

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**“DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE Ca, Fe,
Zn y ÁCIDO FÍTICO EN QUINOA”**

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela, por la Br. Lisbeth
Rodrigues, para optar al título de
Licenciado en Química.

Caracas, Diciembre del 2018

Yo, profesora Rosa Amaro, Investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certifico que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE Ca, Fe, Zn y ÁCIDO FÍTICO EN QUINOA”

Que presenta la Br. Lisbeth Rodrigues, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2017-2018, con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, Diciembre de 2018



Dra. Rosa Amaro.
(Tutora)

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo especial de Grado titulado: **“DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE Ca, Fe, Zn y ÁCIDO FÍTICO EN QUINOA”** presentado por la Br. Lisbeth Rodrigues, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Dra. Rosa Amaro.

(Tutora)



Prof. Rafael Golding.

(Jurado)



Prof. Zurima González.

(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado salud y fortaleza para lograr culminar mi carrera y mi TEG con éxito. Gracias por nunca haberme abandonado, tanto en las buenas como en las malas siempre estuviste presente.

A mi madre Orlanda por haber soportado todos mis momentos de crisis durante la realización de mi trabajo además por todo el apoyo que me dio desde que inicié mi carrera. Por su apoyo incondicional, por celebrar conmigo todos mis logros y por sus palabras de ánimo cada vez que algo salía mal y que me impulsaban a seguir adelante en este camino. Mil gracias, te amo.

A mi hermano Abel porque siempre que te necesito estas allí para mí. Porque cuando mi computadora se dañó y necesitaba escribir el proyecto me prestaste la tuya para yo poder realizarlo. Gracias porque siempre que me sentía mal buscabas la manera de alegrarme, animarme y hacerme sentir mejor. Te amo.

A la profesora Rosa Amaro por darme la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias por su paciencia, su apoyo y por sus enseñanzas. No pude haber escogido una mejor tutora.

A la profesora Janeth Salas del Laboratorio de Espectrometría de Masas, Centro de Química, IVIC por el suministro de las muestras de quinoa que fueron analizadas en este trabajo.

A mi compañera de estudios Bárbara Torres la cual estaba realizando su TEG con la profesora Janeth y fue la que se encargó de realizar la molienda de las muestras de quinoa que fueron analizadas en este trabajo y a su vez fue la encargada de traerme las muestras del IVIC a la Facultad de Ciencias, muchas gracias.

A la profesora Alessia Bastianoni del Instituto de Ciencias de la Tierra ubicado en la Facultad de Ciencias-UCV por permitirme usar el rotavapor del Laboratorio de Geoquímica Orgánica para lograr la realización de una parte importante de mi trabajo.

A mis compañeras del Centro de Química Analítica Omerlin Figueroa, Jhorbelys Silva, Yendry Martínez y al profesor Gustavo Pérez quienes se encargaron de explicarme el funcionamiento de los equipos que tenía que manejar para la realización de mi trabajo.

Nuevamente debo agradecer a Omerlin Figueroa por todo su apoyo cuando necesite de su ayuda durante la realización de mi tesis.

A los profesores Rafael Golding y Gustavo Pérez por su asesoría y apoyo durante la realización de mi tesis. Al profesor Gustavo Pérez por siempre estar al pendiente y siempre dispuesto a ayudarme en lo que necesitara y al profesor Golding por los momentos de humor y por su ayuda cuando algún equipo presentaba problemas.

A todos los tesistas y pasantes del Centro de Química Analítica con los cuales viví momentos agradables y divertidos en nuestras reuniones. Mil gracias a Omerlin Figueroa, Jhorbelys Silva, Mayra Delgado, Ámbar Gonzalez, Jackeline Pérez, Norielys Herrera, Gabriela Salgado, Angel Villalobos, Yendry Martinez y Jaime Herrera por haberme hecho parte del CQA.

Y por último como no darles las gracias a todos los profesores que me dieron clases durante toda mi carrera, fueron ellos quienes con sus enseñanzas y su amor por la universidad, la facultad y la docencia me formaron como profesional.

Mil gracias a todos los que han estado conmigo en este largo camino...

RESUMEN

El método de extracción de ácido fítico en muestras de quinoa fue optimizado mediante el uso de un análisis multivariado. Las variables estudiadas fueron la concentración del ácido, el tipo de ácido de extracción, el tipo de agitación y el tiempo de extracción. Para evaluar la diferencia que existe en el proceso de extracción del ácido fítico en la quinoa con respecto a otros cereales, se usó el trigo como cereal de prueba. Para el análisis del ácido fítico en cereales no procesados, se empleó el método fotocolorimétrico indirecto con reactivo de Wade (FeCl_3 / ácido sulfosalicílico). En el análisis multivariado para el trigo se encontró que las condiciones necesarias para promover la mayor extracción del ácido fítico fueron con el uso de 8mL del ácido tricloroacético a una concentración 0,6 M y agitando mecánicamente por 4 horas. En el análisis multivariado de la quinoa se observó que es indiferente el tipo de ácido empleado en la extracción siendo el HCl 0,5 M y el TCA 0,6 M igual de útiles para realizar la misma, por otro lado fue altamente significativo el tiempo de extracción mostrando mayor respuesta hacia mayores tiempos de extracción. Estos resultados demostraron que es importante la optimización de los métodos de análisis para cada tipo de alimento para lograr un mayor porcentaje de recuperación que se traduce en una mayor exactitud del método.

Se encontró que los porcentajes de recuperación para el análisis de ácido fítico por el método optimizado son altos (80-86,2) % en comparación al método de extracción usualmente aplicado a cereales como el trigo (54%), concluyendo que el mismo método de extracción (TCA 0,6 M y agitación mecánica por 4 h) puede ser empleado para cereales no procesados con bajo y alto contenido mineral. A su vez se observó diferencias significativas en cuanto al contenido de ácido fítico entre las muestras de quinoa ecuatoriana y venezolana. Estos resultados demuestran que el

método propuesto puede ser utilizado para el análisis de ácido fítico en cereales no procesados siendo este método sencillo, rápido y de poco costo.

Por otro lado, en el análisis de metales se encontró que la quinoa tiene un alto contenido mineral con respecto al trigo además se observó diferencias significativas en el contenido de calcio de ambas muestras de quinoa, siendo la quinoa venezolana la que mostró un mayor contenido de este mineral. Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que tanto el contenido de ácido fítico como de minerales depende de factores tales como variedad de la quinoa, la zona de cultivo y tratamiento del grano.

Palabras Clave: Ácido fítico, Quinoa, Cereales no procesados, Método fotocolorimétrico con Reactivo de Wade, Optimización por análisis multivariado.

INDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

- IVIC** : Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
- CQA** : Centro de Química analítica, Facultad de ciencias - UCV
- FAO** : Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- ALADI** : Asociación Latinoamericana de Integración
- FDA** : Administración de Alimentos y Medicamentos
- USDA** : Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
- TCP / Alba** : La Alianza Bolivariana para los Pueblos de Nuestra América / Tratado de Comercio de los Pueblos
- FANB** : Fuerza Armada Nacional Bolivariana de la República Bolivariana de Venezuela
- TCA** : Ácido Tricloroacético
- IP₆ / AF** : Ácido fítico (inositol hexafosfato)
- IP₅** : Myo-inositol pentafosfato
- IP₄** : Myo-inositol tetrafosfato
- IP₃** : Myo-inositol trifosfato
- IP₂** : Myo-inositol difosfato
- IP** : Myo-inositol monofosfato
- HPLC-RI** : Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de índice de refracción
- INIA** : Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
- INIAP** : Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
- AOAC** : Asociación de Químicos Analíticos Oficiales conocida ahora como AOAC Internacional
- GC-FID** : Cromatografía de gases con detector de ionización con llama
- CODEX** : Código Alimentario
- ICP-OES** : Espectroscopia de Emisión Atómica con plasma inductivamente acoplado

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.0. Quinoa.....	3
1.1. Origen	6
1.2. Clasificación de la Quinoa	6
1.3. Distribución geográfica y producción	9
1.4. Comercio Mundial de la Quinoa.....	10
1.5. Quinoa en Venezuela	11
1.6. Valor Nutricional de la Quinoa	12
1.6.1. Proteínas.....	12
1.6.2. Carbohidratos.....	14
1.6.3. Grasas.....	15
1.6.4. Vitaminas.....	17
1.6.5. Minerales.....	18
1.7. Usos de la Quinoa	21
1.7.1. Alimentación Humana e Innovación en la industria alimentaria	21
1.7.2. Alimentación Animal.....	22
1.7.3. Uso Medicinal.....	22
1.8. Efectos en la salud de la Quinoa	22
2.0. Efecto Anti-nutriente del Ácido fítico.....	23

2.1. Localización y contenido.....	24
2.2. Propiedades del ácido fítico.....	26
2.3. Efectos beneficiosos del ácido fítico	28
2.4. Extracción del ácido fítico	29
2.5. Métodos de análisis y determinación del ácido fítico	30
2.5.1. Método fotocolorimétrico para la determinación de ácido fítico, basado en la utilización del reactivo de Wade.	33
ANTECEDENTES	34
OBJETIVOS.....	40
Objetivo General.....	40
Objetivos Específicos	40
DESARROLLO EXPERIMENTAL	41
1. Reactivos utilizados	41
2. Equipos y materiales	42
3. Muestras	44
3.1. Trigo partido #1	44
3.2. Quinoa Ecuatoriana y Venezolana	45
4. Secado de las muestras	47
5. Determinación de humedad en las muestras.....	48
6. Determinación de metales en las muestras	49
7. Análisis por HPLC-RI	51
7.1. Fase móvil.....	51

7.2. Tratamiento de la Quinoa Ecuatoriana para análisis por HPLC	52
8. Diseño Factorial	52
8.1. Diseño Factorial n°1	53
8.2. Diseño Factorial n°2	54
9. Extracción del ácido fítico	57
10. Determinación de los porcentajes de recuperación	57
11. Preconcentración del ácido fítico en el cartucho amino	58
12. Determinación de ácido fítico por el método fotocolorimétrico basado en la utilización del reactivo de Wade.	58
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
1. Determinación de humedad en las muestras.....	59
1.1. Determinación de humedad en la muestra de trigo partido #1	59
1.2. Determinación de humedad en la muestra de harina de quinoa ecuatoriana y venezolana	60
2. Determinación de metales en las muestras	61
2.1. Determinación de metales en el trigo	63
2.2. Determinación de metales en la harina de quinoa ecuatoriana	66
2.3. Determinación de metales en la harina de quinoa venezolana	68
3. Ensayo preliminar por HPLC-RI.....	72
4. Ensayos preliminares del reactivo de Wade y de la curva de calibración.....	74
5. Diseño Factorial para el Trigo.....	77
5.1. Diseño Factorial n°1-Trigo.....	77
5.2. Diseño Factorial n°2-Trigo.....	80

5.3. Diseño Factorial n°3	84
6. Determinación de ácido fítico y porcentaje de recuperación en el trigo	86
7. Diseños Factoriales para la harina de quinoa.....	87
7.1. Eliminación de grasas en muestras de quinoa	87
7.2. Diseño Factorial n°1-Harina de quinoa	88
7.3. Diseño Factorial n°2-Harina de quinoa.....	91
8. Determinación del porcentaje de ácido fítico y recuperación en la quinoa ecuatoriana y venezolana	95
8.1. Porcentaje de ácido fítico y recuperación en la quinoa ecuatoriana... 95	
8.2. Porcentaje de ácido fítico y recuperación en la quinoa venezolana .. 97	
9. Experimento adicional.....	98
CONCLUSIONES	99
RECOMENDACIONES	101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÉNDICES	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.1. Semillas de Quinoa y Amaranto	3
Figura.2. Fruto y Semilla de la Quinoa	4
Figura.3. Anatomía de la Semilla de Quinoa	5
Figura.4. Lago Titicaca de Perú y Bolivia	6
Figura.5. Clasificación de la Quinoa por su color	7
Figura.6. Variedad Amarilla de Maranganí	8
Figura.7. Variedad Rosa de Huancayo	8
Figura.8. Variedad INIA 427-Amarilla Sacaca	8
Figura.9. Variedad Salcedo INIA	8
Figura.10. Variedad INIA Altiplano	8
Figura.11. Variedad INIAP Tunkahuan	8
Figura.12. Regiones Andinas de América del Sur	9
Figura.13. Industrialización de la Quinoa	21
Figura.14. Estructura química del Ácido fítico	24
Figura.15. Interacciones del ácido fítico con minerales y proteínas	27
Figura.16. Muestra de Trigo partido #1	45
Figura.17. Muestra de Quinoa Ecuatoriana Verde Pamba	46
Figura.18. Muestra de Quinoa Venezolana Top Quinoa	46
Figura.19. Harina de Quinoa Venezolana (Izquierda) y Harina de Quinoa Ecuatoriana (Derecha)	47

Figura.20. Liofilización de las muestras	47
Figura.21. Trigo pulverizado.....	47
Figura.22. Procedimiento realizado para determinar el % de humedad en las muestras	48
Figura.23. Tratamiento de las muestras por el método de cenizas.....	49
Figura.24. Procedimiento general de extracción del ácido fítico usado en los diseños factoriales.....	56
Figura.25. Procedimiento general usado para la determinación del ácido fítico	59
Figura.26. Absorbancia vs Concentración de Fe (ppm)	62
Figura.27. Absorbancia vs Concentración de Zn (ppm)	62
Figura.28. Absorbancia vs Concentración de Ca (ppm).....	63
Figura.29. Cromatogramas de un patrón de $(344,3 \pm 3,3)$ ppm de IP ₆ y de la muestra de harina de quinoa ecuatoriana.....	73
Figura.30. Recta de Calibración del ácido fítico	77
Figura.31. Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°1 del Trigo.....	78
Figura.32. Gráfica de Efectos principales para el diseño factorial n°1 en el Trigo	79
Figura.33. Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°2 del Trigo.....	82
Figura.34. Diagrama de Interacción para el diseño factorial n°2 del Trigo	83
Figura.35. Gráfica de Efectos principales para el diseño factorial n°2 en el Trigo	83
Figura.36. Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°3 del Trigo.....	85
Figura.37. Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°1 de la harina de quinoa	89
Figura.38. Diagrama de Interacción para el diseño factorial n°1 de la harina de quinoa	90

Figura.39. Gráfica de Efectos principales para el diseño factorial n°1 en la harina de quinoa	90
Figura.40. Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°2 de la harina de quinoa ...	92
Figura.41. Diagrama de Interacción para el diseño factorial n°2 de la harina de quinoa	93
Figura.42. Gráfica de Efectos principales para el diseño factorial n°2 en la harina de quinoa	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.1. Comparación de la composición de la Quinoa con la de algunos cereales y legumbres (g/100g peso seco)	12
Tabla.2. Aminoácidos esenciales (g/100g proteína).....	13
Tabla.3. Aminoácidos no esenciales (g/100g proteína).....	14
Tabla.4. Fracciones de proteínas (como porcentaje de proteína total)	14
Tabla.5. Perfiles de ácido graso (como porcentaje de fracción de lípidos)	15
Tabla.6. Contenido de vitaminas en la quinoa y en cereales de mayor consumo (mg/100g peso seco)	17
Tabla.7. Contenido de minerales en la quinoa y en cereales de mayor consumo (mg/Kg peso seco).....	19
Tabla.8. Valores de referencia de ingesta de minerales para la población venezolana por grupos de edad y género versus el % de minerales que aporta el consumo diario de 100 g de Quinoa sobre lo recomendado por la Fundación Bengoa	20
Tabla.9. Contenido de fósforo y ácido fítico en cereales, pseudocereales, legumbres, semillas oleaginosas y productos proteínicos.	25
Tabla.10. Parámetros instrumentales usados para la determinación de Fe, Ca y Zn	50
Tabla.11. Variables para el diseño factorial N°1.....	53
Tabla.12. Condiciones de algunas variables del diseño factorial N°1.	53
Tabla.13. Diferentes combinaciones de las variables del diseño factorial N°1	54
Tabla.14. Variables para el diseño factorial N°2	54
Tabla.15. Condiciones de algunas variables del diseño factorial N°2	55
Tabla.16. Diferentes combinaciones de las variables del diseño factorial N°2.....	55

Tabla.17. Porcentaje de Humedad en el Trigo partido #1	60
Tabla.18. Porcentaje de Humedad en la Harina de Quinoa Ecuatoriana	60
Tabla.19. Porcentaje de Humedad en la Harina de Quinoa Venezolana	61
Tabla.20. Contenido de Hierro en Trigo	63
Tabla.21. Contenido de Zinc en Trigo	64
Tabla.22. Contenido de Calcio en Trigo	65
Tabla.23. Comparación de Ca, Fe y Zn de 3 tipos de trigo reportados por la USDA con el trigo analizado en este trabajo.....	65
Tabla.24. Contenido de Hierro en harina de quinoa ecuatoriana	66
Tabla.25. Contenido de Zinc en harina de quinoa ecuatoriana	67
Tabla.26. Contenido de Calcio en harina de quinoa ecuatoriana	67
Tabla.27. Contenido de Hierro en harina de quinoa venezolana.....	68
Tabla.28. Contenido de Zinc en harina de quinoa venezolana.....	69
Tabla.29. Contenido de Calcio en harina de quinoa venezolana	69
Tabla.30. Resumen del contenido de minerales presentes en las 3 muestras analizadas	70
Tabla.31. Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°1 en trigo	78
Tabla.32. Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°2 en trigo	81
Tabla.33. Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°3 en trigo	85
Tabla.34. Valores obtenidos de IP ₆ y porcentaje de recuperación para el trigo	86
Tabla.35. Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°1 para la harina de quinoa	88

Tabla.36. Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°2 para la harina de quinoa	92
Tabla.37. Valores obtenidos de IP ₆ para la harina de quinoa ecuatoriana (HCl 0,5 M) .	95
Tabla.38. Valores obtenidos de IP ₆ y para la quinoa ecuatoriana (TCA 0,6 M)	96
Tabla.39. Porcentaje de ácido fítico en la harina de quinoa venezolana	97
Tabla.40. Porcentajes de ácido fítico en las muestras analizadas	97

INTRODUCCIÓN

La región de los Andes es considerada centro de origen de numerosas especies nativas como la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). La palabra quinoa proviene de la lengua quechua y significa “grano madre”. Hasta un período reciente, la quinoa estuvo considerada únicamente como un alimento de los pueblos andinos, antes de ser mundialmente reconocida en la década de los 70, especialmente por los vegetarianos, en virtud de sus características dietéticas.

En la actualidad la quinoa se encuentra en franco proceso de expansión porque representa un gran potencial para mejorar las condiciones de vida de la población de los Andes y del mundo moderno. Nuevas investigaciones han reafirmado la cantidad y calidad de sus componentes químicos así como se han descubierto nuevos fitoquímicos y se ha demostrado la capacidad de adaptación de las plantas a diversos entornos, finalmente se ha encontrado un mejor aporte de algunos constituyentes químicos y de propiedades antioxidantes con respecto a otros alimentos.

Por otro lado, en la capa externa del grano está presente la saponina que da sabor amargo al grano y que debe ser removida por medio de técnicas de remojo o mediante procesos industriales. Así mismo, la quinoa contiene ácido fítico que puede unirse a minerales como el calcio, hierro y zinc disminuyendo su absorción y aprovechamiento por el cuerpo, es decir disminuyendo su biodisponibilidad. El ácido fítico a su vez disminuye también la absorción de la niacina (Vitamina B3). Por todo esto, el ácido fítico se considera como un antinutriente muy especialmente en personas con un consumo bajo de minerales esenciales, pudiendo ocurrir con mayor frecuencia en los países en desarrollo.

El efecto, potencialmente perjudicial del ácido fítico ha conducido al desarrollo de un gran número de métodos para medir su contenido real en alimentos. Dado que el ácido fítico no tiene un espectro de absorción característico, y por tanto no existen reactivos específicos para su identificación, su determinación ha constituido un problema analítico durante mucho tiempo.

Es por todo lo anterior que esta investigación se centrará en la optimización del método de extracción del ácido fítico en la quinoa y su posterior determinación una vez optimizado el método de extracción. Evidentemente todo nuevo método analítico debe validarse para demostrar su idoneidad, para evaluar la validez del método se determinará el porcentaje de recuperación del analito, para ello se aplicará el método evaluado tanto a muestras de quinoa como a muestras de trigo partido #1 para comparar los resultados. En trabajos anteriores se ha demostrado que los porcentajes de recuperación se ven afectados por el alto contenido mineral de las muestras y por el bajo contenido de fitato de la misma, por esta razón también se analizará el contenido de Ca, Fe y Zn en las mismas para evaluar su efecto sobre la recuperación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.0. Quinoa

La Quinoa o Quinoa es un pseudocereal nativo de las regiones andinas de América del Sur y a menudo se le denomina “el grano de oro de los Andes”. La quinoa es un cultivo de alto valor nutritivo que contiene más proteínas que la mayoría de los demás alimentos vegetales. A la quinoa se le llama pseudocereal porque no pertenece a la familia de las gramíneas, donde están los cereales tradicionales; sin embargo, se le emplea como uno debido al alto contenido de almidón de sus semillas ^[1]. La quinoa pertenece a la familia Amaranthaceae por su parecido al amaranto como se muestra en la figura 1, género *Chenopodium*. Antiguamente, el género *Chenopodium* formaba parte de la familia Chenopodiaceae, sin embargo luego de una revisión filogenética a partir de 1998 el carácter independiente de las familias Chenopodiaceae y Amaranthaceae dejó de existir y ambas familias se fusionaron sobre la base de las similitudes morfológicas y moleculares y se clasificaron bajo la familia Amaranthaceae ^[2].



Figura.1. Semillas de Quinoa y Amaranto ^[3]

Su nombre botánico es *Chenopodium quinoa* Willd. La Asamblea General de las Naciones Unidas declaró el 2013 como el “Año Internacional de la Quinoa” en reconocimiento a las prácticas ancestrales de los pueblos andinos [1].

El fruto de la quinoa [Figura 2] es un aquenio, constituido por el perigonio que contiene una semilla la que se desprende con facilidad al frotar el fruto cuando está seco. El perigonio en estado maduro, es de forma lenticular o elipsoidal. El perigonio es del mismo color que la planta: blanco, amarillo, rojo, morado, marrón claro o negro. Las semillas de quinoa, son pequeñas, redondas y aplanadas, miden aproximadamente 1,5 mm de diámetro, y unas 350 semillas pesan 1 g. Dos capas encierran la semilla: el pericarpio y el epispermo [4].

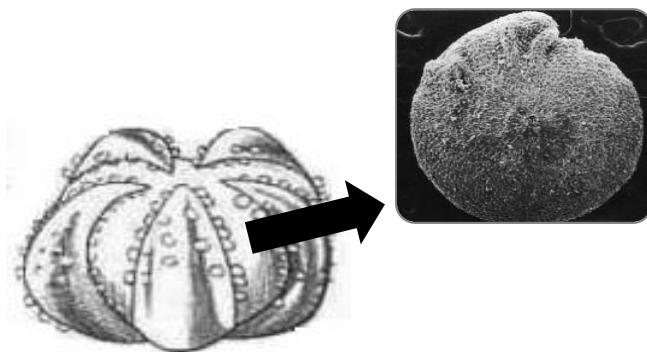


Figura 2. Fruto y Semilla de la Quinoa [2]

El pericarpio, está unido a la semilla y contiene saponina en un rango de 0,2 % - 5,1%, esta capa (pericarpio) es rugosa y seca. La saponina contenida en esta capa se puede remover entre un 20% y 30% por un procedimiento conocido como perlado o por abrasión mecánica con un 50%-79% de remoción de saponinas [2].

Directamente bajo del pericarpio está el epispermo (SC en la figura 3), una membrana delgada que cubre al embrión. El embrión está formado por dos cotiledones y la radícula y constituye el 30% del volumen total de la semilla, el cual envuelve al

perisperma como un anillo, con una curvatura de 320° , es de color amarillo, mide 3,54 mm de longitud y 0,36 mm de ancho [2].

El perisperma es el principal tejido de almacenamiento y está constituido principalmente por granos de almidón, es de color blanquecino y representa prácticamente el 60% de la superficie de la semilla. Cabe destacar que el embrión presenta la mayor proporción de la semilla (30 % de peso), mientras que en los cereales corresponde solamente al 1 %. De allí resulta el alto valor nutritivo de la quinoa. En la figura 3 se puede visualizar una imagen que muestra la anatomía de la semilla de Quinoa con sus partes [2].

