

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



***“OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACIDO
FÍTICO EN CEREALES INFANTILES A BASE DE TRIGO POR HPLC-RI”***

*Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela, por la Br. Dhayezka
Hernández Gollarza, para optar al título de
Licenciado en Química.*

Caracas, Octubre 2015.

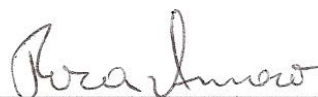
Yo, Profesora Rosa Amaro, Investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

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

“OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACIDO FÍTICO EN CEREALES INFANTILES A BASE DE TRIGO POR HPLC-RI”

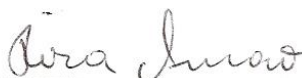
Que presenta la Br. Dhayezka Hernández Gollarza, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2014 y 2015, con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, Octubre de 2015.

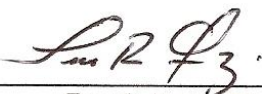


Prof. Rosa Amaro
(Tutora)

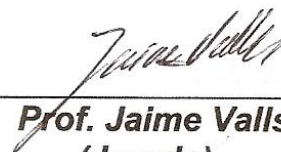
Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACIDO FÍTICO EN CEREALES INFANTILES A BASE DE TRIGO POR HPLC-RI”** presentado por la Br. Dhayezka Hernández Gollarza, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Prof. Rosa Amaro
(Tutora)



Prof. Luis R. Gomez
(Jurado)



Prof. Jaime Valls
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

A dios y la virgen por guiar mi camino, otorgándome la paciencia y fortaleza necesaria para seguirlo sin desvío.

A mi mami, mi Rosarito por ser mi todo, mi heroína, por estar siempre aun cuando todas las demás luces se han apagado.

A mi papá, que para mí vale mucho más ahora, pues los números solo sirven para contar mientras que él es invaluable.

A mi hermano Eduardo por estar tan cerca y tan fuerte a kilómetros de distancia.

A mi hermana Ariday por su gran apoyo y darme el mejor título posible, ser tía de mi Chichu (Jesús) y Iohana. Los amo.

A la Universidad Central de Venezuela por formarme como persona y profesional.

A mi tutora Rosa Amaro, por brindarme su apoyo, enseñanzas y compañía, sé que no pude haber hecho una mejor elección.

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

A mi madrina Yadi, mi segunda mamá por ser incondicional.

A Rigo por su ayuda en todo momento y palabras de aliento.

A ti padrino que ya no estas, que no te has ido, por ser especial y único.

A mi peluda Keiza, última pero no menos importante, mi compañía fiel y silenciosa, porque a veces las palabras no son necesarias para expresar amor.

Gracias a todos.

RESUMEN

El ácido fítico es un ácido orgánico presente en granos de cereales, leguminosos, oleaginosos y algunos tubérculos. La preocupación por su presencia en los alimentos, principalmente los consumidos por la población infantil, se debe a la evidencia de que disminuye la biodisponibilidad de minerales esenciales mediante la interacción con cationes multivalentes y/o proteínas para formar complejos que pueden ser insolubles o no disponibles en condiciones fisiológicas.

Por consiguiente, se han empleado diversos métodos analíticos que permiten la cuantificación del ácido fítico en los alimentos, entre los que se destaca la técnica HPLC-RI. Muchos investigadores han reportados bajos porcentajes de recuperación por esta técnica que pueden estar asociados al alto contenido de minerales en muestras procesadas o a problemas asociados al tratamiento de las mismas.

Con el propósito de mejorar los resultados obtenidos en la metodología de análisis se realizó un estudio multivariado en cereales infantiles disponibles en el mercado venezolano. Los factores de observación fueron la concentración y el tipo de ácido empleado para la extracción, así como el tiempo y tipo de sistema de extracción del analito.

Se determinó que el alto contenido de metales y el tratamiento de muestra influyen en la cuantificación del ácido fítico. El ácido tricloroacético generó bajos porcentajes de recuperación para cereales infantiles (<48%) y valores superiores al 100% para el cereal de trigo no procesado, lo que sugiere que se alcanzó la optimización del método

para este cereal con el uso de este ácido y que el efecto de los metales es importante. Con el ácido clorhídrico se obtuvieron resultados superiores, pero los porcentajes siguieron siendo bajos (<62%) para los cereales infantiles a base de trigo y para el cereal de trigo no procesado; mientras que para el cereal infantil a base de arroz se contempló una mejoría con un porcentaje de (77 – 83)%.

INDICE.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ÁCIDO FÍTICO	3
1.1.1. GENERALIDADES.	3
1.1.2. PROPIEDADES	4
1.1.3. BENEFICIOS	7
1.1.4. ÁCIDO FÍTICO EN LEGUMBRES Y CEREALES	8
1.1.5. CEREALES INFANTILES	10
1.1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS	13
1.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA	15
1.2.1. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO	17
1.2.2. CROMATOGRAFÍA DE PAR IÓNICO	20
1.3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.	21
1.4. LIOFILIZACIÓN.....	25
2. ANTECEDENTES	28
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GENERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1. INSTRUMENTACIÓN	35

4.2. ACCESORIOS	36
4.3. REACTIVOS	36
4.4. OTROS SUMINSTROS	37
4.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	37
4.5.1. SECADO DE LA MUESTRA	37
4.5.2. DISEÑO FACTORIAL	38
4.5.2.1 DISEÑO FACTORIAL N°1	38
4.5.2.1 DISEÑO FACTORIAL N°2	39
4.5.3. EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO FÍTICO	41
4.5.4. TRATAMIENTO DEL CARTUCHO DE INTERCAMBIO ANIÓNICO.....	42
4.5.5. ELIMINACIÓN DEL DISOLVENTE	43
4.5.6. ANÁLISIS POR HPLC-RI.....	44
5. ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	45
5.1. ESTUDIOS PRELIMINARES	45
5.1.1. CONDICIONES DE TRABAJO	45
5.1.2. CURVA DE CALIBRACIÓN	46
5.1.3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA DE CEREAL INFANTIL	49
5.2. DISEÑO FACTORIAL N°1	53
5.3. DISEÑO FACTORIAL N°2	61
5.4. DISEÑO FACTORIAL N°3	71
5.5. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO Y CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	74

5.5.1. CEREAL DE TRIGO “CERELAC”	75
5.5.1.1. EXTRACCIÓN CON HCl.....	76
5.5.1.2 EXTRACCIÓN CON TCA	79
5.5.2. CEREAL DE TRIGO/MIEL.....	84
5.5.2.1. EXTRACCIÓN CON HCl.....	84
5.5.2.2 EXTRACCIÓN CON TCA	87
5.5.3. CEREAL DE ARROZ	90
5.5.3.1. EXTRACCIÓN CON HCl.....	90
5.5.3.2 EXTRACCIÓN CON TCA	92
5.5.4. CEREAL DE TRIGO PARTIDO #1	94
5.5.4.1. EXTRACCIÓN CON HCl.....	95
5.5.4.2 EXTRACCIÓN CON TCA	97
6. CONCLUSIONES	101
7. RECOMENDACIONES	102
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
9. APENDICE.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de fósforo y ácido fítico en cereales, legumbres, semillas oleaginosas y productos proteínicos.....	9
Tabla 2. Factores y niveles del diseño factorial N°1.....	38
Tabla 3. Tiempos empleados para cada tipo de extracción del diseño factorial N°1.....	38
Tabla 4. Combinación de los factores y niveles del diseño factorial N°1.....	39
Tabla 5. Factores y niveles del diseño factorial N°2.....	40
Tabla 6. Concentración del tipo de ácido de extracción del diseño factorial N°2.....	40
Tabla 7. Combinación de los factores y niveles del diseño N°2.....	41
Tabla 8. Concentración en mg/L de ácido fítico obtenidas con el diseño factorial N°1...	53
Tabla 9. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de la dilución o rotaevaporación de las muestras tratadas con HCl 2 M y ultrasonido de punta por 3 minutos.....	62
Tabla 10. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de la dilución o rotaevaporación de las muestras tratadas con HCl 2M y ultrasonido por 3 horas.....	63
Tabla 11. Concentración en mg/L de ácido fítico obtenidas con el diseño factorial N°2.....	67
Tabla 12. Factores y niveles del diseño factorial N°3.....	71
Tabla 13. Concentración del tipo de ácido de extracción para el diseño factorial N°3...	72
Tabla 14. Concentración en mg/L de ácido fítico obtenidas con el diseño factorial N°3.....	72
Tabla 15. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo “cerelac” con agregado de 300mg/L de IP6 y extracción con HCl 0,5 M.....	76

Tabla 16. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo “cerelac” con agregado de 400 mg/L de IP6 agregado y extracción con HCl 0,5M.....	78
Tabla 17. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo “cerelac” con agregado de 300 mg/L de IP6; TCA 0,9 M.....	80
Tabla 18. Resumen de Valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo “cerelac” con agregado de 400 mg/L de IP6; TCA 0,9 M.....	82
Tabla 19. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo “cerelac” con diferentes ácidos de extracción.....	83
Tabla 20. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo/miel; HCl 0,5M.....	85
Tabla 21. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo/miel; TCA 0,9 M.....	87
Tabla 22. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo/miel con diferentes ácidos de extracción.....	89
Tabla 23. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de arroz; HCl 0,5 M.....	90
Tabla 24. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de arroz; TCA 0,9 M.....	92
Tabla 25. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de arroz.....	94
Tabla 26. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo partido #1; HCl 0,5 M.....	95
Tabla 27. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo partido #1; TCA 0,9 M.....	97

Tabla 28. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo partido #1.....	99
Tabla 29. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para todos los cereales analizados para diferentes ácidos de extracción.....	100

1. INTRODUCCIÓN.

La ingesta adecuada de micronutrientes como el hierro, zinc y calcio son importantes para garantizar salud, crecimiento y desarrollo óptimo de los lactantes y niños pequeños^[1]. En virtud de sus características nutricionales, alta disponibilidad relativa y tradiciones alimentarias, los cereales conforman un grupo básico de alimentos en la dieta de la población latinoamericana^[2].

Los cereales, incorporados como harinas, suelen ser los primeros alimentos sólidos que se dan a los niños para complementar la leche materna y fórmula infantil, coincidiendo con un período de rápido crecimiento y desarrollo, cuando una dieta adecuada es fundamental para satisfacer las necesidades de nutrientes del niño^[3].

Debido a los numerosos beneficios para la salud de la fibra dietética, el consumo de salvado de varios granos de cereales está aumentando. El ácido fítico se asocia con el salvado, algunos salvados pueden contener más de 5% de ácido fítico. Como consecuencia, un mayor consumo de ácido fítico es el resultado del aumento en el consumo de alimentos ricos en fibra. Si el consumidor está ingiriendo una dieta marginal en minerales esenciales, el ácido fítico puede llevar a una deficiencia nutricional^[4].

El ácido fítico tiene la fuerte capacidad de quelar iones metálicos multivalentes, especialmente zinc, calcio y hierro. La unión puede dar lugar a sales muy insolubles que son pobremente absorbidos desde el tracto gastrointestinal, lo que se traduce en una escasa biodisponibilidad de minerales^[5]. La importancia de la combinación correcta

de alimentos para proporcionar cantidades suficientes de todos los nutrientes esenciales para el organismo debe hacerse hincapié, particularmente en los grupos de población donde el impacto de una alta concentración de fitato puede ser más grave. Este es el caso de los niños, adolescentes, mujeres embarazadas y adultos mayores, donde la absorción de minerales es especialmente importante^[6].

Debido a la acción antinutricional del ácido fítico es necesario contar con métodos de análisis que permitan la cuantificación del mismo y proporcionen resultados confiables, ya que el efecto negativo que tiene sobre la disponibilidad de minerales es de gran relevancia principalmente en la población infantil.

El contenido de ácido fítico puede variar dependiendo del tipo de cereal. La mayoría de los alimentos para infantes están hechos a base de trigo, arroz y/o maíz; siendo el trigo quien posee una mayor cantidad de ácido fítico, el cual se encuentra al igual que en el arroz en la capa del pericarpio. En cuanto al maíz posee un menor contenido de ácido fítico, y se encuentra a diferencia de muchos cereales en el germen.

Este trabajo propone la optimización del método de análisis para la cuantificación del ácido fítico en cereales infantiles a base de trigo que se encuentran disponibles en el mercado venezolano, siendo las variables de este estudio el uso de diferentes tipos de ácidos, concentraciones y métodos de extracción utilizando como técnica de análisis HPLC-RI.

1.1 ÁCIDO FÍTICO.

1.1.1 GENERALIDADES

El ácido fítico se encuentra ampliamente distribuido en los alimentos de consumo habitual, particularmente en los vegetales. Se encuentra en altas concentraciones en las semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas, y en menores cantidades en los tubérculos y los productos de la huerta. En general, su presencia no implica la existencia de problemas de toxicidad aguda. Sin embargo, como interfiere con la función de los nutrientes esenciales, el ácido fítico puede ser considerado una sustancia natural antinutriente^[7].

El ácido fítico es un anillo inositol substituido con seis grupos fosfato (Figura 1) cuyo nombre químico es myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquis (dihidrógeno fosfato) (IP6).

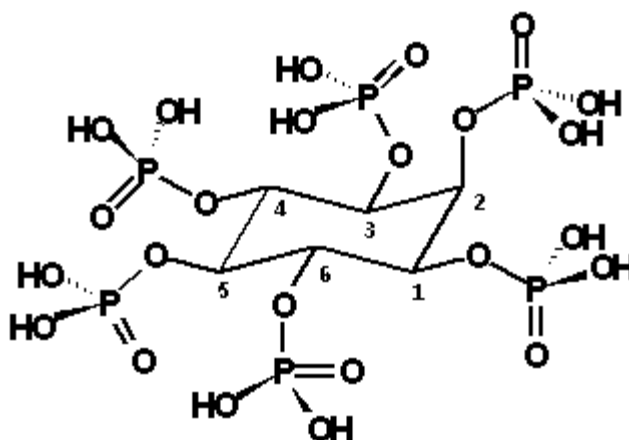


Figura 1. Estructura química del ácido fítico

1.1.2 PROPIEDADES

El ácido fítico se hidroliza, enzimáticamente por fitasas, o químicamente hacia sus inositoles fosfatos menores, tales como el inositol pentafofato (IP5), inositol tetrafofato (IP4), inositol trifosfato (IP3) y posiblemente el inositol difosfato (IP2) y monofosfato durante el almacenamiento, la fermentación, la germinación, el procesamiento de alimentos o en la digestión en el intestino humano. Sólo el IP6 y el IP5 tienen un efecto negativo en la biodisponibilidad de los minerales, los otros productos hidrolíticos formados tienen una pobre capacidad de unirse a los minerales o los complejos formados son más solubles^[4].

En esta forma el fósforo permanece no disponible para el hombre y animales monogástricos, debido a que éstos no están provistos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato^[8].

Los grupos ácidos presentes en su molécula facilitan la formación de sales de zinc, hierro, calcio, magnesio, cobalto y manganeso, las cuales presentan baja solubilidad en las condiciones de pH intestinal, lo que compromete la biodisponibilidad de estos minerales, así como la del fósforo presente en el quelato o fitato. Adicionalmente, se ha comprobado que el ácido fítico también genera una disminución en la digestibilidad de lípidos, almidón y proteínas^[2].

La solubilidad de las sales formadas por el ácido fítico varía en función del pH, debido a los grupos fosfatos y su capacidad de formar los complejos metálicos. La interacción del

ácido fítico con las proteínas es dependiente del pH, 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 del ácido fítico (Figura 2). En la semilla 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 emplea para definir la mezcla de sales de Ca y Mg del ácido fítico^[8].

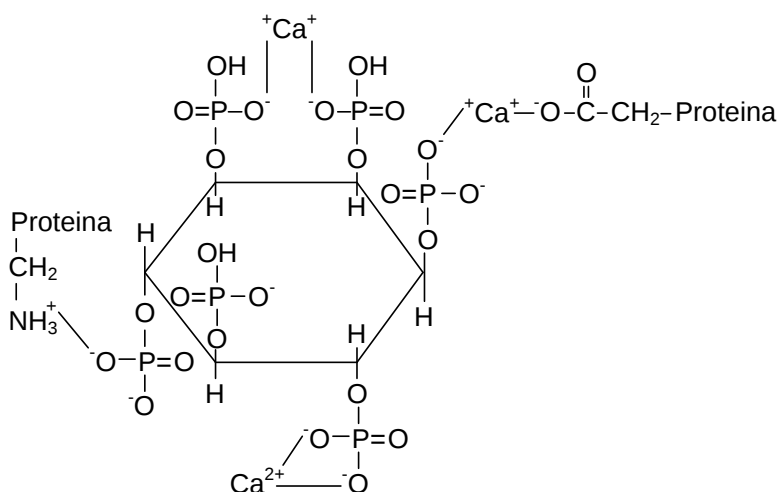


Figura 2. Interacciones del ácido fítico con minerales y proteínas.

