm
Sensibilidad	0.05 ppm
Combustible / Oxidante	Acetileno / Aire
Modo de Medida	Integración

La ecuación de la recta obtenida para el Fe bajo estas condiciones instrumentales fue: $Y = 0.0197X + 0.0041$ $R^2 = 0.9992$

A partir de esta ecuación se obtuvieron los siguientes resultados para la concentración de Fe en las muestras de Cerelac:

Tabla N° 4. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de Cerelac.

Muestra	Peso de muestra (g) (± 0.0001)	Contenido de Fe (mg/100g) (± 0.2)
1	5.0817	*11,2
2	5.0158	10.2
3	5.0109	10.3

* No se rechazo al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla N°5. Contenido de Fe en la muestra de Cerelac.

Contenido de Fe (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Fe reportado en la etiqueta (mg/100g)
+10.6±0.6	5.7%	15

+Este contenido de Fe es equivalente a 0.0106 %p/p.

Dado que se observa diferencia entre el valor presentado en la etiqueta y el valor obtenido por el método de análisis utilizado, se realizó una comparación estadística de estos resultados para un grado de confianza del 95%, considerando el valor de la etiqueta como el verdadero. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla N° 6.

Tabla N° 6. Prueba estadística: Contraste de Significación.

Contenido de Fe experimental (x) (mg/100g)	Contenido de Fe en la etiqueta (μ) (mg/100g)	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{critico}}(95\%,2)$
10.6±0.6	15.0	12.70	4.30

El $t_{\text{calculado}}$ es mayor que el t_{critico} , esto implica que las diferencias entre el valor experimental del Fe y el reportado en la etiqueta son significativas, por lo tanto, se procedió a realizar el análisis de Fe por el método de Adición de Estándar para determinar si estas diferencias se pueden atribuir a la matriz de la muestra.

Determinación de Fe por el Método de Adición Estándar

Ecuación de la recta: $Y = 0.0244X + (0.0271)$ • $R^2 = 0.9993$

• El punto corte en esta ecuación es la absorbancia de los patrones que solo contienen muestra, en este caso el valor (0.0271) corresponde a la absorbancia de la muestra 1.

Los resultados para la concentración de Fe en la muestra fueron:

Tabla Nº 7. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de Cerelac.

Muestra	Peso de muestra (g) (± 0.0001)	Contenido de Fe (mg/100g) (± 0.9)
1	5.0817	13.6
2	5.0158	12.2
3	5.0109	*11.2

* No se rechazó al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla Nº 8. Promedio del contenido de Fe en la muestra de Cerelac.

Contenido Fe (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Fe reportado en la etiqueta (mg/100g)
$+12 \pm 1$	8%	15

⁺ Este valor es equivalente a 0.012 %p/p.

Para determinar si existe diferencias significativas en los resultados de Fe en el Cerelac con el uso del Método de Adición de Estándar con respecto al de Curva de Calibración, se realizó un estudio estadístico por comparación de medias, para ello se realizó primero la prueba F de dos colas para el 95 % de confianza y luego la prueba t. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla N° 9.

Tabla N° 9. Comparación de métodos

	Calibración directa	Adición estándar
Fe (mg/100g)	11,2	13.6
	10.2	12.2
	10.3	11.2
Promedio	10.6±0.6	12±1
F_{calculado}	4.79	
F_{teórico}	39	
t_{calculado}	2.31	
t_{teórico}	2.78	

El $F_{\text{calculado}} < F_{\text{teórico}}$, esto indica que las varianzas de los métodos de calibración directa y adición estándar son de la misma población.

Se observa que la $t_{\text{calculado}} < t_{\text{teórico}}$, implica que las medias obtenidas por calibración directa y adición estándar no difieren significativamente.

Seguidamente, se realizó un estudio de las pendientes obtenidas por la curva de calibración directa y por adición de estándar comparando sus límites de confianza al 95%, se encontró que no existen diferencias significativas entre las mismas, lo que indica que no existe un efecto matriz en la determinación de Fe en el Cerelac.

Se puede concluir que la diferencia en el valor de la etiqueta y el obtenido experimentalmente no puede ser atribuido a un efecto de matriz.

Determinación de Ca por el Método de Calibración Directa

La tabla que se presenta a continuación contiene un resumen de las condiciones instrumentales óptimas para la determinación de calcio en las muestras:

Tabla Nº 10. Condiciones de trabajo.

Parámetros Instrumentales	Valores óptimos
Corriente de la lámpara	10 mA
Longitud de onda	422.7 nm
Ancho de banda	0.5 nm
Rango óptimo de concentración	1-4 ppm
Sensibilidad	0.02 ppm
Combustible / Oxidante	Oxido nitroso / Acetileno
Modo de Medida	Integración

A partir de estas condiciones se obtuvo la curva de calibración siguiente:

$$\text{Ecuación de la recta: } Y = 0.0674X + 0.028 \quad R^2 = 0.9994$$

Por medio de esta ecuación se encontraron los siguientes resultados para la concentración de Ca en la muestra de Cerelac:

Tabla N° 11. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de Cerelac.

Muestra	Peso de muestra (g) (± 0.0001)	Contenido de Ca (mg/100g) (±6)
1	5.0817	*449
2	5.0158	435
3	5.0109	437

* No se rechaza al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla N° 12. Contenido de Ca en la muestra de Cerelac.

Contenido de Ca (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Ca reportado en la etiqueta (mg/100g)
⁺ 440±8	1.8%	500

⁺Equivalente a 0.440 %p/p.

En la tabla N° 13, se presenta la comparación estadística con la prueba t al 95 % de confianza del valor obtenido para el calcio experimentalmente y el reportado por el fabricante en la etiqueta.

Tabla N° 13. Prueba estadística: Contrasté de Significación.

Contenido de Ca experimental (x) (mg/100g)	Contenido de Ca en la etiqueta (μ) (mg/100g)	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{critico}}(95\%,2)$
440 \pm 8	500	12.99	4.30

El $t_{\text{calculado}}$ es mayor que el t_{critico} , esto indica que las diferencias entre el valor experimental del Ca y el reportado en la etiqueta son significativas. Nuevamente se procedió a realizar el análisis de Ca por el Método de Adición de Estándar para determinar si las diferencias se pueden atribuir a un efecto de matriz.

Determinación de Ca por el Método de Adición Estándar

Ecuación de la recta: $Y = 0.0606X + (0.0337) \bullet \quad R^2 = 0.9992$

- En esta ecuación el valor (0.0337) corresponde a la absorbancia de la muestra 1.

Los resultados para la concentración de Ca en la muestra se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N° 14. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de Cerelac.

Muestra	Peso de muestra (g) (± 0.0001)	Contenido de Ca (mg/100g) (±39)
1	5.0817	*459
2	5.0158	439
3	5.0109	444

* No se rechazó al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla N° 15. Promedio del contenido de Ca en la muestra de Cerelac.

Contenido Ca (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Ca en reportado en la etiqueta (mg/100g)
⁺ 447 ± 10	2.2%	500

⁺ Equivalente a 0.447 % p/p.

La tabla N° 16 muestra un resumen de los resultados estadístico para la comparación de las medias obtenidas para el Ca por el método de Calibración Directa y Adición de Estándar.

Tabla N° 16. Comparación de métodos.

	Calibración directa	Adición estándar
Ca (mg/100g)	449	459
	435	439
	437	444
Promedio	440±8	447±10
F_{calculado}		1.89
F_{teórico}		39
t_{calculado}		0.94
t_{teórico}		2.78

Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{teórico}}$, implica que las varianzas de ambos métodos son de la misma población.

Se observa que la $t_{\text{calculado}} < t_{\text{teórico}}$, por lo tanto, las medias obtenidas por calibración directa y adición estándar no difieren significativamente.

Nuevamente se puede concluir que la diferencia entre el valor experimental y el reportado por la etiqueta no puede atribuirse a un efecto matriz.

Determinación de Zn por el Método de Calibración Directa

En la tabla N° 17 se presenta un resumen de las condiciones instrumentales óptimas para la determinación de zinc en las diferentes muestras de cereal:

Tabla N° 17. Condiciones de trabajo.

Parámetros Instrumentales	Valores óptimos
Corriente de la lámpara	5 mA
Longitud de onda	213.9 nm
Ancho de banda	0.5 nm
Rango óptimo de concentración	0.4-1.5 ppm
Sensibilidad	0.008 ppm
Combustible / Oxidante	Acetileno / Aire
Modo de Medida	Integración

La ecuación de la recta obtenida bajo estas condiciones fue:

$$Y = 0.1402X + 0.0115 \quad R^2 = 0.9994$$

Por medio de esta ecuación se obtuvieron los siguientes resultados para la concentración de Zn en la muestra:

Tabla N° 18. Valores obtenidos de Zn para diferentes muestras de Cerelac.

Muestra	Peso de muestra (g) (± 0.0001)	Contenido de Zn (mg/100g) (± 0.04)
1	5.0817	0.73
2	5.0158	0.74
3	5.0109	0.72

Tabla N° 19. Contenido de Zn en la muestra de Cerelac.