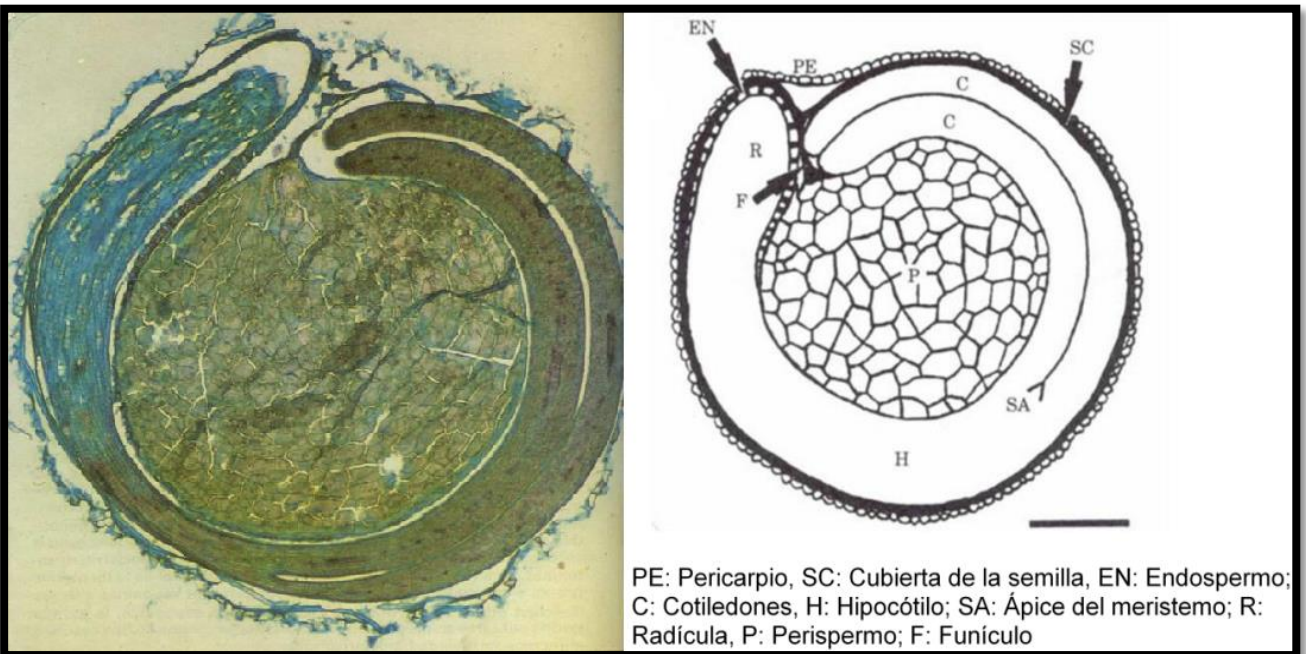


Figura 3. Anatomía de la semilla de Quinoa [5,6]

1.1. Origen

La quinoa es una planta andina que se originó en los alrededores del lago Titicaca de Perú y Bolivia [Figura 4]. La quinoa fue cultivada y utilizada por las civilizaciones prehispánicas y reemplazada por los cereales a la llegada de los españoles, a pesar de constituir un alimento básico de la población de ese entonces [1].



Figura 4. Lago Titicaca de Perú y Bolivia [7]

1.2. Clasificación de la Quinoa

La clasificación de la Quinoa se hace en función de las características de los granos como el color y contenido de saponinas en los mismos. Estas características dependen de la variedad de Quinoa.

- Por su contenido de saponinas

- Quinoa Amarga (alto contenido de saponinas > 0,11 %): Variedades mostradas en las figuras 6, 7 y 8.

- Quinoa Dulce (bajo contenido de saponinas < 0,11 %): Variedades mostradas en las figuras 9,10 y 11.

- Por su color

En la comercialización se diferencian 3 colores en razón de que los granos tienen la particularidad de que luego de ser desaponificadas adquieren estos 3 colores comerciales. La quinoa blanca, también conocida como quinoa dorada es la más reconocida y la que más se comercializa. Además, existen la quinoa roja y la negra [8].

- Quinoa Blanca: Tiene un ligero sabor a nuez, contiene menos calorías que las otras y posee más fibra que la quinoa roja.
- Quinoa Roja: Tiene propiedades similares a la quinoa blanca; de pocas calorías, rica en proteínas y es altamente nutritiva. Es la que contiene menos grasas y es la más alta en carbohidratos, lo que la hace un excelente alimento para deportistas. La variedad roja tiene un sabor más terroso.
- Quinoa Negra: Esta variedad es considerada más rara que la blanca y la roja. Nació como un híbrido de la cruce de semilla de quinoa y de espinaca. Su sabor es terroso (sabor parecido a la tierra) [8].

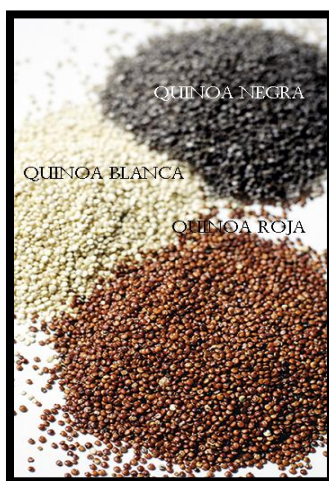


Figura 5. Clasificación de la Quinoa por su color [8].

A continuación se muestran algunas imágenes de Variedades de Quinoa.



Figura.6.Variedad Amarilla de Marangani [9]



Figura.7.Variedad Rosa de Huancayo [9]



Figura.8.Variedad INIA 427- Amarilla Sacaca [9]



Figura.9.Variedad Salcedo INIA [9]



Figura.10.Variedad INIA Altiplano [9]



Figura.11.Variedad INIAP Tunkahuan [9]

1.3. Distribución geográfica y producción

La quinoa se encuentra de forma nativa en todos los países de la región andina, encontrándose desde Colombia (Pasto) hasta el norte de Argentina (Jujuy y Salta) y el sur de Chile, estas regiones tienen en común que se encuentran ubicadas sobre la cordillera de los Andes como se muestra en la figura 12. Según la FAO, en el período 1992 - 2010 el área cosechada y la producción total de quinoa en los principales países productores - Bolivia, Perú y Ecuador - ha casi duplicado y triplicado sus cifras respectivamente.



Figura 12. Regiones Andinas de América del Sur ^[10]

Así mismo los cultivos de la quinoa han trascendido las fronteras continentales. Es cultivada en Francia, Inglaterra, Suecia, Dinamarca, Holanda e Italia. En los Estados Unidos se produce en Colorado y Nevada y en Canadá en las praderas de Ontario. Por ejemplo, en Kenia la semilla mostró altos rendimientos (4 ton/ha) y en el Himalaya y las planicies del norte de la India, el cultivo puede desarrollarse con éxito con un buen rendimiento ^[1]

1.4. Comercio mundial de la Quinoa

Actualmente, el intercambio comercial de este producto se encuentra muy concentrado, tanto por origen como por destino. El 82,4% de las exportaciones mundiales se originan en los países de la ALADI en particular, en tres países andinos: Bolivia, Ecuador y Perú ^[11].

La exportación de quinoa en Perú se elevó 36,2 mil toneladas en el 2014 a 41,4 mil toneladas (14,3%) en el 2015, una cifra récord de exportación mientras que en el 2016 se mantiene esa tendencia y aumenta a 44,3 mil toneladas (7,1%). Sin embargo, para el 2016 la exportación a Estados Unidos decae de 18,09 mil toneladas a 13,8 mil toneladas, la causa que explica esta disminución en las exportaciones hacia el mercado norteamericano se inician con la salida masiva de exportaciones de quinoa convencional procedentes de la costa peruana (Arequipa, La Libertad, etc.) a lo largo del 2014, en dicho año hasta en seis oportunidades fueron retenidos embarques de quinoa en las aduanas norteamericanas debido a que se detectaron residuos de plaguicidas, y como en dicho país los órganos oficiales (FDA-USDA) aún no han determinado a la fecha los contenidos máximos de residuos de plaguicidas permisibles para su consumo, no puede ingresar quinoa con alguna traza aunque sea marginal de residuos de plaguicidas, lo cual sí se permite en otros mercados como Canadá, Brasil, Israel, o la Unión Europea, de ahí que a los Estados Unidos solo ingresan embarques de quinoa convencional libre de plaguicidas (0%) o solo quinoa orgánica. Entre los países miembros de la Unión Europea que destacan por su mayor participación se tiene a Holanda, Inglaterra, Italia, Alemania, Francia y España ^[12].

Mientras que las exportaciones en Bolivia entre el 2005 y 2015 acumularon 946 millones de dólares en términos de valor, y 285 mil toneladas en volumen, registrándose el pico más alto en el 2014. Al tercer trimestre del 2016, se registró un

crecimiento del 8% en volumen, mientras que el valor disminuyó en un 33% respecto al mismo período del 2015. Finalmente las exportaciones de quinoa en Ecuador entre los años 2013 y 2015 fueron de 386 ,1116 y 1073 toneladas respectivamente ^[13].

Actualmente Ecuador puede exportar quinoa en grano a Estados Unidos, Canadá, Unión Europea, Australia, Corea del Sur, Emiratos Árabes Unidos, Israel, Japón, Venezuela; cumpliendo los requisitos internos y externos ^[14].

1.5. Quinoa en Venezuela

Hace 24 años se documentó que buenos resultados se produjeron en ensayos con quinoa que fueron realizados en las áreas de Mérida y Maracay con miras a su futura introducción en los estados de Trujillo y Lara (FAO 1994) ^[1]. Por otro lado desde hace 10 años como PLAN DE LA PATRIA se ha estado introduciendo en las zonas andinas de Venezuela el cultivo de quinoa. Sin embargo, hasta los momentos no existen ni estudios formales publicados relacionados con el agro ni cifras oficiales precisas respecto al área cultivada y producción de este cultivo.

Para el 2008 mediante el TRATADO DE COMERCIO DE LOS PUEBLOS Y LA ALTERNATIVA BOLIVARIANA PARA LAS AMÉRICAS (TCP ALBA) pequeños productores de la región de Salinas de Garci Mendoza (Municipio de Bolivia) iniciaron la producción de 300 toneladas anuales de quinoa real certificada la cual sería exportada a Venezuela en forma de grano, galletas y otros derivados para alimentar a la FANB de Venezuela ^[15]. El consumo de quinoa en Venezuela está restringido a la adquisición por medio de ofertas en detal en comercios de Valencia, Caracas y Maracay, y en páginas web con precios elevados; con abastecimiento por importaciones minoritarias de los proveedores ^[16].

1.6. Valor Nutricional de la Quinoa

En cuanto a la composición nutricional, la quinoa se puede comparar en energía a alimentos similares consumidos en nuestro país como frijoles, maíz, arroz o trigo, tal y como se muestra en la tabla 1.

Tabla.1.Comparación de la composición de la Quinoa con la de algunos cereales y legumbres (g/100g peso seco) ^[5,17]

	Grasa	Proteína	Cenizas	Fibra	Carbohidratos	Energía*
Quinoa	6,3	16,5	3,8	3,8	69,0	399
Arroz	2,2	7,60	3,4	6,4	80,4	372
Cebada	1,9	10,8	2,2	4,4	80,7	383
Maíz	4,7	10,2	1,7	2,3	81,1	408
Sorgo	3,46	10,6	0,84	6,7	72,1	329
Trigo	2,3	14,3	2,2	2,8	78,4	392
Lupino**	7,0	39,1	4,0	14,6	35,3	361
Frijol**	1,1	28,0	4,7	5,0	61,2	367
Soja**	18,9	36,1	5,3	5,6	34,1	451
Avena	11,6	5,20	10,4	2,9	69,8	372
Centeno	13,4	1,80	2,6	2,1	80,1	390

*Kcal/100g = 4× (% proteína + carbohidratos) + 9× (% grasa)

**Legumbres

1.6.1. Proteínas

Sobre una base de materia seca, la quinoa muestra un contenido de proteína mayor que el encontrado en los cereales, pero mucho menor que el encontrado en las

leguminosas, como se puede observar en la tabla 1 ^[18]. La proteína está compuesta por aminoácidos, ocho de los cuales están considerados esenciales tanto para niños como para adultos. La quinoa tiene un buen equilibrio de los aminoácidos que componen la proteína. Es excepcionalmente alta en lisina un aminoácido que no es excesivamente abundante en el reino vegetal ^[5]. En la Tabla 2 y 3 se muestran la composición de la quinoa y de otros cereales en cuanto a aminoácidos esenciales y no esenciales.

Tabla.2.Aminoácidos esenciales (g/100g proteína) ^[18]

	HIS	ILE	LEU	LYS	M+C	P+T	THR	TRY	VAL
Quinoa	3,2	4,9	6,6	6,0	5,3	6,9	3,7	0,9	4,5
Arroz	2,1	4,1	8,2	3,8	3,6	10,5	3,8	1,1	6,1
Maíz	2,6	4,0	12,5	2,9	4,0	8,6	3,8	0,7	5,0
Trigo	2,0	4,2	6,8	2,6	3,7	8,2	2,8	1,2	4,4
Recomendaciones de la FAO									
Infantes	2,6	4,6	9,3	6,6	4,2	7,2	4,3	1,7	5,5
Preescolar	1,9	2,8	6,6	5,8	2,5	6,3	3,4	1,1	3,5
Niños	1,9	2,8	4,4	4,4	2,2	2,2	2,8	0,9	2,5
Adultos	1,6	1,3	1,9	1,6	1,7	1,9	0,9	0,5	1,3

Abreviaturas: HIS-Histidina, ILE-Isoleucina, LEU-Leucina, LYS-Lisina, M+C-Metionina+Cistina, P+T-Fenilalanina + Tirosina, THR-Treonina, TRY-Triptófano, VAL-Valina.

Tal y como se muestra en la Tabla 2, si se compara con el patrón de puntuación de aminoácidos esenciales recomendado por la FAO, la quinoa supera las recomendaciones para los nueve aminoácidos esenciales en niños y adultos ^[1]

Tabla.3.Aminoácidos no esenciales (g/100g proteína) ^[18]

	ALA	ARG	ASP	GLU	GLY	PRO	HPR	SER
Quinoa	4,6	7,3	7,2	11,6	6,1	3,2	0,3	3,5
Arroz	6,0	6,9	10,0	19,7	4,7	4,9	NR	6,3
Maíz	7,3	4,2	6,9	18,8	4,0	9,1	NR	5,1
Trigo	3,6	4,5	5,0	29,5	4,0	10,2	NR	4,8

Abreviaturas: ALA-Alanina, ARG-Arginina, ASP-Ácido aspártico, GLU-Ácido glutámico, GLY- Glicina, PRO- Prolina, HPR- Hidroxiprolina, SER-Serina.

NR-No reportado

En los pseudocereales, como la quinoa, las albúminas y las globulinas son la fracción proteica principal (44-77% de la proteína total), que es mayor que la de las prolaminas (0,5-7,0%). El gluten está formado por las gluteninas y las prolaminas en particular por las gliadinas, la quinoa se considera un grano sin gluten debido al bajo contenido de estas proteínas ^[5].

Tabla.4.Fracciones de proteínas (como porcentaje de proteína total) ^[18]

	Albuminas + Globulinas	Gluteninas/Glutelinas	Gliadina/Prolamina
Quinoa	76,6	12,7	7,2
Maíz	38,3	37,2	24,5
Arroz	19,2	71,9	8,9
Trigo	17,1	54,4	28,5

1.6.2. Carbohidratos

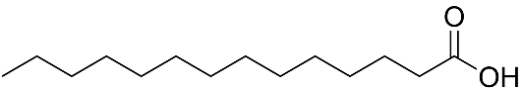
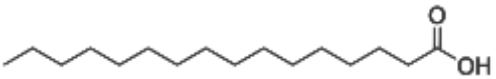
El principal componente de la quinoa consiste en carbohidratos, y varía del 67% al 74% de la materia seca. El almidón constituye alrededor del 52-60% el cual se

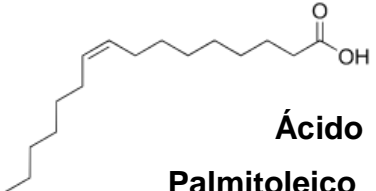
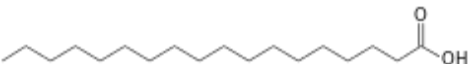
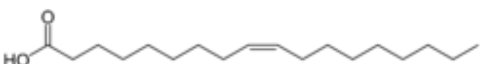
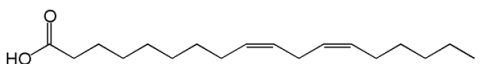
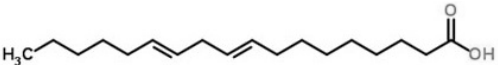
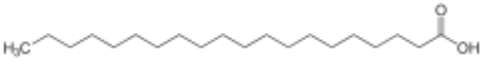
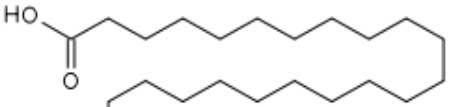
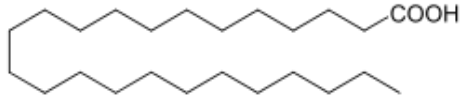
encuentra en el perisperma de la semilla. El contenido de amilosa es aproximadamente 11%, que es menor que en los cereales, por ejemplo arroz (17%), trigo (22%) o cebada (26%). Otros carbohidratos se encuentran en pequeñas cantidades, como monosacáridos (2%) y disacáridos (2,3%), fibra cruda (2,5-3,9%) y pentosanos (2,9-3,6%) [5]

1.6.3. Grasas

Tal y como se muestra en la Tabla 1, la quinoa contiene más grasas (6,3 g) por cada 100 g de peso en seco en comparación con los frijoles (1,1 g), el maíz (4,7 g), el arroz (2,2 g) y el trigo (2,3 g). Las grasas son una importante fuente de calorías y facilitan la absorción de vitaminas liposolubles. Del contenido total de materias grasas de la quinoa [Ver Tabla 5], más del 50 % viene de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales linoleico (omega 6) y linolénico (omega 3). Los ácidos linoleico y linolénico se consideran ácidos grasos esenciales, ya que no los puede sintetizar el organismo [1].

Tabla.5.Perfiles de ácidos grasos (como porcentaje de fracción de lípidos) [18]

	Quinoa	Soja	Maní	Aceituna
 Ácido Mirístico	0,2	NR	NR	NR
 Ácido Palmítico	9,9	9,4	9,3	9,6

 <p>Ácido Palmitoleico</p>	0,1	NR	NR	NR
 <p>Ácido Estéarico</p>	0,8	4,4	2,0	2,8
 <p>Ácido Oleico</p>	24,5	21,6	44,7	79,4
 <p>Ácido Linoleico (*)</p>	50,2	55,2	35,8	7,6
 <p>Ácido Linolénico (*)</p>	5,4	9,4	NR	0,6
 <p>Ácido Eicosanoico</p>	2,7	NR	4,2	NR
 <p>Ácido Docosanoico</p>	2,7	NR	3,4	NR
 <p>Ácido Tetracosanoico</p>	0,7	NR	1,9	NR

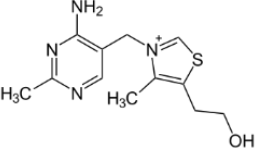
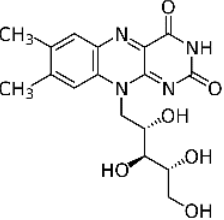
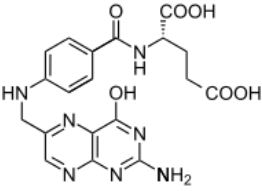
NR-No reportado

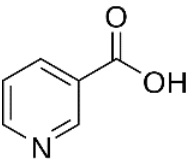
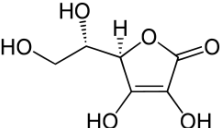
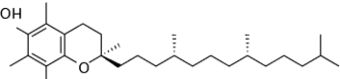
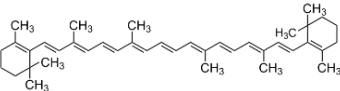
* Ácido graso esencial

1.6.4. Vitaminas

La quinoa es también una buena fuente de vitamina B2 (riboflavina) y vitamina E en comparación con otros granos, mientras que su contenido en tiamina es similar al de otros granos y el de niacina es en promedio inferior, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla.6.Contenido de vitaminas en la quinoa y en cereales de mayor consumo (mg/100g en peso seco) [1,5]

	Quinoa	Arroz	Cebada	Trigo
 <p>Tiamina (Vitamina B1)</p>	0,38	0,47	0,49	0,55
 <p>Riboflavina (Vitamina B2)</p>	0,39	0,10	0,20	0,17
 <p>Ácido fólico</p>	0,0781	0,020	-	0,078

 <p>Niacina (Vitamina B3)</p>	1,06	5,98	5,44	5,88
 <p>Ácido ascórbico</p>	4,00	0	0	0
 <p>α-Tocoferol (Vitamina E)</p>	5,37	0,18	0,35	1,15
 <p>β-Caroteno</p>	0,39	NR	0,01	0,02

NR-No reportado

1.6.5. Minerales

El contenido de cenizas en la quinoa es mayor que el del arroz, el trigo y la mayoría de los otros granos, tal y como se puede apreciar en la Tabla 1. Debido a esto, las semillas de quinoa contienen altas cantidades de minerales. En la tabla 7 se puede

observar el alto contenido de minerales tales como Ca, Fe, K, Mg, Cu, Mn y Cl que se encuentran en la quinoa en comparación a otros granos de uso común.

Tabla.7.Contenido de minerales en la quinoa y en cereales de mayor consumo (mg/Kg en peso seco) ^[18]

	Quinoa	Arroz	Cebada	Trigo	Maíz
Ca	1487	69	430	503	171
P	3837	1378	3873	4677	2926
Fe	132	7	32	38	21
K	9267	1183	5028	5783	3771
Mg	2496	735	1291	1694	1371
Na	122	69	203	89	69
Cu	51	2	3	7	NR
Mn	100	23	19	39	5
Zn	44	6	35	47	29
Cl	1533	NR	260	633	137
S	1933	NR	NR	NR	NR
Al	110	NR	NR	NR	NR
B	10	0,3	5	NR	2
Co	0,05	0,01	0,08	0,02	NR
Mo	0,01	0,9	0,5	NR	0,6

Las cantidades de calcio, magnesio y potasio en las semillas de la quinoa se consideran suficientes para una dieta balanceada ^[19]. En especial, la quinoa es una buena fuente de hierro y magnesio si se compara con las recomendaciones relativas al consumo diario de minerales, la tabla 8 muestra las cantidades de ingesta de minerales recomendadas para la población venezolana en una publicación de la revista Archivos

Latinoamericanos de Nutrición realizada por la Fundación Bengoa en el 2012, por otro lado esta tabla también muestra el porcentaje de minerales que aporta el consumo diario de 100g de quinoa según lo recomendado en esta publicación.

Tabla.8. Valores de referencia de ingesta de minerales para la población venezolana por grupos de edad y género versus el % de minerales que aporta el consumo diario de 100 g de Quinoa sobre lo recomendado por la Fundación Bengoa. [18,20]

Grupo, Edad y Sexo	Hierro (mg/día)	Calcio (mg/día)	Zinc (mg/día)	% Fe	% Ca	% Zn
0-6 meses (M)	0	210	2		70,8	220,0
6-12 meses (M)	11	270	3	120,0	55,1	146,7
1-3 años (M)	7	465	3	188,6	32,0	146,7
4-6 años (M)	10	700	5	132,0	21,2	88,0
7-9 años (M)	9	1000	6	146,7	14,9	73,3
10-12 años (M)	8	1065	8	165,0	14,0	55,0
13-15 años (M)	10	1200	10	132,0	12,4	44,0
16-17 años (M)	11	1200	11	120,0	12,4	40,0
18-29 años (M)	8	1100	11	165,0	13,5	40,0
30-59 años (M)	8	1050	11	165,0	14,2	40,0
60 y más (M)	8	1300	11	165,0	11,4	40,0
0-6 meses (F)	0	210	2		70,8	220,0
6-12 meses (F)	11	270	3	120,0	55,1	146,7
1-3 años (F)	7	465	3	188,6	32,0	146,7
4-6 años (F)	10	700	5	132,0	21,2	88,0
7-9 años (F)	9	1065	6	146,7	14,0	73,3
10-12 años (F)	8	1200	8	165,0	12,4	55,0
13-15 años (F)	13	1200	9	101,5	12,4	48,9
16-17 años (F)	15	1200	9	88,0	12,4	48,9
18-29 años (F)	18	1100	8	73,3	13,5	55,0
30-59 años (F)	16	1085	8	82,5	13,7	55,0
60 y más (F)	8	1300	8	165,0	11,4	55,0
Embarazadas	27	+100	11	48,9	148,7	40,0
Mujeres que lactan	+9	+100	12	146,7	148,7	36,7

Como ejemplo se puede decir a partir de los datos mostrados en la tabla anterior que el consumo de 100g de quinoa diariamente proporciona el 73,3% de Fe, 13,5 % de Ca y el 55,0 % de Zn del valor diario de consumo de estos minerales recomendado por la Fundación Bengoa para personas del sexo femenino entre los 18-29 años.

1.7. Usos de la Quinoa

Los principales usos conocidos de la quinoa son:

1.7.1. Alimentación Humana e Innovación en la industria alimentaria

La quinoa se puede comer como un reemplazo de arroz, como un cereal que requiere cocción para el desayuno, o se puede hervir en agua para preparar cereales para bebés. Los brotes verdes pueden agregarse a las ensaladas. Las semillas se pueden moler y usarse como harina. La harina de quinoa se puede mezclar con maíz o harina de trigo. Las semillas se utilizan hervidas como arroz o se usan para espesar la sopa o como papilla [5].



Figura.13.Industrialización de la Quinoa [1]

1.7.2. Alimentación Animal

La planta entera se usa como forraje verde. También se aprovechan los residuos de la cosecha para alimentar vacunos, ovinos, cerdos, caballos y aves ^[1].

1.7.3. Uso Medicinal

Tienen uso medicinal las hojas, tallos y granos, a los que se atribuyen propiedades cicatrizantes, desinflamantes, analgésicas contra el dolor de muelas, desinfectantes de las vías urinarias; se utilizan también en caso de fracturas, en hemorragias internas y como repelente de insectos ^[1].