Sin embargo, es importante considerar que la solubilidad de las sales del ácido fítico varía con el pH, ya que el grado de protonación de los grupos fosfato que no se han unido a los metales está en función de dicho parámetro. Aparentemente, en la semilla el ácido fítico se encuentra como sales relativamente solubles de Na o K más que como fitina insoluble. Las sales de Ca y Mg son solubles a pH bajos e insolubles a pH elevados, por lo tanto a pH fisiológico serían insolubles, de ahí el descenso de la biodisponibilidad mineral. 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^[8].

El grado de interacción entre ácido fítico y proteínas es dependiente de la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con minerales a un pH dado. A bajo pH, por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el ácido fítico negativamente. En estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas, y ésteres fosfato aniónicos del ácido fítico, formándose un complejo binario (Figura 2). A pH intermedio, por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, dado que la carga de las proteínas al igual que la del ácido fítico es negativa, su interacción sería imposible, sin embargo si puede realizarse a través de la formación de un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} (Figura 2). Esta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo imidazol desprotonado de la histidina, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos. A pH intermedio también pueden existir algunos complejos binarios, ya que a dicho pH los residuos lisil y arginil de las proteínas están aún cargados positivamente. A pH elevado la interacción entre las proteínas y el ácido fítico disminuye, los grupos lisil y arginil pierden su carga, y por tanto su capacidad de formar complejos binarios. Los complejos ternarios se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta a pH elevado; un incremento en la concentración del ión Na hace que la reacción de equilibrio del complejo ternario se desplace hacia la derecha liberándose fitato cálcico insoluble y proteína-sódica soluble (Figura 2)^[8].

Nutricionalmente, lo más resaltante es el hecho de que a pH 6 (pH aproximado del duodeno, donde tiene lugar la absorción máxima de iones metálicos divalentes) se produce la precipitación máxima de fitato-mineral^[9].

Se ha reportado que la reducción de la disponibilidad de minerales esenciales por cualquiera de los fitatos o de los complejos fitato-proteína en las legumbres y otros alimentos depende de varios factores tales como^[9]:

- La capacidad del transporte endógeno en la mucosa intestinal para absorber los minerales esenciales unidos a fitato y otras sustancias dietéticas.
- La concentración de ácido fítico en los productos alimenticios.
- La concentración de minerales en los alimentos.
- La digestión o hidrólisis del fitato por la enzima fitasa en el intestino.
- Inhibición de fitasa.
- Transformación de los productos por el procesamiento.

1.1.3 BENEFICIOS.

Se ha reportado una gran variedad de beneficios del ácido fítico en la salud humana, siendo este un agente contra el cáncer (tejido blando, de colon, cáncer de pulmón metastásico y el cáncer de mama), un inhibidor para el desarrollo de cálculos renales y también un agente antioxidante. La función antioxidante del ácido fítico se produce por la quelación del hierro mediante la ocupación de todos los puntos de coordinación disponibles, por lo que inhibe la generación de $\cdot\text{OH}$ ^[10].

1.1.4 ÁCIDO FÍTICO EN LEGUMBRES Y CEREALES.

El contenido de ácido fítico y fósforo de los cereales, legumbres, semillas oleaginosas y sus productos proteicos se presentan en la Tabla 1. La cantidad de ácido fítico varía desde 0,50 hasta 1,89% en cereales (excepto arroz pulido), 0,40 a 2,06% en las legumbres, 2,0 a 5,2% en las semillas oleaginosas, excepto soja y cacahuetes (agrupados en leguminosas), y 0,40-7,50 % en los productos de proteína. En el arroz pulido (de grano corto, mediano y largo) el contenido de ácido fítico oscila desde 0,14 hasta 0,34%^[9].

Entre los cereales, las legumbres y otras semillas oleaginosas, el sésamo tiene una mayor cantidad de ácido fítico. En muchos casos, el contenido de ácido fítico no se considera que sea absoluto y puede variar dependiendo de la variedad de cultivo, las condiciones climáticas, ubicación, condiciones de riego, tipo de suelo, y el año durante el cual se cultivan^[9].

Tabla 1. Contenido de fósforo y ácido fítico en cereales, legumbres, semillas oleaginosas y productos proteínicos.

	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
Milo	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
Las habas (descascarado)	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, desgrasados)	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
Harina de soja (con toda la grasa o desgrasada y casco)	0,39-0,45	1,40-1,60
Colza concentrado de proteína	1,49-2,11	5,30-7,50
Concentrado de proteína de trigo	0,53-0,76	1,88-2,70
El gluten de trigo	0,60	2,13

1.1.5 CEREALES INFANTILES.

La dieta de un infante está determinada por diferentes factores: las necesidades metabólicas, el crecimiento, el desarrollo del sistema nervioso, los riñones y el aparato digestivo. Por lo tanto, siempre es necesario evaluar todos estos aspectos a fin de proporcionarle una dieta con suministros adecuados en cada etapa del desarrollo. Lo más importante es ofrecer un consumo adecuado de energía para cubrir las

necesidades y estimular el crecimiento y la formación de tejidos, con el fin de mantener la velocidad correcta de crecimiento^[7].

El objetivo principal de la dieta adicional en lactantes es complementar la leche materna con nutrientes esenciales (sobre todo hidratos de carbono) que propicien el crecimiento y desarrollo adecuado. Además, la dieta complementaria estimula la función gastrointestinal y favorece los hábitos dietéticos^[7].

Los principales componentes de los alimentos infantiles son los cereales, las verduras y las legumbres. Son una buena fuente de proteínas, minerales y vitaminas para los bebés, pero la mayoría de estos componentes pueden contener ácido fítico, un factor antinutricional. Durante el período pre-destete, la dieta de un bebé se basa en harinas de cereales, así como de las fórmulas especiales para infantes. Los antecedentes demuestran que las propiedades negativas del ácido fítico, en particular sobre la biodisponibilidad de minerales, pueden tener un efecto sobre la salud del bebé durante este primer período de crecimiento^[11].

El bebé, después de 4 meses de edad, está en riesgo de desarrollar un déficit de hierro como resultado de una disminución de sus depósitos orgánicos y el aumento de sus necesidades nutricionales, determinado por la velocidad de crecimiento^[7].

Por lo tanto, una dieta adecuada es fundamental para satisfacer las necesidades nutricionales infantiles. Los cereales para bebés tienen altas cargas energéticas, con base en su contenido de hidratos de carbono y proteínas, alrededor del 78% y 13%, respectivamente, y también proporcionan minerales y vitaminas, sobre todo tiamina. Los

cereales más comunes que se utilizan para formular harinas de cereales infantiles son el trigo, la cebada, el centeno, la avena, el arroz y el maíz. Ellos pueden ser utilizados individualmente o mezclados para obtener harinas infantiles multicereales. Otros productos tales como raíces (tapioca, las zanahorias) o legumbres (guisantes) también pueden ser utilizados para preparar tales alimentos^[3].

Los cereales infantiles son comúnmente fortificados con vitaminas y minerales con el fin de lograr la ingesta dietética de referencia. Sin embargo, en la fortificación no sólo la calidad sino también la estabilidad y la biodisponibilidad de los minerales son muy importantes. La biodisponibilidad puede ser definida como el grado en que un nutriente es capaz de ser absorbido dentro del cuerpo. Un gran número de factores pueden influir en la proporción en que es absorbido un nutriente de un alimento en particular. El ácido fítico es un factor antinutricional, se encuentra principalmente en los cereales no refinados, legumbres y semillas oleaginosas. En condiciones fisiológicas donde se encuentra cargado negativamente, quela fuertemente cationes como el zinc, calcio y hierro, provocando la formación de sales insolubles, generando baja disponibilidad ^[12].

La baja absorción de estos nutrientes a base de cereales se considera que es un factor en la etiología de las deficiencias de minerales en los lactantes. Sin un suministro adecuado de hierro biodisponible, los bebés pronto se convierten en deficientes de hierro. Esta deficiencia se encuentra ligada a complicaciones como la anemia, una disminución significativa en el desarrollo psicomotor y mental, y la reducción de la capacidad de autoinmunidad del cuerpo. Los cereales también pueden afectar la absorción de calcio, evitando la formación de una masa ósea óptima, que puede ser importante en la reducción del riesgo de fracturas y osteoporosis a largo plazo. La deficiencia de zinc puede conducir a un aumento de la gravedad y la incidencia de las

infecciones diarreicas y respiratorias, así como la disminución de las tasas de crecimiento^[3].

1.1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS.

En la extracción del fitato presente en los distintos alimentos y/o semillas influyen varios factores entre los que se encuentran^[8]:

- 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 en los alimentos.
- El pH.
- El tipo de solvente y fuerza iónica usada en la extracción.
- La presencia de hierro endógeno, que a altas concentraciones puede precipitar el fitato durante la extracción, y con ello producir un error por defecto en la cuantificación final

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. Hasta 1980, el ácido fítico era exclusivamente determinado a través de métodos de precipitación no específicos o de intercambio iónico. Actualmente son más comunes los métodos que incluyen HPLC de fase reversa, cromatografía iónica o RMN^[8].

Aún sigue vigente el método considerado como oficial por la A.O.A.C. desarrollado por Harland y Oberleas. 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. El ácido fítico es extraído directamente de la muestra con HCl 1,2%, el extracto obtenido es eluido a través de una resina de intercambio iónico para separar el fósforo inorgánico y así preconcentrar el IP6. El fitato eluido es digerido con ácido sulfúrico y ácido nítrico concentrados y el contenido de fósforo liberado es cuantificado mediante análisis fotocolorimétrico del IP6 como ortofosfato (PO_4^{3-})^[8].

Con los avances en la tecnología de análisis, muchos de los procedimientos anteriores son considerados complejos y de alto consumo de tiempo, por ende han sido modificados. Posteriormente, muchos métodos se han descrito para determinar la concentración de ácido fítico en los granos de cereales. Los métodos HPLC tienen la sensibilidad y reproducibilidad necesaria para medir bajas concentraciones en diversos productos, por lo que son adecuados para cuantificar el contenido de ácido fítico de los alimentos procesados. Pueden simultáneamente separar y determinar IP6 y las especies fosforiladas más bajas con un acortamiento del tiempo de extracción y preconcentración^[13].

En el método propuesto por Lehrfeld y Morris en el año 1992, la separación de los inositoles fosfato se realiza según el método de Harland y Oberleas y la solución resultante es concentrada y analizada por HPLC con una columna C18 de fase reversa. Otros autores han mejorado el análisis con HPLC utilizando en la preconcentración, la cromatografía de intercambio iónico para separar los inositoles fosfato, que son determinados con HPLC de par iónico con una columna de C18 fase reversa^[8].

1.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA.

La cromatografía es la ciencia y el arte de separar entre si los componentes de una sustancia. La separación se consigue a través de una gran variedad de técnicas cuyas bases moleculares tienen diferencias muy diversas^[14].

Todo proceso cromatográfico tiene como característica la distribución de los componentes en dos fases, una móvil y una estacionaria, estas fases son inmiscibles. La fase móvil es un líquido, un gas o un fluido supercrítico, la fase estacionaria generalmente se coloca en una columna cilíndrica de dimensiones apropiadas. Cada componente experimenta una afinidad distinta por la fase estacionaria y así permanece en esta fase más o menos tiempo; cuando interacciona con la fase móvil. Todos los componentes de la muestra pasan por este proceso, pero como sus afinidades por la fase estacionaria son diferentes, permanecerán tiempos diferentes en ella, algunos serán eluidos primeros, los más rápidos y otros después, el resultado final es que se van a separar a lo largo del camino de migración^[15].

Debido a lo anterior, la clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. Las tres clases generales de cromatografía son: cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos^[16].

El gran poder de la cromatografía líquida reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de

numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores^[14].

Una de las primeras clasificaciones de la cromatografía líquida se refiere a la forma física global de la fase estacionaria; así tendríamos cromatografía en columna, cromatografía en capa fina y cromatografía líquida capilar. Otras nomenclaturas se basan en la dirección del flujo de la fase móvil: cromatografía ascendente, cromatografía descendente y cromatografía en lecho plano. Otras clasificaciones se basan en la eficiencia de la separación; así, hablaríamos de cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía de capa fina de alta resolución. Los diferentes tipos de cromatografía líquida también se clasifican atendiendo a la interacción que se produce entre la fase estacionaria y el soluto^[14]. Según esta clasificación se denominan: cromatografía de reparto, cromatografía de adsorción, cromatografía iónica y cromatografía de exclusión por tamaño.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es la técnica más usada debido a su alta sensibilidad, su adaptación a las determinaciones cuantitativas y a que permite la separación de especies no volátiles o termolábiles porque trabaja a temperatura ambiente. Es de interés para estudio de sustancias en ciencia, industria y sociedad como: aminoácidos, carbohidratos, terpenoides, plaguicidas, esteroides, hidrocarburos, drogas, proteínas, antibióticos, órgano metálico, especies inorgánicas y otros^[15].

Para el análisis del ácido fítico en cereales infantiles este trabajo propone el empleo de la cromatografía de reparto en fase inversa con formación de pares iónicos usando un detector de índice de refracción, por lo que a continuación se ampliara al respecto.

1.2.1 CROMATOGRAFÍA DE REPARTO.

En esta técnica, una fase estacionaria líquida forma una película delgada en la superficie de un soporte sólido. El soluto se equilibra entre este líquido estacionario y una fase móvil líquida^[17].

La cromatografía de reparto se puede subdividir en cromatografía líquido-líquido y cromatografía de fase unida químicamente. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas que soportan el relleno. En líquido-líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física. En fase unida químicamente, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte. La cromatografía de reparto, al principio era exclusivamente del tipo líquido-líquido; sin embargo, en la actualidad los métodos de fase unida químicamente son los que predominan debido a las desventajas del sistema líquido-líquido. Una de esas desventajas es la pérdida de la fase estacionaria por disolución en la fase móvil, lo que hace necesario un recubrimiento periódico de las partículas del soporte^[16].

La principal ventaja de las columnas en la cromatografía de fase unida químicamente es que son bastante estables, debido a que la fase estacionaria está unida químicamente al soporte y no se puede eliminar o se pierde fácilmente durante el uso. Por lo tanto, no se requiere presaturación de las dos fases^[18].

La cromatografía de fase unida químicamente normalmente implica una fase estacionaria relativamente no polar (por ejemplo, C8 o C18 hidrocarburos) que se utiliza

en conjunción con fases móviles muy polares para separar una amplia variedad de solutos menos polares. Las columnas de cromatografía de fase unida químicamente también se pueden utilizar para separar especies iónicas a través de cromatografía de par iónico^[18].

Casi todas las columnas de cromatografía de reparto utilizan sílice rígida o soportes a base de sílice que ofrecen alta eficiencia de la columna y una excelente estabilidad mecánica a altas presiones. Todos los diversos métodos para la fijación de una fase unida a un soporte silíceo se basan en la reacción de los grupos silanol superficiales^[18]. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 μm . La superficie de la sílice totalmente hidrolizada por calentamiento con HCl 0,1 M durante uno o dos días, está constituida por grupos silanol químicamente reactivos (Figura 3)^[16].

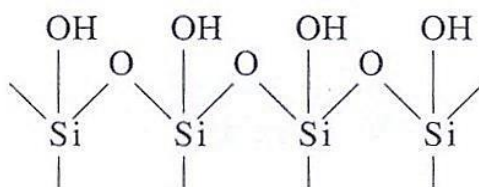


Figura 3. Superficie de la sílice hidrolizada^[16].

Las columnas más útiles y ampliamente disponibles están basadas en siloxanos. El siloxano en condiciones de fase unida químicamente se prepara típicamente mediante la reacción de los grupos silanol del apoyo con reactivos organoclorosilano u organoalcóxidosilano (dependiendo del grupo R deseado). Fases ligadas de este tipo son hidrolíticamente estable durante todo el intervalo de pH 2 - 8,5^[18].