Contenido Zn (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Zn reportado en la etiqueta (mg/100g)
+0.73±0.01	1.4%	No reporta

⁺ Equivalente a 0.00073 %p/p.

La determinación del contenido mineral en el resto de los cereales se realizó empleando el Método de Calibración Directa, no solo porque se demostró que con el Cerelac no se obtiene un efecto matriz en la determinación de Fe y Ca, sino porque para los demás cereales estudiados no se observa diferencia significativa entre el contenido de Fe y Ca obtenido de forma experimental y el reportado en la etiqueta, como se mostrara a continuación, a excepción del trigo partido # 1 Miduchy que no tiene reporte mineral.

6.1.2. Trigo partido #1

La determinación de Fe, Ca y Zn en el Trigo partido # 1 se realizó bajo los parámetros instrumentales mostrados en la tabla 3, 10 y 17 respectivamente.

Concentración de Fe

Ecuación de la recta: $Y = 0.0197X + 0.0041$ $R^2 = 0.9992$

Tabla N° 20. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de trigo.

Muestra	Peso de muestra (g) (± 0.0001)	Contenido de Fe (mg/100g) (± 0.1)
1	5.0013	2.2
2	5.0118	2.1
3	5.0618	2.1
4	5.0034	2.1

Tabla N° 21. Contenido de Fe en la muestra de trigo partido #1.

Contenido de Fe (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Fe reportado en la etiqueta (mg/100g)
⁺ 2.12 ± 0.05	2.4%	No reporta

⁺ Equivalente a 0.00212 %p/p.

Concentración de Ca

Ecuación de la recta: $Y = 0.0768X + 0.0365$ $R^2 = 0.9994$

Tabla N° 22. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de trigo.

Muestra	Peso de muestra (g) (± 0.0001)	Contenido de Ca (mg/100g)
1	5.0013	34.6±0.4
2	5.0118	*39.7±0.6
3	5.0618	35.9±0.4
4	5.0034	35.2±0.4

* Se rechazo al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla N° 23. Contenido de Calcio en la muestra de trigo partido #1.

Contenido de Ca (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Ca reportado en la etiqueta (mg/100g)
+35.2±0.6	1.7%	No reporta

+Equivalente a 0.0352 %p/p.

Concentración de Zn

Ecuación de la recta: $Y = 0.1402X + 0.0115$ $R^2 = 0.9994$

Tabla N° 24. Valores obtenidos de Zn para diferentes muestras de trigo.

Muestra	Peso de muestra (g) (± 0.0001)	Contenido de Zn (mg/100g) (± 0.1)
1	5.0013	2.1
2	5.0118	2.4
3	5.0618	2.2
4	5.0034	2.2

Tabla N° 25. Contenido de Zn en el Trigo partido #1.

Contenido de Zn (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Zn reportado en la etiqueta (mg/100g)
⁺ 2.2±0.1	4.5%	No reporta

⁺Equivalente a 0.0022 %p/p.

El trigo partido Miduchy no es un cereal infantil como el cerelac, sino que es un trigo alimenticio que ha sido tamizado a un cierto tamaño de grano. Existe tres tipos de este trigo (# 1, 2 y 3), siendo el #1 el de tamaño de grano mas pequeño. Se puede observar claramente para este cereal tiene un contenido mineral (Ca y Fe) mucho más bajo que el del Cerelac, lo cual es normal, ya que los cereales infantiles se le adicionan

estos minerales para mejorar su contenido nutricional. Para el caso del Zn el valor en el trigo es mayor lo que puede deberse al proceso de preparación de muestra.

6.1.3. Cereal de Arroz Nestum

Concentración de Fe

Ecuación de la recta: $Y=0.0406x-0.0034$ $R^2= 0.9991$

Tabla N° 26. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de Arroz.

Muestra	Peso de muestra (g) (±0.0001)	Contenido de Fe (mg/100g) (±0.2)
1	5.0186	13.6
2	5.0109	14.6
3	5.0529	14.8
4	5.0119	*13.2

*No se rechaza por prueba Q al 95% de confianza.

Tabla N° 27. Contenido de Fe en la muestra de Cereal Arroz Nestum.

Contenido de Fe (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Fe en la etiqueta (mg/100g)
$+14.1 \pm 0.8$	5.7%	15.0

*Equivalente a 0.0141 %p/p.

En la tabla N° 28, se presenta la comparación estadística del valor obtenido para el hierro experimentalmente y el reportado en la etiqueta.

Tabla N° 28. Prueba estadística: Contraste de Significación.

Contenido de Fe experimental (x) (mg/100g)	Contenido de Fe en la etiqueta (μ) (mg/100g)	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{critico}}(95\%,3)$
14.1±0.8	15.0	2.25	3.18

El $t_{\text{calculado}}$ es menor que el t_{critico} , esto quiere decir que las diferencias entre el valor experimental y el reportado en la etiqueta no son significativas y se atribuyen a errores aleatorios.

Concentración de Ca

Ecuación de la recta: $Y=0.0616x+0.0035$ $R^2= 0.9979$

Tabla N° 29. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de Arroz.

Muestra	Peso de muestra (g) (±0.0001)	Contenido de Ca (mg/100g)
1	5.0186	355±16
2	5.0109	345±18
3	5.0529	344±18
4	5.0119	*331±18

*No se rechazo al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla N° 30. Contenido de Ca en la muestra de Arroz Nestum.

Contenido de Ca (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Ca en la etiqueta (mg/100g)
+344 ± 10	2.9%	320

+Equivalente a 0.344 %p/p.

En la tabla N° 31 se presenta la comparación estadística con la prueba t al 95% de confianza del valor obtenido para el calcio experimentalmente y el reportado en la etiqueta.

Tabla N° 31. Prueba estadística: Contraste de Significación.

Contenido de Ca experimental (x) (mg/100g)	Contenido de Ca en la etiqueta (μ) (mg/100g)	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{critico}}(95\%,3)$
344 \pm 10	320	4.8	3.18

El $t_{\text{calculado}}$ es mayor que el t_{critico} , esto indica que las diferencias entre el valor experimental del Ca y el reportado en la etiqueta son significativas.

Concentración de Zn

Ecuación de la recta: $Y=0.1458x -0.0038$ $R^2= 0.9993$

Tabla N° 32. Valores obtenidos de Zn para diferentes muestras de Arroz.

Muestra	Peso de muestra (g) (±0.0001)	Contenido de Zn (mg/100g)
1	5.0186	1.14±0.02
2	5.0109	1.14±0.04
3	5.0529	*1.07±0.04
4	5.0119	1.12±0.04

*No se rechazo al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla N° 33. Contenido de Zn en el Arroz Nestum.

Contenido de Zn (mg/100g)	Coficiente de variación	Contenido de Zn en la etiqueta (mg/100g)
+1.12 ±0.03	2.7%	No reporta

+Equivalente a 0.00112 %p/p.

6.1.4. Cereal de Maíz Nestum

Concentración de Fe

Ecuación de la recta: $Y=0.0469x-0.005$ $R^2= 0.9995$

Tabla Nº 34. Valores obtenidos de Fe para diferentes muestras de Maíz.

Muestra	Peso de muestra (g) (±0.0001)	Contenido de Fe (mg/100g) (±0.2)
1	5.0095	14.8
2	5.0107	*13.9
3	5.0129	15.4
4	5.0317	15.1

* No se rechaza al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla Nº 35. Contenido de Fe en la muestra de Maíz.

Contenido de Fe (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Fe en la etiqueta (mg/100g)
⁺ 14.8±0.6	4.1%	15.0

⁺Equivalente a 0.0148 %p/p.

Concentración de Ca

Ecuación de la recta: $Y=0.0643x+0.0005$ $R^2= 0.9999$

Tabla N° 36. Valores obtenidos de Ca para diferentes muestras de Maíz.

Muestra	Peso de muestra (g) (±0.0001)	Contenido de Ca (mg/100g)
1	5.0095	367±4
2	5.0107	371±4
3	5.0129	346±2
4	5.0317	*344±2

*No se rechaza al realizar la prueba Q al 95% de confianza.

Tabla N° 37. Contenido de Ca en la muestra de Maíz.

Contenido de Ca (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Ca en la etiqueta (mg/100g)
+357 ± 14	3.9%	360

+Equivalente a 0.357%p/p.

Concentración de Zn

Ecuación de la recta: $Y=0.1806x-0.0058$ $R^2= 0.9993$

Tabla N° 38. Valores obtenidos de Zn para diferentes muestras de Maíz.

Muestra	Peso de muestra (g) (±0.0001)	Contenido de Zn (mg/100g) (± 0.04)
1	5.0095	0.40
2	5.0107	0.38
3	5.0129	0.38
4	5.0317	0.38

Tabla N° 39. Contenido de Zn en la muestra de Maíz.

Contenido de Zn (mg/100g)	Coefficiente de variación	Contenido de Zn en la etiqueta (mg/100g)
$^{+}0.38 \pm 0.01$	2.6%	No reporta

⁺Equivalente a 0.00038 %p/p.

En la tabla N° 40 se muestra un resumen de la concentración experimental de Fe, Ca y Zn de las muestras estudiadas:

Tabla N° 40. Concentración experimental de los metales en las muestras.