1.8. Efectos en la salud de la Quinoa

Además de su alto valor nutricional y su atributo libre de gluten, se ha informado que la quinoa ejerce efectos beneficiosos en los consumidores de grupos de alto riesgo, tales como niños, ancianos, intolerantes a la lactosa y personas con anemia, obesidad, dislipidemia y enfermedad celíaca. Estos beneficios se han relacionado con el contenido de proteínas, fibra, vitaminas y minerales, ácidos grasos y, especialmente, con la presencia de una gran cantidad de fitoquímicos que proporcionan a la quinoa una ventaja notable sobre otros granos en términos de nutrición humana y salud ^[21].

La capa de semilla externa de la quinoa es rica en saponinas amargas que interfieren con su palatabilidad y digestibilidad además de que puede llegar a ser tóxica en altas dosis, por lo que es necesario eliminarlas antes de consumirlas. A pesar de sus características, se ha descrito una amplia gama de actividades biológicas para las

saponinas, incluidas las actividades antifúngicas, antivirales, anticáncer, hipocolesterolémica, hipoglucémica, antitrombótica, diurética y antiinflamatoria [21].

Los fitoesteroles son compuestos lipófilos estructuralmente similares al colesterol. Debido a esta similitud, compiten por la absorción intestinal del colesterol y reducen la producción de lipoproteínas aterogénicas en los intestinos y el hígado, reduciendo así los niveles de colesterol. Además, se han descrito actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas para los fitoesteroles [21]

Su consumo tiene un efecto benéfico sobre los diversos factores de riesgo que facilitan el desarrollo de la diabetes mellitus (DM) y las enfermedades vasculares, y al estar libre de gluten, puede ser una importante opción en la alimentación de personas con DM1 [22]. Aunque se ha descrito que muchos componentes de la quinoa contribuyen a los efectos beneficiosos para la salud humana, hasta la fecha, la evidencia de estos beneficios demostrados tanto en animales como en humanos es aún limitada.

2.0. Efecto Anti-nutriente del Ácido fítico

El ácido fítico [myoinositol 1,2,3,4,5,6-hexakis (dihidrogenofosfato)] es un importante compuesto antinutricional presente en muchos cereales. En el tracto gastrointestinal puede formar complejos insolubles con cationes multivalentes como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} , reduciendo así su biodisponibilidad [18].

El ácido fítico consta de un anillo inositol substituido con seis grupos fosfato como se puede observar en la figura 14. Este compuesto se encuentra frecuentemente en la mayoría de las semillas y granos de cereales, ya que es la principal forma natural de almacenamiento de fósforo (P), representando del 60 % al 90 % del fósforo total [23].

El P restante está representado por fosfato inorgánico soluble y P celular (P unido en ácidos nucleicos, proteínas fosforiladas, lípidos P, azúcares P) [24].

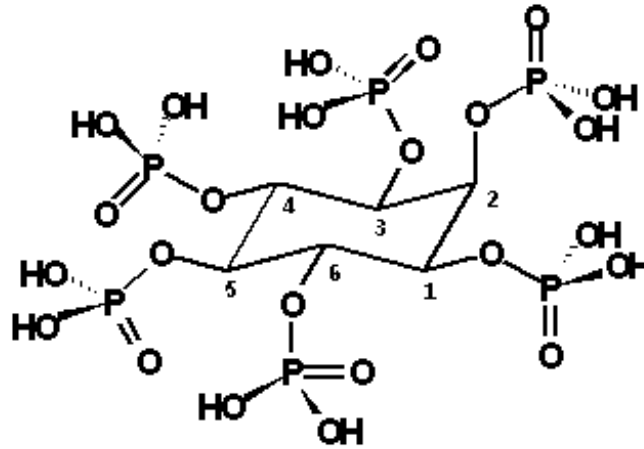


Figura.14.Estructura química del Ácido fítico [25].

2.1. Localización y Contenido

El ácido fítico se encuentra en cereales y leguminosas y constituye aproximadamente entre 1 % y 2 % del peso de la semilla, incluso puede alcanzar cantidades de 3 % a 6 % en algunos cereales. En cuanto a su localización en las leguminosas, este ácido está distribuido de manera uniforme en el cotiledón y asociado a estructuras proteínicas. En los cereales se encuentra en las capas externas como la aleurona y, en el germen, en forma de subestructuras cristalinas en los cuerpos proteínicos [26]. En la quinoa el ácido fítico se encuentra en las capas externas de la semilla, así como en el endospermo [5]. A continuación se muestran los porcentajes de ácido fítico que se encuentran en algunos cereales, legumbres, semillas y pseudocereales.

Tabla.9. Contenido de fósforo y ácido fítico en cereales, pseudocereales, legumbres, semillas oleaginosas y productos proteínicos [25].

	Fósforo (%)	Ácido fítico (%)
Cereales		
Trigo	0,17-0,38	0,62-1,35
Trigo (duro rojo de invierno)	0,24	0,84
Trigo (suave)	0,32	1,14
Arroz (integral de grano largo)	0,25	0,89
Arroz (grano largo pulido)	0,10	0,34
Arroz (grano medio pulido)	0,04-0,05	0,14-0,19
Arroz (grano corto pulido)	0,04	0,14
Arroz Salvaje	0,62	2,20
Maíz (comercial)	0,25	0,89
Maíz (alto contenido de lisina)	0,28	0,99
Triticale	0,14-0,53	0,50-1,89
Centeno	0,27	0,97
Cebada	0,27-0,33	0,97-1,16
Avena	0,22-0,29	0,79-1,01
Mijo	0,28	0,99
Sorgo (bajo tanino)	0,16	0,57
Sorgo (alto tanino)	0,27	0,96
Legumbres		
Frijoles negros (semilla entera)	0,41	1,46
Frijoles negros (cotiledones)	0,48	1,70
Frijoles verdes (conjunto)	0,19	0,66
Garbanzo	0,08	0,28
Caupí	0,12	0,44
Soja	0,28-0,4	1,00-1,47
Frijoles blancos pequeños californianos	0,29	1,03
Habas	0,25	0,89
Chícharos	0,33	1,20
Guisantes	0,11	0,40
Guisantes de Alaska	0,19	0,67
Habas descascaradas	0,51	1,80
Frijol blanco	0,21-0,45	0,74-1,58
Habichuelas blancas	0,15-0,21	0,55-0,75
Frijoles rojos mexicanos	0,15-0,31	0,54-1,10
Frijoles "Great Northern"	0,16-0,46	0,56-1,63

Frijoles pintos	0,17-0,5	0,61-1,95
Frijoles rojos	0,34-0,5	1,20-2,06
Harina de maní (descascarado)	0,48	1,70
Otras semillas oleaginosas		
Semillas de sésamo (conjunto)	1,33	4,71
Semillas de sésamo (descascarado)	1,45	5,16
Semillas de sésamo (tostado)	1,33	4,72
Harina de semillas de sésamo	1,46	5,18
Colza (desgrasados)	1,12	2,00-3,98
Harina de semilla de algodón (rotor seco)	0,83	2,94
Harina de semilla de algodón (sin glándulas)	1,35	4,80
Granos tostados de algodón (sin glándulas)	0,73	2,60
Productos proteínicos		
Hojuelas de Soja (desgrasados)	0,43	1,52
Aislado de proteína de soja	0,12-0,33	0,43-1,17
Concentrado de proteína de soja	0,35-0,61	1,24-2,17
Concentrado de proteína de colza	1,49-2,11	5,30-7,50
Concentrado de proteína de trigo	0,53-0,76	1,88-2,70
Gluten de trigo	0,60	2,13
Pseudocereales		
Quinoa	0,38	1,18-1,94
Amaranto	0,53	1,23

2.2. Propiedades del ácido fítico

El Ácido fítico a pH neutro (pH= 7) y al pH 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 moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas. La interacción del Ácido fítico con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes la interacción es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato: éstos pueden unirse bien a un sólo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfato de distintas moléculas de Ácido fítico [27]. En los granos el Ácido fítico se encuentra como

una mezcla de sales con varios cationes como K, Mg, Ca, Mn, Zn y Fe; el término fitina se ha empleado para designar una mezcla de sales de Ca y Mg del Ácido fítico [27].

La "insolubilidad" del Ácido fítico es la principal causa de su comportamiento antinutricional y de sus propiedades fisicoquímicas. Los minerales y el ácido fítico en el pH ácido del estómago se disocian y son solubles sin embargo una vez son transportados al intestino delgado a un pH= 5-7 debido a la alta densidad de grupos fosfato cargados negativamente el fitato forma sales mixtas con cationes minerales las cuales son insolubles a ese pH. Sin embargo, es importante considerar que la solubilidad de las sales del Ácido fítico varía con el pH, las sales de Ca y Mg son solubles a pH bajos ya que el ácido fítico posee mayor afinidad por las moléculas con terminaciones libres H^+ que por los metales y son insolubles a pH elevados, por lo tanto al pH en el que se encuentra el intestino delgado serían insolubles, de ahí el descenso de la biodisponibilidad mineral ya que los minerales se hacen inaccesibles para la absorción intestinal. Por lo que se refiere al fósforo presente en la molécula de Fitato, el ser humano no lo puede aprovechar porque el organismo no produce la enzima fitasa necesaria para hidrolizar el ácido fítico y liberar así el fósforo de este compuesto. En general, las sales hidrogenadas y monovalentes del ácido fítico son solubles en agua, mientras que las sales metálicas divalentes y trivalentes son bastante insolubles. La figura 15 muestra como son las interacciones del ácido fítico con minerales y proteínas.

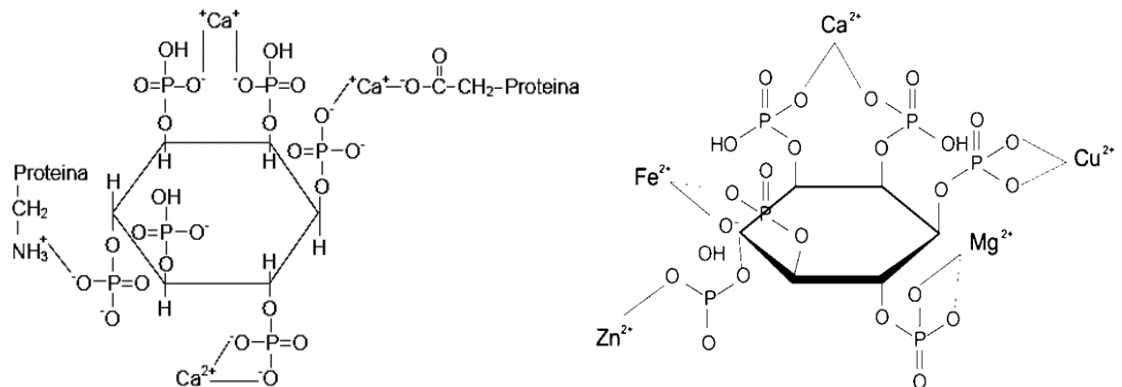


Figura.15. Interacciones del ácido fítico con minerales y proteínas [25].

El ácido fítico puede ser degradado a myo-inositol pentafosfato (IP₅), tetra- (IP₄), tris- (IP₃), bis- (IP₂), monofosfatos (IP). Solo el IP₆ e IP₅ 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 [27].

En los cereales y las leguminosas, las diferentes técnicas de procesamiento tradicionales, como la germinación, el remojo y la fermentación se han utilizado para activar las fitasas endógenas presentes en los cereales y bacterias. El fitato es hidrolizado por la fitasa endógena del cereal para reducir los fosfatos de myo-inositol. Se ha demostrado que estos procesos reducen la cantidad de fitato y por lo tanto aumentan la disponibilidad de minerales. A su vez la introducción de fitasas exógenas en los alimentos también puede degradar el ácido fítico presente en los mismos. La hidrólisis no enzimática del ácido fítico generalmente se produce cuando los alimentos son calentados (T >40 °C) o tratados con ácidos fuertes y concentrados [27]. Una alternativa a la degradación del ácido fítico y que es empleada en la industria alimentaria es la adición de determinados compuestos que tienen la capacidad de unirse al hierro produciendo la reducción del hierro en estado férrico al estado ferroso el cual presenta una menor capacidad de unirse al ácido fítico

2.3. Efectos beneficiosos del ácido fítico.

Dejando a un lado la importante acción antinutritiva del ácido fítico, no debemos olvidar que existen algunos beneficios para la salud en los que se ve implicado de forma positiva el ácido fítico[28].

El ácido fítico se une a los iones calcio y magnesio, evitando su unión con moléculas de pectina en los tejidos, lo que favorece el reblandecimiento y la disolución

de las sustancias pécticas. El ácido fítico al igual que las lectinas, inhibidores de amilasas, o taninos, posee también efectos que curiosamente, parecen ser similares a aquellos atribuidos a la fibra dietética, como son la disminución del índice de glucemia en sangre, del riesgo de cáncer de colon y mama, y del nivel de lípidos en sangre. El ácido fítico es capaz de unirse al hierro, evitando la peroxidación de los lípidos. De esta forma queda mermada la formación de radicales libres durante la oxidación de los lípidos, que puede alterar las membranas celulares y estimular la proliferación celular [28]. Su ingesta es indispensable para una dieta sana y equilibrada, debido a la acción inhibidora en la cristalización de sales cálcicas, tales como fosfatos y oxalatos; evitando por tanto la formación de depósitos minerales patológicos como son los cálculos renales [27]. Algunos isómeros del inositol fosfato productos de su degradación como el IP₃ e IP₄ presentan funciones fisiológicas como mensajeros intracelulares, efectos antiinflamatorios y prevención de complicaciones derivadas de la diabetes.

2.4. Extracción del ácido fítico.

En la capacidad de extracción del fitato presente en los distintos alimentos y/o semillas influyen varios factores entre los que se encuentran [27]:

1. La asociación del fitato con otros componentes, y por tanto la naturaleza de las proteínas y los cationes mono- y divalentes con los que el fitato se encuentra formando complejos.
2. El pH.
3. El tipo de solvente y fuerza iónica usada en la extracción.
4. La presencia de Fe endógeno, que a altas concentraciones puede precipitar el Fitato durante la extracción, y con ello producir un error por defecto en la cuantificación final.

Varios solventes han sido evaluados para determinar su especificidad en la extracción del ácido fítico. Los más comúnmente utilizados son el HCl (0,2 M, 0,5 M ó 0,65 M) y el ácido tricloroacético diluido (TCA). En la bibliografía también aparecen otros solventes como el H₂SO₄ al 3% y la solución HCl 1,2% / Na₂SO₄ 10% [27].

2.5. Métodos de análisis y determinación del ácido fítico.

El efecto, potencialmente perjudicial del ácido fítico, relativo a la alteración de los niveles de nutrientes en los seres humanos, ha conducido al desarrollo de un gran número de técnicas para medir su contenido real en alimentos [27]. La mayoría de los métodos clásicos para la determinación de fitato se basan en la precipitación de fitato con ión férrico, debido a que el fitato forma un complejo insoluble con este ión en solución ácida [29].

Estos métodos han sido divididos en métodos directos en los cuales el fitato férrico es removido y determinado como fósforo o inositol y métodos indirectos en los cuales se agrega un exceso de cloruro férrico para precipitar el fitato y el hierro como fitato férrico. Así, la concentración de fitato es determinada a partir de estos resultados usando una proporción teórica de Fe: P de 4:6 o a través de la determinación de hierro residual en solución luego de la precipitación de fitato férrico de una concentración conocida de sal férrica en solución ácida. Para calcular la cantidad de ácido fítico en el extracto original, se asume que la precipitación del fitato es cuantitativa y no ocurre contaminación del precipitado con otros ésteres de fosfato. Cuando el cálculo se realiza por análisis de Fe, se asume que la proporción molar Fe: P- fítico es definida, lo que depende del número de lavados realizados al precipitado. Los métodos basados en la precipitación del complejo fitato - hierro, dan resultados satisfactorios para granos y semillas con un alto contenido de fitato, pero estos procedimientos son menos adecuados cuando los contenidos de fitato son menores [27]. Una de las desventajas de

los métodos de precipitación con hierro es que no sólo el fitato (inositol hexafosfato) sino que otros componentes que contienen fósforo son precipitados. Todos los inositoles fosfatos de la forma di a hexafosfatos forman complejos insolubles con hierro. Sin embargo, mono, di y trifosfatos son apreciablemente solubles y no son cuantitativamente precipitados. En todos estos métodos puede ocurrir una gran variación de resultados, debido a que la proporción de P/Fe puede variar de 1,5 - 2,4. Además, la solubilidad del fitato férrico se incrementa con un exceso de cloruro férrico y pequeñas cantidades de fosfato inorgánico tienden a precipitar ^[29].

En los métodos de intercambio iónico la etapa de precipitación es eliminada, la extracción del fitato se realiza directamente y la solución resultante es pasada a través de una resina de intercambio iónico, eluyendo primero el P, y posteriormente el fitato que es determinado por distintos procedimientos. El uso de una columna de intercambio aniónico fue introducido por Harland y Oberleas ^[30] que desarrollaron un método en el que una vez extraído el fitato con HCl 1,2%, el extracto obtenido es eluído a través de una resina de intercambio iónico para separar el P inorgánico. El fitato eluído es digerido con H₂SO₄ y HNO₃ concentrado, y el contenido de P liberado cuantificado colorimétricamente. El principal inconveniente de este método es que la etapa de digestión necesita una continua atención para minimizar las pérdidas producidas como consecuencia de una digestión incompleta o excesiva ^[29]. Posteriormente, Latta y Eskin ^[28] desarrollaron un método más rápido y simple, basándose en la reacción entre el ión férrico y el ácido sulfosalicílico. En éste, el ácido fítico es primero concentrado en una resina de intercambio de aniones, y una vez eluído el P inorgánico con NaCl 0,1 M se realiza la elución del fitato con NaCl 0,7 M. La concentración de fitato se determina colorimétricamente utilizando el reactivo de Wade (FeCl₃.6H₂O al 0,03% y ácido sulfosalicílico al 0,3%), utilizando como estándar fitato cálcico, que es previamente convertido en AF libre y determinado con el método de Harland y Oberleas ^[30], o bien fitato sódico que es soluble en agua por lo que no es necesaria su conversión en AF

libre. Para el 2005 H.-R. Park et al. [31] desarrollaron un método para determinar ácido fítico colorimétricamente en cereales infantiles utilizando el reactivo de Wade obteniendo porcentajes de recuperación del 94% [31].

En la actualidad sigue vigente el método desarrollado por Harland y Oberleas [30]. Estos autores considerando que el fitato en la planta se encuentra unido a proteínas y minerales, modificaron su método inicial mediante la inclusión del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ajuste de los extractos a pH 7, para eliminar estas uniones y mejorar así la recuperación del fitato y la exactitud del ensayo. Así, el ácido fítico es extraído de la matriz del alimento con HCl al 0,8 M y el extracto obtenido, una vez filtrado, es diluido con una solución de EDTA/NaOH y lavado a través de una columna de intercambio aniónico, donde la mayoría de las impurezas son eluidas fuera de la columna, mientras que el ácido fítico es retenido en la misma [27].

El principal inconveniente tanto de los métodos de precipitación como de los de intercambio iónico es la falta de especificidad, como consecuencia de la dificultad del ajuste de las condiciones de hidrólisis necesarias para que sólo determinados inositol fosfato (IP_6) sean liberados para su cuantificación. Por ello estos métodos son válidos para aquellos cereales y leguminosas sin procesar, ya que en ellos básicamente sólo hay ácido fítico (IP_6), no aconsejándose su uso en alimentos procesados, ya que éstos contienen también cantidades apreciables de isómeros del ácido fítico desfosforilados como IP_5 , IP_4 e IP_3 y posiblemente IP_2 e IP . Estos fosfatos son determinados también en los métodos de precipitación, y en los de intercambio iónico son retenidos en la columna y eluidos con el ácido fítico por lo que el método sobreestima el contenido de ácido fítico de los alimentos procesados; debido a la falta de especificidad del mismo [27]. Este inconveniente se resuelve utilizando métodos de separación como HPLC hay que destacar que en este método los distintos inositol fosfatos son determinados como entidades independientes, permitiendo la cuantificación de IP_6 ó IP_5 en mezclas que

incluso contienen todos los isómeros, sin embargo debido a que los inositol fosfatos no tienen un espectro característico de absorción, su detección mediante análisis HPLC está limitada a métodos que emplean monitoreo del índice de refracción.

2.5.1. Método fotocolorimétrico para la determinación de ácido fítico, basado en la utilización del reactivo de Wade.

La concentración de ácido fítico se determina colorimétricamente utilizando el reactivo de Wade, dicho reactivo consiste en $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0,03% y ácido sulfosalicílico al 3%. En presencia del ácido fítico, el hierro se enlaza al éster fosfato del ácido fítico haciéndose incapaz de reaccionar con el ácido sulfosalicílico, de modo que se produce un descenso de la intensidad del color, lo que implica que el aumento de la concentración del ácido fítico, conlleva a una disminución en la absorbancia; razón por la cual, este análisis es considerado una medida indirecta. Dicha disminución del color a 500 nm es proporcional a la concentración de ácido fítico ^[31,32].

ANTECEDENTES

Jenny Ruales & Baboo M. Nair (1993): Realizaron el análisis de minerales en la quinoa con un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian AA 1275) equipado con un atomizador de tubo de grafito (GTA 95). Las muestras homogeneizadas (15-70 g) fueron secadas y luego se incineraron a 450 ° C. Posteriormente fue añadido ácido clorhídrico y la solución fue evaporada a sequedad. El residuo fue disuelto en ácido nítrico 0,1 N y los contenidos minerales se determinaron por absorción atómica. El contenido de minerales para la quinoa entera cruda fueron Ca: 874 mg/100 g peso seco, Fe: 81 mg/100 g peso seco y Zn: 36 mg/100 g peso seco, a su vez determinaron el contenido de minerales de la quinoa pulida y lavada obteniendo los siguientes resultados Ca: 1231 mg/100 g peso seco, Fe: 59 mg/100 g peso seco y Zn: 45 mg/100 g peso seco [33].

Jenny Ruales & Baboo M. Nair (1993): Determinaron el fitato en Harina de Quinoa como equivalentes de hexafosfato, utilizando el método descrito por Harland y Oberleas [30] (1986). La muestra (2 g de harina de quinoa) fue mezclada con 40 ml de HCl 0,78 M mediante agitación vigorosa durante 3h a 20°C. La suspensión fue filtrada con vacío a través de un papel Whatman n. ° 1. Una alícuota de 1 mL del filtrado fue mezclada con una solución de (EDTA/NaOH) y fue llevada a 25 mL con agua. Posteriormente la mezcla fue pasada por un intercambiador aniónico. La columna fue lavada primero con 15 ml de H₂O y luego con 15 ml de NaCl 0,1 M antes de eluir con 15 ml de NaCl 0,7 M. Para la cuantificación usaron un método fotocolorimétrico tratando la muestra con una solución de molibdato de amonio al 2,5% en H₂SO₄ 1N y reactivo de ácido sulfónico para determinar el contenido de fósforo, midiendo la absorbancia a 640 nm. La cantidad de fitato (fitato = 28,2% P) en la muestra se calculó como equivalentes de hexafosfato [23].

H.-R. Park et al. (2005): Evaluaron diferentes métodos analíticos para la determinación del ácido fólico en alimentos para lactantes. Compararon los métodos espectrofotométricos (AOAC y reactivo de Wade) y cromatográficos (GC-FID y HPLC), y el valor determinado espectrofotométricamente mostró niveles de ácido fólico más altos que los de los métodos cromatográficos. Determinaron que el método AOAC mostró una recuperación completa para los alimentos infantiles después de agregar ácido fólico mientras que con el uso del reactivo de Wade los porcentajes de recuperación fueron del 94%, para los métodos cromatográficos por GC-FID y HPLC-RI observaron una recuperación deficiente ^[31].

Dilia Caripa (2008): Cuantificó el ácido fólico en cereales infantiles por el método de HPLC-RI utilizando una columna PRP-1 de material PEEK, un ultrasonido de punta para la extracción del ácido, un rotaevaporador para la eliminación del solvente y como sistema de secado de las muestras la liofilización. A su vez determinó las concentraciones de calcio, hierro y zinc presentes en los cereales por Espectroscopía de Absorción Atómica en Llamas. Determinó que las concentraciones de los metales en los cereales infantiles en algunos casos fueron similar al reportado en las etiquetas. Los porcentajes de recuperación del ácido fólico fueron muy bajos, estuvieron en el siguiente rango (48 - 57) %, por lo que concluye que la recuperación del ácido se ve afectada con el alto contenido mineral que presentan los cereales. Esto se puede relacionar con lo planteado por otros investigadores donde señalan la posible formación de un complejo metal-fitato, el cual afecta el porcentaje de recuperación del fitato en cereales infantiles ^[34].