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto: cromatografía en fase normal y cromatografía en fase inversa^[16].

En la cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases estacionarias, estando formada la más común por grupos no polares unidos a la sílice; los más utilizados los grupos orgánicos $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ y $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$. De ellos, la cadena de 18 carbonos (grupo octadecilo) es la más común^[14]. En los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución^[16].

En la mayoría de las aplicaciones de la cromatografía de fase inversa, la elución se lleva a cabo con una fase móvil de elevada polaridad como es el caso de una disolución acuosa conteniendo concentraciones diversas de disolventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. De este modo, se ha de poner especial cuidado en que el valor del pH no sea mayor que 7,5 porque si no puede tener lugar la hidrólisis del siloxano, lo que originaría la degradación o destrucción del relleno^[16].

La cromatografía en fase inversa es relativamente popular ya que en las separaciones en fase inversa los picos tienden a ser agudos y simétricos y el equilibrio en las reacciones de adsorción/desorción tiende a ser rápido^[14].

1.2.2 CROMATOGRAFÍA DE PAR IÓNICO.

Es un tipo de cromatografía de reparto de fase inversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. La fase móvil está constituida por una disolución tampón acuosa que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, y un compuesto iónico que aporta un contraión de carga opuesta a la del analito ^[16].

Los grupos iónicos pueden estar recubiertos dinámicamente en columnas de fase inversa usando compuestos iónicos que se unen al relleno de la fase inversa. Se pueden añadir al eluyente aniones de ácidos alquilsulfónicos; por ejemplo, ácido hexasulfónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{H}^+$). Estos cubren la fase estacionaria de la fase inversa, dándole propiedades de intercambio catiónico. Análogamente se pueden añadir al eluyente cationes, como el hidróxido de tetrapropilamonio ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_4\text{N}^+\text{OH}^-$), para darle propiedades de intercambio aniónico^[14].

1.3 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Actualmente la extracción en fase sólida es una técnica muy popular, dado que ofrece la preparación de muestras en forma rápida y selectiva. La versatilidad de la extracción en fase sólida permite el uso de esta técnica para muchos propósitos, tales como la purificación, enriquecimiento de compuestos trazas, desalado, derivatización y fraccionamiento de clase^[19].

Los procedimientos de extracción en fase sólida se utilizan no sólo para extraer trazas de compuestos orgánicos a partir de muestras ambientales, sino también para eliminar los componentes interferentes en matrices complejas con el fin de obtener un extracto limpio que contiene los analitos de interés. La técnica de extracción en fase sólida se aplica ampliamente para el aislamiento de los analitos a partir de una matriz líquida y extractos purificados^[19].

El principio de la extracción en fase sólida es similar a la de la extracción líquido-líquido, que implica una partición de los solutos entre dos fases. Sin embargo, en lugar de dos fases líquidas inmiscibles, como en la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida comprende el particionamiento entre un líquido (disolvente o matriz de la muestra con analitos) y un sólido (absorbente) de fase^[19].

La selección de un sorbente apropiado en la extracción en fase sólida depende de la comprensión de los mecanismos de interacción entre el sorbente y el analito de interés. Esa comprensión a su vez depende del conocimiento de las propiedades hidrofóbicas y polares tanto del soluto como del sorbente. Los mecanismos de retención más

comunes se basan en fuerzas de van der Waals (interacciones no polares, enlaces de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo y las interacciones iónicas). Cada sorbente ofrece una combinación única de estas propiedades que se pueden aplicar a una amplia variedad de problemas de extracción^[19].

El soporte sólido se puede clasificar atendiendo a diferentes características químicas: polar y no polar; ácido, neutro o básico; hidrófilo o hidrófobo; y afinidad catiónica o afinidad aniónica^[14].

En la técnica de extracción en fase sólida existen cuatro tipos de formatos de sorbente: discos libres (que generalmente son 47 mm de diámetro o el tamaño de filtración estándar), discos en barriles de jeringa del cartucho (que varían en tamaño desde los discos microscópicos en jeringas de 1 mL a una jeringa de 6 mL), una configuración de placa de 96 pocillos de microtitulación que utiliza el disco de 1 mL, y la punta de pipeta^[19].

Hoy en día un gran número de sorbentes están disponibles, y los grupos que se usan con más frecuencia son:

- Gel de sílice modificado químicamente.
- Sorbentes poliméricos.
- Carbono poroso.

La extracción en fase sólida se lleva a cabo utilizando sorbentes a base de resina de sílice u orgánicos, con características físicas y propiedades químicas adecuadas. La naturaleza del material de base y los grupos funcionales adicionales afectan la forma en que se utilizan los sorbentes. Los sorbentes en todos los casos son materiales poliméricos tridimensionales que se fabrican bajo condiciones diseñadas para proporcionar un material rígido muy poroso pero con una gran área superficial^[19].

El proceso de extracción en fase sólida puede proporcionar muestras que se encuentran en solución, libre de componentes de interferencia de la matriz y con suficiente concentración para la detección. La extracción en fase sólida se logra a través de la interacción de tres componentes: el sorbente, el analito y el disolvente. El analito debe ser atraído más fuertemente al sorbente que a la matriz. El mejor mecanismo y procedimiento de extracción en fase sólida se definen por las características del analito en la muestra. Los pasos del proceso de extracción en fase sólida se muestran en la figura 4^[19].

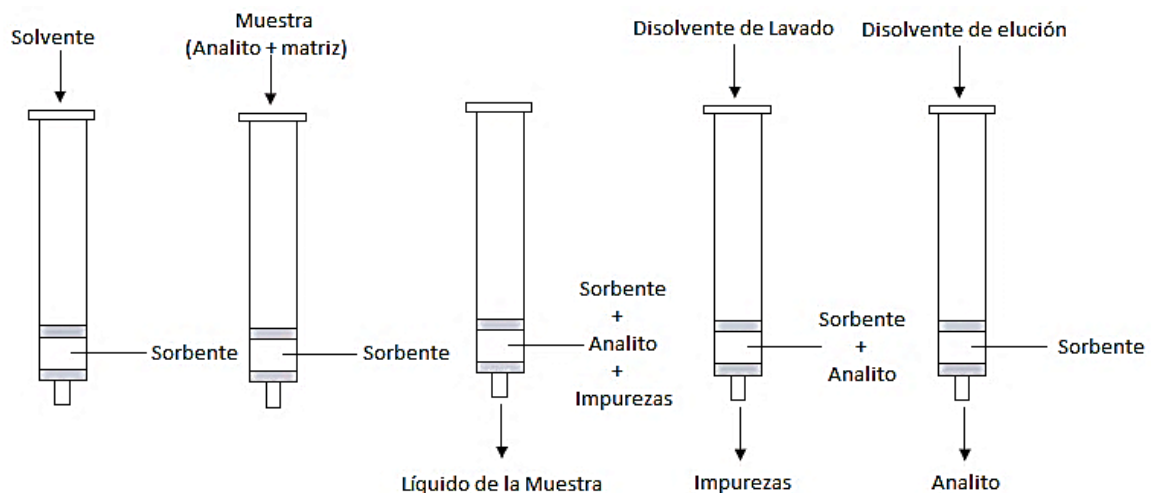


Figura 4. Procedimiento de extracción en fase sólida^[19].

La extracción en fase sólida no solo transforma la matriz de la disolución, sino que al mismo tiempo reduce el volumen de la muestra. Por lo tanto, es claro que se necesitan superficies grandes para retener elevadas cantidades de analito, de manera que la cantidad de fase sólida para la extracción depende tanto del tamaño de la muestra como de la concentración presente de analito^[14].

La extracción en fase sólida se ha presentado como alternativa a la extracción líquido-líquido, debido a la simplicidad, bajo costo y fácil automatización. Puede ser un método eficaz para la preparación de muestras. Es una técnica de preparación de muestras ampliamente utilizada para el aislamiento, la concentración, limpieza y cambio de medio. El desarrollo de los absorbentes más selectivos y de fácil uso, ha dado lugar a procedimientos simplificados y una disminución del riesgo de errores. La extracción en fase sólida tiene muchas ventajas en comparación con las técnicas de preparación de muestras más tradicionales, tales como: altas recuperaciones del analito, concentración del analito, extractos altamente purificados, la capacidad de extraer simultáneamente analitos de una amplia gama de polaridad, facilidad de automatización, compatibilidad con el análisis instrumental y la reducción del disolvente orgánico^[19].

Para el análisis de ácido fítico es necesario el uso de fases con grupos aminos (aminopropil), ya que puede interactuar a través de enlaces de hidrogeno y por sus propiedades de intercambiador aniónico.

1.4 LIOFILIZACIÓN.

Históricamente el proceso de liofilización se ha considerado el mejor método de conservación de productos de diversa naturaleza: farmacéutico (comprimidos, tejidos, plasma, sueros y otros productos biológicos), catalizadores, materiales orgánicos (madera, flores, animales), alimentos y otros^[20].

La liofilización es un proceso de conservación mediante sublimación utilizado con el fin de reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles. La estructura fisicoquímica del material no es alterada, pero permite su conservación indefinida sin cadena de frío, con menos del 15% de humedad y alta estabilidad microbiológica^[20].

T.A Jennings (1993) define la liofilización como un proceso de estabilización en el cual el material primero se congela y se concentra el solvente, comúnmente agua, reduciéndolo mediante sublimación y desorción, a niveles que no sostendrán más el crecimiento biológico o las reacciones químicas. Consta de tres fases: sobrecongelación, desecación primaria y desecación secundaria^[20]. La liofilización da lugar a productos alimenticios de mayor calidad que cualquier método de secado. El factor principal es que se preserva la rigidez estructural en la sustancia congelada cuando se verifica la sublimación. Al añadir agua posteriormente, el producto rehidratado retiene la mayor parte de su estructura original. Las temperaturas bajas que se emplean reducen al mínimo las reacciones de degradación que casi siempre ocurren en los procesos comunes de secado^[20].

La liofilización involucra varias etapas (Figura 5)^[21]:

- Congelación a bajas temperaturas.
- Secado por sublimación del hielo (o del solvente congelado) del producto congelado, generalmente a muy baja presión, comúnmente se estudia en dos etapas, a saber: etapa primaria de secado y etapa secundaria de secado.
- Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas.

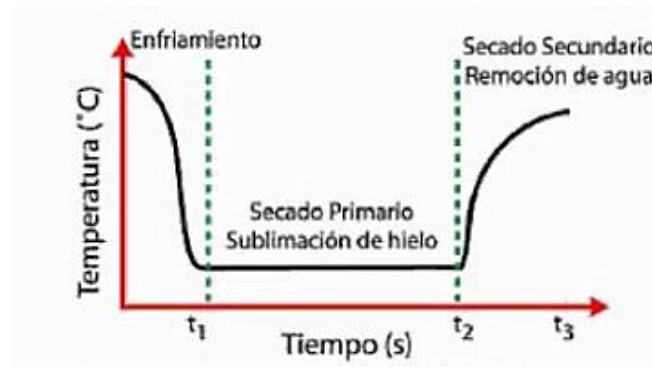


Figura 5. Pasos del proceso de liofilización^[21].

Al final de la etapa de secado primaria, todo el hielo se ha eliminado. Una cantidad significativa de agua permanece asociada con la fase de soluto y no se congela. Esta agua no congelada se retira por desorción en la etapa de secado secundario del proceso, por lo general el empleo de temperaturas por encima de temperatura ambiente hasta que el contenido de agua residual disminuye hasta el contenido de humedad deseado^[21].

La temperatura y la presión baja, junto con la ausencia de agua líquida y oxígeno, permiten que la estructura inicial de alta porosidad sea preservada; estos factores también reducen al mínimo la degradación térmica y química^[21].

Generalmente, al liofilizar adecuadamente un material se puede almacenar por periodos muy largos de tiempo, con reducciones muy bajas de sus características organolépticas, físicas, químicas y biológicas^[20].

La principal ventaja de esta técnica es la calidad superior del producto final. Sin embargo, visto el costo del proceso, la liofilización queda generalmente reservada para productos con un alto valor agregado, semejantes a los productos farmacéuticos o alimentos para bebés y ciertas especies. Una de las causas de este elevado costo es la longevidad del producto procesado. En efecto, la baja presión del proceso y la débil conductividad de los productos liofilizados (debido a la textura porosa) afectan de manera significativa y negativa la transferencia de calor y de masa y por consecuencia la duración de la operación de deshidratación^[20].

En síntesis ofrece ventajas tan importantes como la conservación y transporte fácil de los productos, la ausencia de temperaturas altas, la inhibición del crecimiento de microorganismos, o la recuperación de las propiedades del alimento al añadirle el volumen de agua que en un principio tenía^[20]

2. ANTECEDENTES.

En 1989, Lehrfeld^[22] analizó el contenido de ácido fítico en cereales y legumbres por HPLC-UV e RI. La extracción y purificación del ácido fítico se realizó con HCl, se utilizó un ultrasonido de punta y un cartucho amino (columna de intercambio aniónico). Para el análisis del ácido fítico se empleó una columna de fase reversa PRP-1 y una fase móvil metanol-ácido fórmico a la cual se le añadió hidróxido de tetrabutilamonio para la formación del par iónico, con ajuste de pH a 4,3 mediante ácido sulfúrico. Al modificar conjuntamente los procedimientos de extracción y concentración, con el uso de la columna C18 permitieron la detección rápida del ácido fítico y otros inositoles parcialmente fosforilados en los granos de cereales y legumbres. El uso del ultrasonido de punta reduce el tiempo de extracción pero se debe evitar algunos problemas que se generan con ciertos cereales, como la formación de soluciones tipo gel, excesiva formación de espuma y burbujas de aire, que pueden impedir una correcta extracción.

En 1994, Lehrfeld^[23] continuó el análisis de inositoles fosfatos en cereales y legumbres siguiendo el mismo tratamiento de muestra de su trabajo de 1989, en búsqueda de menores tiempos de análisis y mejoras en la resolución cromatográfica. Utilizó una columna de fase inversa (PRP-1) en modo par iónico de material PEEK (Polyether ether ketone) ya que se reporta adsorción no específica de fitato en las columnas de acero inoxidable. Se evaluaron tres sistemas de solvente: Fase móvil A, sistema a base de metanol. Fase móvil B, sistema a base de acetonitrilo y la Fase móvil C, un sistema a base de metanol optimizado. Obteniéndose con el sistema de solventes B, menores tiempos de análisis y mejor resolución del IP3, IP4, IP5 e IP6. Se determinó que con el uso del par iónico de hidróxido de tetraetilamonio en vez de hidróxido de tetrabutilamonio se requiere menores cantidades de metanol en la fase móvil, siendo de interés por razones económicas y ambientales.

En 2001, Febles y colaboradores^[7] mediante el método propuesto por Garcia-Villanova en 1982 para la determinación de ácido fítico en harinas de cereales, analizaron una gran cantidad de muestras de cereales infantiles de diferentes variedades. Este método está basado en la titulación complejimétrica del exceso de hierro, utilizando el ácido sulfosalicílico como indicador del punto final. La media aritmética obtenida de todas las muestras estudiadas fue de 24,6 mg/g de ácido fítico. Las harinas libres de gluten presentaron el contenido más bajo de ácido fítico.

Ese mismo año, Febles y colaboradores^[6], realizaron otro estudio con el mismo método donde analizaron harinas de trigo de grano entero y refinadas. Las concentraciones del ácido fítico se encontraron en un rango de (2 - 4) mg/g para las harinas refinadas y de (6 - 10) mg/g para las de granos entero. Evidenciándose que en las harinas de grano entero hay mayor concentración del ácido. Este resultado parece lógico, ya que el ácido fítico, se encuentra en el trigo, en las cubiertas exteriores, en el pericarpio y en la capa de aleurona.

En 2001, Brooks y Lampi^[24] cuantificaron el ácido fítico en cereales infantiles por dos métodos. En el método HPLC por par iónico se utilizó ácido clorhídrico 2 M como ácido de extracción, una columna PRP-1,5 μ m y detección por RI. En el método HPLC por intercambio iónico se utilizó ácido tricloroacético 0,61 M con detección UV-Visible. Se obtuvieron grandes diferencias en las concentraciones del ácido fítico para ambos métodos. Con el método por par iónico se obtuvieron valores de IP6 más bajos que con el método por intercambio iónico. Se realizaron estudios anexos para determinar si existían otras variables que afectaran la recuperación del ácido fítico y se concluyó que el alto contenido de minerales es un factor determinante en la recuperación por HPLC-RI.