Muestra	Concentración de Fe (mg/100g)	Concentración de Ca (mg/100g)	Concentración de Zn (mg/100g)
Cereal de trigo Cerelac	10.6 ± 0.6	440 ± 8	0.73 ± 0.01
Trigo partido # 1	2.12 ± 0.05	35.2 ± 0.6	2.2 ± 0.1
Cereal de arroz Nestum	14.1 ± 0.8	344 ± 10	1.12 ± 0.03
Cereal de maíz Nestum	14.8 ± 0.6	357 ± 14	0.38 ± 0.01

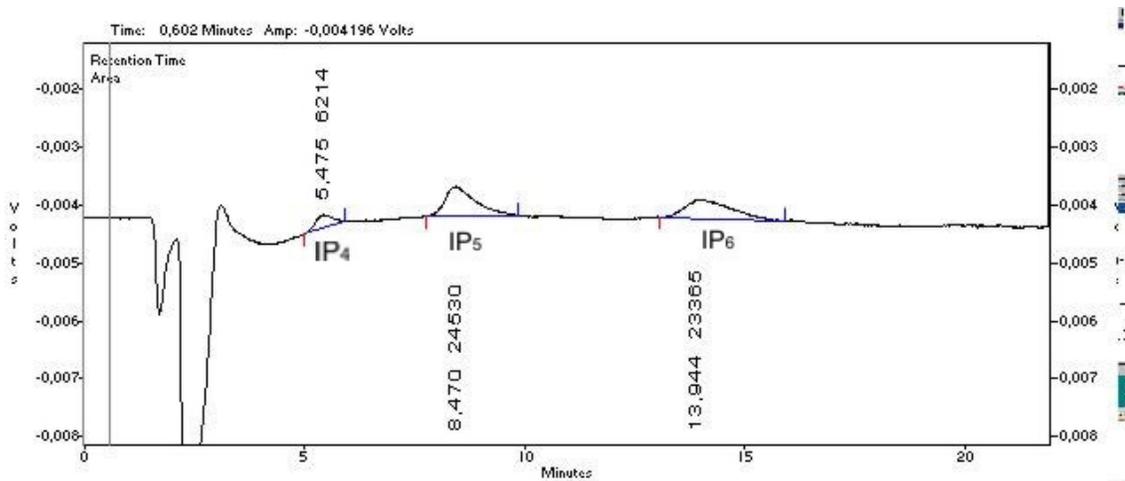
6.2. Contenido de Ácido Fítico en las muestras de cereales por HPLC-RI.

6.2.1. Estudios Preliminares

6.2.1.1. Determinación de las condiciones de trabajo.

Para establecer los parámetros cromatográficos ideales para la separación del ácido fítico y algunos inositoles fosfato menores por la técnica HPLC-RI, se procedió a ensayar con diferentes fases móviles cambiando el porcentaje de hidróxido de tetraetilamonio en ellas, para ello se empleó una mezcla de inositoles fosfatos, obtenida a partir de la hidrólisis de un patrón de 28051 ppm de ácido fítico y manteniendo fijo el flujo de fase móvil en 0.8 mL/min. La primera fase móvil estudiada fue la (A), compuesta por 0.07% hidróxido de tetraetilamonio. Con esta fase móvil no se logró la separación de los inositoles fosfatos. En la fase móvil (B) se aumento el porcentaje de hidróxido a 0.10% y obteniendo aún una muy baja separación de los inositoles fosfato estudiados. Por ultimo, con un porcentaje de 0.14% de TEA (Fase móvil C) se logró una buena separación de los inositoles fosfato del tretra al hexafosfato.

En la siguiente figura se presenta el cromatograma obtenido al inyectar 20 μ L de un patrón hidrolizado de ácido fítico con la fase móvil (C).



Cromatograma N^o 1. Solución patrón hidrolizada de ácido fólico.

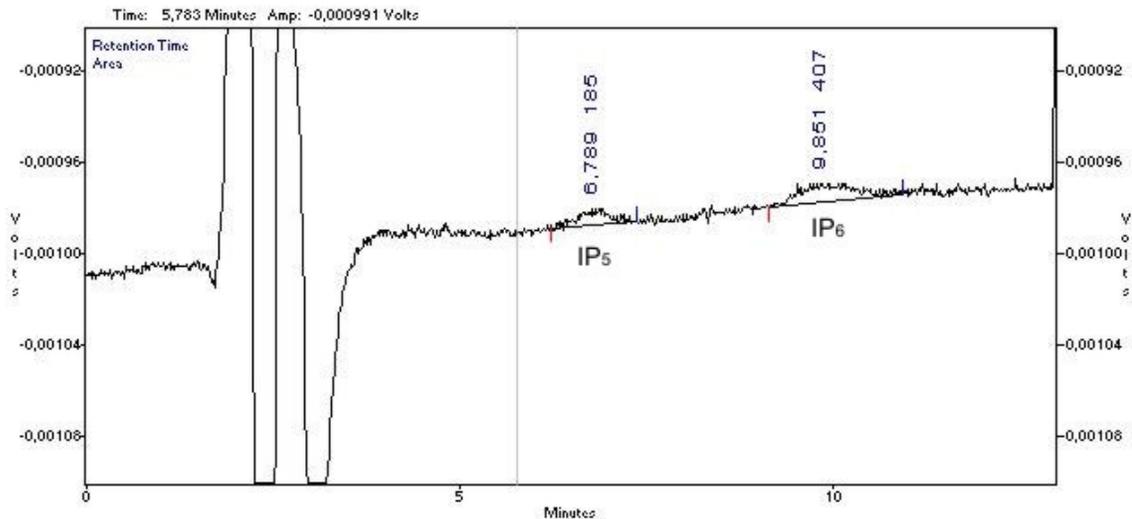
A continuación se resumen los parámetros cromatográficos utilizados para el estudio de ácido fólico en los cereales infantiles:

- Fase móvil: 5% metanol, 0.14% hidróxido de tetraetilamonio (TEA) y ácido fórmico hasta obtener un pH de 4.3.
- Flujo de fase móvil: 0.8 mL/min.
- Volumen de inyección: 20 µL.
- Columna: PRP-1 de 5 µm de diámetro de partícula y dimensiones de 150 x 4.6 mm.
- Temperatura del detector: 30°C
- Sensibilidad del detector: 4x10⁻⁵ RIU/F.S

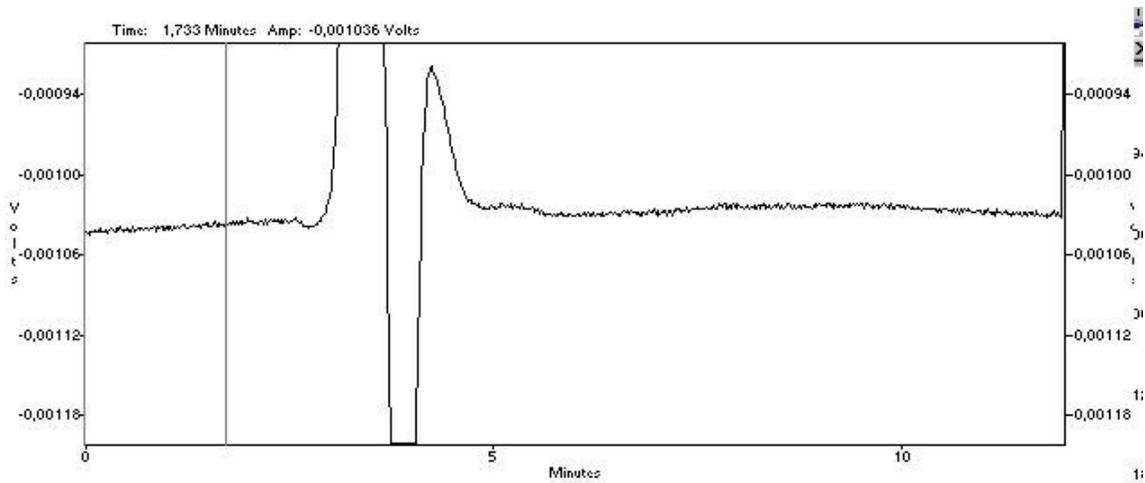
6.2.1.2. Eliminación de Grasas

Algunos autores (15) sugieren que la presencia de las grasas interfieren en el análisis del ácido fítico, en este apartado se procedió a evaluar la conveniencia o no del proceso de eliminación de grasas.

Para ello se tomó dos muestras liofilizadas de Cerelac de $(1,0000 \pm 0,0001)$ g cada una. Una de ellas se extrajo con 30 mL de hexano, calentando a 40 °C en un baño de agua y agitando durante 15 min. La suspensión obtenida se centrifugó durante 10 min a 3400 rpm. El hexano se decantó y se eliminó, mientras que en el residuo se eliminó el solvente remanente por secado bajo un flujo de gas de nitrógeno. El resto del tratamiento fue similar para las dos muestras. Los cromatogramas 2 y 3 muestran los resultados obtenidos para las muestras evaluadas bajo los dos métodos, se puede visualizar que solo el cromatograma correspondiente a la muestra que no fue extraída con hexano presentó señal de ácido fítico e IP₅.