Salas Daniela (2010): evaluó los distintos métodos fotocolorimétricos (Método fotocolorimétrico del complejo azul de molibdeno, complejo amarillo del ácido de vanadomolibfosfórico y el método basado en la utilización del reactivo de Wade) para medir el ácido fólico determinando que el método fotocolorimétrico basado en la

utilización del reactivo de Wade tiene un procedimiento sencillo y rápido en la medida del ácido fítico, además de no requerir digestión de la muestra. A su vez estudió el efecto de los metales en la etapa de extracción del ácido fítico en muestras sintéticas que simulaban la matriz de los cereales infantiles por el método de espectrometría de absorción molecular UV-Visible. En las muestras que no contenían metales la recuperación estuvo en el orden del 75%, mientras que en las muestras que presentaban hierro y calcio, estos porcentajes disminuyeron a valores entre 57 y 69%. Por lo que determinó que la presencia de metales influye en la recuperación del ácido fítico. También evaluó el efecto que tiene al emplear ácido tricloroacético (0,3 M) en vez de ácido clorhídrico como ácido de extracción y demostró que se obtienen mejores porcentajes de recuperación (71%) cuando se está en presencia de metales [32].

Eloy Mijares (2013): estudió el efecto del tipo de ácido y su concentración en la recuperación del ácido fítico en presencia de metales, en muestras sintéticas por el método HPLC-RI utilizando una columna de fase inversa tipo PRP-1 de material PEEK. Los tipos de ácidos estudiados fueron el ácido tricloroacético y el ácido clorhídrico. Determinó que la presencia de metales en la matriz de la muestra influye notoriamente en la recuperación del AF y que este efecto se ve atenuado mientras mayor es la concentración del ácido fítico. En las muestras con alto contenido de AF y metales, el uso del ácido tricloroacético mejoró los porcentajes de recuperación cuando la concentración del ácido tricloroacético es alta y se emplean tiempos largos de extracción, lo que puede deberse a una redisolución del complejo fitato-mineral. Para bajas concentraciones de ácido fítico y altas concentraciones de metales, ambos ácidos de extracción generaron baja recuperación en presencia de metales bajo las condiciones experimentales evaluadas [35].

Olga, Milan Natilia & Daniela (2013): Analizaron el contenido de ácido fítico, fósforo y de calcio en cuatro variedades de quinoa (variedad de quinoa Nariño de

Colombia la cual tuvo un proceso previo de remoción de saponinas (QC), quinoa comercial "Anapqui's" (QBA) y -IICA – 020 -Oruro de Bolivia (QB) y quinoa Huancavelica de Perú (QP). El contenido de fósforo fue determinado con un espectrofotómetro a $\lambda = 820$ nm con reactivo de molibdato ($3,4$ mM $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$) y de ácido ascórbico al 20% (p/v). El contenido de Calcio se midió mediante espectrometría de absorción atómica (Solaar M-6, TJA Solutions, Reino Unido). Finalmente el contenido de ácido fítico fue estimado mediante un método de isotacoforesis. El método consistió en añadir 50 ml de HCl al 1,14 M a 5 g de las variedades de quinoa y del control (granos de trigo). Después de agitar a temperatura ambiente (18°C) durante 1 h, la mezcla fue diluida en 100 ml con HCl al 3,5% y luego centrifugada a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C . El sobrenadante fue separado del precipitado y transferido a un matraz volumétrico de 20 ml. El pH del sobrenadante (1,5 o 2 ml) fue ajustado a 6,0-6,4 con HCl y luego fue llevado a 100 ml con agua desionizada. La solución fue analizada por isotacoforesis. El tiempo de separación varió de 25 a 35 minutos. Utilizaron un método de calibración externo con soluciones de la sal dodecasódica de ácido fítico, para los patrones se midieron 7 puntos de calibración en el intervalo de concentración de 10 a 120 μM . Las variedades presentaron altos contenidos de P y Ca. El ácido fítico en QC fue significativamente más bajo que en las otras variedades^[36].

Paula Olivera & Diego Nieto (2014): Analizaron 8 muestras de distintas marcas comerciales de quinoa de mayor distribución en el mercado local de Perú; las muestras fueron analizadas junto con un material de referencia certificado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Dispusieron aproximadamente unos 20 g de granos de quinoa por muestra sobre un vidrio de reloj que dejaron secar a 50°C por 24 horas. Posteriormente, pulverizaron las muestras utilizando un mortero de ágata. Cada una de las muestras fueron colocadas en una matriz de 25 mm de diámetro donde se realizó el pastillado con una prensa hidráulica por 2 minutos, para obtener pastillas de aproximadamente 1g por triplicado. Analizaron las pastillas tanto en un sistema modular

de Fluorescencia de Rayos X cuya fuente de excitación era una fuente anular de Cd-109, como en un sistema cerrado de espectrometría de Fluorescencia de Rayos X con blancos secundarios y un tubo de rayos X cuyo ánodo es de Gadolinio. Los resultados mostraron la presencia de elementos como K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb y Sr. A su vez los resultados mostraron al calcio como segundo mineral más abundante en la quinoa; sin embargo; para cada muestra de quinoa el contenido es variable (entre 600 y 1200 mg/kg peso seco), para el hierro los valores están entre 111-148 mg/Kg peso seco^[37].

Dhayezka Hernandez (2015): Realizó un estudio multivariado para medir las variables que afectan el proceso de extracción de ácido fítico en cereales infantiles disponibles en el mercado venezolano. Las variables que estudió fueron la concentración y el tipo de ácido a emplear en la extracción, así como el tiempo y tipo de sistema de extracción del ácido fítico. Encontró que el alto contenido de metales y el tratamiento de muestra influyen en la cuantificación del AF. Con el ácido tricloroacético observó bajos porcentajes de recuperación para cereales infantiles (< 48%) y valores superiores al 100 % para el cereal de trigo no procesado mientras que con el ácido clorhídrico obtuvo porcentajes superiores (< 62%) para cereales infantiles a base de trigo y para el cereal de trigo no procesado; mientras que para el cereal infantil a base de arroz obtuvo porcentajes de (77 – 83) %^[25].

La información presentada hasta el momento muestra que la Quinoa es un pseudocereal con alto contenido de ácido fítico y minerales como Ca, Fe y Zn. También se ha señalado por diferentes autores que la capacidad de extracción del ácido fítico en cereales se ve influenciada por la concentración de estos minerales y del propio ácido fítico en las muestras. Dada la importancia de establecer el verdadero valor nutricional de un alimento tan beneficioso como la Quinoa se ve la necesidad de desarrollar un método que permita establecer la concentración de ácido fítico en Quinoa y dado que la

presencia de metales afectan seriamente el proceso de extracción se hace necesario determinar el contenido de metales como Ca, Fe y Zn en las muestras evaluadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollo del método para la determinación de Fe, Ca, Zn y ácido fólico en quinoa por Espectrometría de absorción atómica en llama y UV-Visible.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análisis de Fe, Ca y Zn en quinoa por espectrometría de absorción atómica en llama.
- Optimización del método de extracción de ácido fólico en quinoa.
- Determinación del contenido de ácido fólico en quinoa por Espectrometría de absorción molecular en el UV-Visible.
- Discusión de resultados.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. REACTIVOS UTILIZADOS.

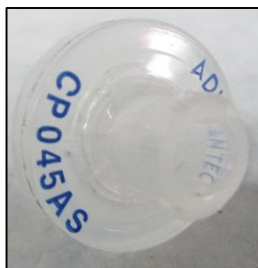
Nombre	Fórmula química	Marca	% Pureza	P.M (g/mol)
Ácido nítrico	HNO ₃	Merck KGaA	65,0	63,01
Ácido clorhídrico	HCl	Sigma-Aldrich	37,0	36,46
Carbonato de Calcio	CaCO ₃	Merck KGaA	99,9	100,09
Sal dipotásica de ácido fítico analizada por ICP-OES	C ₆ H ₁₆ K ₂ O ₂₄ P ₆	Sigma-Aldrich	92,0	736,20
Óxido de Lantano	La ₂ O ₃	Sigma-Aldrich	99,9	325,81
Cloruro férrico hexahidratado	FeCl ₃ .6H ₂ O	Merck KGaA	99,0	270,30
Ácido sulfosalicílico dihidratado	C ₇ H ₆ O ₆ S.2H ₂ O	Merck KGaA	99,0	254,22
Hidróxido de Sodio	NaOH	Merck KGaA	99,0	44,00
Ácido tricloroacético	C ₂ HCl ₃ O ₂	Merck KGaA	99,5	163,38
Cloroformo	CHCl ₃	Sigma-Aldrich	99,0	119,38
Metanol – Grado HPLC	CH ₃ OH	Merck KGaA	99,9	32,04
Hidróxido de tetraetilamonio	N(CH ₂ CH ₃) ₄ OH	Merck KGaA	20,0	147,07
Ácido fórmico	CH ₂ O ₂	Riedel-de Haën	85,0	46,03

2. EQUIPOS Y MATERIALES.

			
<p>Destilador Barnstead MP-6^a.</p>	<p>Estufa marca Lab- Line Imperial V.</p>	<p>Mufla marca Ney 2- 160. Serie II.</p>	<p>Liofilizador marca LABCONCO®</p>
			
<p>Ultrasonido 8892 marca Cole Parmer</p>	<p>Agitador Vortex marca Multi-Pulse</p>	<p>Espectrómetro de absorción atómica marca novAA® 350 – Analytic Jena AG</p>	<p>Cartucho de extracción amino Sep-Pack®</p>
			
<p>Medidor de pH Thermo Electron Corporation® Orion 4-STAR™.</p>	<p>Manifold de filtrado conectado a una bomba de vacío</p>	<p>Balanza Analítica AB204 marca METTLER TOLEDO ®</p>	<p>Filtros de celulosa de 0,45 µm. Milipore. D = 25 mm</p>



Filtros de nylon de 0,45 μm . Micron. D= 25 mm



Filtros de celulosa CP 045AS de 0,45 μm . Advantec. D= 13 mm



Rotavapor Fisatom acoplado a un chiller Haake KT-33



Espectrofotómetro de UV/VIS Thermo Electron Corporation ® Evolution TM 300.



Centrífuga 5804 R. 15 amp versión. EPPENDORF ®.







Lazo de inyección de 20 μL para puerto de inyección del HPLC.



Molino de bolas de acero, modelo SPEX 8000D

El sistema de HPLC-RI consta de los siguientes componentes

	<p>Una bomba isocrática de HPLC, marca HP modelo 1100</p>		<p>Columna tipo PRP-1 de la casa Hamilton, de 5 μm de diámetro de partícula y dimensiones de 150 x 4,6 mm.</p>
	<p>Puerto de Inyección con una válvula de inyección, marca RHEODYNE modelo 7725i</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Detector de Índice de Refracción, marca HP-1047A, con un intervalo de T desde 30 hasta 50°C y un rango de sensibilidad desde 32 x 10 RIU a 1/64 x 10 RIU para la salida del registrador. - Sistema de Adquisición- Herramientas Biocrom.

3. MUESTRAS.

3.1. TRIGO PARTIDO #1.

La muestra de trigo partido #1, marca Miduchy fue obtenida en el año 2015 en el mercado Guaicaipuro ubicado en la ciudad de Caracas. La muestra se mantuvo almacenada en un desecador en una Bolsa tipo Ziploc con cierre hermético como se muestra en la figura 16.



Figura.16.Muestra de Trigo partido #1

3.2. QUINOA ECUATORIANA Y VENEZOLANA.

Las muestras fueron suministradas por la profesora Janeth Salas del Laboratorio de Espectrometría de Masas, Centro de Química, IVIC. La muestra comercial de quinoa venezolana fue obtenida en el estado Monagas y la muestra comercial de quinoa ecuatoriana fue traída de Ecuador; estas muestras comerciales se pueden visualizar en las figuras 17 y 18. Las semillas de la muestra comercial de Quinoa marca Verde Pamba producida en Ecuador y las semillas de la Top Quinoa producida en Venezuela fueron pasadas por un molino de bolas de acero, modelo SPEX 8000D por 15 minutos obteniéndose la harina de quinoa, el tamaño promedio de partícula fue igual a $1,2 \mu\text{m}$; este valor se obtuvo por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido.

Las muestras fueron almacenadas en un desecador en tubos de centrífuga Falcon® de 50 mL. Ambas muestras presentaron una diferencia en la coloración de la harina como se puede visualizar en la figura 19.



Figura.17. Muestra de Quinoa Ecuatoriana Verde Pamba.

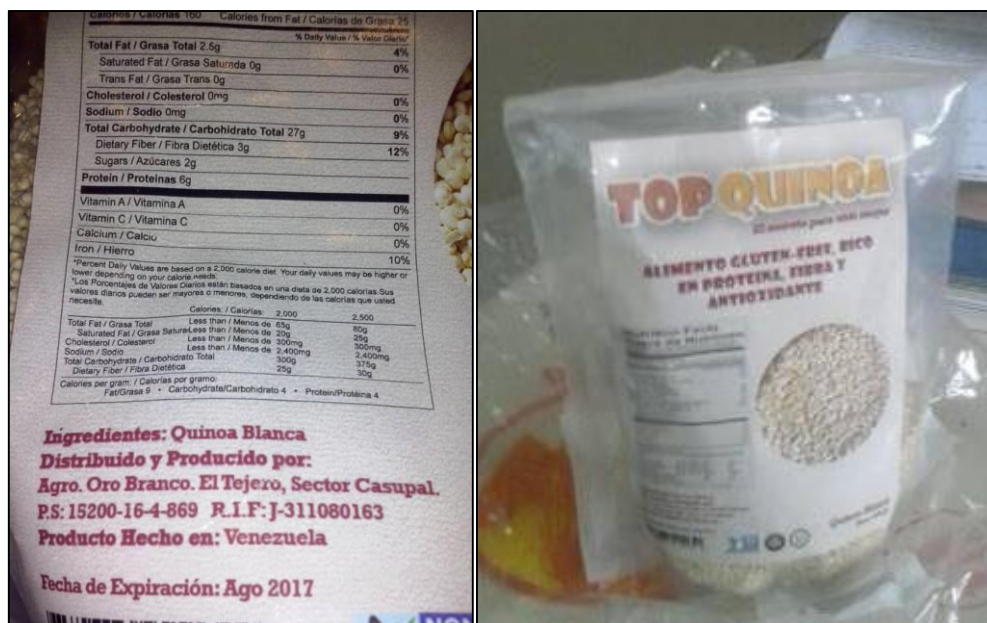


Figura.18. Muestra de Quinoa Venezolana Top Quinoa.

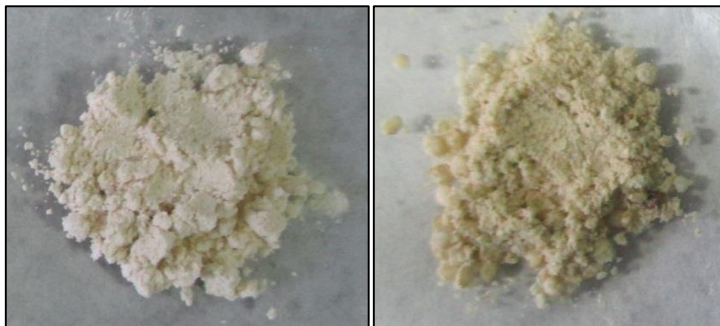


Figura. 19. Harina de Quinoa Venezolana (Izquierda) y Ecuatoriana (Derecha)

4. SECADO DE LAS MUESTRAS.

Durante el análisis para la determinación de ácido fítico puede haber absorción o liberación de agua dependiendo de la humedad del ambiente, dado que esto modifica la composición química de los sólidos las muestras se secaron por el proceso de Liofilización en un Liofilizador marca LABCONCO® como se muestra en la figura 20. Las muestras fueron previamente congeladas y luego se dejaron por 24 horas en el equipo a una presión entre (0,326-0,363) mBar y a una temperatura de -51°C para permitir que el agua congelada en las muestras se sublime. Las muestras de trigo partido #1 fueron pulverizadas en un mortero luego del proceso de liofilización hasta obtener un polvo fino como se muestra en la figura 21; con un número de mesh de 30 ($600\mu\text{m}$).



Figura.20. Liofilización de las muestras.

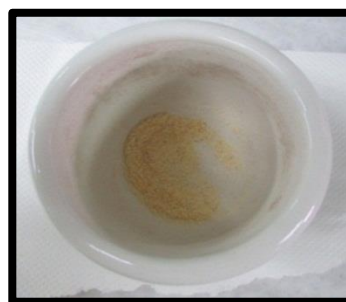


Figura.21. Trigo pulverizado.

Las muestras fueron almacenadas en un desecador en tubos de centrifuga Falcon ® de 50 mL.

5. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN LAS MUESTRAS.

La determinación de humedad en las muestras se hizo por el método de la AOAC [38]. Para ello se llevaron a peso constante 3 crisoles seguidamente se añadieron aproximadamente 1 g de la muestra en cada crisol, posterior a este paso los crisoles se dejaron en una estufa marca Lab-Line Imperial V a 100 °C por 24 horas. Se usó un desecador para dejar enfriar los crisoles antes de pesar en la balanza. Finalmente por diferencia de pesada se calcularon los porcentajes de humedad.

A continuación se muestra el procedimiento realizado para la determinación del porcentaje de humedad en las muestras una vez obtenido el peso constante de los crisoles.

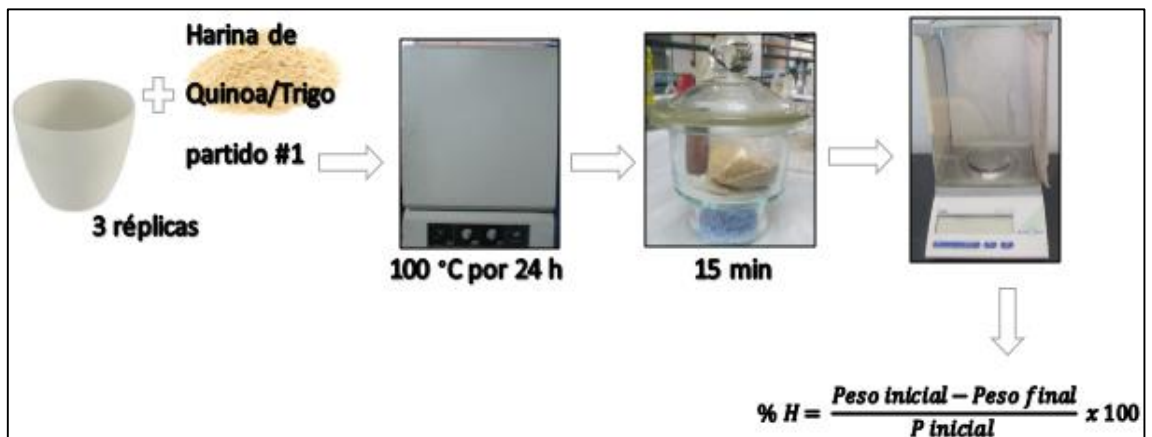


Figura.22. Procedimiento realizado para determinar el % de humedad en las muestras.

6. DETERMINACIÓN DE METALES EN LAS MUESTRAS.

Para la determinación de metales se empleó el método de cenizas, el cual consistió en la calcinación de la muestra a 450°C . Para ello, 7 g de las muestras (Trigo partido #1 y/o Harina de Quinoa) contenidas en cápsulas de porcelana se llevaron a una mufla marca Ney 2-160.Serie II por 24 horas. Pasadas las 24 horas las muestras fueron tratadas con gotas de HNO_3 al 65% p/p, asegurando que todas las cenizas de color gris se tornaron de color negro, y se colocó de nuevo en la mufla por otras 24 horas. Finalizadas las 24 horas se trataron las muestras de cenizas color blanco con gotas de HCl 37 % p/p hasta obtener una solución de color amarillo. Esta solución se transfirió cuantitativamente a un balón de 100mL en el caso de la muestra de Quinoa y a un balón de 50mL para la muestra de Trigo, obteniéndose una solución incolora luego del enrase. A partir de estas soluciones se tomaron alícuotas y se prepararon soluciones más diluidas para entrar en el rango de trabajo de la curva de calibración del elemento en análisis. En la figura 23 se muestra el tratamiento utilizado para las muestras por el método de ceniza

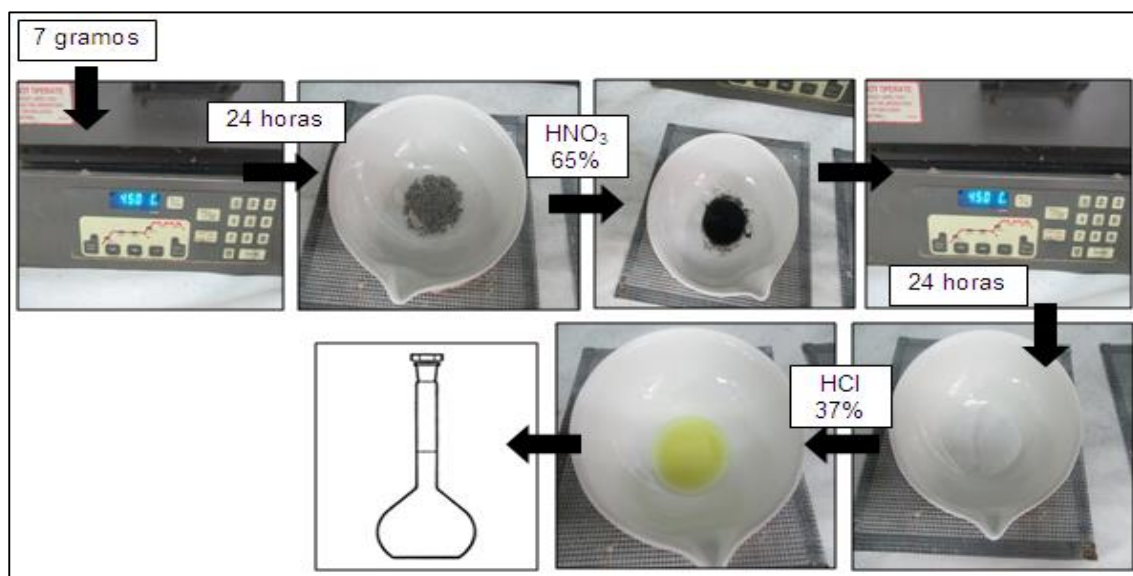


Figura.23. Tratamiento de las muestras por el método de ceniza.

Posterior a la calcinación de las muestras por el método de cenizas las concentraciones de Ca, Fe y Zn en Quinoa y Trigo se determinaron en un espectrómetro de absorción atómica marca novAA®350 – Analytic Jena AG. La llama utilizada fue de acetileno / aire y los parámetros instrumentales optimizados por el equipo se muestran a continuación:

Tabla.10. Parámetros instrumentales usados para la determinación de Fe, Ca y Zn.

Metal	Longitud de Onda (nm)	Rango óptimo de concentración
Fe	248,3	(2 - 9) ppm
Ca	422,7	(10 – 40) ppm
Zn	213,9	(0,4 – 1,5) ppm

Es importante señalar que las muestras de trigo y quinoa contienen fosfato inorgánico que no es eliminado durante la calcinación, este fosfato inorgánico forma compuestos de baja volatilidad con el calcio los cuales son relativamente estables en una llama de acetileno/aire (2200 a 2400 °C). Así la cantidad de átomos libres de calcio generados en la llama será menor que la obtenida con una solución de calcio de igual concentración, pero sin presencia de fosfato, provocando una disminución de la señal. Esta interferencia se puede resolver modificando la naturaleza de la llama, usando una más caliente de acetileno/óxido nitroso (2950 y 3050 °C) la cual es capaz eliminar o atenuar esta interferencia o por la adición de lantano (agente liberador) que logra suprimir el efecto del fosfato, ya que este tiene mayor afinidad al lantano que al calcio, de forma tal que deja libre al calcio en solución para ser medido totalmente. Dado que en el CQA no se disponía del Óxido Nitroso para formar esta llama se escogió la adición de Óxido de Lantano a las muestras para suprimir la formación de estos compuestos poco volátiles ^[39].

En el manual del equipo, el cual contiene las especificaciones de cada elemento para su análisis hacen mención de esta interferencia química para la determinación de calcio con una llama acetileno/aire y recomiendan el uso de 10.000 ppm de La en patrones y muestras para corregirla. Por esta razón se preparó una solución de óxido de lantano de 50.000 ppm de tal forma que al tomar una alícuota de 10 mL y luego enrasar en balones de 50 mL la concentración de lantano en las muestras y patrones sean de 10.000 ppm de La.

7. Análisis por HPLC-RI

Para determinar si la muestra de quinoa tiene presente otros inositoles fosfatos además del ácido fítico se realizó una inyección de la muestra en un HPLC. Las condiciones de trabajo se presentan a continuación:

7.1. Fase Móvil

La elección de la fase móvil se realizó con ayuda de los trabajos de Dilia Caripa (2008) ^[34] y Dhayezka Hernández (2015) ^[25]. La fase móvil usada fue de: 5% metanol y 0,14% de hidróxido de tetraetilamonio con un ajuste de pH = 4,06 con ácido fórmico al 85%. Esta fase móvil fue filtrada con un filtro acuoso de 0,45 µm en un sistema de filtración de solventes conectado a una bomba de vacío. Finalmente la fase móvil fue desgasificada en un ultrasonido por 30 minutos.

7.2. Tratamiento de la harina de quinoa ecuatoriana para análisis por HPLC.

Se pesaron ($0,5000 \pm 0,0003$) g de la muestra y se procedió a realizar la extracción del ácido fítico con 8 mL de HCl 0,5 M agitando mecánicamente por 4 horas. Acto seguido se centrifugó la muestra a 3400rpm a 10°C por 10 minutos, el líquido fue decantado a un balón de 25 mL y el residuo se trató con 3mL del HCl 0,5 M y se volvió a centrifugar para finalmente decantar este sobrenadante al balón de 25 mL y enrasar con agua desionizada.