En 2003, Rodríguez J.^[25] analizó cuales eran las condiciones óptimas de separación de los inositoles fosfatos, utilizando en el estudio una columna tipo PRP-1 de material PEEK y detector RI, con una fase móvil de metanol-tetraetilamonio-ácido fórmico en diferentes proporciones. Concluyó que la mejor fase móvil para la separación era la de composición: 5% p/p de metanol, 0,28% p/p de hidróxido de tetraetilamonio y ácido fórmico para ajustar el pH a 4,3. Adicionalmente, determinó el efecto de diferentes variables sobre el tratamiento de dos muestras de trigo utilizando un diseño factorial, donde las variables fueron: temperatura de secado, tiempo de secado, tipo de extracción y volumen de ácido de extracción (HCl). El estudio reflejó que el procedimiento de secado más eficaz fue para una temperatura de 45°C por un tiempo de 6 horas, mientras que para la extracción se obtiene una mayor señal con un equipo de ultrasonido de punta por 2 minutos y 2 mL de ácido clorhídrico 0,5 M. Se concluyó que los métodos de secado por estufa no son los más idóneos para eliminar la humedad de las muestras. El porcentaje de recuperación fue de 52%.

En 2004, Park y colaboradores^[11]; compararon el método espectrofotométrico de la AOAC modificado por Harland y Oberleas (1986) con el método de Latta y Eskin (1980), a su vez con los métodos cromatográficos GC-FID y HPLC-RI en la determinación del contenido de ácido fítico en muestras de alimentos infantiles tipo pasta y harina. Los métodos espectrofotométricos mostraron valores más altos de ácido fítico que los métodos cromatográficos. El método de la AOAC determinó que la cantidad de ácido fítico en los alimentos tipo harina eran de 363 mg/100g y los de pasta en base húmeda eran de 46,3 mg/100g. Cuando los alimentos tipo pasta se procesaban a una base seca, los niveles de ácido fítico eran más altos a los de harina.

En 2006, Hernández L.^[26] evaluó las diferentes etapas del pre-tratamiento de muestras sintéticas en el análisis de ácido fítico en trigo por HPLC-RI y su la aplicación en

muestras reales. Determinó que el método de secado de la muestra por liofilización es más apropiado con respecto al secado con estufa ya que no ocurre degradación del analito. A su vez concluye que el uso del cartucho amino como método de concentración del ácido fítico no produce pérdidas significativas del mismo. Con el uso de un rotaevaporador en el proceso de eliminación del ácido de extracción se produce menos pérdidas del ácido fítico con respecto a un horno de vidrio. Con la optimización del método para el tratamiento de la muestra y extracción del ácido fítico, obtuvo un porcentaje de recuperación del 90%, usando ácido clorhídrico 0,5 M, como ácido de extracción.

En 2008, Caripá D.^[27] cuantificó el ácido fítico 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 fítico 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.

En 2010, Liang, J. y colaboradores^[28] estudiaron la solubilidad in-vitro de calcio, hierro y zinc en relación a los niveles de ácido fítico presentes en alimentos a base de arroz, empleando el procedimiento establecido por la A.O.A.C. Utilizaron como indicador para

predecir la biodisponibilidad de minerales, la relación existente entre el radio molar del ácido fítico y el mineral. Los minerales dispuestos en digestiones ácidas junto con el sobrenadante de las digestiones enzimáticas fueron determinados con un equipo ICP-OES y el contenido de ácido fítico fue analizado con detección espectrofotométrica con cloruro férrico y ácido sulfosalicílico. Los resultados se establecieron en tres grupos; siendo el grupo A el de bajo contenido de ácido fítico y minerales como productos de arroz blanco, tallarines y galletas de arroz, los valores fueron: ácido fítico de 3,7mg/g; calcio de 66mg/100mg; hierro de 3,1mg/100mg y zinc de 1,9mg/100mg. El grupo B, de bajo contenido de ácido fítico y niveles altos de minerales como los alimentos infantiles, los valores fueron: ácido fítico entre (0,9 - 5,9) mg/g; calcio de 450mg/100mg; hierro de 10mg/100mg y zinc de 4mg/100mg. El grupo C, de alto contenido de ácido fítico y bajo en minerales como productos de arroz integral y germinado, los valores fueron: ácido fítico entre (10 - 17)mg/g; calcio entre (20 - 40)mg/100mg; hierro entre (2 - 6)mg/100mg y zinc entre (2 - 3)mg/100mg. Concluyendo que los productos de arroz con un procesamiento primario son fuentes pobres de minerales por contener un alto nivel de ácido fítico, lo que disminuye su biodisponibilidad. Los productos con un procesamiento más intenso tienden a degenerar el ácido fítico, teniendo así mayor biodisponibilidad de minerales. En el caso de los alimentos infantiles sugirieron que se debe mejorar el procesamiento de los mismos para así disminuir los niveles de ácido fítico y otros inhibidores, aumentando así la biodisponibilidad de minerales. Finalmente, encontraron que para ciertas concentraciones de ácido fítico la biodisponibilidad de los metales dependía de la relación $[\text{fitato}]/[\text{metal}]$.

En 2010, Salas D.^[29] 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 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.

En 2013, Mijares E.^[30] 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 IP6 y que este efecto se ve atenuado mientras mayor es la concentración del ácido fítico. En las muestras con alto contenido de IP6 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.

3. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Optimización del método analítico para la determinación del ácido fítico presente en cereales infantiles a base de trigo por el método HPLC-RI.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar los parámetros óptimos para la separación de los inositoles fosfatos en muestras de cereales infantiles comerciales.
- Estudiar el efecto del tipo de extracción, tiempo de extracción, tipo de ácido y concentración de ácido sobre el porcentaje de ácido fítico en cereales a base de trigo.
- Determinación del porcentaje de recuperación del ácido fítico de los cereales evaluados en la condiciones de mayor respuesta en la optimización.
- Comparación del contenido de ácido fítico en cereales infantiles a base de trigo.

4. PARTE EXPERIMENTAL.

4.1. INSTRUMENTACION.

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

- 1.- Bomba isocrática de HPLC, marca HP modelo 1100.
- 2.- Puerto de Inyección con una válvula de inyección, marca RHEODYNE modelo 7725i, con un lazo de inyección de 20 μ L.
- 3.- Columna tipo PRP-1 de la casa Hamilton, de 5 μ m de diámetro de partícula y dimensiones de 150 x 4,6 mm.

Se ha reportado que el empleo de columnas de acero inoxidable trae inconvenientes debido a la tendencia que tiene el analito de absorberse en este material, es por ello que la columna, el lazo de inyección y todas las conexiones son elaboradas con un material polimérico externo resistente a la presión, poliéter éter cetona (PEEK) para solventar este problema.

- 4.- Detector de Índice de Refracción, marca HP-1047A, con un intervalo de temperatura desde 30 hasta 50°C y un rango de sensibilidad desde 32 x 10 RIU (baja sensibilidad) a 1/64 x 10 RIU (alta sensibilidad) para la salida del registrador.
- 5.- Sistema de adquisición de datos que registra la salida analógica del detector y la procesa con un software llamado EZCHROM.

4.2 ACCESORIOS.

- 1.- Rotaevaporador marca Buchi, modelo R-1100, con un criostato acoplado para refrigerar el condensador y una bomba de vacío, para ayudar a la evaporación de los disolventes.
- 2.- Ultrasonido de punta.
- 3.- Liofilizador marca LABCONCO.
- 4.- El programa de tratamiento de datos para el diseño estadístico empleado fue el Statgraphic Plus 5.1 y para las pruebas estadísticas de contrastes de significación y parámetros de calidad analítica fue el Excel 2013 Microsoft Office de Microsoft Inc. Corporation®.

4.3 REACTIVOS.

1. Sal dipotásica de IP6 al 95 % pureza hidratada de SIGMA-ALDRICH.
2. Sal dipotásica de IP6 al 92 % pureza hidratada de SIGMA-ALDRICH, analizada por ICP-OES.
3. Metanol grado HPLC al 99,9% de SIGMA-ALDRICH.
4. Hidróxido de tetraetilamonio acuoso al 20% marca MERCK.
5. Ácido fórmico de 85% de pureza de RIEDEL-DE HAËN.
6. Agua desionizada de 18 MΩ-cm de resistividad tratada con un sistema marca BARNSTEAD.
7. Ácido clorhídrico 37 % de RIEDEL-DE HAËN.
8. Ácido tricloroacético al 99,5% de MERCK.

4.4 OTROS SUMINISTROS.

Los cereales que se analizaron fueron:

- Cereal de Arroz
- Cereal de Trigo/miel.
- Cereal de Trigo “Cerelac”.
- Cereal de Trigo partido #1

4.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

4.5.1 SECADO DE LA MUESTRA

Las muestras de cereales se secaron al comienzo del análisis por el método de liofilización, para así evitar la degradación de la muestra que producen otros métodos y que todos los cereales de análisis tuviesen la misma base seca.

4.5.2 DISEÑO FACTORIAL.

Con el objetivo de determinar el efecto de diferentes variables sobre el tratamiento de las muestras de los cereales, se emplearon dos diseños factoriales 2^3 .

4.5.2.1 DISEÑO FACTORIAL N°1.

En la tabla 2 están tabulados los factores y niveles que se emplearon en el diseño factorial N°1.

Tabla 2. Factores y niveles del diseño factorial N°1.

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

En las siguientes tablas se especifican las condiciones de algunas variables del diseño factorial:

Tabla 3. Tiempos empleados para cada tipo de extracción del diseño factorial N°1.

Tipo de Extracción	Tiempo de Extracción [min]	
	Corto	Largo
Ultrasonido de punta	1	3
Ultrasonido	90	180

Se utilizó el ácido clorhídrico en una concentración de 0,5 M y el Ácido Tricloroacético en una concentración de 0,6 M. En la tabla 4. se muestran las diferentes combinaciones de variables y niveles del diseño factorial.

Tabla 4. Combinación de los factores y niveles del diseño factorial N°1.

Experimento	A	B	C
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	-	-

4.5.2.2 DISEÑO FACTORIAL N°2.

Con los resultados del diseño factorial N°1 se evaluó el efecto de la concentración del tipo de ácido, dejando fija la variable del tiempo de extracción en los valores establecidos en la tabla 3 como tiempo largo. En la tabla 5. se muestran las diferentes combinaciones de variables y niveles del diseño factorial.

Tabla 5. Factores y niveles del diseño factorial N°2.

	Variables	-	+
A	Tipo de extracción	Ultrasonido de punta	Ultrasonido
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.

Tabla 6. Concentración del tipo de ácido de extracción del diseño factorial N°2.

	Concentración del Ácido [M]	
	Baja	Alta
HCl	0,5	2
TCA	0,6	0,9

En la tabla 7. se muestran las diferentes combinaciones de variables y niveles del diseño factorial.

Tabla 7. Combinación de los factores y niveles del diseño N°2.

Experimento	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Con los valores que con llevan a la mayor respuesta en la determinación del ácido fítico, tomando en cuenta ambos diseños factoriales, se prepararon las muestras de cada cereal, para el cálculo del porcentaje de recuperación de ácido fítico.

4.5.3. EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO FÍTICO

Se pesó aproximadamente 1 g de cada muestra y se empleó 20 mL de ácido para la extracción, tomando en cuenta los tipos de extracción considerados y sus respectivos tiempos. Luego se centrifugó cada solución durante 10 min a 3400 rpm a una temperatura de 5°C, el sobrenadante se decantó en un balón de 50 mL y seguidamente el residuo de cada tubo de centrifuga se mezcló con 10 mL del ácido de extracción para realizar el lavado del mismo, para esto, se agitó la suspensión con una varilla de vidrio. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 10 min, el sobrenadante se combinó con el anterior y luego se enrazo con agua desionizada. Se trasvasó la solución a un tubo centrifuga y se congelaron las muestras por un plazo de 24 h.

Terminado el lapso se descongelaron y se centrifugaron nuevamente durante 10 min a 3400 rpm a una temperatura de 5°C. Por último, las muestras se filtraron antes de preconcentrar los inositoles fosfato, empleando filtros de celulosa y luego de filtros de nylon con la ayuda de una manifold.

4.5.4. TRATAMIENTO EN EL CARTUCHO DE INTERCAMBIO ANIÓNICO.

Para cada muestra se colocó una alícuota de 10 mL de las soluciones de extracción en una jeringa de 50 mL y se llevó a un volumen de 50 mL con agua desionizada, luego se pasó esta solución a través del cartuchos Sep-Pak® NH₂ y se lavó con 10 mL de una disolución de HCl 0,05 M. Hecho esto, se eluyó el ácido fítico retenido de la resina con 3 mL de HCl 2 M.

Estos cartuchos están fabricados a base de sílice, con una fase polar de carácter básico (aminopropil) unida químicamente con un tamaño de partícula de 55 a 105 µm y se emplean como adsorbente polar o como intercambiador aniónico débil en medio acuoso en un rango de pH 2 - 8. Por esta razón, eran previamente activados mediante lavados sucesivos con 10 mL de disoluciones acuosas ácidas de acuerdo al siguiente orden: agua desionizada; HCl 0,5 M; HCl 2,0 M; HCl 0,5 M y agua desionizada. Acoplado al cartucho se ubicaron filtros de jeringa marca Millipore con membranas de nylon (diámetro de 25 mm y tamaño de poro de 0,45 µm) para evitar así el paso de partículas indeseadas que pudieran ser arrastradas a través del sistema.

En el caso de las muestras tratadas con ácido clorhídrico 2 M como ácido de extracción, se disminuyó la concentración de este disolvente antes del tratamiento con el cartucho

de intercambio aniónico, esto se realizó por dos métodos. El primero consistió en tomar una alícuota de 10 mL de muestra y rotaevaporarla a sequedad, el residuo fue redissuelto en HCl 0,05 M luego se hizo la extracción en fase sólida del ácido fólico. En el segundo método se tomó una alícuota de 10 mL de muestra y se llevó a un volumen final de 200 mL con agua desionizada seguidamente se hizo el tratamiento con el cartucho amino.

4.5.5. ELIMINACIÓN DEL DISOLVENTE

Las muestras se rotaevaporaron a sequedad con la finalidad de eliminar la matriz ácida de las mismas y finalmente, el residuo fue redissuelto en 1 mL de fase móvil para la muestras de arroz, trigo/miel y cerelac. En el caso del cereal de trigo partido #1 el residuo fue redissuelto en 4 mL de fase móvil, debido a su alto contenido natural de ácido fólico. El esquema general del procedimiento seguido para el tratamiento de muestras se presenta en la figura 6.

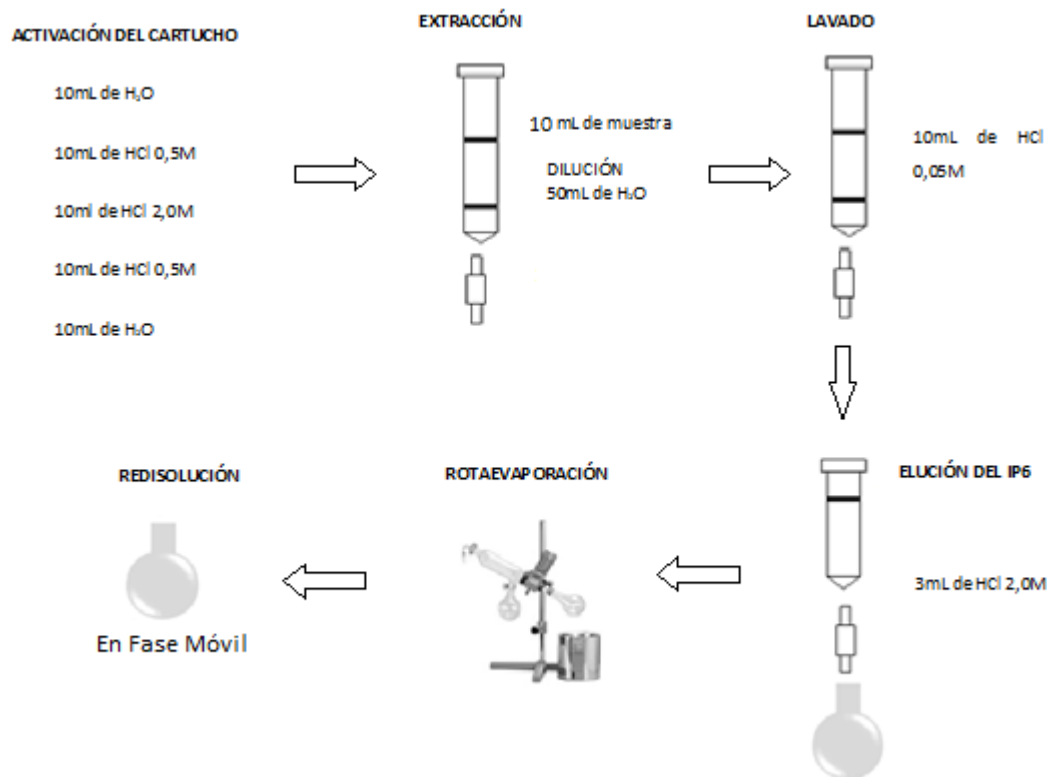


Figura 6. Procedimiento realizado para el tratamiento de las muestras.