Cromatograma N° 2. Muestra de Cerelac sin extracción con hexano.

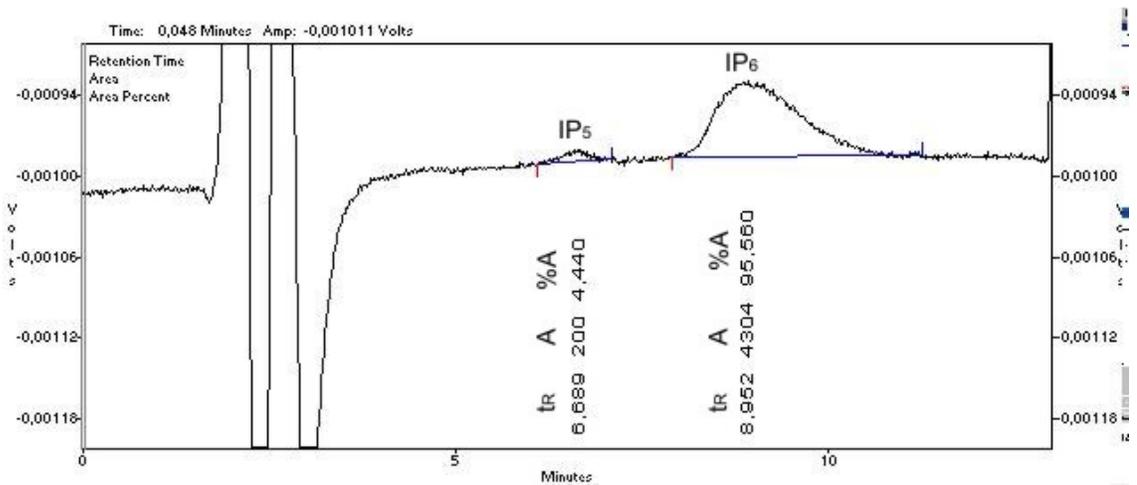


Cromatograma N° 3. Muestra de Cerelac extraída con hexano.

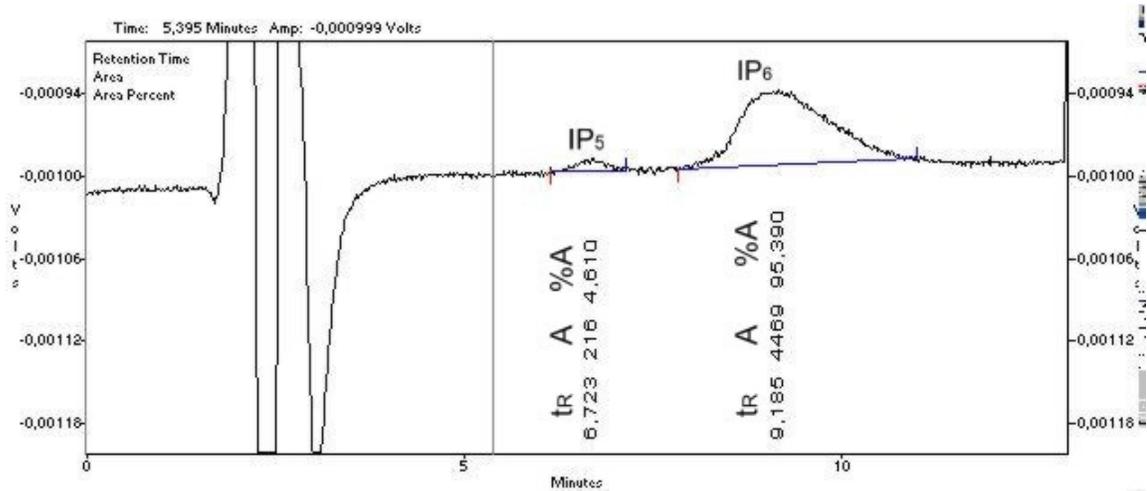
Se puede concluir que el proceso de extracción de las grasas presentes en los cereales infantiles con hexano interfiere en la determinación del ácido fólico, por lo tanto, no se realizó este paso durante el tratamiento de las muestras de cereales infantiles.

6.2.1.3. Extracción del ácido fítico.

Durante la extracción del ácido fítico presente en los cereales infantiles (cerelac, arroz y maíz) empleando el ultrasonido de punta por 2 min, se observó la formación de una solución muy turbia y espesa, esto generó inconvenientes durante la preconcentración del IP₆ en el cartucho amino. Para solventar este problema se procedió a verificar con dos muestras de cerelac de (1,0000 ± 0.0001) g contaminadas con 1 mL del patrón de IP₆ de 6011 ppm, si la extracción empleando el ultrasonido de punta por 2 min era equivalente a la del ultrasonido por 2 horas. Los siguientes cromatogramas corresponden a dicho ensayo:



Cromatograma N° 4. Muestra de Cerelac extraída con el ultrasonido de punta por 2 min.



Cromatograma N° 5. Muestra de Cerelac extraída con el ultrasonido por 2 horas.

En estos cromatogramas se puede visualizar que no existen diferencias en las áreas obtenidas para los picos de ácido fítico.

Por lo tanto, se concluye que ambas formas de extracción son equivalentes ya que arrojan resultados similares en cuanto al contenido de ácido fítico. Esta experiencia concuerda con lo planteado por Lehrfeld (14) en su artículo de 1994, donde menciona que por ambas vías el proceso de extracción se lleva a cabo eficientemente. De esta manera, la etapa de extracción de ácido fítico en los cereales infantiles se realizó con el ultrasonido por 2 horas.

6.2.2. Determinación del ácido fítico y porcentaje de recuperación.

6.2.2.1. Cereal de trigo Cerelac.

Para determinar la concentración del ácido fítico extraído de las muestras de Cerelac, se construyó una curva de calibración con patrones de IP₆ entre 61.2 ppm y 721.22 ppm.

La ecuación de la recta obtenida fue: $Y = 17.635X - 836.89$ $R^2 = 0.9980$

En la siguiente tabla se presentan las áreas y los % de área correspondientes a los inositoles fosfato presentes en la muestra de Cerelac 1:

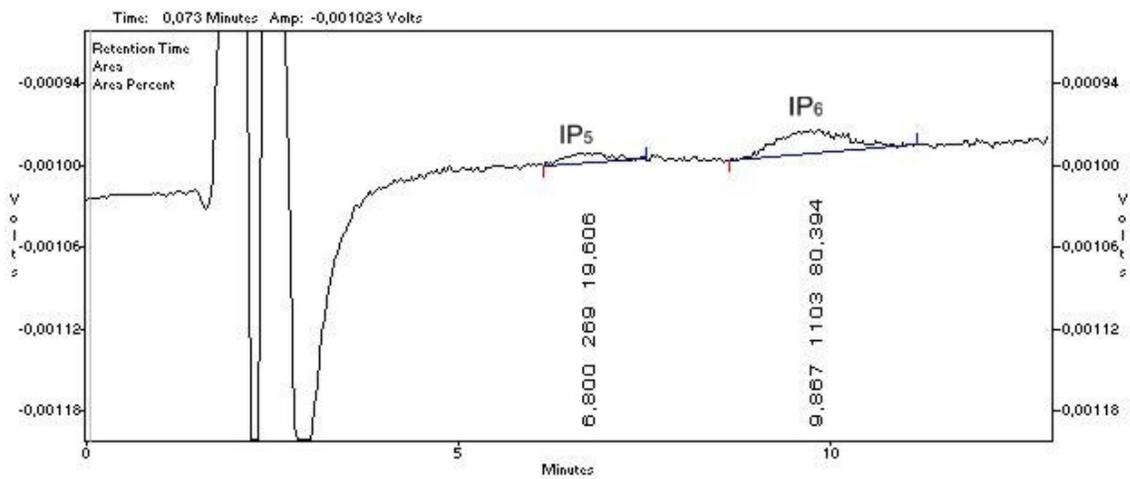
Tabla Nº 41. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en Cerelac 1 (1.0023 ± 0.0001) g.

Inositol tetrafosfato (IP ₄)		Inositol pentafofato (IP ₅)		Inositol hexafofato (IP ₆)	
Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio
No se observo		268 ± 31	(18 ± 2)%	1173 ± 44	(82 ± 2)%

Por medio de la ecuación de la recta se determinó el porcentaje de ácido fítico en la muestra de Cerelac 1:

$$\%p/p \text{ IP}_6 = (0.058 \pm 0.005) \%$$

El cromatograma N° 6 corresponde a la inyección de la muestra de cerelac 1, se puede observar solo la presencia del inositol pentafofato y el hexafofato (ác. fítico) en esta muestra:



Cromatograma N° 6. Muestra de Cerelac 1 sin contaminar.