Una alícuota de 6mL de la muestra se pasó por el cartucho amino para finalmente eluir el ácido fítico retenido del mismo con 5 mL de HCl 2 M, esta muestra fue recolectada en un balón fondo plano de boca 24/40 para ser rotaevaporada. La rotaevaporación de la muestra a sequedad se realizó a 40°C por 35 min a 80rpm. Finalmente se usaron 5 mL de la fase móvil para redissolver el residuo. Esta muestra fue inyectada al cromatógrafo bajo las siguientes condiciones: temperatura del detector y de la columna 40°C, volumen de inyección de 20 μ L y flujo de fase móvil de 0,8 mL/min. Para este ensayo se inyectó la muestra y un patrón de ($344,3 \pm 3,3$) ppm de IP₆. Tanto la muestra como el patrón fueron filtrados con filtros de celulosa de 0,45 μ m antes de ser inyectadas a la columna.

8. DISEÑO FACTORIAL.

Dadas las diferencias matriciales de las muestras de trigo y de quinoa, especialmente en el contenido mineral y de grasas se decidió hacer la optimización del método de extracción del ácido fítico con el uso de diseños factoriales tanto en la muestra de trigo como en la muestra de quinoa ecuatoriana (que era la disponible para

el momento de este estudio). Una vez obtenido el método de extracción óptimo para la quinoa ecuatoriana se utilizó el mismo para el análisis de la quinoa venezolana, tomando en cuenta que las matrices de ambas muestras son similares. Con el objetivo de realizar esta optimización se emplearon dos diseños factoriales 2^3 para establecer el efecto de las diferentes variables sobre la extracción del ácido fítico en las muestras de trigo y quinoa.

8.1. DISEÑO FACTORIAL N°1.

En la tabla 11 están tabuladas las variables y niveles que se emplearon para el diseño factorial N°1 tanto para el trigo como para la quinoa ecuatoriana.

Tabla.11.Variabes para el diseño factorial N°1.

Variables		-	+
A	Tipo de ácido	HCl	TCA
B	Tipo de extracción	Ultrasonido	Agitación mecánica
C	Tiempo de extracción	Corto	Largo

En la siguiente tabla se especifican las condiciones de algunas variables del diseño factorial:

Tabla.12.Condiciones de algunas variables del diseño factorial N°1

Tipo de Extracción	Tiempo de Extracción (h)	
	Corto	Largo
Ultrasonido	2	4
Agitación Mecánica	2	4

En este diseño se utilizó el ácido clorhídrico en una concentración de 0,5 M y el ácido tricloroacético en una concentración de 0,3 M para el trigo mientras que para el diseño factorial de la quinoa ecuatoriana se usó una concentración del ácido tricloroacético de 0,6 M. En la tabla 13 se muestran las diferentes combinaciones de variables y niveles del diseño factorial N°1.

Tabla.13.Diferentes combinaciones de las variables del diseño factorial N°1

Experimento	A		B		C	
1	+	TCA	+	Ag. Mecánica	+	4 h
2	+	TCA	+	Ag. Mecánica	-	2 h
3	+	TCA	-	Ultrasonido	+	4 h
4	+	TCA	-	Ultrasonido	-	2 h
5	-	HCl	+	Ag. Mecánica	+	4 h
6	-	HCl	+	Ag. Mecánica	-	2 h
7	-	HCl	-	Ultrasonido	+	4 h
8	-	HCl	-	Ultrasonido	-	2 h

8.2. DISEÑO FACTORIAL N°2.

En la tabla 14 están tabuladas las variables y niveles que se emplearon para el diseño factorial N°2 tanto para el trigo como para la quinoa ecuatoriana.

Tabla.14.Variabes para el diseño factorial N°2 para trigo.

Variables		-	+
A	Tipo de extracción	Ultrasonido	Agitación mecánica

B	Concentración del ácido	Baja	Alta
C	Tipo de ácido	HCl	TCA

En la siguiente tabla se especifican las condiciones para las concentraciones de los ácidos que se emplearon. Para la aplicación de este diseño se utilizó el tiempo de extracción de 4 h.

Tabla.15. Condiciones de algunas variables del diseño factorial N°2 para trigo.

Tipo de Ácido	Concentración del ácido (M)	
	Baja	Alta
HCl	0,5	2,0
TCA	0,3	0,6

Las concentraciones de TCA observadas en la tabla 15 corresponden a las variables del diseño factorial del trigo. Para el diseño factorial de la quinoa ecuatoriana las variables de concentración para el ácido tricloroacético fueron de 0,6 M y 0,9 M como baja y alta concentración respectivamente, mientras que las del ácido clorhídrico fueron iguales a las empleadas para el trigo.

En la tabla 16 se muestran las diferentes combinaciones de variables y niveles del diseño factorial N°2 para el trigo.

Tabla.16. Diferentes combinaciones de las variables del diseño factorial N°2

Experimento	A		B		C	
1	+	Ag. Mecánica	+	0,6 M	+	TCA
2	+	Ag. Mecánica	+	2,0 M	-	HCl

3	+	Ag. Mecánica	-	0,3 M	+	TCA
4	+	Ag. Mecánica	-	0,5 M	-	HCl
5	-	Ultrasonido	+	0,6 M	+	TCA
6	-	Ultrasonido	+	2,0 M	-	HCl
7	-	Ultrasonido	-	0,3 M	+	TCA
8	-	Ultrasonido	-	0,5 M	-	HCl

A continuación se muestra el procedimiento de forma general seguido para la extracción del ácido fítico en los diseños factoriales.

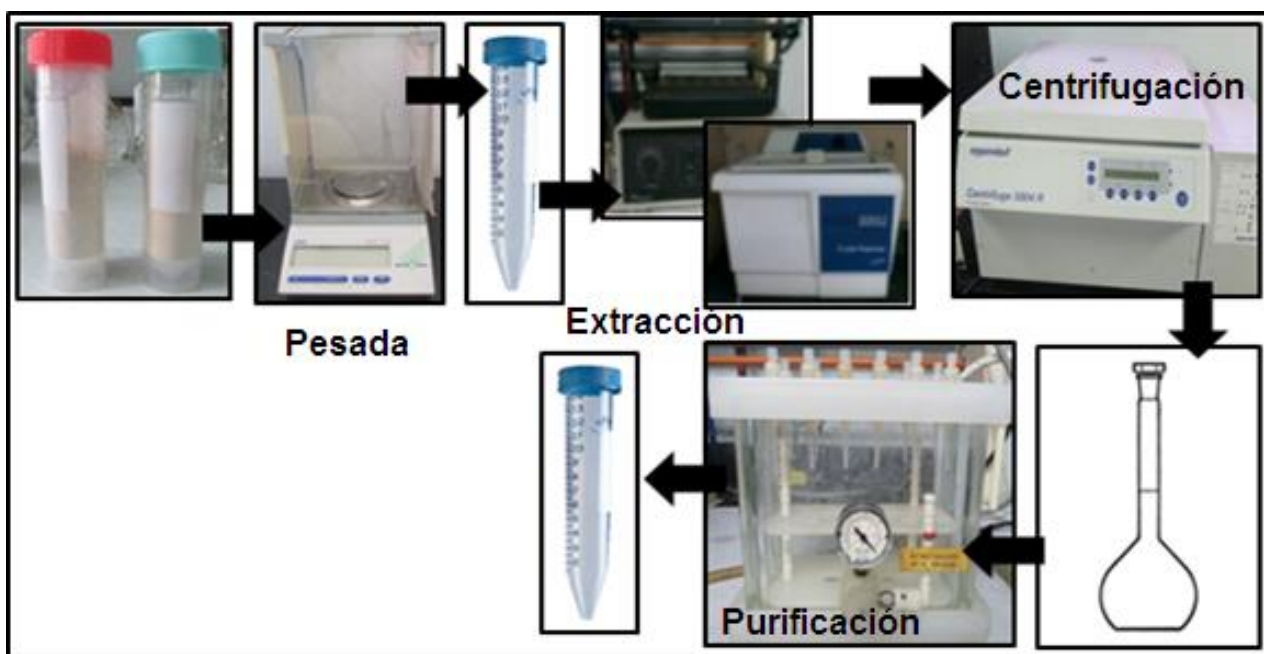


Figura.24. Procedimiento general de extracción del ácido fítico usado en los diseños factoriales.

9. EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO FÍTICO.

Se pesó una cantidad de la muestra (1g para el trigo y 0,5 g para la quinoa) en un tubo de centrífuga, se agregó 8 mL del ácido de extracción y se realizó la extracción tomando en cuenta las variables de los diseños factoriales. Pasado el tiempo de extracción las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 3400 rpm a una temperatura de 10°C, el sobrenadante se decantó a un balón de 25 mL y el residuo fue tratado con 5 mL del ácido de extracción agitando con un capilar de vidrio para realizar el lavado del residuo. Se centrifugaron nuevamente las muestras por otros 10 minutos, el sobrenadante se decantó al mismo balón de 25 mL para finalmente enrasar con agua destilada. Por último, las muestras fueron filtradas antes de pre-concentrar una alícuota de las mismas en el cartucho amino de intercambio aniónico con la ayuda de un Manifold, empleando filtros de celulosa o de nylon de 0,45 μm dependiendo de la turbidez de la muestra.

10. DETERMINACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN.

Todo nuevo método analítico debe validarse para demostrar su idoneidad, para evaluar la validez del método se determinaron los porcentajes de recuperación del analito, para ello se preparó una solución de $(5806,4 \pm 10,9)$ ppm de ácido fítico a partir de la sal dipotásica al 92% pureza, posterior a ello se pesaron cuatro réplicas de trigo liofilizado de $(0,5000 \pm 0,0003)$ g, a dos de ellas se le añadieron 1mL de la solución madre de $(5806,4 \pm 10,9)$ ppm y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Pasadas las 24 horas se procedió a extraer el ácido fítico con el método de extracción optimizado en el análisis multivariado. Para el caso de la quinoa ecuatoriana y

venezolana se realizó el mismo procedimiento a diferencia de que se pesaron ($0,2000 \pm 0,0003$) g de la muestra.

11. PRECONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO FÍTICO EN EL CARTUCHO AMINO.

Se dispuso de un montaje de extracción, en el cual se acopló una inyectora a un filtro de celulosa de $0,45 \mu\text{m}$ que a su vez estaba acoplado al cartucho amino. Este cartucho de intercambio aniónico, fue activado previamente al hacerle pasar alícuotas sucesivas de 10 mL de las siguientes disoluciones: agua destilada, HCl 0,5 M, HCl 2,0 M, HCl 0,5 M y agua destilada. Estas disoluciones fueron desechadas.

La introducción de la muestra al cartucho se hizo agregando 10 mL de agua destilada en una inyectora de 50 mL; seguido de 5 mL de la muestra y finalmente se completó el volumen de la inyectora con agua destilada, luego se pasó toda la solución al cartucho. El lavado del cartucho de extracción se hizo con 10 mL de agua destilada seguido de 10 mL de una disolución de HCl 0,05M. Estas alícuotas fueron añadidas en la misma inyectora usada para introducir la muestra de manera de arrastrar todo el analito que pudiese existir en la inyectora. Finalmente el analito fue eluido del cartucho con 5mL de HCl 2,0 M y recolectado en un balón de 25mL.

12. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO POR EL MÉTODO FOTOCOLORIMÉTRICO BASADO EN LA UTILIZACIÓN DEL REACTIVO DE WADE.

La etapa final consistió en colocar una alícuota de 2 mL de la disolución obtenida en la pre-concentración del ácido fítico en un balón de 10 mL. El pH de esta solución que es aproximadamente de 1,4 se llevó a pH cercano a 2,0 con 0,30 mL de una

solución de NaOH 2,0 M, se añadió 1 mL del reactivo de Wade y finalmente se enrasó con agua destilada ajustada a pH=2,1. Esto se realizó de esta forma porque el color de la solución se ve afectada por el pH del medio ^[32]. A continuación se muestra el procedimiento general usado para la determinación de ácido fítico tanto en trigo como en quinoa.

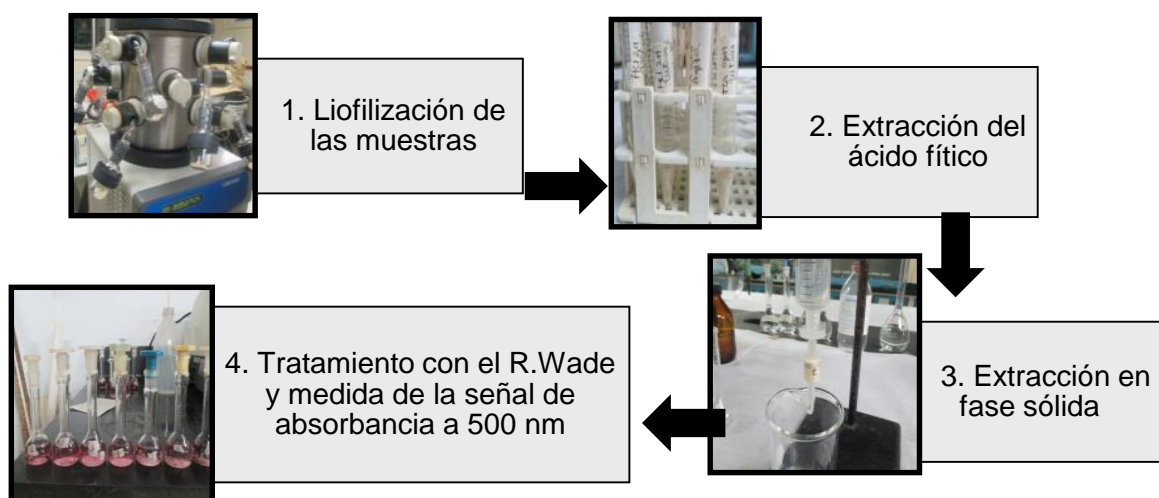


Figura.25. Procedimiento general usado para la determinación de ácido fítico.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN LAS MUESTRAS

1.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN LA MUESTRA DE TRIGO PARTIDO N°1

En la siguiente tabla se muestran los resultados de humedad obtenidos para el trigo partido n°1 empleando el método de la AOAC ^[38]

Tabla.17. Porcentaje de Humedad en el Trigo Partido #1.

Réplica	Trigo inicial ($\pm 0,0001$) g	Trigo final ($\pm 0,0001$) g	% Humedad
1	1,0034	0,9172	8,5908
2	1,0014	0,9169	8,4382
3	1,0051	0,9198	8,4867
% Humedad en Trigo partido #1 = $(8,50 \pm 0,08)$ % C.V = 0,94 %			

El porcentaje de humedad encontrado está por debajo del valor máximo de humedad (14,5 %) permitido para el trigo por la norma del CODEX ^[40].

1.2. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN LA MUESTRA DE HARINA DE QUINOA ECUATORIANA Y VENEZOLANA.

En las siguientes tablas se muestran los resultados de humedad obtenidos para las muestras de quinoa empleando el método de la AOAC ^[38]

Tabla.18. Porcentaje de Humedad en la Harina de Quinoa Ecuatoriana.

Réplica	Quinoa inicial ($\pm 0,0001$) g	Quinoa final ($\pm 0,0001$) g	% Humedad
1	1,0001	0,8827	11,7388
2	1,0001	0,8841	11,5988
3	1,0000	0,8843	11,5700
% Humedad en la Harina de Quinoa Ecuatoriana = $(11,6 \pm 0,1)$ % C.V = 0,86 %			

Tabla.19. Porcentaje de Humedad en la Harina de Quinoa Venezolana.

Réplica	Quinoa inicial ($\pm 0,0001$) g	Quinoa final ($\pm 0,0001$) g	% Humedad
1	1,0028	0,1100	11,0690
2	1,0008	0,1087	10,8613
% Humedad en la Harina de Quinoa Venezolana = (11,0 \pm 0,1) % C.V = 0,91 %			

El porcentaje de humedad en ambas muestras se encuentran dentro del rango de % de humedad encontrado por varios autores en muestras de harina de quinoa (9,4 – 13,4) % [41].

2. DETERMINACIÓN DE METALES EN LAS MUESTRAS

A continuación se presentan las curvas de calibración obtenidas para Ca, Fe y Zn bajo las condiciones instrumentales presentadas en la tabla 10, las cuales fueron usadas para la determinación del contenido de estos metales en las muestras de trigo y quinoa. Los patrones fueron preparados simulando lo mejor posible la matriz de las muestras para evitar las interferencias físicas, es decir que el contenido ácido añadido en la calcinación de las muestras e inclusive el lantano añadido en las muestras de calcio también fue agregado en los patrones manteniendo el mismo factor de dilución. Es de indicar que el proceso de calcinación de las muestras lleva alrededor de 48 horas y no se podían medir las 3 réplicas de las muestras al mismo tiempo por falta de espacio en la mufla, por esta razón cada vez que se procedía a medir una nueva muestra proveniente de algún otro día de preparación se medían algunos patrones para verificar las curvas de calibración. Por otro lado, la determinación de metales de la

quinoa venezolana se hizo unos meses después del análisis de metales de la quinoa ecuatoriana ya que para este tiempo se logró tener a disposición esta muestra para el análisis, por esta razón las curvas de calibración tuvieron que volver a ser realizadas.

Curva de Calibración para el Hierro

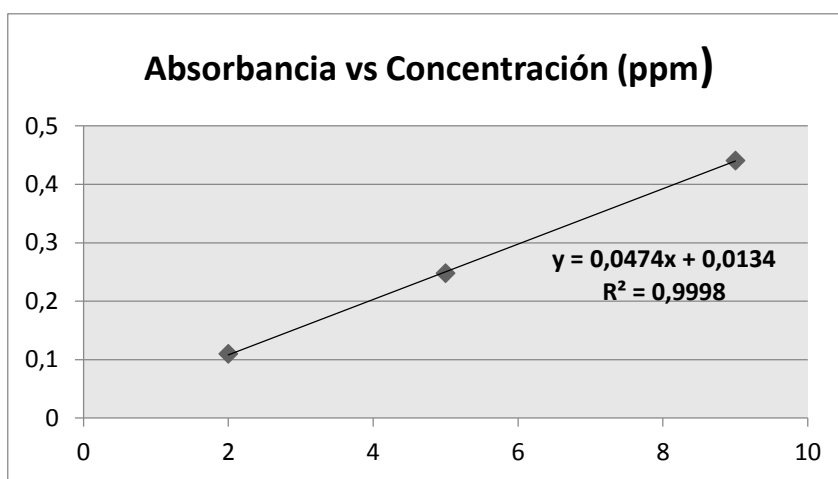


Figura.26. Absorbancia vs Concentración de Fe (ppm)

Curva de Calibración para el Zinc

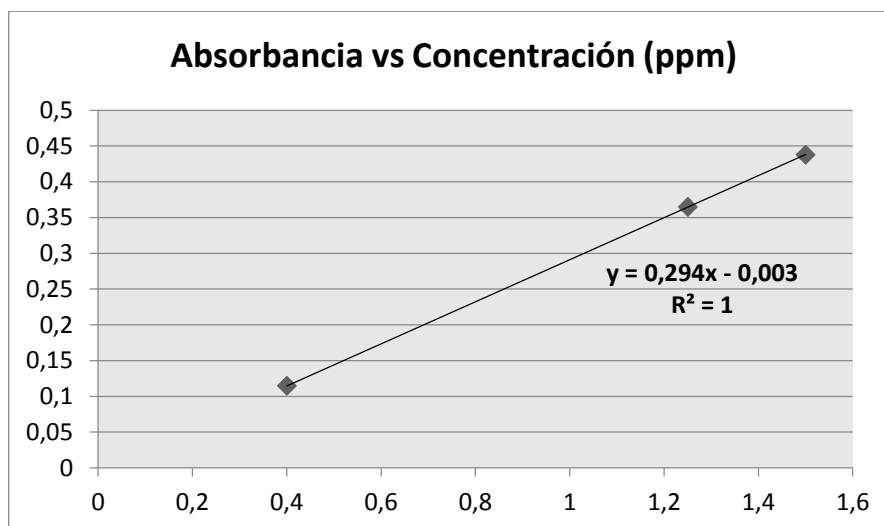


Figura.27. Absorbancia vs Concentración de Zn (ppm)

Curva de Calibración para el Calcio

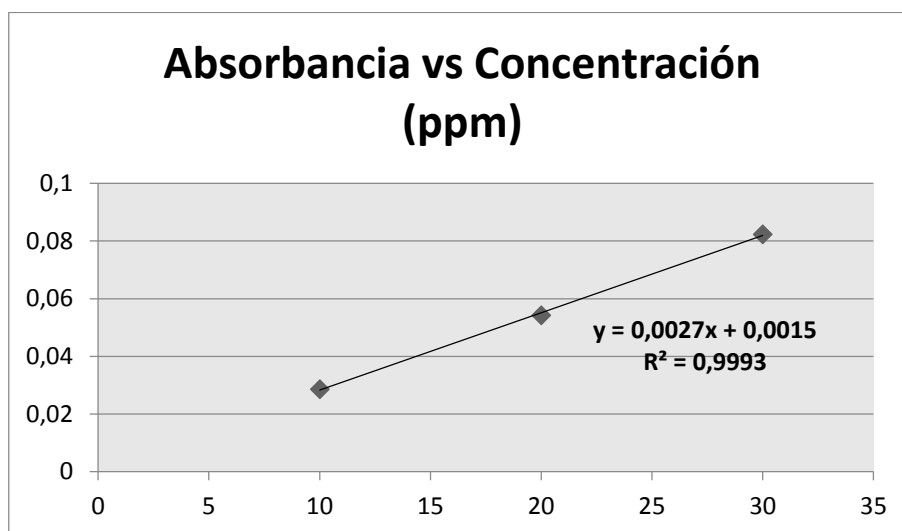


Figura.28. Absorbancia vs Concentración de Ca (ppm)

2.1. DETERMINACIÓN DE METALES EN EL TRIGO

DETERMINACIÓN DE HIERRO

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el hierro (Fe) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.20. Contenido de Hierro en Trigo

Muestra	[Fe] (ppm)	mg Fe / 100 g muestra
1	0,23912	3,71737
	0,23832	3,70420
2	0,24252	3,77337
	0,24542	3,81960

3	0,25232	3,93319
	0,25752	4,01880
mg Fe / 100 g muestra = $3,8 \pm 0,1$ C.V.= 3,3 %		

DETERMINACIÓN DE ZINC

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el zinc (Zn) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.21.Contenido de Zinc en Trigo

Muestra	[Zn] (ppm)	mg Zn / 100 g muestra
1	0,394253	4,39501
	0,393253	4,38395
2	0,392453	4,37510
	0,443953	4,94289
3	0,445553	4,96058
	0,444953	4,95395
mg Zn / 100 g muestra = $4,7 \pm 0,3$ C.V.= 6,7 %		

DETERMINACIÓN DE CALCIO

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el calcio (Ca) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.22. Contenido de Calcio en Trigo

Muestra	[Ca] (ppm)	mg Ca / 100 g muestra
1	0,03578	33,07061
	0,03566	32,97209
2	0,03535	32,71757
	0,03687	33,95194
3	0,03693	34,00118
	0,03595	33,19690
mg Ca / 100 g muestra = $33,3 \pm 0,5$ C.V.= 1,6 %		

La tabla 23 muestra los valores del contenido de minerales (Ca, Fe y Zn) en 3 tipos de trigo reportados por la USDA ^[42] en comparación con los valores encontrados en este trabajo para la muestra de trigo analizada.

Tabla.23. Comparación de Ca, Fe y Zn de 3 tipos de trigo reportados por la USDA con el trigo analizado en este trabajo.

	mg Fe / 100 g trigo	mg Zn / 100 g trigo	mg Ca / 100 g trigo
Trigo Duro	3,52	4,16	34,0
Trigo Blanco Suave	5,37	3,46	34,0
Trigo Blanco Duro	4,56	3,33	32,0
Trigo analizado en este trabajo	$3,8 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,3$	$33,3 \pm 0,5$

Como se puede observar en la tabla 23 el contenido de minerales obtenido para el trigo se encuentra dentro de los valores reportados por la USDA ^[42] para diferentes tipos de trigo, teniendo mayor similitud con los valores reportados para el trigo duro. Los coeficientes de variación observados entre 1 a 7% están asociados a la heterogeneidad de las muestras estudiadas.

2.2. DETERMINACIÓN DE METALES EN LA HARINA DE QUINOA ECUATORIANA

DETERMINACIÓN DE HIERRO

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el hierro (Fe) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.24.Contenido de Hierro en Harina de Quinoa Ecuatoriana.

Muestra	[Fe] (ppm)	mg Fe / 100 g muestra
1	0,25648	8,28744
	0,25668	8,29426
2	0,25748	8,32154
	0,26898	8,71324
3	0,27378	8,87688
	0,27298	8,84961
mg Fe / 100 g muestra = $8,6 \pm 0,3$ C.V.= 3,3 %		

DETERMINACIÓN DE ZINC

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el zinc (Zn) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.25.Contenido de Zinc en Harina de Quinoa Ecuatoriana.

Muestra	[Zn] (ppm)	mg Zn / 100 g muestra
1	0,134307	3,77367
	0,134307	3,77367
2	0,135607	3,80940
	0,135907	3,81748
3	0,136307	3,82847
	0,136007	3,82023
mg Zn / 100 g muestra = $3,8 \pm 0,02$ C.V.= 0,6 %		

DETERMINACIÓN DE CALCIO

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el calcio (Ca) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.26.Contenido de Calcio en Harina de Quinoa Ecuatoriana.