4.5.6. ANÁLISIS POR HPLC-RI.

Las muestras se inyectaron por triplicado al cromatógrafo previamente filtradas por un filtro de jeringa de nylon (diámetro de 25 mm y tamaño de poro de 0,45 μm), de Millipore.

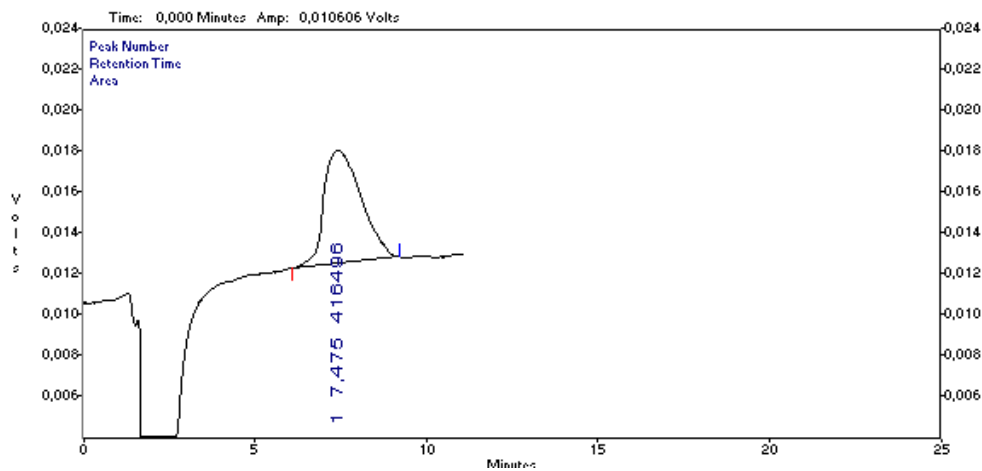
La fase móvil empleada consistió en una solución al 5% de metanol y 0,21% de hidróxido de tetraetilamonio (formador del par iónico) en agua desionizada, con un ajuste del pH a 4,3 con ácido fórmico. El flujo fue de 1 mL/min.

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

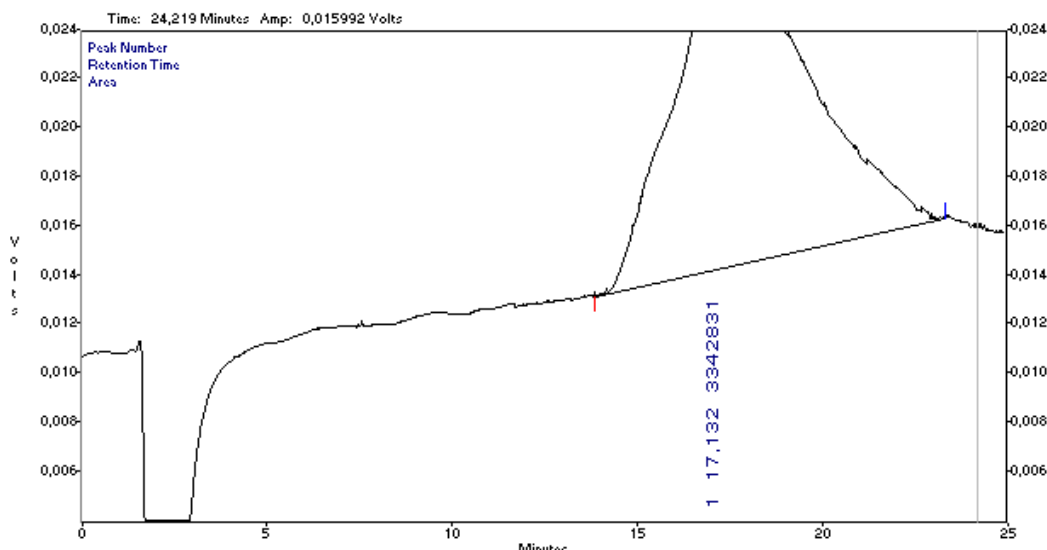
5.1 ESTUDIOS PRELIMINARES

5.1.1. CONDICIONES DE TRABAJO.

Con el propósito de conocer las condiciones cromatográficas de trabajo, se procedió a inyectar al sistema en forma individual 20 μL de las soluciones patrón de ácido fítico de 500 mg/L y ácido tricloroacético de 0,012 M aproximadamente. A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos.



Cromatograma 1. Solución patrón de 500mg/L de ácido fítico.



Cromatograma 2. Solución patrón de 0,012 M de ácido tricloroacético.

Se estableció que el tiempo de retención del IP6 se encuentra alrededor de los 7,4 min, mientras que para el ácido tricloroacético está alrededor de los 17,1 min. Por lo que se decidió que el tiempo de corrida para las muestras tratadas con ácido tricloroacético sería de 25 min y el resto de las muestras de 15 min.

5.1.2. CURVA DE CALIBRACIÓN

Para preparar las soluciones patrón necesarias para las curvas de calibración se emplearon las siguientes soluciones:

- Solución Madre N°1 de ácido fítico de (2000 ± 2) mg/L a partir de la sal al 92% p/p de pureza (la pureza de este patrón se determinó por ICP-OES). Para ello se pesaron

(0,6047 $\pm$ 0,0003) g de la sal dipotásica de ácido fítico hidratada, se disolvió en la mínima cantidad de agua desionizada y se transvaso a un balón aforado de 250 mL para luego ser enrazado. A partir de esta disolución se prepararon patrones de 300, 400, 500 y 600 mg/L respectivamente de IP6. Estos patrones se emplearon para los dos diseños factoriales evaluados.

- Solución Madre N°2 de ácido fítico de (2504 $\pm$ 4) mg/L a partir de la sal al 95% p/p de pureza. Para ello se pesaron (0,2940 $\pm$ 0,0003) g de la sal dipotásica de ácido fítico hidratada, se disolvieron en la mínima cantidad de agua desionizada y luego se transvaso y enraza en un balón de 100 mL. A partir de esta disolución se prepararon patrones de 200, 300, 400, 500 y 600 mg/L respectivamente de IP6. Estos patrones se emplearon para la etapa de cuantificación y cálculo de porcentaje de recuperación del ácido fítico en los cereales infantiles.

Mediante estos patrones se construyeron las curvas de calibración necesarias para la determinación del IP6 en las muestras analizadas. En estas curvas se graficó el área de pico cromatográfico vs concentración del patrón con la finalidad de obtener la concentración de IP6 en las muestras por medio de una regresión lineal y seguidamente el porcentaje de recuperación en la etapa de la determinación de ácido fítico en las condiciones de mayor respuesta. A continuación se muestra como ejemplo dos curvas de calibración realizadas en días consecutivos.

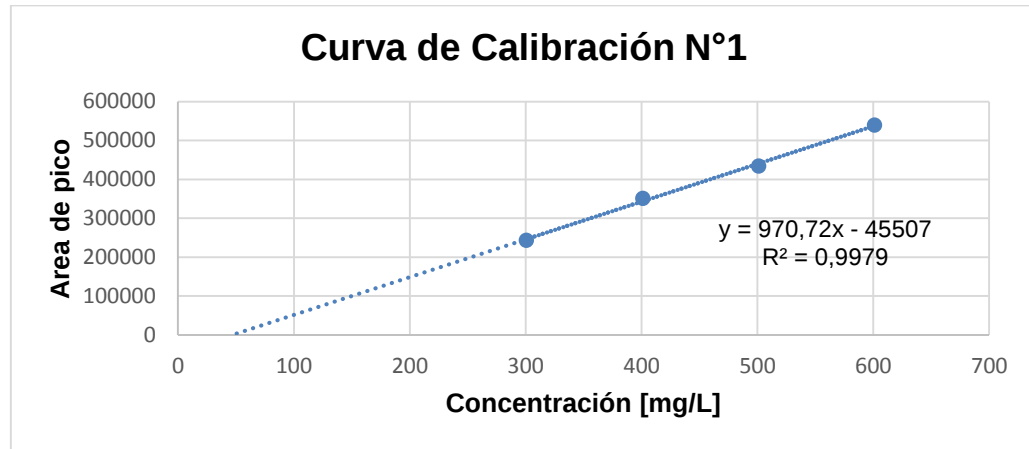


Gráfico 1. Curva de calibración del día 20/07/15

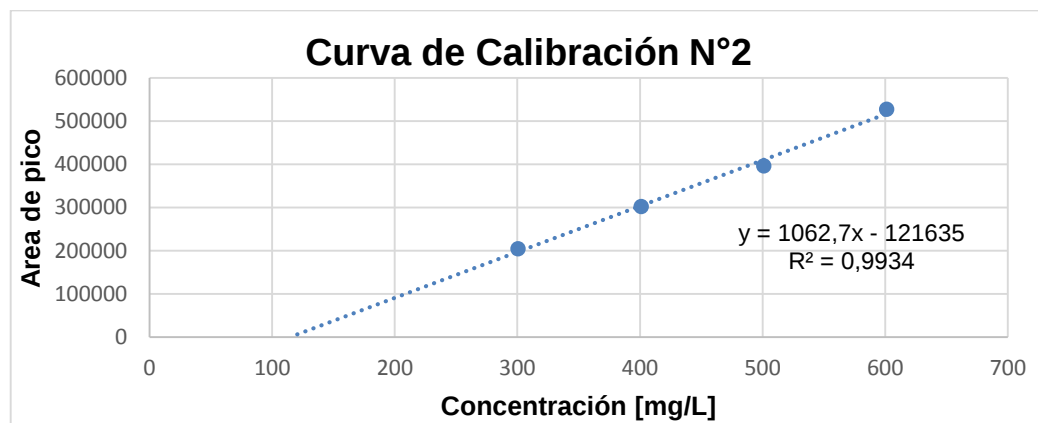
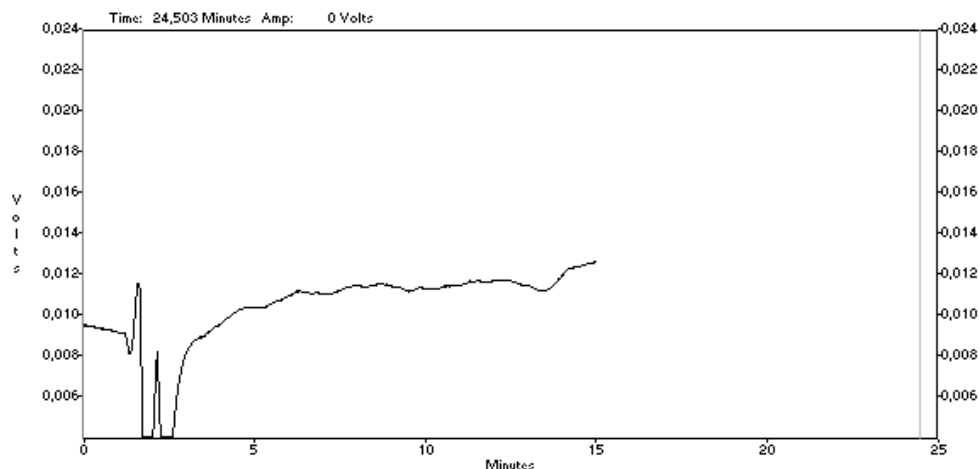


Gráfico 2. Curva de calibración del día 21/07/15

A pesar de que el equipo se estabiliza antes de comenzar las mediciones durante 1 h haciendo fluir fase móvil a través de él, se puede observar en ambos gráficos que la ecuación de la recta varía con tan solo un día de análisis, por lo tanto debido a las variaciones en la sensibilidad de la técnica, se realizaron curvas de calibración cada día de medición para asegurar que los resultados obtenidos y la cuantificación del analito fuesen confiables.

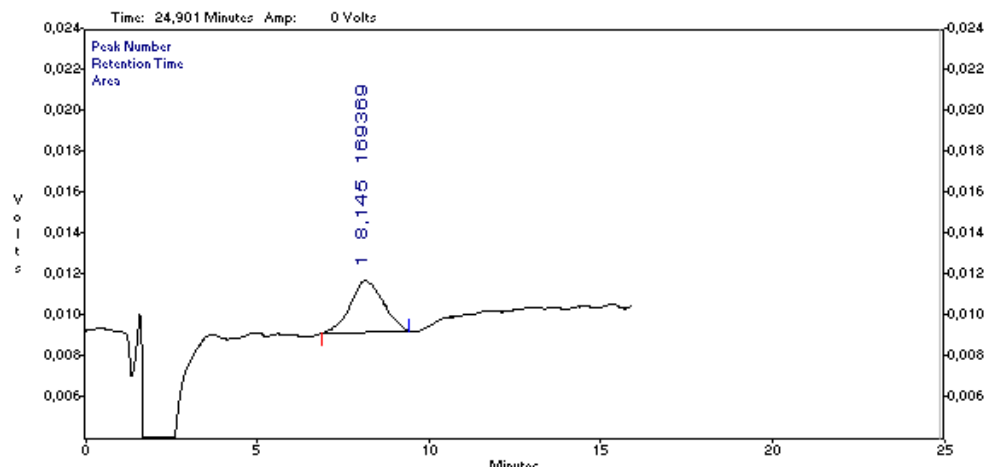
5.1.3 SELECCIÓN DE LA MUESTRA DE CEREAL INFANTIL

Con el fin de establecer las condiciones de trabajo se procedió a ensayar con los cereales de más alto contenido de ácido fítico como lo son: cereal trigo/miel y cereal de trigo “cerelac”, para determinar cuál será usado durante la aplicación de los diseños factoriales. Las muestras se trataron según el método utilizado por Caripá, D.^[27] que emplea HCl 0,5 M y ultrasonido durante 2 horas. A continuación se muestra el cromatograma obtenido.



Cromatograma 3. Muestra de Cereal Trigo/miel

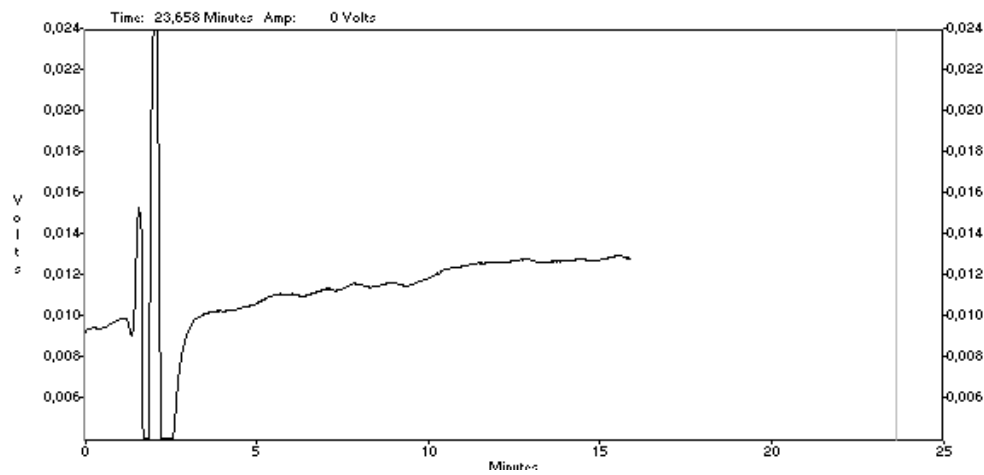
Al no ver evidencia de ningún pico correspondiente al IP6, se agregó a la muestra 1 mL de la solución madre N°1, para verificar la detección del IP6 por parte del sistema cromatográfico tomando en cuenta el efecto de la matriz de la muestra durante el tratamiento. A continuación se muestra el Cromatograma obtenido.