Adicionalmente se realizó el análisis de otra muestra de Cerelac y los resultados obtenidos fueron:

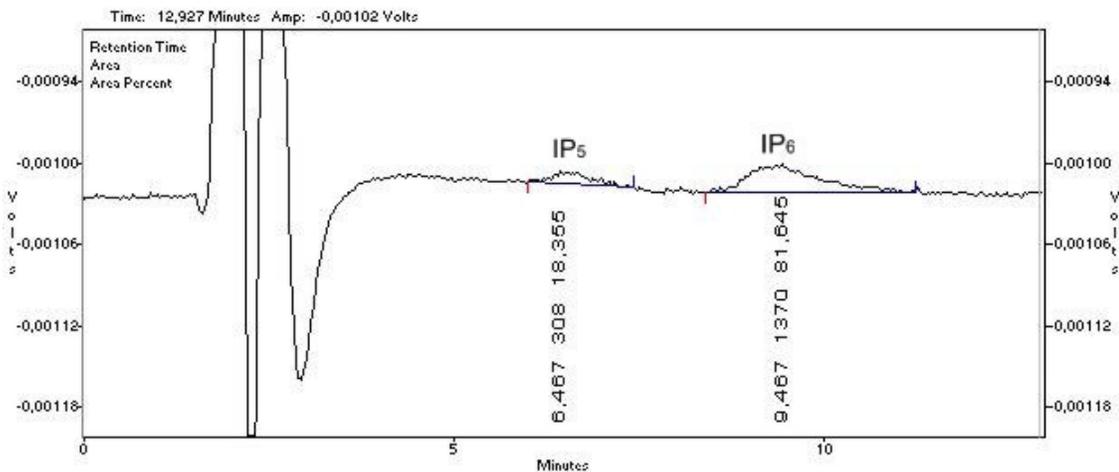
Tabla N° 42. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en Cerelac 2 (1.0027 ± 0.0001) g.

Inositol tetrafosfato (IP ₄)		Inositol pentafosfato (IP ₅)		Inositol hexafosfato (IP ₆)	
Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio
No se observo		329 ± 22	(20.0 ± 0.6)%	1319 ± 56	(80 ± 1)%

Se realizó el cálculo del porcentaje de IP₆ presente en el Cerelac 2 empleando la curva de calibración anterior y se obtuvo:

$$\%p/p \text{ IP}_6 = (0.060 \pm 0.005) \%$$

En el cromatograma N° 7 se presentan los picos correspondientes al IP₅ e IP₆ presentes en la muestra de Cerelac 2:



Cromatograma N° 7. Muestra de Cerelac 2 sin contaminar.

El porcentaje de ácido fítico en el cereal infantil de trigo Cerelac es:

$$\%p/p \text{ IP}_6 = (0.059 \pm 0.001) \%$$

Para el cálculo del porcentaje de recuperación se utilizó las muestras de cerelac contaminadas con 1 mL de una solución patrón IP_6 de 6120ppm.

La siguiente tabla presenta las áreas obtenidas para cada replica de cerelac contaminada:

Tabla N° 43. Área promedio obtenida para las muestras de cerelac contaminadas.

Peso de muestra (g)	Área promedio
Cerelac 3 (1.0063 ± 0.0001) g	11726 ± 170
Cerelac 4 (1.0055 ± 0.0001) g	13463 ± 169

En base a los datos anteriores se procedió a realizar el cálculo del % de recuperación y los resultados fueron: (Ver Apéndice, Sección 10.2.4)

Tabla N° 44. Porcentaje de recuperación del ácido fítico en la muestra de Cerelac.

Muestra	Masa IP_6 de contaminación (mg)	Masa IP_6 total determinada (mg)	Masa IP_6 original (mg)	% de recuperación
Cerelac 3	6.1 ± 0.2	3.55 ± 0.08	0.59 ± 0.01	48 ± 2
Cerelac 4	6.1 ± 0.2	4.05 ± 0.08	0.59 ± 0.01	57 ± 2

Rango % de recuperación de IP_6 obtenido para el cerelac= 48% - 57%

Se puede observar un bajo porcentaje de recuperación para esta muestra.

6.2.2.2. Trigo partido # 1.

La curva de calibración se construyó con patrones de IP₆ entre 240.44 y 961.76 ppm.

$$\text{Ecuación de la recta: } Y = 16.096X - 1099 \quad R^2 = 0.9954$$

Para el cálculo del porcentaje de ácido fítico se estudiaron dos muestras de trigo partido # 1, los resultados se presentan a continuación:

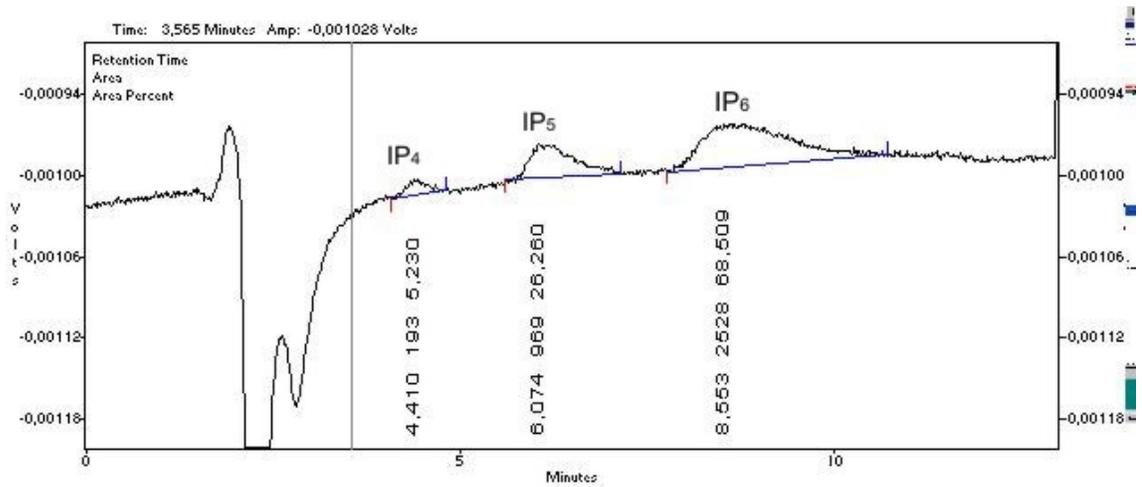
Tabla Nº 45. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en el trigo 1 (1.0153 ± 0.0001) g.

Inositol tetrafosfato (IP ₄)		Inositol pentafosfato (IP ₅)		Inositol hexafosfato (IP ₆)	
Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio
210 ± 21	(6.0 ± 0.2)%	999 ± 30	(28 ± 1)%	2378 ± 133	(66 ± 2)%

El porcentaje de ácido fítico presente en la muestra de trigo 1 fue:

$$\%p/p \text{ IP}_6 = (0.22 \pm 0.04) \%$$

El cromatograma Nº 8 corresponde a la inyección de una muestra del trigo 1, en este cromatograma se puede notar la presencia del IP₄, IP₅ e IP₆:



Cromatograma N^o 8. Muestra de trigo 1 sin contaminar.

Los resultados de la segunda muestra analizada de trigo se presentan a continuación:

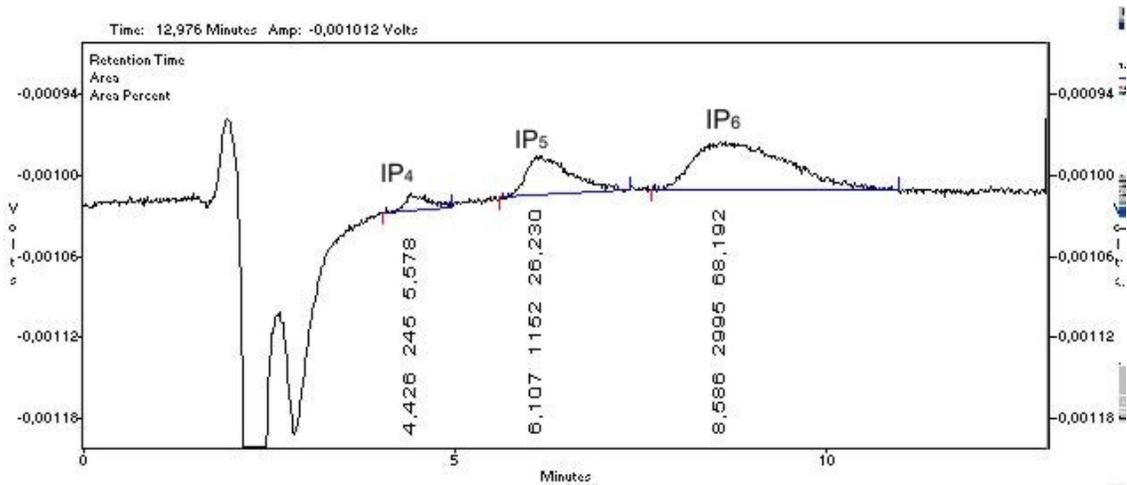
Tabla N^o 46. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en el trigo 2 (1.0119 ± 0.0001) g.

Inositol tetrafosfato (IP ₄)		Inositol pentafofato (IP ₅)		Inositol hexafofato (IP ₆)	
Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio
220 ± 31	(5.0 ± 0.6) %	1116 ± 38	(26,0 ± 0.7)%	2953 ± 124	(69 ± 1)%

El porcentaje de ácido fítico en la muestra de trigo 2 fue:

$$\%p/p \text{ IP}_6 = (0.25 \pm 0.04) \%$$

El cromatograma N° 9 corresponde a la muestra de trigo 2:



Cromatograma N° 9. Muestra de trigo 2 sin contaminar.