Muestra	[Ca] (ppm)	mg Ca / 100 g muestra
	0,03812	69,98358
	0,03921	71,77340

1		
2	0,03712	68,34154
	0,03723	68,52217
3	0,03812	69,98358
	0,03921	71,77340
mg Ca / 100 g muestra = $69,7 \pm 1,6$ C.V.= 2,3 %		

2.3. DETERMINACIÓN DE METALES EN LA HARINA DE QUINOA VENEZOLANA

DETERMINACIÓN DE HIERRO

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el hierro (Fe) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.27.Contenido de Hierro en Harina de Quinoa Venezolana

Muestra	[Fe] (ppm)	mg Fe / 100 g muestra
1	3,998336721	7,4943
	4,005729070	7,4981
2	4,024209943	7,5327
	4,334688597	8,1131
3	4,377194604	8,1926
	4,440029569	8,3102
mg Fe / 100 g muestra = $7,9 \pm 0,4$ C.V.= 5 %		

DETERMINACIÓN DE ZINC

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el zinc (Zn) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.28.Contenido de Zinc en Harina de Quinoa Venezolana.

Muestra	[Zn] (ppm)	mg Zn / 100 g muestra
1	0,6535455053	3,0583
	0,6344221106	2,9689
2	0,6903964266	3,2308
	0,6331658291	2,9627
3	0,6525683975	3,0535
	0,6640145170	3,1070
mg Zn / 100 g muestra = 3,1 ± 0,1 C.V.= 3,2 %		

DETERMINACIÓN DE CALCIO

A partir de la ecuación de la recta elaborada para el calcio (Ca) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla.29.Contenido de Calcio en Harina de Quinoa Venezolana.

Muestra	[Ca] (ppm)	mg Ca / 100 g muestra
1	27,25477288	85,0280
	26,97827518	84,1654

2	27,53127057	85,8906
	29,80908492	92,9875
3	30,25674786	94,3933
	29,80250165	92,9763
mg Ca / 100 g muestra = 89 ± 5 C.V.= 5,6 %		

A continuación se muestra un resumen del contenido de minerales encontrado en las muestras de trigo y en las muestras de harina de quinoa tanto ecuatoriana como venezolana.

Tabla.30. Resumen del contenido de minerales presentes en las 3 muestras analizadas.

	mg Fe / 100 g muestra	mg Zn / 100 g muestra	mg Ca / 100 g muestra
Trigo	$3,8 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,3$	$33,3 \pm 0,5$
Harina de Quinoa Ecuatoriana	$8,6 \pm 0,3$	$3,80 \pm 0,02$	$69,7 \pm 1,6$
Harina de Quinoa Venezolana	$7,9 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,1$	89 ± 5

A partir de la tabla anterior se puede observar la diferencia en el contenido de hierro y calcio entre el trigo y ambas muestras de quinoa. Los resultados dejan en evidencia lo ya expuesto por otros autores ^[5, 18,19] en cuanto al alto contenido mineral que tiene la quinoa en comparación a otros cereales, el trigo en este caso. Sin embargo, se puede notar también diferencia en cuanto a este contenido mineral en

ambas muestras de quinoa, la diferencia más relevante es que la quinoa venezolana tiene un mayor contenido de calcio que la quinoa ecuatoriana.

Los resultados de Calcio y de Zinc encontrados para ambas muestras de quinoa están dentro de los siguientes rangos (52,4 – 146,3) mg Ca/100 g y (0,43 – 6,11) mg Zn/100 g reportados por Rosero O. et al (2013) ^[36] y Olivera P. et al (2014) ^[37] para diferentes variedades de quinoa comerciales y no comerciales procedentes de Bolivia y Perú. Sin embargo, el contenido de Hierro se ubica por debajo a lo reportado por dichos autores (11,1-13,5) mg Fe/ 100 g. Estos resultados dan en evidencia que la cantidad de minerales en las semillas de quinoa depende de la variedad de quinoa y de la zona de cultivo.

Por otro lado, las semillas de quinoa se pueden adquirir como integrales (con cáscara), descascaradas (cáscara removida) o descascaradas con posterior lavado (saponinas extraídas), en cada caso la composición química será diferente ^[16]. La remoción de la cáscara reduce significativamente el contenido de calcio en la semilla mientras que en las semillas lavadas para eliminación de saponinas luego de descascaradas tienen un menor contenido de hierro según lo publicado por autores como Konishi et al (2004) ^[43], Hitomi et al (2002) ^[44] y Ranhotra et al (1993) ^[45]. Las muestras de quinoa analizadas en este trabajo son del tipo comercial por tanto han sido sometidas a un proceso de limpieza, escarificación, lavado, despedrado y selección, para tener un producto apto para su consumo ^[16]. Debido a esto puede esperarse que el contenido de Calcio y Hierro en estas muestras disminuyera significativamente por estos procesos. Es así que el contenido de Calcio encontrado para la quinoa ecuatoriana y venezolana es similar al encontrado por Ranhotra ^[45] en una muestra comercial de colorado e igual a 70 mg Ca/100 g peso seco y por Jenny y Baboo ^[34] en una muestra de quinoa procedente de Ecuador e igual a 87,4 mg Ca /100 g peso seco

respectivamente. Por otro lado el contenido de Hierro encontrado en estas muestras están dentro del rango reportado por Hitomi y Ranhotra (6,3 - 9,2 mg/100 g peso seco) para diferentes variedades de quinoa con remoción de cáscara y saponinas. Finalmente el contenido de Zinc reportado en estas muestras es cercano al reportado por Ranhotra (3,2 mg Zn/100 g peso seco). Estos resultados demuestran que el contenido mineral en las semillas de quinoa también depende del tipo de tratamiento que hayan sufrido los granos de quinoa.

3. ENSAYO PRELIMINAR POR HPLC-RI

El principal inconveniente en los métodos fotocolorimétricos es que pueden sobreestimar el contenido de ácido fítico debido a su falta de especificidad. Por ello estos métodos son válidos para cereales que se encuentran en estado natural, ya que en ellos básicamente sólo hay ácido fítico, no aconsejándose su uso en alimentos procesados ya que estos contienen también cantidades apreciables de compuestos desfosforilados del ácido fítico como IP₅, IP₄, IP₃ y posiblemente IP₂ e IP. Estos inositoles fosfatos también son retenidos en el cartucho amino y por tanto también son eluidos con el HCl 2,0M durante la preconcentración del ácido fítico siendo también incluidos en el cálculo de este compuesto [27].

Las muestras empleadas en este estudio son del tipo comercial, pero en grano entero por lo que se debería esperar que solo deban contener el ácido fítico. Para corroborar este hecho se procedió a realizar un análisis cualitativo de la harina obtenida de la quinoa ecuatoriana por HPLC-RI. Este método de HPLC-RI a emplear permite separar los inositoles fosfatos del IP₃ a IP₆ en el caso de estar presentes en la muestra. A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos de la muestra y de un patrón de concentración conocida e igual a (344,3 ± 3,3) ppm IP₆

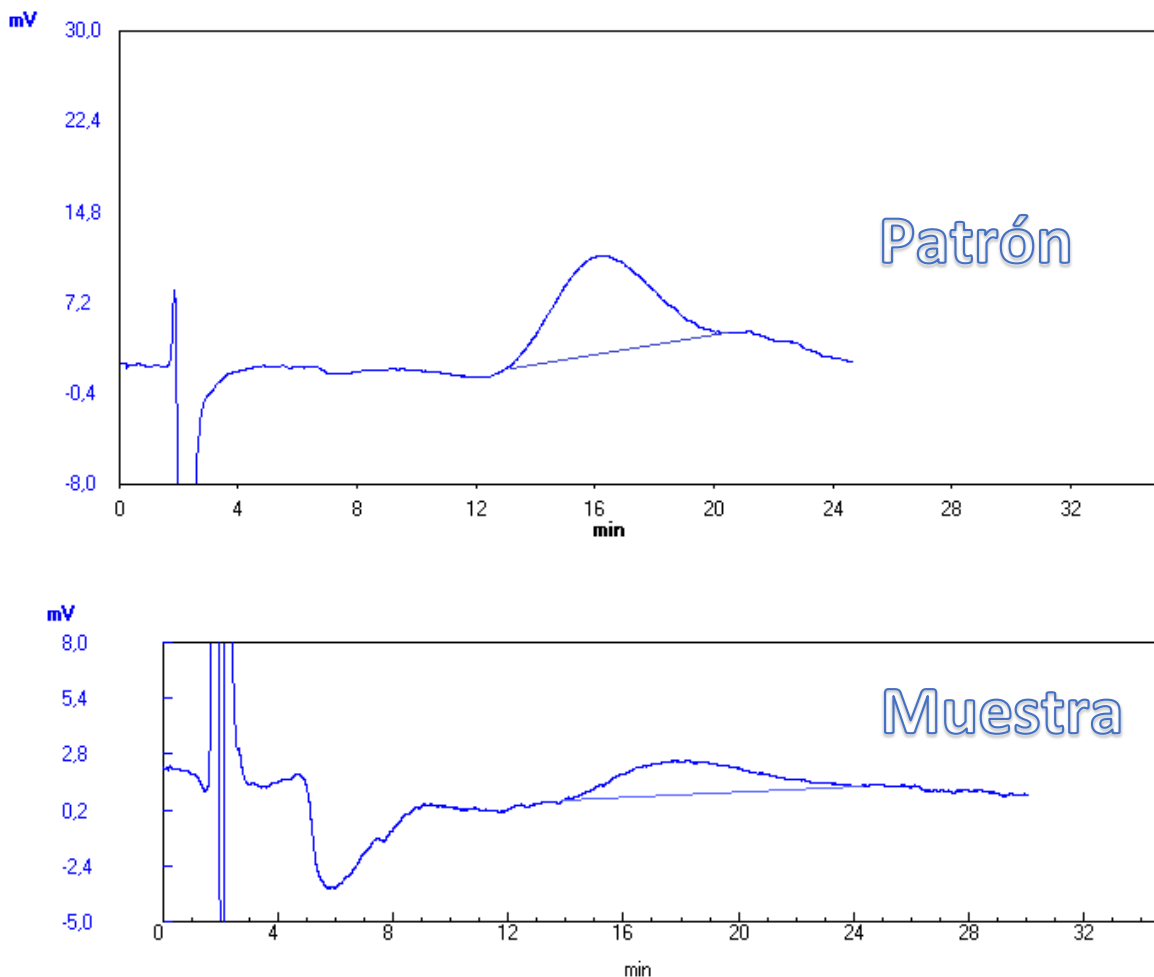


Figura.29. Cromatogramas de un patrón de $(344,3 \pm 3,3)$ ppm de IP_6 y de la muestra de harina de quinoa ecuatoriana.

De los cromatogramas se puede deducir que el pico observado en los 17 min corresponde al ácido fítico, dado que el tiempo de retención en muestra y patrón son muy similares. En los primeros 4 minutos del cromatograma se observa la alteración de la señal de IR producto del solvente y componentes de la muestra no retenidos. Los inositoles del IP_3 al IP_5 suelen aparecer entre los 4 y 12 min en las condiciones experimentales aplicadas en este análisis ^[46] por lo que se puede indicar que no existen picos correspondientes a estos inositoles fosfato. Se puede apreciar una señal negativa

en la muestra, la misma debe estar asociada a un componente de la muestra que no fue eliminado en el proceso de purificación de la misma, sin embargo aun estando esta alteración no se aprecia los picos de los inositoles de menor grupo fosfato en el cromatograma. Es así que se puede corroborar entonces que en estas muestras no están presentes los inositoles fosfatos IP₅, IP₄ y IP₃ lo que permite el uso de métodos fotocolorimétricos para la cuantificación de ácido fítico en las mismas.

4. ENSAYOS PRELIMINARES DEL REACTIVO DE WADE Y DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Luego que las muestras son preconcentradas en el cartucho amino de intercambio aniónico las mismas quedan en una matriz ácida. El reactivo de Wade a pH muy ácidos pH<2 sufre una disminución en la señal de absorbancia debido a que a pH<2 el ácido sulfosalicílico se protona haciéndolo incapaz de formar el complejo con el Hierro. En estudios anteriores [25,32,34,35] esta matriz ácida es eliminada rotaevaporando las muestras; este paso es esencial en HPLC-RI dado que se implementa para evitar el daño de la columna o la aparición de una señal indeseada en el sistema de detección, sin embargo en este trabajo la cuantificación se realiza por un método fotocolorimétrico con el objetivo de simplificar los pasos de tratamiento de la muestra y tratar de disminuir lo más posible las pérdidas del analito durante el tratamiento de muestra cómo fue reportado por Daniela Salas en el 2010 [32], donde observó que el paso de la rotaevaporación puede generar una pérdida cercana al 15% del analito. Para ello se hizo un estudio de cómo afecta el pH la señal de absorbancia del reactivo de Wade.

La primera prueba consistió en el ajuste del pH a 4,0 con un buffer de CH₃COOH/CH₃COONa, el resultado fue un cambio en la coloración del reactivo de

vinotinto a pardo. Este fenómeno se puede explicar porque el catión de Fe^{+3} es pequeño y posee una gran facilidad para hidrolizarse con el agua entre pH 2-3 , y para pH mayores de 3 se forman especies aún más condensadas como el óxido férrico hidratado $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{nH}_2\text{O}$ de color rojo pardo el cual es soluble a este pH pero imparte un color amarillento a la solución [47].

Se observa también que cuando se prepara el reactivo de Wade el pH de la solución es 2,1 y cuando se enrasa solo con agua destilada se observa un cambio de color de esta solución por lo que se procedió a ajustar el pH del agua destilada a 2,1 con ayuda de HCl antes de agregar la misma al reactivo de Wade obteniendo la estabilidad del color vinotinto. La absorbancia de esta solución fue de 0,864; a su vez esta solución se comparó con un blanco el cual consistía en el reactivo de Wade más agua destilada sin ajuste de pH, el cual presentó una absorbancia de 0,863. Debido a la similitud de ambas absorbancias se procedió a trabajar a pH 2,1. Para evaluar la eficiencia en la recuperación del procedimiento de cuantificación propuesto (con el paso de preconcentración con cartucho amino con respecto a la ausencia de este paso) se prepararon 2 disoluciones patrones de $(28,27 \pm 0,07)$ ppm de IP_6 y $(141,3 \pm 0,4)$ ppm de IP_6 a partir de una disolución de $(1009,5 \pm 2,5)$ ppm de ácido fítico.

A partir de la disolución de $(28,27 \pm 0,07)$ ppm de IP_6 se tomó una alícuota de 4 mL se llevó a un balón de 10mL y se le realizó el tratamiento directo con 1mL del reactivo de Wade antes de enrasar. A su vez se tomaron 5 mL de la disolución de $(141,3 \pm 0,4)$ ppm de IP_6 y se hizo pasar por el cartucho amino, el ácido fítico fue eluido con 5mL de HCl 2,0 M y fue recolectado en un balón de 25mL el cual fue enrasado posteriormente. Finalmente de esta última solución se tomaron 4 mL, se le ajusto el pH a 2,0 y se realizó el tratamiento con 1 mL del reactivo de Wade antes de enrasar en un balón de 10mL con agua destilada con pH ajustado a 2,1.La recuperación encontrada

con el uso de la preconcentración con cartucho amino fue del 87%, este porcentaje es mayor al reportado por Daniela Salas en el 2010 (79%).

Una vez establecidas estas condiciones se decidió evaluar la linealidad de la curva de calibración y en qué rango de concentración de ácido fítico en que se debía trabajar, para ello se preparó una disolución de $(51,0 \pm 0,1)$ ppm de ácido fítico a partir de una disolución de $(1019,4 \pm 2,5)$ ppm de ácido fítico. De esta disolución de $(51,0 \pm 0,1)$ ppm de ácido fítico se prepararon los patrones para la curva de calibración en un intervalo de concentración de $(5,10 - 30,58)$ ppm. Sin embargo al realizar pruebas se encontró que a concentraciones mayores a 15 ppm se perdía la linealidad de la recta de calibración por lo que se realizó el ajuste de rango de trabajo a concentraciones de 5 a 15 ppm de IP_6 .

La recta de calibración obtenida para este rango se muestra en la figura 30, es importante mencionar que la recta de calibración y el blanco eran preparados cada vez que se iba a realizar la medida dado que los valores de absorbancia variaban de un día a otro. Los límites de detección y cuantificación encontrados fueron de 1,34 ppm y 3,64 ppm respectivamente.

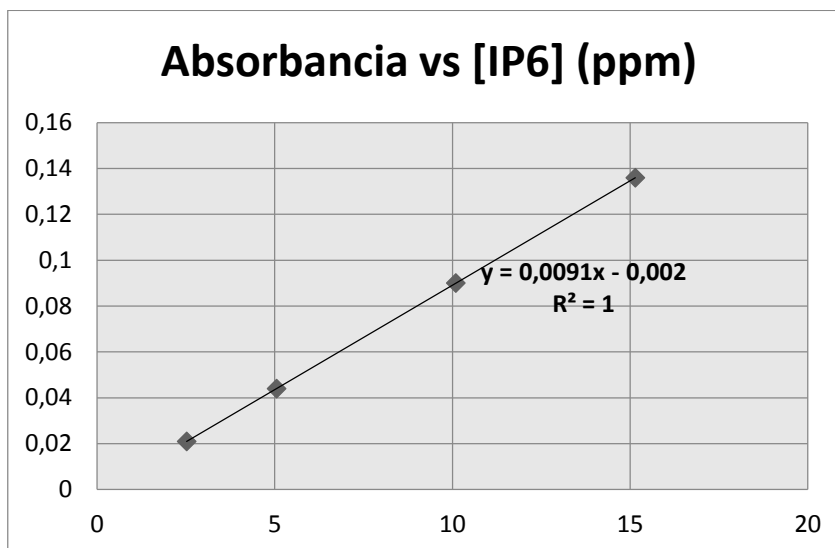


Figura. 30. Recta de Calibración del ácido fítico.

Trabajar en un rango tan pequeño de concentración supone una gran limitación, aun así existe una muy buena relación lineal entre la cantidad presente de estándares y la respuesta observada (absorbancia), con un coeficiente de determinación igual a 1 por lo que se confirma que se cumple con los criterios de linealidad del método y por esta razón se procedió a trabajar con este rango de concentraciones.

5. DISEÑO FACTORIAL PARA EL TRIGO

5.1. DISEÑO FACTORIAL N°1 – TRIGO

En la tabla 31 se muestran los resultados de la determinación de ácido fítico en las muestras de trigo para todos los experimentos realizados según el diseño factorial n°1 con su respectiva réplica. El volumen de ácido empleado fue de 8mL. La evaluación del diseño se llevó a cabo con el Software estadístico Statgraphics Centurion XVII.

Tabla.31.Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°1 para el trigo

Experimento	A	B	C	% IP ₆ (1)	% IP ₆ (2)
1	TCA	AG.MECÁNICA	4 h	1,09565721	1,09565721
2	TCA	AG.MECÁNICA	2 h	0,87072131	0,91185776
3	TCA	ULTRASONIDO	4 h	1,06741312	1,08109790
4	TCA	ULTRASONIDO	2 h	0,88355017	0,89039940
5	HCl	AG.MECÁNICA	4 h	0,91834643	1,09653312
6	HCl	AG.MECÁNICA	2 h	0,85615326	0,89724863
7	HCl	ULTRASONIDO	4 h	0,87617575	1,01307827
8	HCl	ULTRASONIDO	2 h	0,83610659	0,82875635

A continuación se presenta en la Figura 31 el Diagrama de Pareto para la determinación de las variables significativas para la extracción del ácido fítico en el trigo

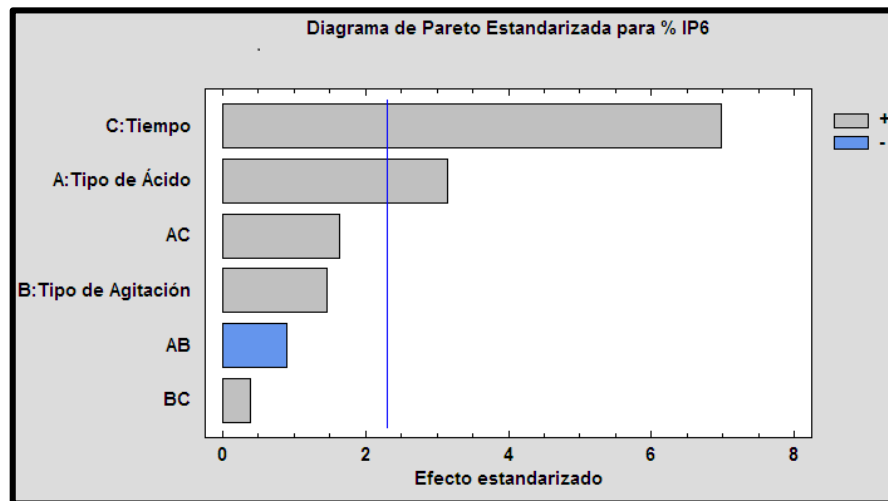


Figura.31.Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°1 del Trigo

En el Diagrama de Pareto se puede visualizar las variables que tienen un alcance significativo sobre la respuesta del sistema si estas superan el límite de

significación. En el Diagrama de Pareto de la figura 31 se puede observar que solo 2 de las 3 variables estudiadas fueron relevantes, siendo estas el Tiempo y el Tipo de Ácido empleados en la extracción. Ambas variables tuvieron una tendencia positiva, lo que indica que la mayor respuesta se obtiene sobre el factor positivo. Entre estas variables el tiempo mostró el efecto más acentuado sobre la extracción del ácido fólico. Según lo observado en el diagrama de Pareto anterior y los resultados mostrados en la tabla 31 la mayor respuesta para la extracción del ácido fólico en el trigo se logró con el ácido tricloroacético empleando un tiempo de extracción de 4 horas indistintamente del tipo de sistema de extracción empleado.

En la figura 32 se muestra el gráfico de efecto principal. En estos gráficos se puede visualizar que mientras mayor es la pendiente de la recta mayor es el efecto de la variable sobre la respuesta.

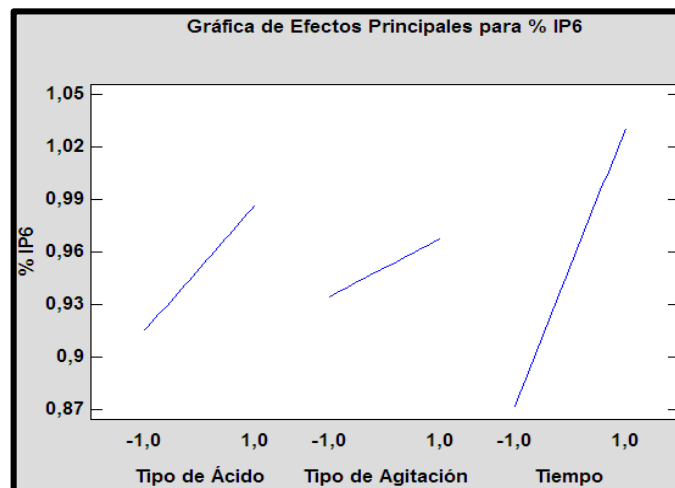


Figura.32. Gráfica de Efectos principales para el diseño factorial n°1 en el Trigo

En esta figura se puede notar que es el tiempo de extracción el que presenta la mayor pendiente, lo que indica el mayor efecto, seguido del tipo de ácido y por último el tipo de agitación, sin tener esta última mucha importancia.

Para el caso del efecto del ácido, que es la segunda variable de relevancia, los resultados indican que se obtiene mejora en la extracción cuando se utiliza el ácido tricloroacético esto puede deberse a que una vez extraído de la muestra el ácido fítico y metales ambos en solución rápidamente forma quelatos produciendo la pérdida del analito por precipitación, sin embargo el ácido tricloroacético es capaz de redissolver más fácilmente estos quelatos algo que no se facilita con el ácido clorhídrico como fue reportado por Eloy Mijares en el 2013 [35]. A su vez el TCA puede degradar las proteínas que también pueden formar complejos con el ácido fítico y liberar el mismo en la solución.

De este diseño factorial se puede concluir que las condiciones experimentales con mayor respuesta en la extracción del ácido fítico para el trigo se alcanzaron empleando 8mL de TCA 0,3 M con 4 horas de extracción siendo indiferente el sistema de extracción utilizado en este experimento.

5.2. DISEÑO FACTORIAL N°2 – TRIGO

Para este diseño en particular las muestras tratadas durante la extracción con HCl 2,0 M debieron ser diluidas a un volumen de 100 mL en vez de 25 mL para asegurar una disminución de la concentración del HCl a un valor de aproximadamente 0,05 M durante la preconcentración del ácido fítico y así asegurar la retención del mismo en el cartucho amino, a su vez se tuvo que tomar una alícuota mayor e igual a 4 mL para la cuantificación con el reactivo de Wade, esta vez empleando 0,55 mL de NaOH 2,0 M para el ajuste de pH. Para este diseño se dejó fijo el tiempo de extracción de 4 horas y se emplearon 8mL del ácido para la extracción.

En la tabla 32 se muestran los resultados de la determinación de ácido fóico en las muestras de trigo para todos los experimentos realizados según el diseño factorial n°2 con su respectiva réplica. La evaluación del diseño se llevó a cabo con el Software estadístico Statgraphics Centurion XVII.