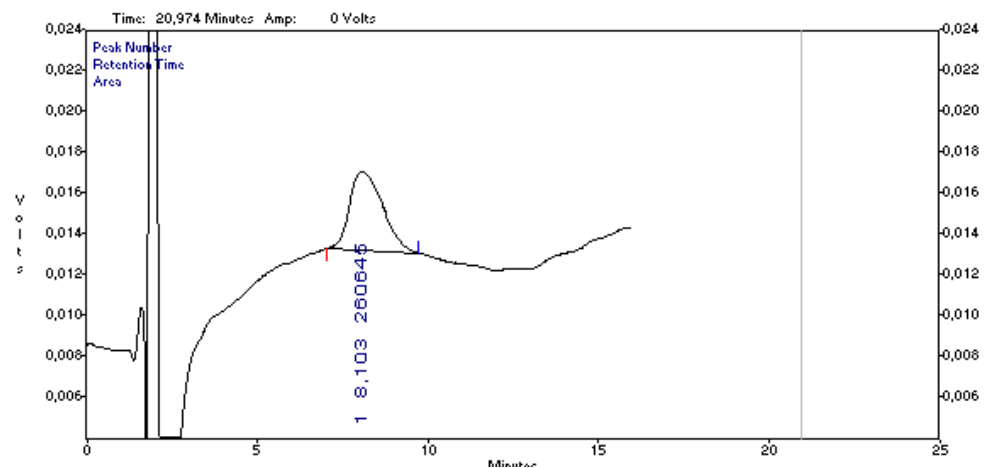
Cromatograma 4. Muestra de Cereal Trigo/miel con agregado de patrón de IP6.

Con el agregado de IP6 a la muestra se logró constatar la detección del ácido fítico por parte del sistema cromatográfico. Se deduce que en las condiciones actuales de tratamiento de muestra no se logra extraer todo el ácido fítico de la misma por lo que la concentración obtenida es tan baja que no pudo ser detectada por el equipo.

Así mismo se observa para el cereal de trigo “Cerelac” en los cromatogramas 5 y 6.



Cromatograma 5. Muestra de Cereal de Trigo "Cerelac"



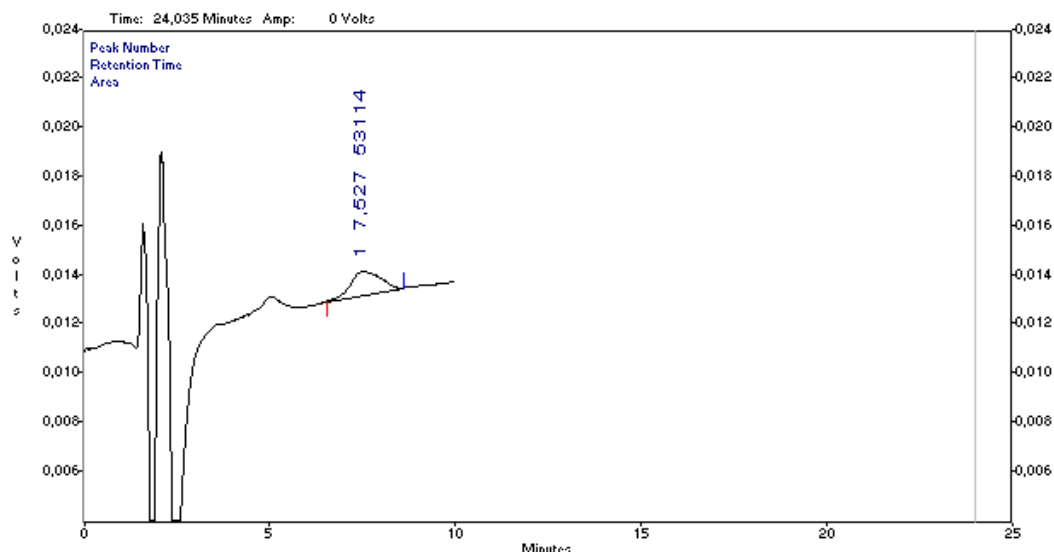
Cromatograma 6. Muestra de Cereal de Trigo "Cerelac" con agregado de patrón de IP6.

Debido a esto se tomó la decisión de trabajar agregando en las muestras 1 mL de la solución madre N°1, de tal manera que la concentración de ácido fítico final extraída fuese de aproximadamente 400 mg/mL. De esta forma partiremos siempre de una señal de IP6 en el cromatograma obtenido en cada experimento, siendo esta señal mayor

mientras más eficiente es el proceso de extracción y de esta forma lograr la optimización del método de extracción del ácido fítico por HPLC-RI

En las muestras del cereal trigo/miel se produjo una solución muy turbia y espesa, lo que generó inconvenientes en el momento del filtrado y preconcentrado del IP6 en el cartucho amino. Tomando en cuenta lo anterior, se seleccionó el cereal de trigo “cerelac” como muestra de análisis para el diseño de experimento.

De manera de certificar que el método de tratamiento muestra es capaz de extraer el ácido fítico de la misma, se procedió a analizar una muestra de trigo partido #1, ya que al ser un cereal natural no procesado, la concentración de ácido fítico suele ser elevada. A continuación se muestra el cromatograma correspondiente:



Cromatograma 7. Muestra de Cereal de Trigo partido #1

Como se observa en el cromatograma 7. el pico del IP6 está presente, lo que confirma que el método de tratamiento de la muestra utilizado para la extracción del ácido fítico funciona.

5.2. DISEÑO FACTORIAL N°1

En la Tabla 8. se muestran los resultados de la determinación de ácido fítico en las muestras de cereal de trigo “cerelac” para todos los experimentos realizados según el diseño factorial 2^3 con su respectiva replica. Se llevó a cabo la evaluación del diseño con el Software estadístico Statgraphics Plus 5.1

Tabla 8. Concentración en mg/L de ácido fítico obtenidas con el diseño factorial N°1.

Experimento	A	B	C	Replica 1	Replica 2
1	+	+	+	380	324
2	+	+	-	358	283
3	+	-	+	306	289
4	+	-	-	241	220
5	-	+	+	478	414
6	-	+	-	401	435
7	-	-	+	448	437
8	-	-	-	438	388

A continuación se presenta en la Figura 7. el diagrama de pareto para la determinación de las variables significativas para la extracción del ácido fítico.

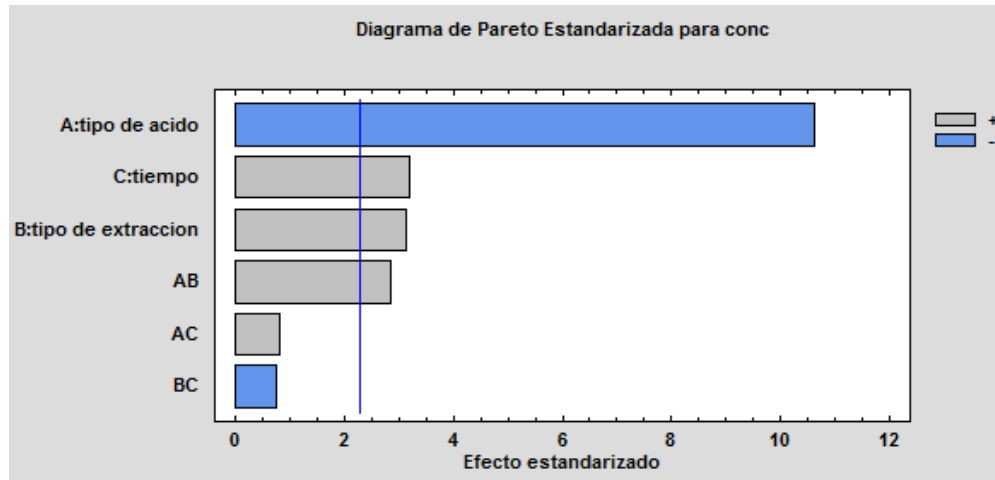


Figura 7. Diagrama de Pareto para el diseño factorial N°1.

En un diagrama de Pareto se evalúa cuáles son las variables estudiadas que tienen un alcance significativo sobre la respuesta del sistema. Fue así que para la extracción de ácido fólico este diagrama mostró que todas las variables de estudio fueron relevantes. Tanto el tiempo como el tipo de extracción tuvieron una tendencia positiva, lo que indica que se generó una mayor respuesta hacia mayores tiempos de extracción en este caso de 3 horas y con el uso de ultrasonido como método de extracción. Sin embargo es el tipo de ácido de extracción quien mostró un efecto más acentuado sobre la recuperación, el signo negativo indica que la mayor respuesta se obtiene con ácido clorhídrico.

En cuanto a las interacciones solo el que combinó el tipo de ácido y el tipo de sistema de extracción fue la significativa. Si se construye un diagrama de interacción se pueden ver que valores deben tomar las variables que interactúan para que se produzca una

mayor respuesta. En la figura 9. se muestra el diagrama de interacción con los valores promedios de respuesta de acuerdo a las interacciones estimadas.

DIAGRAMA AB

Factor A

	+	
	+	
Factor B -	264	336
	428	432
	-	+
	-	

Figura 8. Diagrama de interacción AB para el diseño factorial N°1.

El primer cuadrante (264) corresponde al valor promedio de la concentración de ácido fítico para los experimentos cuyos niveles adopten A+ y B- (Tipo de ácido: TCA; Tipo de extracción: ultrasonido de punta), esto corresponde a los experimentos 3 y 4 de la Tabla 8. Los resultados obtenidos para el resto de los cuadrantes fueron calculados de la misma manera.

La mayor respuesta (valor = 432) se produce cuando A es negativa (HCl) y B es positiva (ultrasonido). Esto corresponde a los experimentos 5 y 6. Sin embargo este valor no es muy diferente al obtenido cuando A es negativa (HCl) y B es negativa (ultrasonido de punta), valor de 428 por lo que se establece que lo más importante es el uso del HCl.

En la figura 9. se puede visualizar el nivel de importancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta del sistema, es importante destacar que mientras mayor es la pendiente de la recta mayor es su efecto.

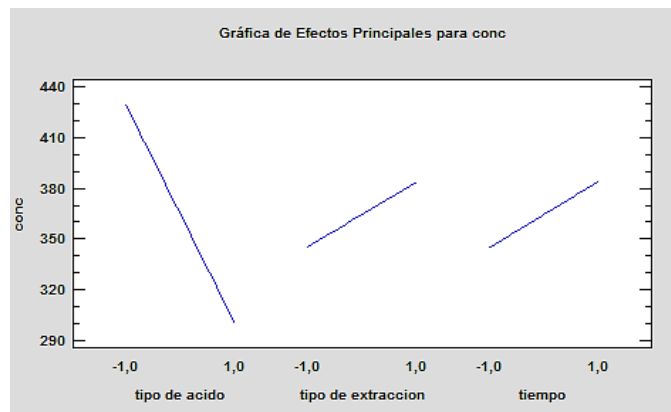


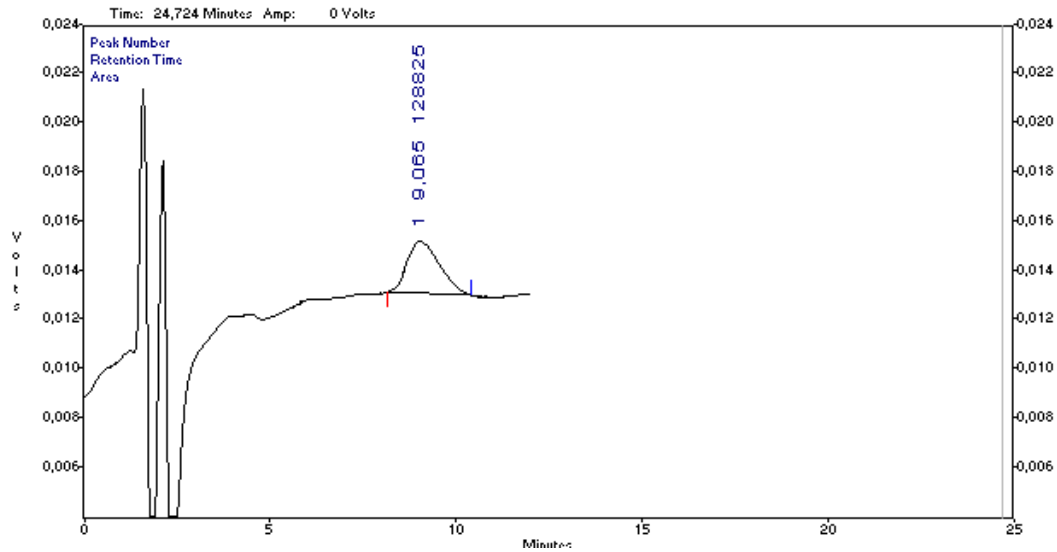
Figura 9. Gráfico de efectos principales para el diseño factorial N°1.

El tipo de ácido de extracción presentó una pendiente más acentuada y con sentido negativo, lo que reafirma a el ácido clorhídrico el de mayor significancia entre las variables evaluadas en el diseño N°1.

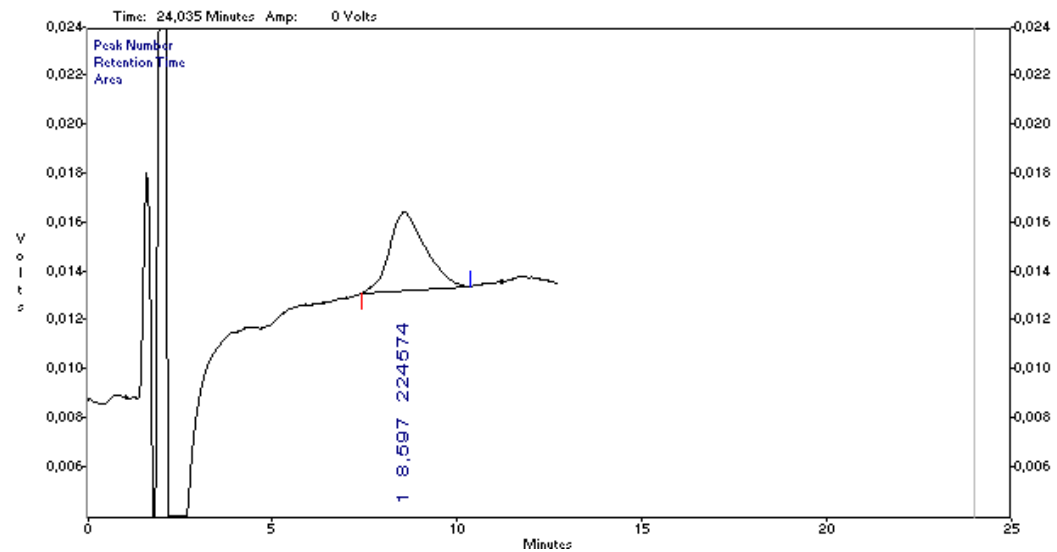
En este diseño factorial se encontró que las condiciones con mayor respuesta para la determinación del ácido fítico se alcanzaron utilizando HCl 0,5 M como ácido de extracción y empleando un ultrasonido durante 3 horas.

En estos resultados es importante señalar el efecto que tiene el tiempo de extracción sobre la concentración obtenida de IP6, para ello observemos los siguientes cromatogramas:

Los cromatogramas 8 y 9 muestran los picos de ácido fítico correspondientes a las corridas del diseño usando HCl 0,5M como ácido de extracción y ultrasonido de punta.



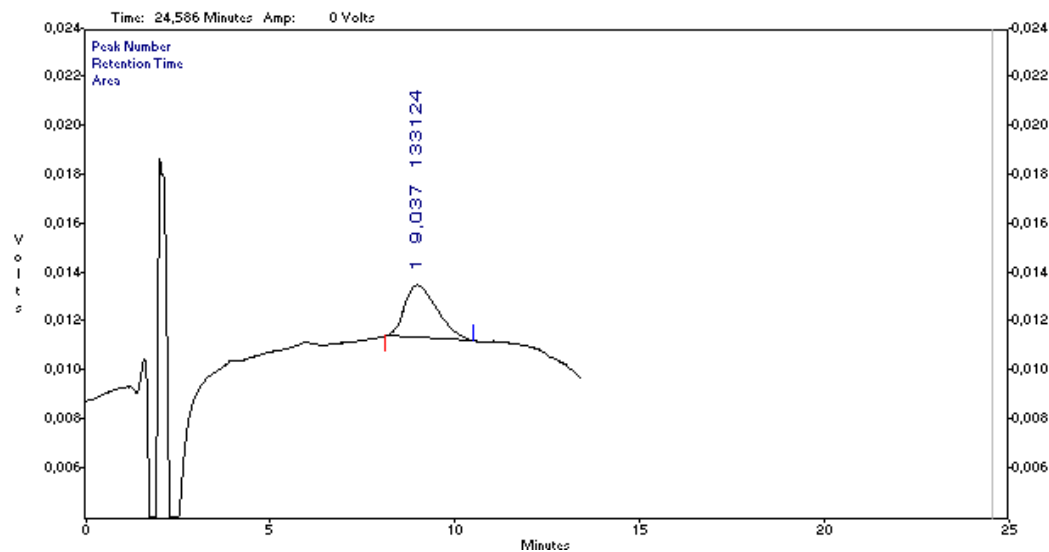
Cromatograma 8. HCl 0,5 M; Ultrasonido de punta por 1 min.