El contenido de ácido fítico determinado para el trigo partido # 1 es:

$$\%p/p \text{ IP}_6 = (0.24 \pm 0.02) \%$$

Para determinar el porcentaje de recuperación de ácido fítico, se utilizó las dos muestras de trigo contaminadas con una solución patrón IP_6 de 6011ppm, los resultados obtenidos fueron:

Tabla N° 47. Área promedio obtenida para las muestras de trigo contaminadas.

Peso de muestra (g)	Área promedio
Trigo 3 (1.0064 ± 0.0001) g	9764 ± 170
Trigo 4 (1.0056 ± 0.0001) g	9262 ± 174

En cuanto a los porcentajes de recuperación se obtuvo:

Tabla N° 48. Porcentaje de recuperación del ácido fítico en la muestra de Trigo.

Muestra	Masa IP₆ de contaminación (mg)	Masa IP₆ total determinada (mg)	Masa IP₆ original (mg)	% de recuperación
Trigo 3	6.0 ± 0.2	6.8 ± 0.2	2.4 ± 0.4	73 ± 7
Trigo 4	6.0 ± 0.2	6.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4	67 ± 7

Rango % de recuperación de IP₆ obtenido para el trigo partido # 1= 67% - 73%

Igualmente se observa un bajo porcentaje de recuperación para esta muestra, su magnitud es un poco mayor que el obtenido para el cereal infantil Cerelac.

6.2.2.3. Cereal de Arroz Nestum.

La curva de calibración se construyó con patrones de IP₆ entre 240.44 y 961.76 ppm.

$$\text{Ecuación de la recta: } Y = 17.089X - 398.04 \quad R^2 = 0.9985$$

Se analizó una muestra de arroz y se obtuvo los siguientes resultados:

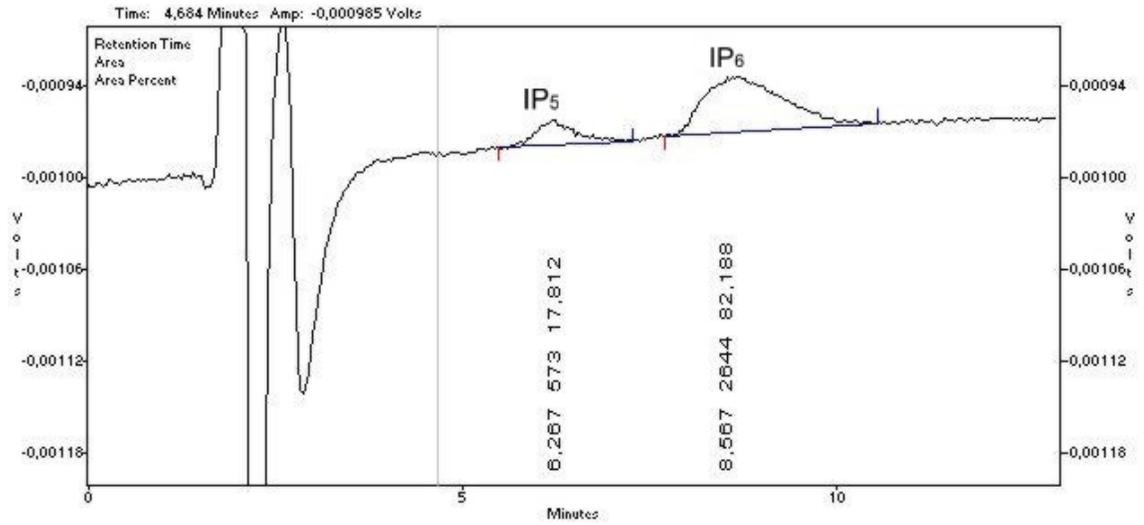
Tabla N° 49. Áreas y % áreas obtenidas para los inositoles fosfato presentes en Arroz 1 (1.0106 ± 0.0001) g.

Inositol tetrafosfato (IP ₄)		Inositol pentafosfato (IP ₅)		Inositol hexafosfato (IP ₆)	
Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio	Área promedio	% Área promedio
No se observo		557 ± 16	(17.6 ± 0.6)%	2614 ± 125	(82.4 ± 0.6)%

Por medio de la ecuación de la recta se determinó el porcentaje de ácido fítico en la muestra de arroz 1:

$$\%p/p \text{ IP}_6 = (0.087 \pm 0.008) \%$$

El cromatograma N° 10 corresponde a la muestra de arroz 1 analizada:



Cromatograma N° 10. Muestra de arroz sin contaminar.

Para realizar el cálculo del porcentaje de recuperación del IP₆, se contaminó una muestra de arroz con una solución madre de IP₆ de 6120 ppm. Los resultados obtenidos fueron:

Tabla N° 50. Área promedio obtenida para la muestra de arroz contaminada.

Peso de muestra (g)	Área promedio
Arroz 2 (1.0030 ± 0.0001) g	13831 ± 131

En base a los datos anteriores se procedió a realizar el cálculo % de recuperación y los resultados fueron:

Tabla Nº 51. Porcentaje de recuperación del ácido fítico en la muestra de Arroz.

Muestra	Masa IP₆ de contaminación (mg)	Masa IP₆ total determinada (mg)	Masa IP₆ original (mg)	% de recuperación
Arroz 2	6.1 ± 0.2	4.18 ± 0.05	0.88 ± 0.08	54 ± 2

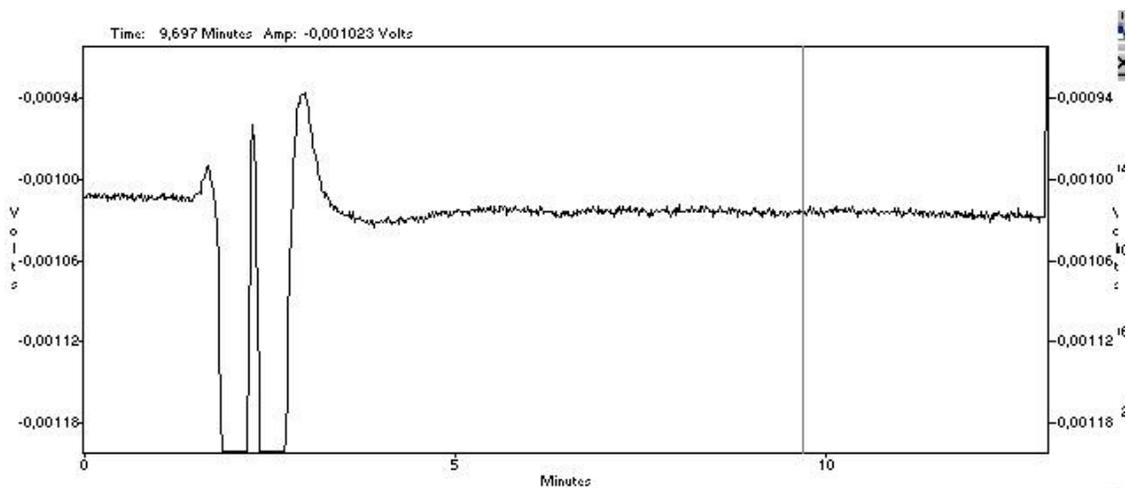
6.2.2.4. Cereal de Maíz Nestum.

Para construir la curva de calibración se emplearon patrones de ácido fítico entre 122.4 ppm y 721.22 ppm.

$$\text{Ecuación de la recta: } Y = 16.14 X - 621.73 \quad R^2 = 0.9983$$

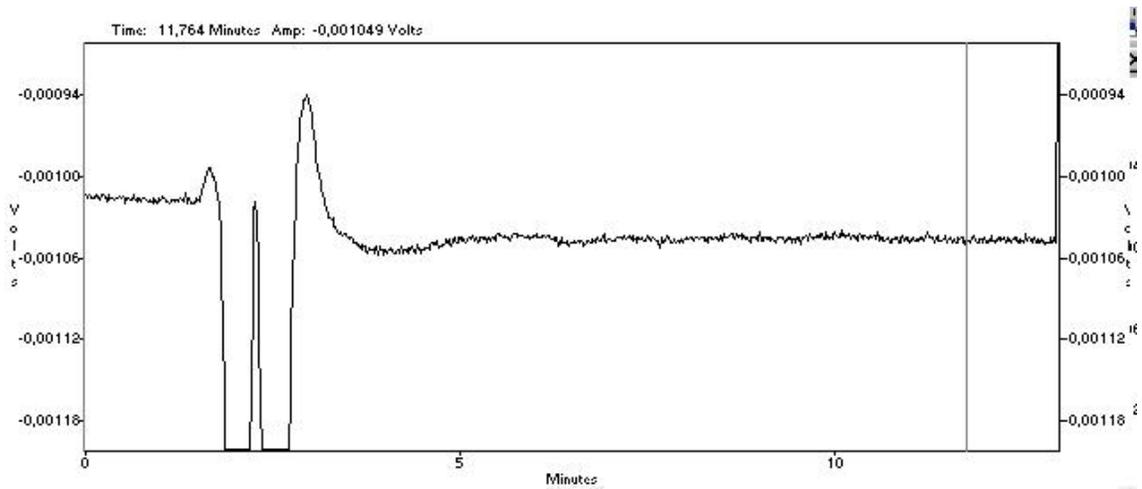
El análisis de las muestras de maíz no presento señal de ácido fítico ni de inositoles fosfato menores, los cromatogramas obtenidos para dos muestras de maíz se presentan a continuación:

Maíz 1 = (1.0073 ± 0.0001) g



Cromatograma N° 11. Muestra de Maíz 1 sin contaminar.