Tabla.32.Porcentajes de ácido fóico obtenidos en el diseño factorial n°2 para el trigo.

Experimento	A	B	C	% IP ₆ (1)	% IP ₆ (2)
1	AG.MECÁNICA	0,6 M	TCA	1,19736971	1,31862238
2	AG.MECÁNICA	2,0 M	HCl	1,18115337	1,16601038
3	AG.MECÁNICA	0,3 M	TCA	1,06741312	1,08109790
4	AG.MECÁNICA	0,5 M	HCl	0,88355017	0,89039940
5	ULTRASONIDO	0,6 M	TCA	1,12450146	1,12450146
6	ULTRASONIDO	2,0 M	HCl	1,27455030	1,16833774
7	ULTRASONIDO	0,3 M	TCA	0,87617575	1,01307827
8	ULTRASONIDO	0,5 M	HCl	0,83610659	0,82875635

A continuación se presenta en la Figura 33 el Diagrama de Pareto para la determinación de las variables significativas para la extracción del ácido fóico en el trigo.

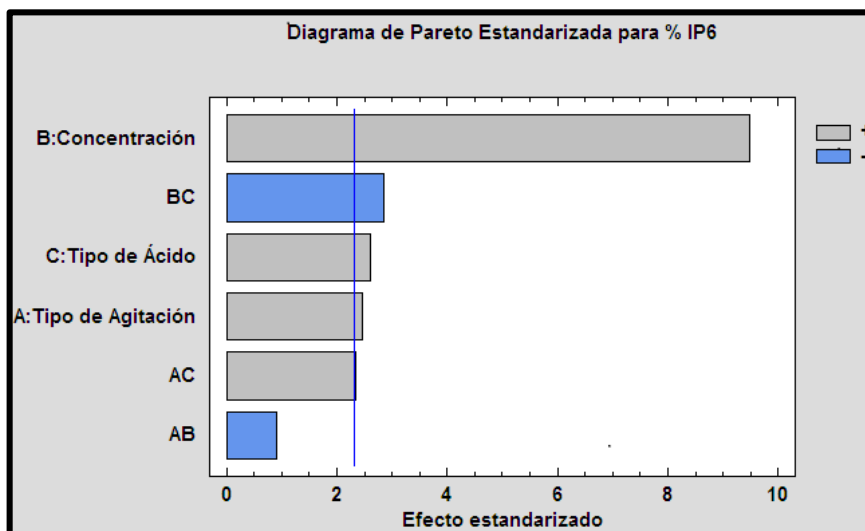


Figura.33. Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°2 del Trigo.

En este diagrama se puede observar que las 3 variables estudiadas fueron relevantes, siendo la Concentración del ácido la que muestra un alcance más significativo. La concentración, el tipo de ácido y de agitación mostraron una tendencia positiva es decir que la mayor respuesta se generó empleando el ácido tricloroacético 0,6 M con agitación mecánica.

En el Diagrama de Pareto se puede observar también que la interacción BC muestra un alcance significativo, es decir que la respuesta del sistema también está influenciada por la interacción de estas dos variables. Construyendo un diagrama de interacción se pueden fijar que valores deben tomar las variables que interactúan para que se produzca una mayor respuesta. En la figura 34 se muestra el diagrama de interacción con los valores promedios de respuesta de acuerdo a las interacciones estimadas.

DIAGRAMA BC

Factor B
+

Factor C -	1,1975	1,1912	Factor C +
	0,8597	1,0094	

Factor B
-

Figura.34. Diagrama de Interacción para el diseño factorial n°2 del trigo.

La mayor respuesta se observa empleando ácido clorhídrico con concentración 2,0 M (1,1975 %), sin embargo este valor es muy parecido al obtenido empleando ácido tricloroacético con concentración 0,6 M (1,1912 %).

En la figura 35 se puede observar el gráfico de efecto principal donde se muestra el nivel de importancia y la tendencia de las variables sobre la respuesta del sistema para el diseño factorial n°2.

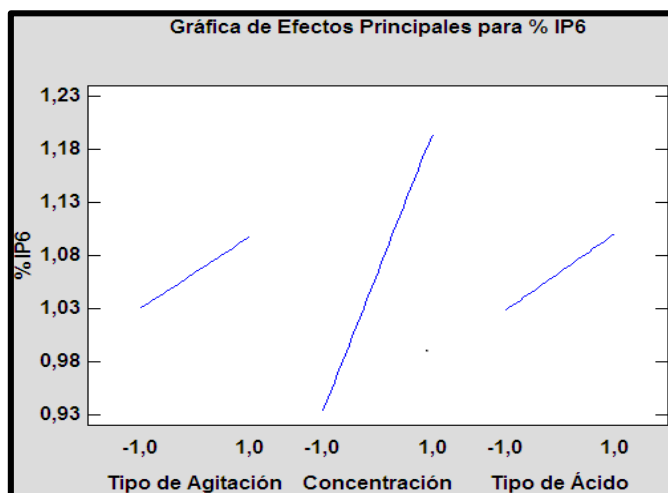


Figura.35. Gráfica de Efectos principales para el diseño factorial n°2 para Trigo.

En este gráfico se observa que la concentración tuvo una pendiente muy acentuada representando la variable con mayor alcance significativo, la pendiente tiene un sentido positivo, es decir que la mayor respuesta se obtuvo a mayores concentraciones del ácido de extracción, nuevamente el ácido tricloroacético muestra una mayor respuesta en el sistema, en este diseño el tipo de agitación tiene un sentido positivo y una pendiente más acentuada con respecto al diseño factorial n°1, es decir que para este diseño, donde se está evaluando el efecto de la concentración de ácido, el tipo de agitación tiene un mayor alcance significativo que para el diseño factorial n°1 donde no se está considerando esta variable.

En resumen en el diseño factorial n°2 se encontró que las condiciones experimentales con mayor respuesta en la extracción del ácido fítico en el trigo se alcanzaron empleando 8mL de TCA 0,6 M como ácido de extracción y empleando la agitación mecánica por 4 horas.

El diseño factorial n°1 mostró una mayor respuesta para tiempos de agitación de 4 horas. Mientras que en el diseño factorial n°2 la mayor respuesta se observa a mayores concentraciones del ácido de extracción, es decir que estas 2 variables son altamente significativas en la extracción del ácido fítico en esta muestra.

5.3. DISEÑO FACTORIAL N°3

Un tercer diseño, en este caso 2^2 , fue aplicado para visualizar mejor las interacciones entre el tipo de ácido y la concentración de ácido dejando fijos el tipo de extracción: Agitación mecánica y el Tiempo de extracción: 4 h. En la tabla 33 se

muestran los resultados de concentración del ácido fítico para el trigo con su respectiva réplica.

Tabla.33.Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°3.

Experimento	A	B	% IP ₆ (1)	% IP ₆ (2)
1	TCA (+)	0,6 M (+)	1,19736971	1,31862238
2	HCl (-)	2,0 M (+)	1,18115337	1,16601038
3	TCA (+)	0,3 M (-)	1,06741312	1,08109790
4	HCl (-)	0,5 M (-)	0,88355017	0,89039940

A continuación se presenta en la Figura 36 el Diagrama de Pareto para la determinación de las variables significativas para la extracción del ácido fítico en el trigo con el diseño factorial n°3.

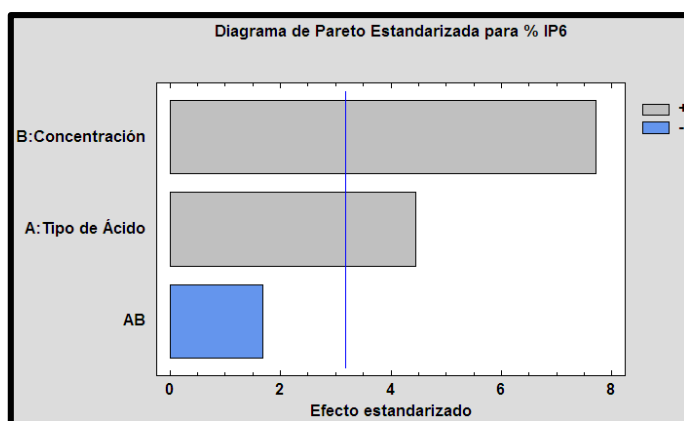


Figura.36.Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°3 del Trigo.

Ambas variables pasan el límite de significación y con sentido positivo es decir con TCA a 0,6 M, este diseño factorial reafirma lo encontrado en el diseño factorial n°2 y muestra realmente el tipo de ácido y a que concentración se obtiene mayor respuesta

en el sistema, hecho que no se pudo observar claramente en el diagrama de interacción del diseño factorial n°2. Una vez optimizado el proceso de extracción para el trigo se procedió a cuantificar el contenido de ácido fítico en la muestra de trigo bajo estas condiciones.

6. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN EN EL TRIGO.

La extracción del ácido fítico en el trigo se realizó entonces con 8mL de TCA 0,6 M empleando agitación mecánica por 4 horas. Se pesaron dos réplicas de $(0,5000 \pm 0,0003)$ g del trigo. Para la estimación del porcentaje de recuperación se añadió 1mL de una solución patrón de ácido fítico de $(5806,4 \pm 10,9)$ ppm a dos réplicas previamente pesadas de la muestra.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos para la determinación del ácido fítico en el trigo con su respectivo porcentaje de recuperación.

Tabla. 34. Valores obtenidos de IP₆ y porcentaje de recuperación para el trigo.

mg IP6 en la muestra	mg IP6 añadidos	mg IP6 total (Réplica 1)	mg IP6 total (Réplica 2)	% Recuperación (1)	% Recuperación (2)
$(5,63 \pm 0,08)$	$(5,81 \pm 0,02)$	$(10,24 \pm 0,09)$	$(10,49 \pm 0,09)$	(80 ± 1)	(84 ± 1)

El rango de porcentajes de recuperación de IP₆ en el trigo fue de $(80 - 84)$ % con 8 mL de TCA 0,6 M y agitación mecánica por 4 horas. El porcentaje de ácido fítico encontrado para el trigo fue de $(1,13 \pm 0,02)$ % IP₆ con un C.V = 1,8 %. Dado que la

recuperación fue mayor de 80% se puede indicar que el método propuesto tiene una exactitud adecuada para ser aplicada en el análisis del trigo.

7. DISEÑOS FACTORIALES PARA LA HARINA DE QUINOA.

7.1. ELIMINACIÓN DE GRASAS EN MUESTRAS DE QUINOA

Según Harland y Oberleas ^[30], el contenido de grasa influye en la capacidad de extracción del ácido fítico en alimentos y debe mantenerse bajo (< 5 %) o reducirse antes de la extracción. La quinoa tiene un contenido de grasas alrededor del 6% y por tanto se evaluó la conveniencia o no de la eliminación de grasas en las muestras de quinoa. Para ello, se pesaron 4 réplicas de $(0,5000 \pm 0,0003)$ g de la muestra, a dos de ellas se les procedió a eliminar las grasas con una mezcla de cloroformo / metanol (2:1).

El procedimiento consistió en añadir a la muestra 8 mL de cloroformo y 4 mL de metanol, posterior a ello se colocó en un baño de agua a 40°C agitando por 15 minutos. La suspensión se centrifugó por 10 minutos a 10 °C con 3400 rpm. Finalmente el líquido se decantó y se le hizo pasar una corriente de N₂ para secar el sólido. Posterior a este paso se procedió a realizar el método de extracción optimizado para el trigo. Al momento de la extracción de estas 4 muestras no se observó ninguna turbidez y por tanto no hubo problema en la extracción, filtración y posterior pre-concentración del ácido fítico en el cartucho amino.

Al comparar los datos obtenidos con y sin eliminación de grasas se observó una pérdida cercana al 23% del analito. Se supuso que el Metanol, que es un solvente polar al igual que el ácido fítico pudo haber sido el responsable de la pérdida de analito, por

esta razón se hizo otra prueba de eliminación de las grasas solo con cloroformo obteniéndose nuevamente una pérdida del analito del 23%. En vista a estos resultados y teniendo en cuenta que las muestras de quinoa ecuatoriana sin eliminar grasas no presentaron inconvenientes en el proceso de extracción al ser filtradas, antes del paso del cartucho amino, se decidió no realizar el paso de eliminación de las grasas para las muestras de quinoa.

7.2. DISEÑO FACTORIAL N°1 – HARINA DE QUINOA

En la tabla 35 se muestran los resultados de la determinación de ácido fítico en las muestras de quinoa en forma de harina para todos los experimentos realizados según el diseño factorial n°1 propuesto para la determinación de ácido fítico en quinoa con su respectiva réplica. El volumen de ácido empleado fue de 8mL. La evaluación del diseño se llevó a cabo con el Software estadístico Statgraphics Centurion XVII.

Tabla.35. Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°1 para la harina de quinoa.

Experimento	A	B	C	% IP ₆ (1)	% IP ₆ (2)
1	TCA	AG.MECÁNICA	4 h	1,38180354	1,02957890
2	TCA	AG.MECÁNICA	2 h	1,19285909	1,17930387
3	TCA	ULTRASONIDO	4 h	1,30156051	1,41002396
4	TCA	ULTRASONIDO	2 h	1,22021333	1,15242368
5	HCl	AG.MECÁNICA	4 h	1,48988285	1,86912596
6	HCl	AG.MECÁNICA	2 h	1,15196326	1,09775321
7	HCl	ULTRASONIDO	4 h	1,38263179	1,62662578
8	HCl	ULTRASONIDO	2 h	1,05688454	1,04333474

A continuación se presenta en la Figura 37 el Diagrama de Pareto para la determinación de las variables significativas para la extracción del ácido fítico en la harina de quinoa.

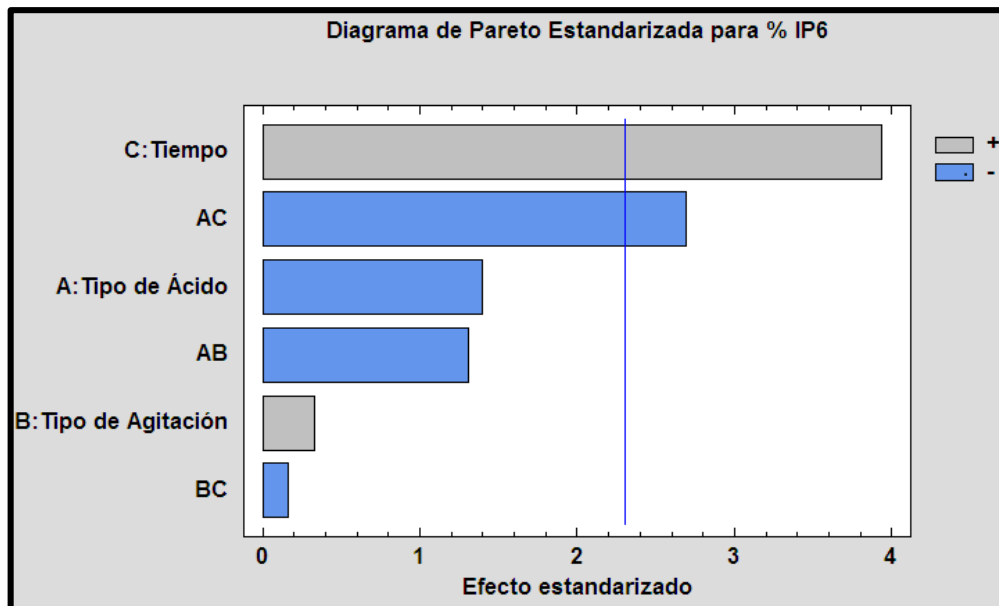


Figura.37. Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°1 de la harina de quinoa.

La variable del tiempo superó el límite de significancia y con signo positivo es decir que la mayor respuesta del sistema fue a mayor tiempo de extracción (4 h) siendo esta variable la que juega un papel importante en la extracción del ácido fítico en la harina de quinoa, este mismo hecho fue observado con el trigo. Además en el diagrama de Pareto se visualiza también una interacción de segundo orden AC que supera el límite de significación, es decir que la respuesta del sistema también está influenciada por la interacción de las variables tiempo y tipo de ácido. Construyendo un diagrama de interacción se pueden fijar que valores deben tomar las variables que interactúan para que se produzca una mayor respuesta. En la figura 38 se muestra este diagrama de interacción con los valores promedios de respuesta de acuerdo a las interacciones estimadas.

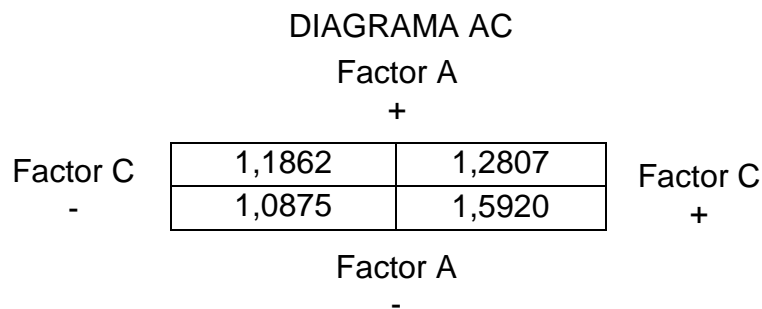


Figura.38. Diagrama de Interacción para el diseño factorial n°1 de la harina de quinoa.

La mayor respuesta en este diagrama se observara empleando ácido clorhídrico 0,5 M por 4 horas.

En la figura 39 se puede observar el diagrama de efecto principal, nivel de importancia y la tendencia de las variables sobre la respuesta del sistema para el diseño factorial n°1 para la extracción de ácido fítico en la harina de quinoa.

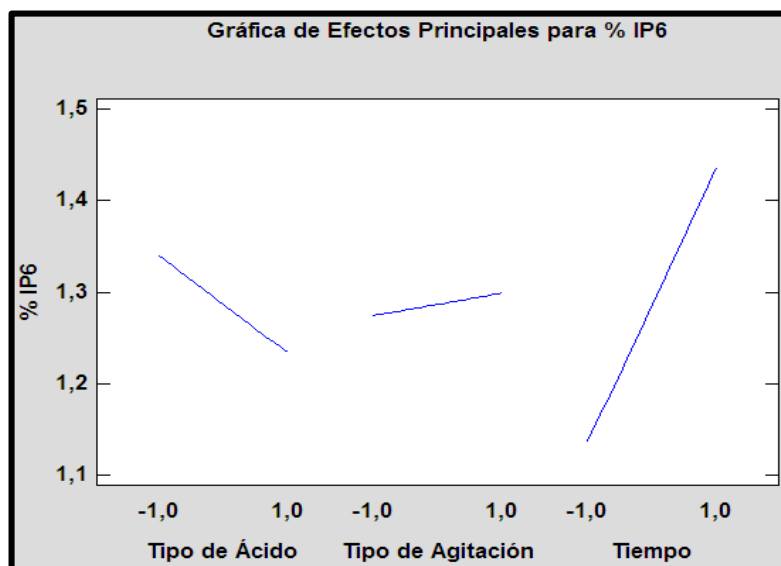


Figura.39. Gráfica de Efectos principales para el diseño factorial n°1 en la harina de quinoa.

Para este gráfico el tiempo es el que tiene una pendiente más acentuada representando la variable más significativa, además tiene un sentido positivo al igual que ocurrió con el trigo, el tipo de ácido mostró tener algo de pendiente sin embargo el diagrama de Pareto no indicó que esta variable sea significativa.

En este diseño factorial se encontró que las condiciones experimentales con mayor respuesta en la extracción del ácido fítico en la harina de quinoa se alcanzaron empleando 8mL de HCl 0,5 M como ácido de extracción y empleando la 4 horas de agitación indiferentemente del equipo de extracción utilizado.

7.3. DISEÑO FACTORIAL N°2 – HARINA DE QUINOA

Para este diseño se fijó la variable del tiempo de extracción en 4 horas. Las muestras tratadas con HCl 2,0 M en el paso de extracción debieron ser llevadas a un volumen de 100 mL en vez de 25 mL para asegurar una disminución de la concentración del HCl y asegurar la retención del ácido fítico en el cartucho amino.

En la tabla 36 se muestran los resultados de la determinación de ácido fítico en las muestras de harina de quinoa para todos los experimentos realizados según el diseño factorial n°2 con su respectiva réplica y empleando 8mL del ácido de extracción. La evaluación del diseño se llevó a cabo con el Software estadístico Statgraphics Centurion XVII.

Tabla.36.Porcentajes de ácido fítico obtenidos en el diseño factorial n°2 para la harina de quinoa.

Experimento	A	B	C	% IP ₆ (1)	% IP ₆ (2)
1	AG.MECÁNICA	0,9 M	TCA	1,19815734	1,25063140
2	AG.MECÁNICA	2,0 M	HCl	1,60952502	1,74073636
3	AG.MECÁNICA	0,6 M	TCA	1,38180354	1,02957890
4	AG.MECÁNICA	0,5 M	HCl	1,48988285	1,86912596
5	ULTRASONIDO	0,9 M	TCA	1,21321312	1,23949212
6	ULTRASONIDO	2,0 M	HCl	1,32270853	1,34898752
7	ULTRASONIDO	0,6 M	TCA	1,30156051	1,41002396
8	ULTRASONIDO	0,5 M	HCl	1,38263179	1,62662578

A continuación se presenta en la Figura 40 el Diagrama de Pareto para la determinación de las variables significativas para la extracción del ácido fítico en la harina de quinoa.

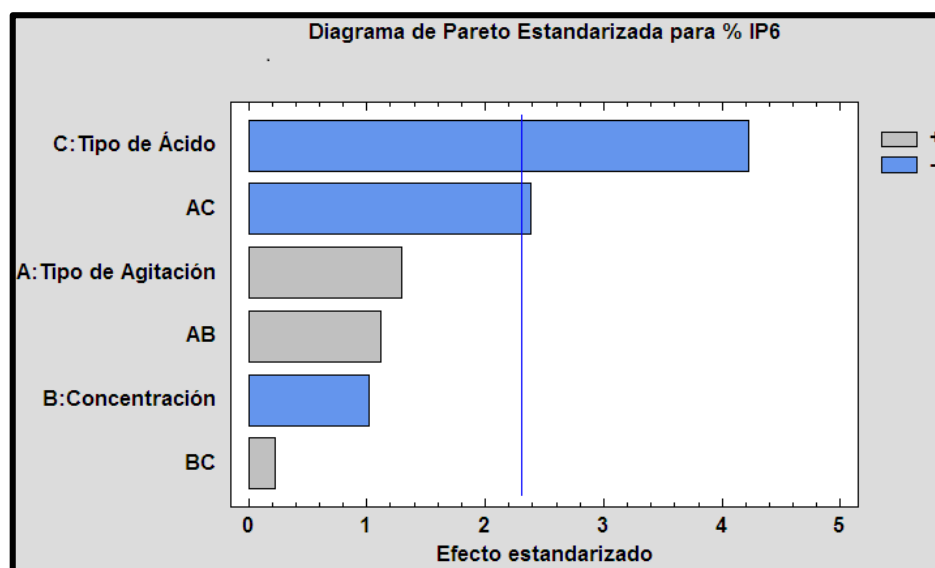


Figura.40.Diagrama de Pareto para el Diseño Factorial N°2 de la harina de quinoa.

La variable correspondiente al tipo de ácido fue relevante en este diseño, es decir que tiene un alcance significativo y con sentido negativo es decir que se obtiene mayor respuesta del sistema empleando el ácido clorhídrico. El diagrama de Pareto también muestra que la respuesta del sistema también está influenciada por la interacción de las variables A y C. En la figura 41 se muestra el diagrama de interacción con los valores promedios de respuesta de acuerdo a las interacciones estimadas.

DIAGRAMA AC
Factor A
+

Factor C -	1,6773	1,2150	Factor C +
	1,4202	1,2911	

Factor A
-

Figura.41. Diagrama de Interacción para el diseño factorial n°2 de la harina de quinoa.

Para este diagrama se indica que la mayor respuesta del sistema se obtiene empleando HCl y agitando mecánicamente. En este caso el tipo de agitación está mostrando mucha más importancia que en los diseños factoriales anteriores. En la figura 42 se puede observar el nivel de importancia y la tendencia de las variables sobre la respuesta del sistema para el diseño factorial n°2.

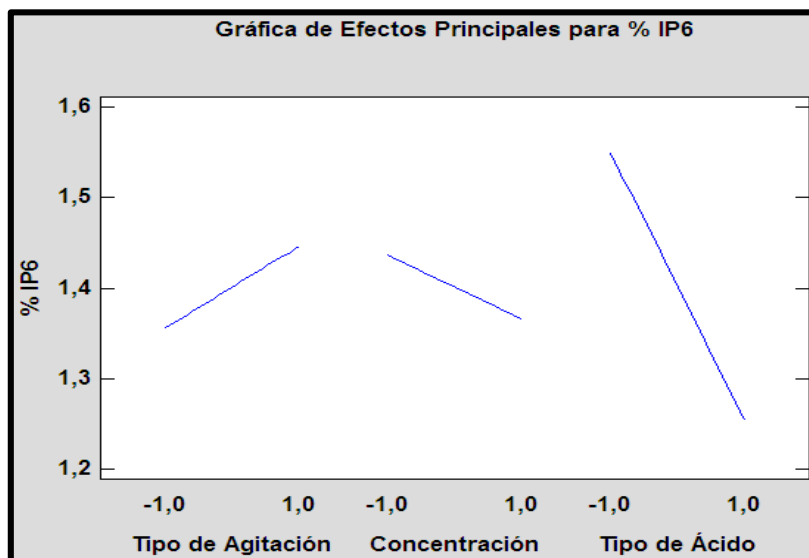


Figura.42. Gráfica de Efectos principales para el diseño factorial n°2 en la harina de quinoa.