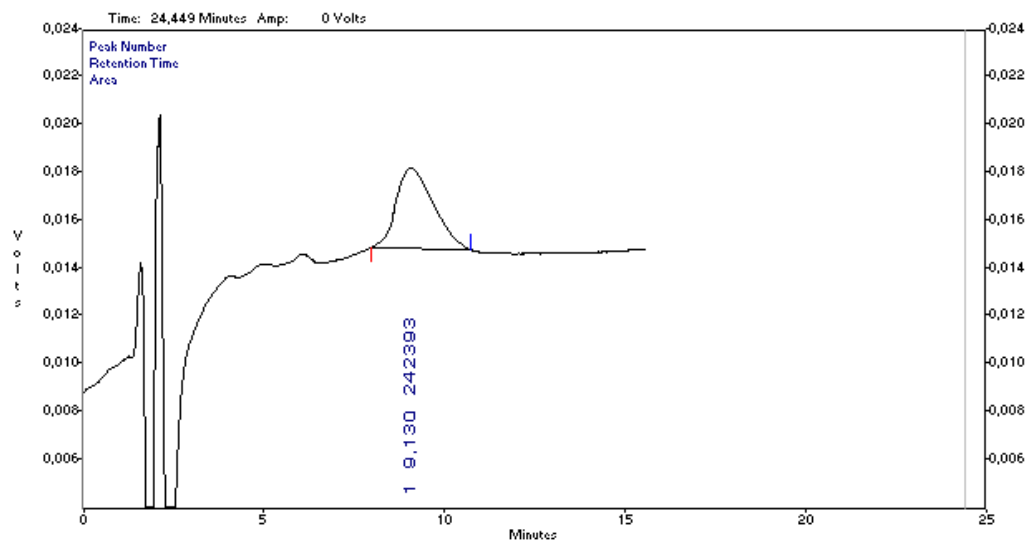
Cromatograma 9. HCl 0,5 M; Ultrasonido de punta por 3 min.

Se puede apreciar que el área de pico para el ácido fítico empleando ultrasonido de punta se incrementó cuando el tiempo se aumentó de 1 a 3 minutos. Lo que puede deberse a mejoras en el proceso de extracción del IP6 al estar mayor tiempo en contacto con el ácido de extracción. También puede ser producto de la redisolución del complejo fitato-mineral, como fue reportado en el trabajo de Mijares E.^[30] en el 2013.

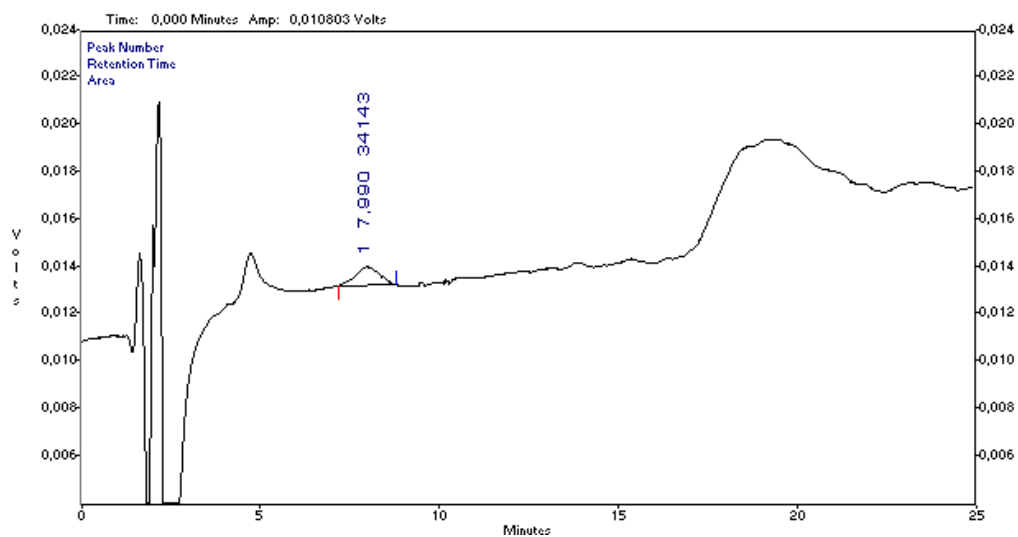
Este efecto también se observó cuando se utilizó HCl 0,5 M y ultrasonido normal, en los cromatogramas 10 y 11. Al igual que cuando se empleó TCA 0,6 M con el uso de ultrasonido de punta y ultrasonido normal, correspondiente a los cromatogramas 12, 13, 14 y 15 respectivamente.



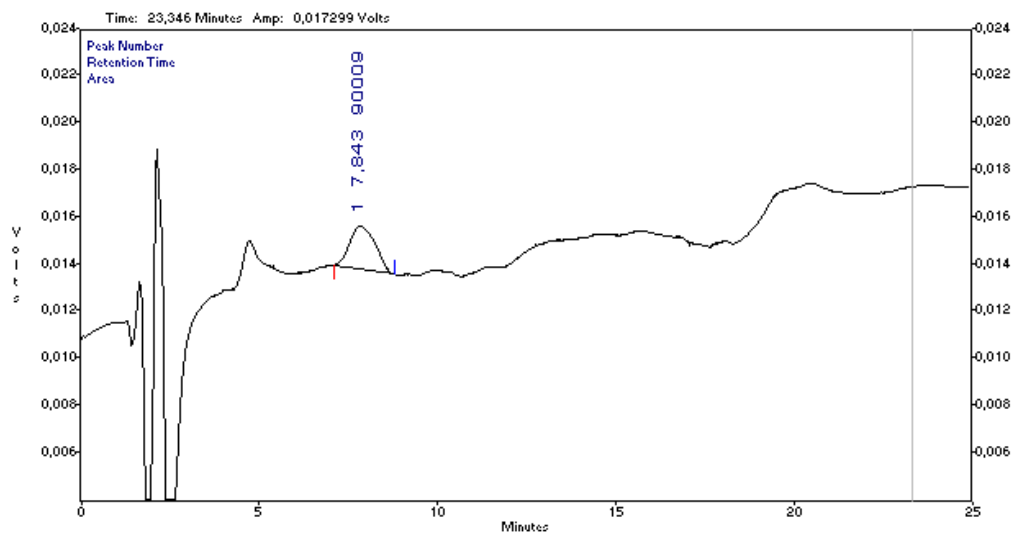
Cromatograma 10. HCl 0,5 M; Ultrasonido por 1 h y media.



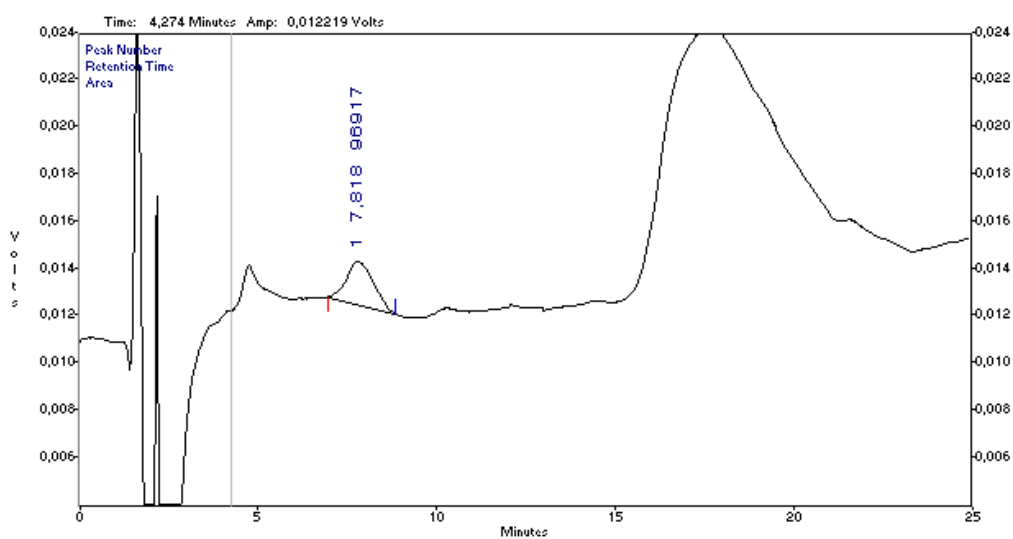
Cromatograma 11. HCl 0,5 M; Ultrasonido por 3 h.



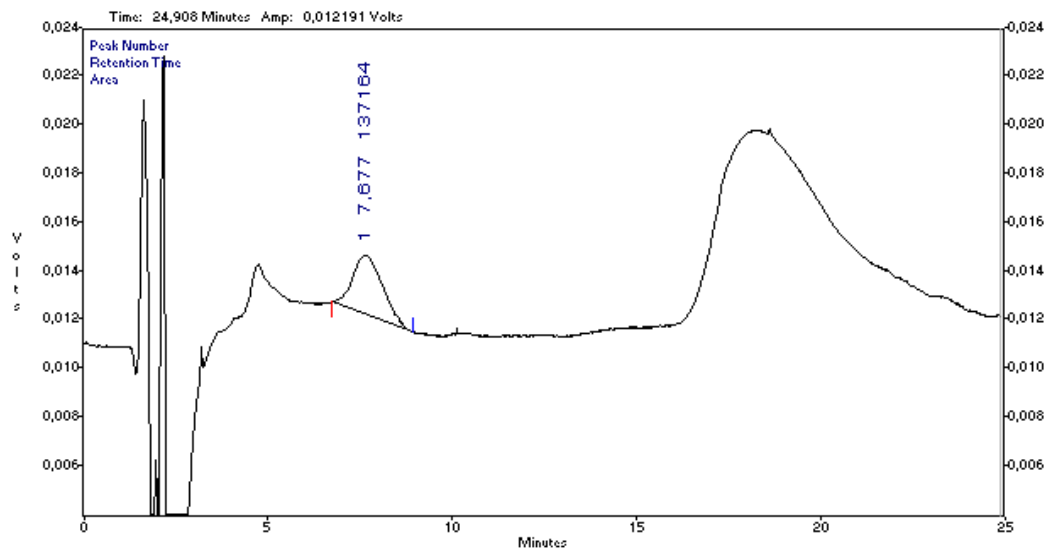
Cromatograma 12. TCA 0,6 M; Ultrasonido de punta por 1 min.



Cromatograma 13. TCA 0,6 M; Ultrasonido de punta por 3 min.



Cromatograma 14. TCA 0,6 M; Ultrasonido por 1 h y media.



Cromatograma 15. TCA 0,6 M; Ultrasonido por 3 h.

5.3. DISEÑO FACTORIAL N°2

Para este diseño en particular, una parte de las muestras fueron tratadas con ácido clorhídrico 2 M como ácido de extracción, por lo que debieron ser sometidas a un proceso adicional para disminuir la concentración de este ácido antes del tratamiento con el cartucho de intercambio aniónico, porque de lo contrario no ocurrirá la retención del IP6 en el mismo, esto se realizó por dos métodos. El primero consistió en tomar una alícuota de 10 mL de la muestra y rotaevaporarla a sequedad, el residuo fue redissuelto en HCl 0,05 M y se procedió al proceso de extracción en fase sólida. En el segundo método se tomó una alícuota de 10 mL de muestra y se disolvió en 200mL de agua desionizada, seguidamente se hizo pasar esta solución a través del cartucho amino.

Para este diseño se dejó fija la variable del tiempo de extracción, siendo para el ultrasonido de punta de 3 min y para el ultrasonido normal de 3 h.

Con el fin de evaluar si existe diferencia entre estos dos métodos se realizó la comparación estadística de las concentraciones de ácido fítico obtenidas para cada uno de ellos a través de las pruebas F y t. Los resultados de estas pruebas se presentan en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de la dilución o rotaevaporación de las muestras tratadas con HCl 2 M y ultrasonido de punta por 3 min.

Método	Dilución (A)	Rotaevaporador (B)
Concentración de IP6 [mg/L]	342	319
	351	337
	343	356
	271	327
	300	424
	288	407
	315	412
		448
Promedio	316	379
S	31	50
S²	940	2473
F_{teórico} (7;6;0,05)	4,21	
F_{exp}	2,63	
t_{teórico} (0,025;13)	2,16	
t_{exp}	2,98	

En esta experiencia (tabla 9) el valor de F_{exp} obtenido fue menor al $F_{\text{teórico}}$ por lo que las varianzas son de la misma población y los cálculos de la prueba t se realizaron para varianzas iguales. Por otro lado se obtuvo que $t_{\text{exp}} > t_{\text{teórico}}$, lo que indica que es significativo el efecto producido por el método utilizado para la disminución de la concentración del disolvente en la muestra, cuando se utilizó el ultrasonido de punta durante 3 min como método de extracción.

Tabla 10. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de la dilución o rotaevaporación de las muestras tratadas con HCl 2M y ultrasonido por 3 h.

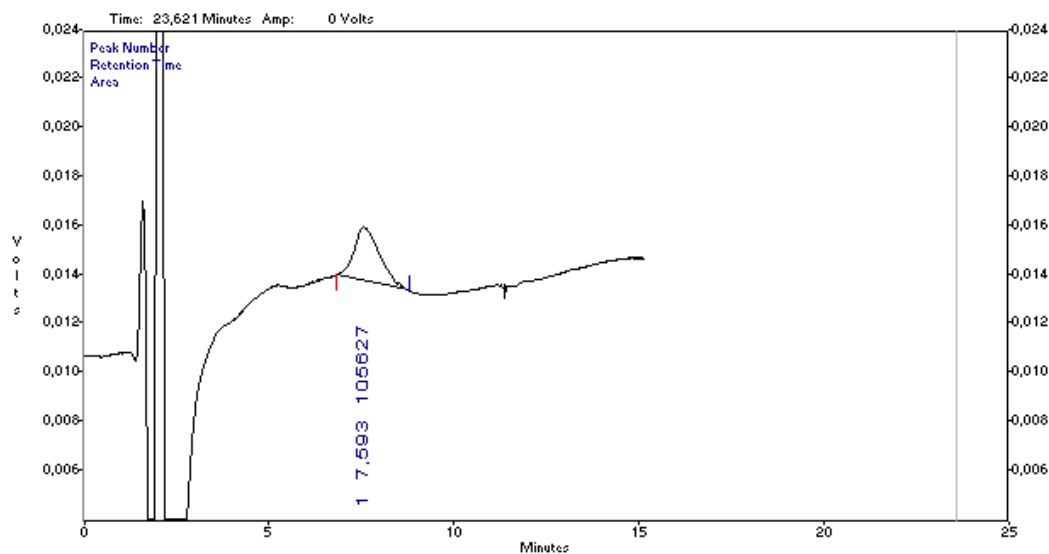
Método	Dilución (A)	Rotaevaporador (B)
Concentración de IP6 [mg/L]	356	393
	391	385
	346	386
	365	397
	418	450
	407	457
	419	448
	458	
Promedio	395	417
S	38	33
S2	1434	1102
$F_{\text{teórico}} (7;6;0,05)$	4,21	
F_{exp}	1,30	
$T_{\text{teórico}} (0,025;13)$	2,16	
t_{exp}	1,21	

En esta experiencia (tabla 10) el valor de F_{exp} obtenido fue menor al $F_{\text{teórico}}$ por lo que las varianzas son de la misma población y los cálculos de la prueba t se realizaron para

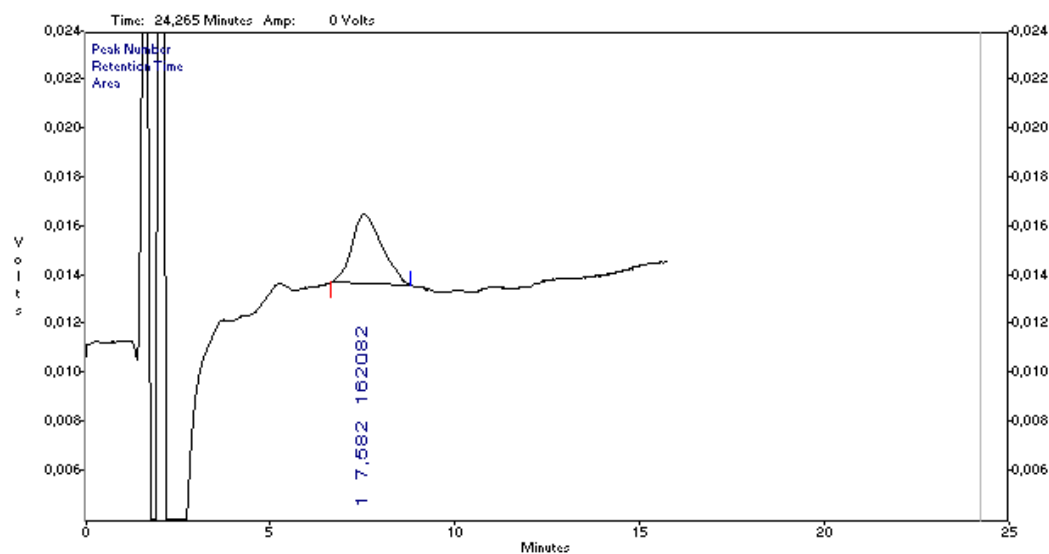
varianzas iguales. Por otro lado se obtuvo que $t_{exp} < t_{teórico}$, lo que indica que no es significativo el efecto producido por el método utilizado para la disminución de la concentración del disolvente en la muestra, cuando se utilizó el ultrasonido durante 3 h como método de extracción.