Maíz 2= (1.0061 ± 0.0001) g



Cromatograma N° 12. Muestra de Maíz 2 sin contaminar.

Se puede decir que si existe ácido fítico en la muestra pero no pudo ser detectado por este método.

Para estimar el porcentaje de recuperación de IP_6 , se procedió de la misma forma que las muestras anteriores, considerando que no hay aporte de ácido fítico original de la muestra, los resultados obtenidos fueron:

Tabla N° 52. Áreas promedio obtenidas para las muestras de maíz contaminadas.

Peso de muestra (g)	Área promedio
Maíz 3 (1.0022 ± 0.0001) g	10429 ± 153
Maíz 4 (1.0046 ± 0.0001) g	10515 ± 147

En cuanto a los porcentajes de recuperación se obtuvo:

Tabla N° 53. Porcentaje de recuperación del ácido fítico en la muestra de Maíz.

Muestra	Masa IP₆ de contaminación (mg)	Masa IP₆ total determinada (mg)	Masa IP₆ original (mg)	% de recuperación
Maíz 3	6.1 ± 0.2	3.42 ± 0.05	0	56 ± 2
Maíz 4	6.1 ± 0.2	3.45 ± 0.05	0	57 ± 2

En la tabla N° 54 se muestra un resumen de los porcentajes de recuperación del ácido fítico en las muestras estudiadas:

Tabla N° 54. Porcentaje de recuperación del IP₆ en las muestras analizadas.

Muestra	% recuperación del IP₆
Cereal de trigo Cerelac	48% – 57%
Trigo partido # 1	67% - 73%
Cereal de Arroz Nestum	54%
Cereal de Maíz Nestum	56% - 57%

En la tabla siguiente se muestra un resumen de todos los resultados obtenidos para la determinación de Fe, Ca, Zn, ácido fítico y % de recuperación (de este se colocó un valor promedio del rango para facilitar la discusión) para las diferentes muestras estudiadas:

Tabla N° 55. Contenido de metales, ácido fítico y % de recuperación en las muestras analizadas

Muestra	Concentración de Fe (mg/100g)	Concentración de Ca (mg/100g)	Concentración de Zn (mg/100g)	% p/p de IP₆ en la muestra	% recuperación de IP₆
Cereal de trigo Cerelac	10.6 ± 0.6	440 ± 8	0.73 ± 0.01	0.059 ± 0.001	52 ± 6
Trigo partido # 1	2.12 ± 0.05	35.2 ± 0.6	2.2 ± 0.1	0.24 ± 0.02	70 ± 4
Cereal de Arroz Nestum	14.1 ± 0.8	344 ± 10	1.12 ± 0.03	0.087 ± 0.008	54 ± 2
Cereal de Maíz Nestum	14.8 ± 0.6	357 ± 14	0.38 ± 0.01	0	56.5 ± 0.7

De acuerdo con los resultados contenidos en la tabla N° 55 se observa que los Cereales infantiles presentan alto contenido mineral y % recuperación muy bajos, y que estos son menores al obtenido para trigo partido #1.

En el caso del trigo partido # 1 se observa que el porcentaje de recuperación de ácido fítico también es bajo, por lo cual no se puede afirmar que solo sea el alto contenido mineral en los cereales infantiles el que afecta el % de recuperación.

En cuanto al trabajo realizado por Hernández, este autor analizó una muestra de trigo con mayor contenido de ácido fítico y con un mayor tamaño de grano partido comparado con el trigo partido # 1 estudiado en este trabajo. Con ese tipo de muestra Hernández obtuvo un porcentaje de recuperación de IP_6 entre 90 y 92 %, por lo tanto, se puede decir que otro factor que puede estar afectando el análisis es el tamaño del grano utilizado, que en los cereales infantiles es muy pequeño, y que involucra un paso adicional en la metodología planteada por Hernández para el tratamiento de las muestras, que es el filtrado de las soluciones de los cereales antes de preconcentrar los inositoles fosfatos en el cartucho amino.

Los resultados obtenidos demuestran claramente que el análisis de ácido fítico por la técnica HPLC-RI no se puede aplicar para cereales infantiles, por sus bajos % de recuperación.

7. CONCLUSIONES

Se logro estudiar cereales infantiles con una gran variedad de concentraciones de minerales Ca, Fe, y Zn, en algunos casos con similitud en el reporte de la etiqueta.

Los % de recuperación para los cereales infantiles fueron muy bajos (48 – 57) %

Los % de recuperación para el trigo partido # 1 fue bajo también (67-73%).

Los porcentajes de recuperación no solo se ven afectados por el alto contenido mineral de la muestra sino por el bajo contenido de fitato de la misma o por el tamizado de la muestra a un cierto tamaño de grano.

La técnica HPLC por par iónico en fase reversa con detección por índice de refracción no puede emplearse en el análisis de ácido fítico en cereales infantiles, debido a que se obtienen bajos porcentajes de recuperación de IP₆ por dicha técnica.

8. RECOMENDACIONES

Aplicar la técnica HPLC par iónico con detección por índice de refracción en la determinación de ácido fítico y porcentaje de recuperación en otros granos enteros como: soja, arroz, maíz, etc, evaluando el efecto del tamizado del grano.

Realizar el análisis de ácido fítico y porcentaje de recuperación en cereales infantiles empleando la técnica HPLC intercambio iónico con detección por absorbancia con reacción postcolumna.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Lehrfeld J. *Cereal Chem.* (1989), 66(6), 510-515.
2. Diario de Mallorca. “**Científicos de la UIB prueban que el ácido fólico es vital para la dieta humana**”. (1999). Página 10. [http:// www.uib.es/prensa/octubre 99/dia-01/162382.htm](http://www.uib.es/prensa/octubre99/dia-01/162382.htm)
3. Ultima hora. “**Científicos de la UIB animan a tomar alimentos con ácido fólico, que previene las piedras del riñon**”. (1999). Página 33. [http:// www.uib.es/prensa/octubre 99/dia-01/162509.htm](http://www.uib.es/prensa/octubre99/dia-01/162509.htm)
4. Martínez D Beatriz, Ibáñez G M^a Victoria y Rincón L Francisco. “**Archivos latinoamericanos de nutrición**”. Universidad de Córdoba- Córdoba, España. (2002).52, (3).
5. Plaami S. *Lebensm Wiss u Technol.* (1997), 30, 633-647.
6. Fernández G Amelia. “**Los cereales en la alimentación infantil**” (2006).Centro Nacional de Información de Ciencias Medicas.
7. Burbano C, Muzquiz M, Osagie A, Ayet G & Cuadrado C. *Food Chemistry*.(1995), 52, 321-325
8. Godoy S y Chicco C. “**Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela**”. (2005), mayo-agosto (8).
9. Skoog Douglas, Holler J, Nieman T. “**Principios de Análisis Instrumental**” (2001). Quinta edición. Editorial McGraw Hill, España. Capítulo 28, páginas: 786-809.
10. Enciclopedia libre Wikipedia.”**Liofilización**”. (2007). es. [Wikipedia.org/ wiki / liofilización](http://Wikipedia.org/wiki/liofilización).
11. Romero Pilar. “**Estufas de secado al vacio**”. (2007). www.labconco.com/pdf/spanish_freezone.pdf
12. Alfano N Marisell. “**La Liofilización de productos farmacéuticos**”. (2007). G: / La Liofilización de Productos Farmacéuticos. htm

13. Gómez Héctor y otros. "**Modelo Computacional para la Liofilización de Alimentos de Geometría Finita**". Revista Digital Científica y Tecnológica e-Gnosis. (2007). www.e-Gnosis.udg.mx
14. Lehrfeld J. **J Agric Food Chem.** (1994), 42, 2726-2731.
15. Brooks S P J y Lampi B J. **J Agric Food Chem.** (2001), 49, 564-569.
16. Febles CI, Arias A, Hardisson A, Rodríguez-Álvarez C, Sierra A. **Food Chemistry.** (2001), 74, 437-441.
17. Park Hee-Ra y otros. **Food Control.** (2006), 17, 727-732.
18. Lee K, & Abendroth, J. **Journal of Food Science.** (1983), 48, 1344-1345, 1351.
19. Hernández Luis. "**Evaluación de las diferentes etapas del pre-tratamiento de muestras sintéticas para el análisis de ácido fítico en trigo por HPLC-RI, y su aplicación en muestras reales**". T.E.G Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Octubre 2006.
20. Sanny S L Chan, Elaine L Ferguson, Kart Bailey, Umi Fahmida, Timothy B Harper y Rosalind S Gibson. **Journal of Food Composition and Analysis.** (2007), 20, 609-617.
21. Lars J, Birgitta S y Joakim E. **Journal of AOAC INTERNATIONAL.** (2001), 84, 1984-1992.
22. Sandberg A S y Ahderinne R. **Journal of Food Science.** (1986), 51 (3), 547-550.