Para este diseño factorial el tipo de ácido tiene una pendiente muy acentuada representando la variable con mayor alcance significativo, la pendiente tiene un sentido negativo, es decir que la mayor respuesta se obtuvo empleando el ácido clorhídrico.

En resumen en el diseño factorial n°2 se encontró que las condiciones experimentales con mayor respuesta en la extracción del ácido fítico en la harina de quinoa se alcanzaron empleando 8mL de HCl 0,5 M como ácido de extracción y empleando la agitación mecánica por 4 horas.

8. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ÁCIDO FÍTICO Y RECUPERACIÓN EN LA QUINOA ECUATORIANA Y VENEZOLANA.

8.1. PORCENTAJE DE ÁCIDO FÍTICO Y DE RECUPERACIÓN EN LA QUINOA ECUATORIANA

Para la determinación del % de ácido fítico y recuperación en la quinoa ecuatoriana se pesaron ($0,2000 \pm 0,0003$) de la muestra. El método de extracción utilizado fue el obtenido por el diseño factorial n^2 (HCl 0,5 M con agitación mecánica por 4 horas) y a su vez se decidió emplear también el método de extracción optimizado para el trigo (TCA 0,6 M con agitación mecánica por 4 horas) dado que Eloy Mijares en el 2013 ^[35] observó que para alto contenido de IP_6 y metales como es el caso de la quinoa el TCA mejora los % de recuperación debido a la redisolución del complejo fitato-mineral, además este fue el siguiente método con mayor respuesta en la extracción del ácido fítico en la harina de quinoa Ecuatoriana. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos para la determinación del ácido fítico en la quinoa ecuatoriana utilizando el método optimizado para la misma.

Tabla. 37. Valores obtenidos de IP_6 para la quinoa ecuatoriana (HCl 0,5 M)

mg IP_6 en la muestra	% IP_6	% Recuperación
($4,6 \pm 0,2$)	($1,85 \pm 0,09$) %	85 ± 2

El porcentaje de ácido fítico en la quinoa ecuatoriana bajo estas condiciones experimentales fue de ($1,85 \pm 0,09$) % con un C.V = 4,86 % y una recuperación del

85%. En la tabla 38 se muestran los valores de ácido fítico y recuperación utilizando el método optimizado para el trigo aplicado a la harina de quinoa ecuatoriana.

Tabla. 38. Valores obtenidos de IP₆ y para la quinoa ecuatoriana (TCA 0,6 M)

mg IP6	% IP ₆	% Recuperación
(4,8 ± 0,1)	(1,90 ± 0,06) %	(86,2 ± 1,6) %

El porcentaje de ácido fítico en la harina de quinoa ecuatoriana bajo estas últimas condiciones experimentales fue de (1,90 ± 0,06) % con un % de recuperación del (86,2 ± 1,6) % y un coeficiente de variación (C.V) de 3,16 %.

Se realizó la comparación de las medias experimentales de ambos métodos (extracción con HCl y extracción con TCA) por la prueba F y t y los resultados mostraron que ambas medias son iguales, por lo que ambos métodos pueden ser usados en el análisis de ácido fítico en la harina de quinoa.

Finalmente los resultados obtenidos demuestran que el análisis de ácido fítico con extracción con TCA 0,6 M, agitación mecánica por 4 horas y detección fotocolorimétrica indirecta con reactivo de Wade se puede aplicar para las muestras de origen natural con bajo y alto contenido mineral debido a sus altos porcentajes de recuperación.

8.2. PORCENTAJE DE ÁCIDO FÍTICO EN LA QUINOA VENEZOLANA

Para la determinación del % de ácido fítico en la Harina de quinoa venezolana se pesaron $(0,2000 \pm 0,0003)$ g de la muestra y se aplicó el método de extracción optimizado con 8mL de TCA 0,6 M con agitación mecánica por 4 horas. A continuación se muestran los resultados obtenidos para 6 réplicas de la muestra.

Tabla.39. Porcentaje de ácido fítico en la Harina de quinoa Venezolana

Absorbancia	% IP ₆	Absorbancia	% IP ₆
0,065	1,121684998	0,059	1,023673638
0,056	0,974667959	0,057	0,991003185
0,061	1,056344092	0,052*	0,909327052
(1,01 ± 0,07) % IP ₆ C.V= 6,93 %			

* Se aplicó la prueba Q pero el valor discordante no puede rechazarse

A continuación se encuentran tabulados los datos de %IP₆ determinados en las 3 muestras analizadas.

Tabla.40. Porcentajes de ácido fítico en las muestras analizadas.

% IP ₆		
Trigo	H.Quinoa Ecuatoriana	H.Quinoa Venezolana
(1,13 ± 0,02) % C.V = 1,77 %	(1,90 ± 0,06) % C.V = 3,16 %	(1,01 ± 0,07) % C.V = 6,93 %

Cabe destacar que la variabilidad de los Coeficientes de Variación en estos estudios se debe a la propia heterogeneidad de las muestras naturales analizadas y se encuentran por debajo del 10% esperado.

A partir de la tabla anterior se puede observar que la H.de Quinoa Ecuatoriana mostró un mayor % de IP₆ en comparación a las otras dos muestras, mientras que el trigo mostró mayor porcentaje de IP₆ que la H. de Quinoa Venezolana. Esta última observación resultó sorprendente dado que la quinoa suele tener porcentajes de ácido fítico mucho mayores al 1% mientras que el trigo tiene valores entre el (0,6 – 1,4) % como se puede observar en la tabla 9, es por ello que no era de esperarse que el contenido de ácido fítico encontrado en la H. de Quinoa Venezolana fuera más parecido al contenido de ácido fítico reportado para el trigo que el reportado para la quinoa. Estas variaciones en el contenido de ácido fítico en las 3 muestras se producen en consecuencia de las condiciones, localización, año de cultivo, aplicación de fertilizantes y variedad del cultivo de las muestras ^[48].

9.0. EXPERIMENTO ADICIONAL

Emulando el método de extracción realizado en otros trabajos por diversos autores ^[23, 25,34] se realizó la extracción y posterior cuantificación del ácido fítico en la muestra de quinoa ecuatoriana. El método de extracción consistió en pesar (2,000 ± 0,003) g de la muestra y extraer por 3 horas agitando mecánicamente con 40 mL de HCl 0,8 M. Esta muestra presentó turbidez por tanto el proceso de filtración de la misma fue más complicado, ya que se tuvo que filtrar primero con celulosa y luego con nylon para aclarar la solución. El porcentaje de ácido fítico encontrado emulando el método de extracción de otros autores fue de (1,20 ± 0,03) % con una recuperación del (54,1 ± 1,6) %. Esta diferencia de recuperación puede estar atribuida a la necesidad de un mayor tiempo de extracción. Por otro lado, también se concluye que no es necesario pesar una cantidad tan elevada de la muestra, es más pesar altas cantidades de la muestra solo favorece la formación de turbidez haciendo más complicado el paso de pre-concentración de las muestras.

CONCLUSIONES

El % de recuperación del ácido fítico en la muestra de trigo empleando el método de extracción con TCA 0,6 M y agitación mecánica por 4 horas fue de (80 – 84) %.

El % de ácido fítico encontrado en la muestra de trigo fue de (1,13 ± 0,02) %.

El % de recuperación del ácido fítico en la muestra de harina de quinoa ecuatoriana empleando el método de extracción con TCA 0,6 M y agitación mecánica por 4 horas fue de (85 - 87) %.

El % de ácido fítico encontrado en la muestra de harina de quinoa ecuatoriana fue de (1,90 ± 0,06) %.

El % de ácido fítico encontrado en la muestra de harina de quinoa venezolana fue de (1,01 ± 0,07) %.

El ajuste de pH de la muestra es un mejor método para el análisis por fotocolorimetría que eliminar la matriz ácida por rotaevaporación, debido a que este último genera una importante pérdida del analito.

Se reafirma lo indicado en la bibliografía que las muestras de quinoa tienen un mayor contenido mineral que el trigo.

El método fotocolorimétrico propuesto se puede aplicar para muestras de origen natural con bajo y alto contenido mineral debido a los altos porcentajes de recuperación observados para el método de extracción propuesto.

El empleo de ácido tricloroacético, tiempos largos de extracción y pesada de poca cantidad de muestra aumenta los % de recuperación del ácido fítico para muestras de alto contenido de metales.

RECOMENDACIONES

Realizar la cuantificación del ácido fítico y % de recuperación por el método de Fröhbeck, en este método se usa una columna de intercambio iónico y se eluye el IP₆ con NaCl por tanto las muestras no tienen una matriz ácida.

Realizar la cuantificación del ácido fítico y % de recuperación para alimentos procesados por el método de HPLC con columnas de intercambio iónico empleando como sistema de detección la conductividad para evitar el paso de rotaevaporación de las muestras que generan gran pérdida de analito.

Realizar la cuantificación del ácido fítico y % de recuperación por este método fotocolorimétrico de diferentes granos de origen natural y con diferentes tamaños de partícula para evaluar el efecto del tamaño del grano en la extracción del ácido fítico.

Emplear tiempos más largos de extracción utilizando el ácido tricloroacético 0,6 M en cereales procesados y pesar pequeñas cantidades de las muestras para evitar la formación de turbidez durante la extracción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). [Internet]. Plataforma de Información de la Quinoa. [Consultado el 13/10/17]. Disponible en : <http://www.fao.org/in-action/quinoa-platform/en/>
2. Torres H, Minaya Instituto Interamericano de ciencias agrícolas oficina en Perú. Escarificadora de Quinoa. Diseño y Construcción. Lima, Perú, 1980. Páginas: 6-7
3. Revista Alimentaria. EL BOOM DE LAS “SÚPER SEMILLAS”: CHÍA, AMARANTO Y QUINOA. [Internet]. [Consultado el 20/04/18]. Disponible en : <http://www.alimentosecuador.com/2015/09/09/el-boom-de-las-super-semillas-chia-amaranto-y-quinoa/>
4. Jancurová M., Minarovičová L., Dandár A. Quinoa-A Review. Czech Journal of Food Sciences. 2009, 2: 71–79.
5. Díaz Raquel. Evaluación de la fermentación acidoláctica de la masa para productos de panificación con inclusión de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). Tesis para optar al título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 2013.
6. Ing. Whalí Christian. Quinoa hacia su cultivo comercial. LATINRECO S.A. 1990.
7. Pinterest. Explora Caribe, Bolivia ¡y mucho más! [Internet]. [Consultado el 20/04/18]. Disponible en : <https://www.pinterest.co.uk/pin/497647827554284290/>
8. Revista Mujer [Internet]. Angélica Lamarca. 18 Enero 2015. [citado el 21/11/17]. Disponible en: <http://www.revistamujer.cl/2015/01/18/01/contenido/los-colores-de-la-quinoa.shtml/>
9. Gómez L., Aguilar E. Guía de Cultivo de la Quinoa. © FAO y Universidad Agraria La Molina. 2016. Lima-Perú.

10. EcuRed- Conocimiento con todos y para todos. América del Sur. [Internet]. [Consultado el 20/04/18]. Disponible en [https://www.ecured.cu/Am%C3%A9rica del Sur](https://www.ecured.cu/Am%C3%A9rica_del_Sur)
11. Asociación Latinoamericana de Integración (ALADI). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Tendencias y perspectivas del comercio internacional de Quinoa. 2014.
12. Romero C. La Quinoa: Producción y Comercio del Perú. Perú-Ministerio de Agricultura y Riego. 2017.
13. Instituto Boliviano de Comercio Exterior (IBCE). CIFRAS Boletín Electrónico Bisemanal N° 563 –Bolivia, 24 de noviembre del 2016. Bolivia: Producción y Exportación de Quinoa.
14. Pro Ecuador-Instituto de promoción de exportaciones e inversiones. Análisis Sectorial –Quinoa 2015. [Internet]. [Consultado el 12/11/17]. Disponible en : <http://www.proecuador.gob.ec/pubs/perfil-de-quinua-2015>
15. Todo sobre la Quinoa. 2008. [Internet]. [Consultado el 09/11/17]. Disponible en: <http://laquinua.blogspot.com/2008/04/producen-quinua-orgnica-para-las.html>
16. Padrón C., Oropeza R., Montes A. Semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow.): composición química y procesamiento. Aspectos relacionados con otras áreas. Revisión. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2014. 5(2) :166-218.
17. Ciacci L., Leproux V., McCarthy A., Serra F., Vianello L. Quinoa in the Kitchen. 2013.
18. Koziol M.J. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Journal of Food Composition and Analysis. 1992. Volume 5, Issue 1. 35-68.
19. Navruz-Varli S., Şanlıer N. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Journal of Cereal Science. 2016. Volume 69, 371-376.

20. Sifontes Y., Aliaga C., Landaeta-Jiménez M. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población venezolana. 2012. ILSI (International Life Sciences Institute), Fundación Bengoa.
21. Vilcacundo R., Hernández-Ledesma B. Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). 2016. Volume 14.1-6.
22. Hernández J. Quinoa, an option for feeding of the diabetes mellitus patient. *Revista Cubana de Endocrinología* 2015.26 (3):304-312.
23. Ruales J., Nair B. Saponins, phytic acid, tannins and protease inhibitors in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Food Chemistry*. 1993.48.137-143.
24. Lopez H., Leenhardt F., Coudray C., Remesy C. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition?. *International Journal of Food Science and Technology*. 2002.37.727-739.
25. Hernández, D. Optimización del método analítico para la determinación de ácido fítico en cereales infantiles a base de trigo por HPLC-RI.T.E.G. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2015.
26. Sotelo A., Mendoza J., Argote R. Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico. *Revista de la sociedad química de México*. 2002. Vol 46.301-306.
27. Domínguez B., Gómez M., Rincón F. Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos latinoamericanos de Nutrición [Internet]* .2002 [Consultado: 27/10/17].52.3. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000300001
28. Martínez C., G. Ros, Periago M., López G., Ortuño J., Rincón F. El ácido fítico en la alimentación humana. *Food Science and Technology International*. 1996.2.201-209.
29. Olavarria H. 2005. Montaje y Validación de un Procedimiento HPLC-IR para Determinar y Cuantificar Mioinositol y Ácido Fítico en Matrices Vegetales. Tesis

- de Grado. Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
30. Harland BF, Oberleas D. A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. *Cereal Chem* 1977; 54: 827-32.
 31. H.-R. Park et al. Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods. 2005. *Food Control* 17 (2006) 727–732.
 32. Salas, D. Estudio del efecto de los metales en la etapa de extracción en fase sólida del ácido fítico, empleando muestras sintéticas que simulen cereales infantiles. T.E.G. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2010.
 33. Ruales J., Nair B. Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Food Chemistry*. 1993. 48. 131-136.
 34. Caripá, Dilia. Determinación de minerales y ácido fítico por HPLC-RI en cereales infantiles. T.E.G Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2008.
 35. Mijares, E. Estudio del efecto del tipo de ácido y concentración en la recuperación del ácido fítico en presencia de metales por el método HPLC-RI. T.E.G Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2013.
 36. Rosero O., Marounek M., Břeňová N., Lukešova D. Phytase activity and comparison of chemical composition, phytic acid P content of four varieties of quinoa grain (*Chenopodium quinoa* Willd.).
 37. Olivera P., Nieto D. Caracterización elemental en granos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) mediante la técnica de fluorescencia de rayos X. Informe Científico Tecnológico. 2014. Volume (14) p 1-5.
 38. Horwitz W. editor. Malt beverages & brewing materials. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Vol II. 17th ed. USA: Association of Official Analytical Chemists; 2000. p. 31.

39. López H., Oropeza I., Betancourt C. Determinación de la concentración de Ca, Mg y K en leche líquida de tres marcas comerciales, empleando la técnica de espectroscopia atómica. Universidad Pedagógica Experimental Libertador. Instituto Pedagógico de Caracas. 2016.
40. NORMA DEL CODEX PARA EL TRIGO Y EL TRIGO DURO. Codex Standard 199-1995.
41. Magno Meyhuay. QUINUA: Operaciones de Poscosecha. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Página 9.
42. USDA. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. USDA Food Composition Databases. [Internet]. [Consultado el 21/05/18]. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>
43. Konishi Y et al. Distribution of Minerals in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2004. 68 (1), 231–234.
44. Ando Hitomi., Chen Y., Tang H., Shimizu M., Watanabe K., Mitsunaga T. Food Components in Fractions of quinoa seed. *Food Sci. Technol. Res.*, 8(1), 80-84, 2002.
45. Ranhotra G., Gelroth J., Glaser B., Lorens K., Jhonson D. Composition and Protein Nutritional Quality of Quinoa. *Cereal Chem.* Vol.70 No3: 303-305. 1993.
46. Amaro R. et al. Study of the effect of Ca, Fe and Zn content on the recovery of phytic acid in infant cereals with the HPLC-RI Method. Problems and solutions. *Ciencia* Vol.24. N°1 (2016) 54-64. Maracaibo, Venezuela.
47. Cotton A, Wilkinson G. *Química Inorgánica Avanzada*. Editorial Limusa. 1969.
48. Sánchez María. "Estudio de la acción fuertemente quelante del ácido fítico como factor antinutricional en granos andinos y su incidencia en la baja biodisponibilidad de minerales" Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad técnica de Ambato. Ecuador. 2011.

APÉNDICES

1- Cálculo de la concentración de la solución madre de ácido fítico de 1000 ppm con su error.

Las soluciones madres de ácido fítico fueron preparadas a partir de la sal dipotásica de ácido fítico $C_6P_6O_{24}H_{16}K_2$ al 92% de pureza.

Gramos de la sal = $(0,1224 \pm 0,0003)$ g

PM de la sal al 92,23%= 736,20 g/mol

PM del ácido fítico= 660,03 g/mol

Cantidad de solución preparada = 100 mL

$$[IP6] = 122,4 \text{ mg sal} \times \frac{92 \text{ g IP6}}{100 \text{ g sal}} \times \frac{660,03 \frac{\text{g}}{\text{mol}} IP6}{736,24 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ sal}} \times \frac{1}{0,1 \text{ L}} = 1009,52 \text{ ppm}$$

$$U[IP6] = 1009,51671 \text{ ppm} \sqrt{\left(\frac{0,0003 \text{ g}}{0,1224 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0,04}{100 \text{ mL}}\right)^2} = 2,50704 \text{ ppm}$$

$$[IP6] = (1009,5 \pm 2,5) \text{ ppm}$$

2- Cálculo de la concentración % p/p del reactivo de Wade ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ / $C_7H_6O_6S$) con su error.

P.M. $C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$ = 254,209 g/mol

P.M. $C_7H_6O_6S$ = 218,179 g/mol

P.M. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ = 270,311 g/mol

Volumen de enrase = 100 mL

g de $C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$ = $(0,3528 \pm 0,0003)$ g

g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ = $(0,0518 \pm 0,0003)$ g

$$\% FeCl_3 \cdot 6H_2O = 0,0518 \text{ g sal} \times \frac{99 \text{ g IP6}}{100 \text{ g sal}} \times \frac{100}{100 \text{ mL}} = 0,051282$$

$$U \% \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 0,051282 \% \sqrt{\left(\frac{0,0003 \text{ g}}{0,0518 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0,04 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right)^2} = 0,000298 \%$$

$$\% \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 0,0513 \pm 0,0003$$

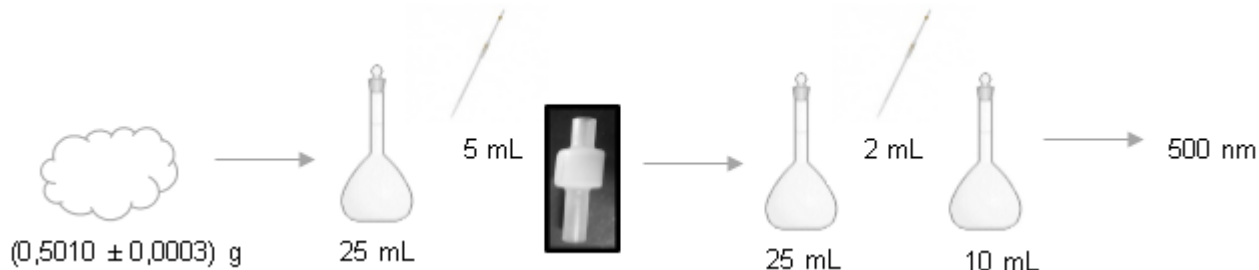
$$\% \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S} = 0,3528 \text{ g sal} \times \frac{218,179 \text{ g/mol}}{254,209 \text{ g/mol}} \times \frac{99 \text{ g IP6}}{100 \text{ g sal}} \times \frac{100}{100 \text{ mL}} = 0,299768 \%$$

$$U \% \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S} = 0,299768 \% \sqrt{\left(\frac{0,0003 \text{ g}}{0,3528 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0,04 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right)^2} = 0,000282 \%$$

$$\% \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S} = 0,2998 \pm 0,0003$$

3- Contenido de ácido fítico % (g IP6/100 g muestra).

Trigo – Extracción con TCA 0,6 M y agitación mecánica por 4 horas.



Ecuación de la recta $y = 0,009906x - 0,001666$

$$[\text{IP6}] = 0,089 + 0,001666 / 0,009906 = 9,152951 \text{ ppm}$$

$$\% \text{IP6} = 9,152951 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{10 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times \frac{25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times \frac{0,025 \text{ L}}{1} \times \frac{1 \text{ g}}{0,5010 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{100}{1} = 1,1418 \%$$

4- Cálculo de % Recuperación del IP6

Trigo – Extracción con TCA 0,6 M y agitación mecánica por 4 horas.

$$mg \text{ IP}_6 \text{ en } 0,5 \text{ g} = 9,152951 \frac{mg}{L} \times \frac{10 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times \frac{25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times \frac{0,025 \text{ L}}{1} \times \frac{0,500 \text{ g}}{0,5010 \text{ g}} = 5,709176 \text{ mg}$$

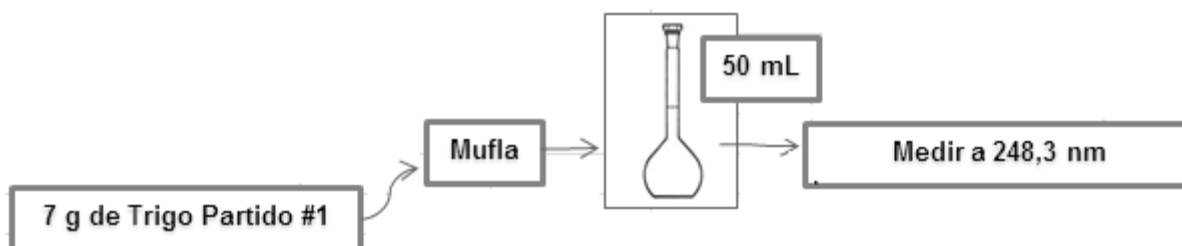
Se contaminó una réplica de la muestra con 1 mL de una solución de (5806,4 ± 10,9), añadiéndose entonces (5,81 ± 0,02) mg de IP₆.

$$mg \text{ IP}_6 \text{ totales} = 8,143434 \frac{mg}{L} \times \frac{10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times \frac{25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times \frac{0,025 \text{ L}}{1} = 10,1792925 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(10,1792925 \text{ mg} - 5,709176 \text{ mg})}{5,81} \times 100$$

$$\% \text{ Recuperación} = 83,79 \%$$

5- Contenido de metales en la muestra (mg metal/100 g muestra)



$$\text{Absorbancia} = 0,2387 \quad [Fe] = 4,745077356 \frac{mg}{L} \quad 7,0000 \text{ g con el } 8,5\% \text{ humedad son } 6,4050 \text{ g}$$

$$mg \text{ Fe en } 100 \text{ g} = 4,745077356 \frac{mg}{L} \times \frac{0,050 \text{ L}}{1} \times \frac{100 \text{ g secos}}{6,4050 \text{ g secos}} = 3,7042 \text{ mg}$$

6- Comparación de medias experimentales

Extracción con HCl 0,5 M (4,6 ± 0,2) mg IP₆ para n= 4

Extracción con TCA 0,6 M (4,8 ± 0,1) mg IP₆ para n=4

$$F_{exp} = \frac{S_1^2}{S_2^2} = 4 \quad F_{crítico}(3,3) = 15,44 \quad F_{crítico} > F_{exp} \text{ Se acepta } H_0: S_1 = S_2$$

$$S = \sqrt{\frac{(S_1)^2(n_1 - 1) + (S_2)^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad S = 0,158113883 \quad t_{calculado} = \frac{|X_1 - X_2|}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = 1,788854382$$

$$t_{crítico} (6, 95\%) = 2,45 \quad t_{crítico} > t_{calculado} \text{ Se acepta } H_0: X_1 = X_2$$

7- Prueba de Rechazo (Prueba Q)

0,052- 0,056- 0,057- 0,059- 0,061- 0,065

$$Q_{exp} = \frac{|X_q - X_n|}{W} = \frac{|0,052 - 0,056|}{0,065 - 0,052} \quad Q_{exp} = 0,3076923077 \quad Q_{crít}(6,95\%) = 0,625$$

$Q_{crítico} > Q_{experimental}$ El resultado discordante no puede rechazarse