10. **ÁPENDICE**

10.1. **Análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica en Llamas**

10.1.1. **Volumen de enrase de las muestras**

Las muestras de trigo partido #1 se llevaron a enrase con agua destilada en balones aforados de 50mL, mientras que las muestras de arroz, maíz y cerelac se enrasaron a 100 mL.

10.1.2. **Cálculo de concentración a través de la curva de calibración directa.**

Arroz Nestum:

Determinación de Fe por el Método de Calibración Directa

Ecuación de la recta: $Y_o = 0.0406X_o - 0.0034$ $S_{y/x} = 0.0056$

Muestra 1

Absorbancia= 0.205

$X_o = Y_o + 0.0034 / 0.0406$

$X_o = 5.133004926$ ppm Fe.

10.1.3. **Cálculo del error en la concentración.**

$X_o = 5.133004926$ ppm Fe

$S_{x_o} = S_{y/x} / b \sqrt{1/m + 1/n + (Y_o - \bar{Y})^2 / b^2 \sum (X_i - \bar{X})^2}$

Donde:

$S_{y/x}$ = error típico de la curva.

b = pendiente.

$$S_{x_0} = 0.0056/0.0406 \sqrt{1/3 + 1/5 + (0.205 - 0.2322)^2 / 0.054066208}$$

$$S_{x_0} = 0.1$$

$$X_0 = (5.1 \pm 0.1) \text{ ppm Fe}$$

10.1.4. Cálculo del error en multiplicaciones y divisiones.

$$X = P \times Q / R \quad S_{x/x} = \sqrt{(S_P/P)^2 + (S_Q/Q)^2 + (S_R/R)^2}$$

$$5.1 \pm 0.1 \text{ mg Fe} \text{ _____ } 1\text{L}$$

$$X \text{ _____ } (0.10000 \pm 0.00008) \text{ L}$$

$$X = (0.51 \pm 0.01) \text{ mg Fe}$$

$$0.51 \pm 0.01 \text{ mg Fe} \text{ _____ } (5.0673 \pm 0.0001) \text{ g muestra}$$

$$X \text{ _____ } 100\text{g}$$

$$X = (10.1 \pm 0.2) \text{ mg Fe/100g muestra}$$

10.1.5. Prueba Q.

Q = Valor sospechoso – Valor más cercano / Rango

Si $Q_{\text{calculado}} > Q_{\text{crítico}}$ se rechaza el valor sospechoso.

10.1.6. Coeficiente de Variación.

$$C.V = (S / X) \times 100$$

10.1.7. Cálculo de la concentración por Adición de Estándar.**Cerelac:****Determinación de Fe por el Método de Adición Estándar**

Ecuación de la recta: $Y = 0.0244X + 0.0271$ $S_{y/x} = 0.00239$

Muestra 1, la cual se utilizó para preparar los patrones

$$X_E = 0.0271 / 0.0244 = 1.110655738 \text{ ppm Fe}$$

10.1.8. Cálculo del error en la concentración por Adición Estándar.

$$X_E = 1.110655738 \text{ ppm Fe}$$

$$S_{x_E} = S_{y/x} / b \sqrt{1/n + Y^2 / b^2 \sum (X_i - X)^2}$$

$$S_{x_E} = 0.08$$

$$X_E = (1.11 \pm 0.08) \text{ ppm Fe}$$

10.1.9. Prueba estadística: Contraste de Significación.

Se aplica para determinar si la diferencia entre la cantidad medida y la cantidad conocida se puede atribuir a errores aleatorios.

$$t = (x - \mu) \sqrt{n} / s$$

Donde:

X= valor experimental
n= número de replicas

μ = valor verdadero
S= desviación estándar de X

10.2. Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)

10.2.1. Cálculo de la concentración de la solución patrón de ácido fítico de 28.051 ppm.

Se preparó a partir de la sal dodecasódica de ácido fítico hidratada $C_6H_{18}O_{24}P_6 \cdot 12 Na \cdot X H_2O$ al 85% de pureza.

Gramos de sal = (4.6797 ± 0.0001) g

PM de la sal al 85% = 935.9 g/mol

PM del ácido fítico = 660 g/mol

100g _____ 85g puros

4.6797g _____ X

X = 3.9777g puros de sal

PM ác. Fítico _____ PM sal 85%

X _____ 3.9777g

X = 2,8051 g = 2805,1 mg

2805,1 mg _____ 0.1L

X _____ 1L

X = 28 051 ppm de ácido fítico.

10.2.2. Cálculo de la concentración de la solución madre de ácido fítico de 6011 ppm.

Se preparó a partir de la sal dipotásica de ácido fítico $C_6H_{16}K_2O_{24}P_6$ al 95% de pureza.

$$\text{Gramos de sal} = (0.3529 \pm 0.0001) \text{ g}$$

$$\text{PM de la sal al 95\%} = 736.2 \text{ g/mol}$$

El cálculo se realizó de forma similar al anterior.

10.2.3. Cálculo de la concentración de los patrones de ácido fítico.

Los patrones de ácido fítico empleados para construir la curva de calibración se prepararon a partir de la solución de 6011 ppm.

$$C_1 = 6011 \text{ ppm}$$

$$C_2 = ?$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

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

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_2 = 6011 \text{ ppm} \times 2 \text{ mL} / 50 \text{ mL}$$

$$C_2 = 240.44 \text{ ppm}$$

10.2.4. Cálculo del porcentaje de recuperación del ácido fítico.

Cerelac

Muestra de cerelac 1 sin contaminar

$$\text{Cerelac 1} = (1.0023 \pm 0.0001) \text{ g} \quad \text{Área promedio} = 1173 \pm 44$$

$$\text{Ecuación de la recta: } Y = 17.635X - 836.89 \quad R^2 = 0.9980$$

$$X = Y + 836.89 / 17.635$$

Concentración de ácido fólico en la muestra = (114 ± 10) ppm

$$114 \pm 10 \text{ mg} \quad \text{_____} \quad 1 \text{ L}$$

$$X \quad \text{_____} \quad (2.000 \pm 0.006) \times 10^{-3} \text{ L}$$

$$X = (0.23 \pm 0.02) \text{ mg}$$

$$0.23 \pm 0.02 \text{ mg} \quad \text{_____} \quad (10.00 \pm 0.02) \times 10^{-3} \text{ L}$$

$$X \quad \text{_____} \quad (25.00 \pm 0.03) \times 10^{-3} \text{ L}$$

$$X = (0.58 \pm 0.05) \text{ mg IP}_6$$

$$\% \text{ IP}_6 \text{ en la muestra} = (0.58 \pm 0.05) \times 10^{-3} \text{ g} / (1.0023 \pm 0.0001) \text{ g} \times 100$$

$$\% \text{ IP}_6 \text{ en la muestra} = (0.058 \pm 0.005) \%$$

Muestra de cerelac 2 sin contaminar

$$\text{Cerelac 2} = (1.0027 \pm 0.0001) \text{ g} \quad \text{Área promedio} = 1319 \pm 56$$

$$\% \text{ IP}_6 \text{ en la muestra} = (0.060 \pm 0.005) \%$$

El porcentaje de ácido fólico en el cereal infantil de trigo Cerelac es:

$$\% \text{p/p IP}_6 = (0.059 \pm 0.001) \%$$

Para calcular el porcentaje de recuperación de ácido fítico se contaminó una muestra de cerelac con 1 mL 6120 ppm.

Muestra de cerelac 3 contaminada

Cerelac 3 = (1.0063 ± 0.0001) g Área promedio= 11726 ± 170

$X = Y + 836.89 / 17.635$

Concentración de ácido fítico en la muestra= (712 ± 13) ppm

712 ± 13 mg _____ 1 L

X _____ $(2.000 \pm 0.006) \times 10^{-3}$ L

$X = (1.42 \pm 0.03)$ mg

1.42 ± 0.03 mg _____ $(10.00 \pm 0.02) \times 10^{-3}$ L

X _____ $(25.00 \pm 0.03) \times 10^{-3}$ L

$X = (3.55 \pm 0.08)$ mg totales de IP_6

% de recuperación de IP_6

Masa de IP_6 que se añadió= (3.55 ± 0.08) mg – (0.59 ± 0.01) mg = (2.96 ± 0.08) mg

% de recuperación de IP_6 = (2.96 ± 0.08) mg / (6.1 ± 0.2) mg $\times 100 = (48 \pm 2)$ %

Muestra de cerelac 4 contaminada

Cerelac 4 = (1.0055 ± 0.0001) g Área promedio= 13463 ± 169

X= (4.05 ± 0.08) mg totales de IP₆

% de recuperación de IP₆

Masa de IP₆ que se añadió= (4.05 ± 0.08) mg – (0.59 ± 0.01) mg = (3.46 ± 0.08) mg

% de recuperación de IP₆= (57 ± 2) %

Rango % de recuperación de IP₆ obtenido para el cerelac= 48% - 57%