Es importante resaltar que durante el método de rotaevaporación se formó una solución tipo gel que requirió alto volumen de disolvente para garantizar el trasvaso cuantitativo de la solución, así mismo se generó una solución muy turbia y que produjo dificultades en el proceso de filtrado y preconcentración del IP6. Por ende se seleccionó el método de dilución para los estudios posteriores del diseño factorial N°2, ya que mediante el mismo, el consumo de filtros de nylon fue menor, lo cual disminuye los costos económicos.

Los cromatogramas del 16 y 17 muestran los picos de ácido fítico obtenidos con las corridas que se realizaron para comparar el método de dilución y el método de rotaevaporación de la muestra; antes del proceso de preconcentración del IP6 usando HCl 2 M como ácido de extracción y ultrasonido de punta durante 3 min.

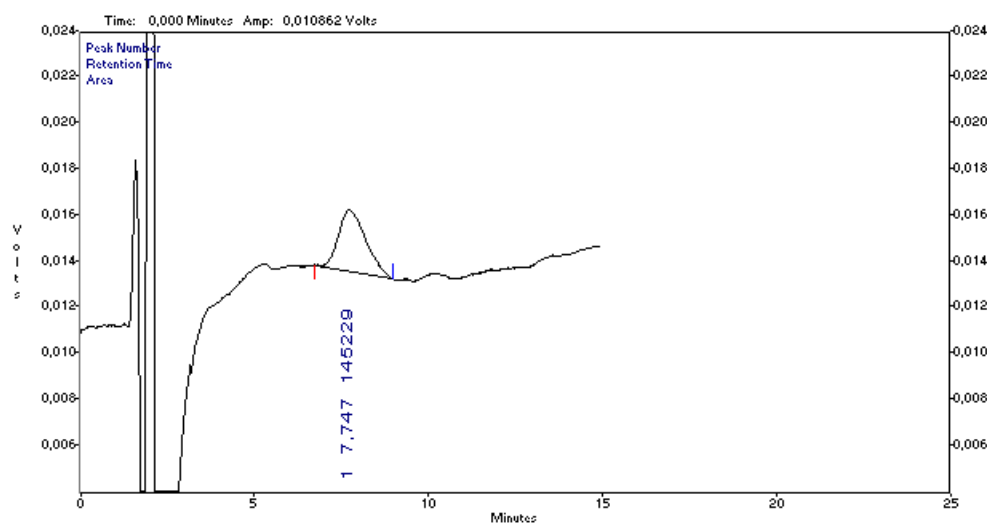


Cromatograma 16. HCl 2 M; Ultrasonido de punta por 3 min. Método de dilución de muestra.

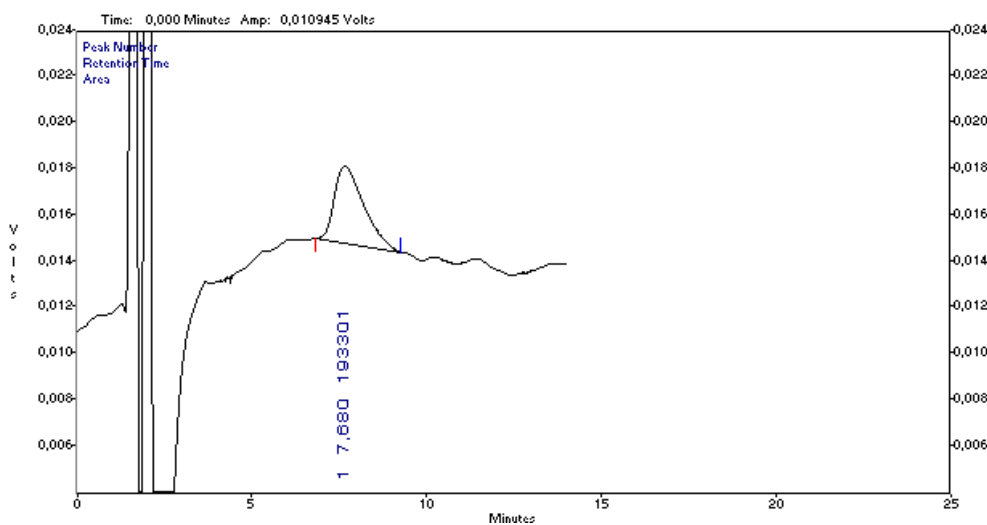


Cromatograma 17. HCl 2 M; Ultrasonido de punta por 3 min. Método de rotaevaporación de muestra.

En los cromatogramas del 18 y 19 se comparan el método de dilución y el método de rotaevaporación de la muestra antes del proceso de preconcentración del IP6, usando HCl 2 M como ácido de extracción y ultrasonido durante 3 h.



Cromatograma 18. HCl 2 M; Ultrasonido por 3 h. Método de dilución de muestra.



Cromatograma 19. HCl 2 M; Ultrasonido por 3 h. Método de rotaevaporación.

En la Tabla 11. se muestran los resultados de la determinación de ácido fítico en las muestras de cereal de trigo “cerelac” para todos los experimentos realizados según el diseño factorial 2^3 con su respectiva replica. Se llevó a cabo la evaluación del diseño con el Software estadístico Statgraphics Plus 5.1

Tabla 11. Concentración en mg/L de ácido fítico obtenidas con el diseño factorial N°2.

Experimento	A	B	C	Replica 1	Replica 2
1	-	-	-	448	437
2	+	-	-	306	289
3	-	+	-	478	414
4	+	+	-	380	324
5	-	-	+	345	295
6	+	-	+	297	271
7	-	+	+	365	425
8	+	+	+	373	439

A continuación se presenta en la Figura 10. el diagrama de Pareto para la evaluación de las variables más significativas en la determinación de ácido fítico.

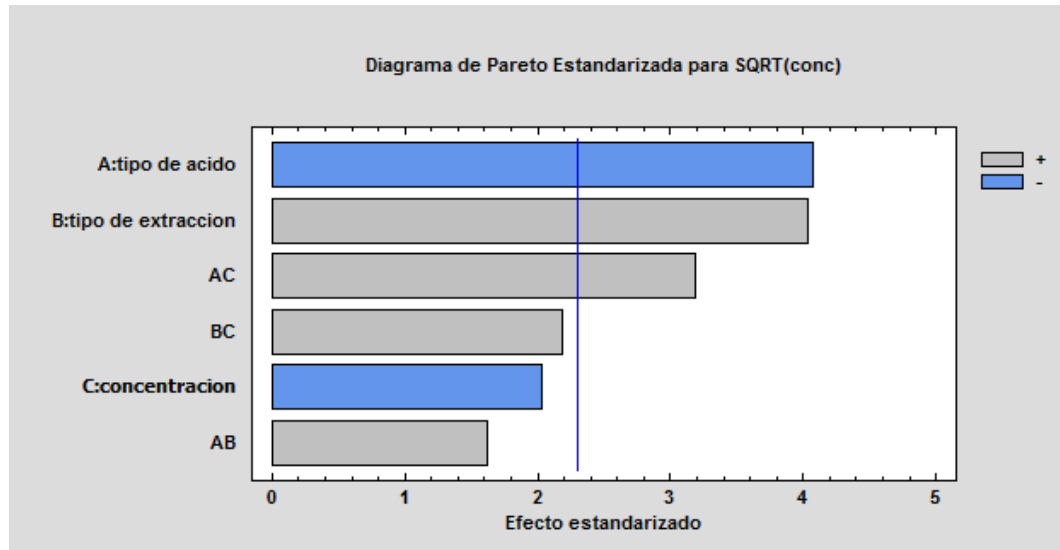


Figura 10. Diagrama de pareto para el diseño factorial N°2.

Para la concentración de ácido fólico este diagrama muestra que solo las variables de tipo de ácido y tipo de extracción fueron relevantes. El tipo de extracción tuvo una tendencia positiva, lo que indicó que tiene una mayor respuesta cuando se utiliza el ultrasonido normal. El tipo de ácido de extracción presentó signo negativo, lo que indica la mayor respuesta con el ácido clorhídrico.

Solo la interacción AC que es entre el tipo de ácido y la concentración del mismo fue significativa, es decir que la respuesta del sistema también está influenciada por la interacción de esos dos factores. Construyendo un diagrama de interacción se pueden fijar que valores deben tomar las variables que interactúan para que produzcan una mayor respuesta. En la figura 11. se muestra el diagrama de interacción con los valores promedios de respuesta de acuerdo a las interacciones estimadas.

DIAGRAMA AC
Factor A

	+	
Factor C -	325	345
	444	358
	-	

+

Figura 11. Diagrama de interacción para el diseño factorial N°2.

La mayor respuesta se produjo cuando los factores interaccionan de la siguiente forma:
A(-)= HCl y C(-)= concentración baja. Esto corresponde a los experimentos 1 y 3.

La figura 12. muestra el nivel de importancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta en el diseño N°2.

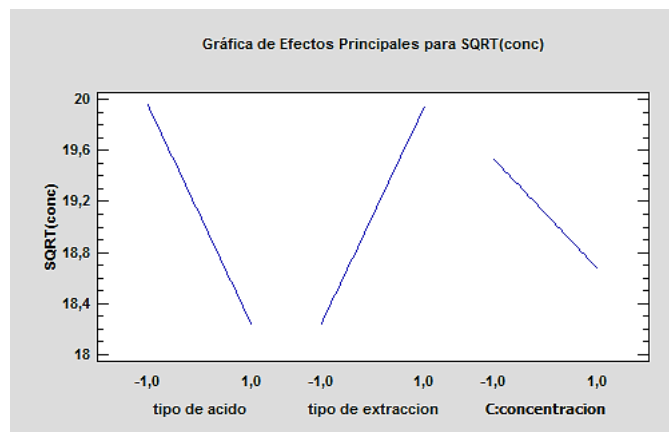
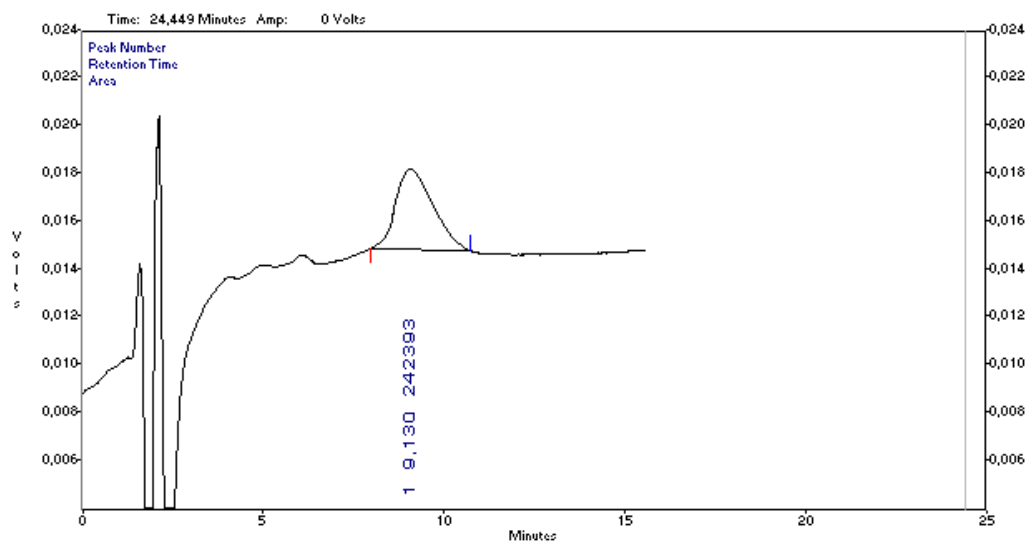


Figura 12. Gráfico de efectos principales para el diseño factorial N°2.

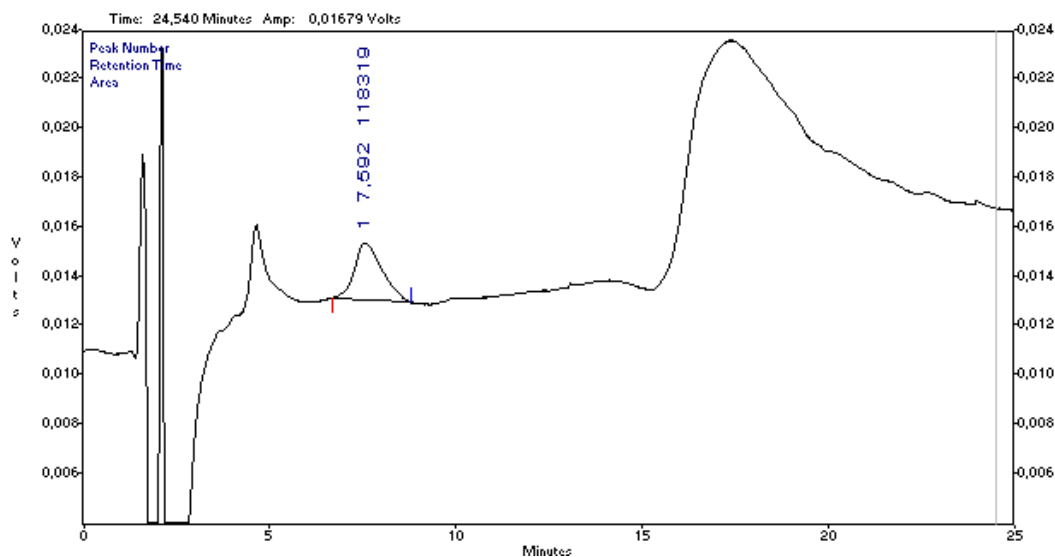
Se evidencia que el tipo de ácido de extracción y el tipo de extracción presentan una pendiente más acentuada. Para el tipo de ácido con sentido negativo, lo que señala al ácido clorhídrico y para el tipo de extracción con sentido positivo destacando al ultrasonido.

Según el diseño factorial N°2 se encontró que las condiciones con mayor respuesta para la determinación del ácido fítico se alcanzaron utilizando HCl 0,5 M como ácido de extracción y empleando un ultrasonido durante 3 h.

Los cromatogramas 20 y 21 muestran los picos de ácido fítico correspondientes a las condiciones de mayor y menor respuesta del sistema, que son para HCl 0,5 M con ultrasonido y TCA 0,6 M con ultrasonido de punta, respectivamente.



Cromatograma 20. HCl 0,5 M; Ultrasonido por 3 h.



Cromatograma 21. TCA 0,6 M; Ultrasonido de punta por 3 min.

5.4. 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 fijo el tipo de extracción: ultrasonido; Tiempo de extracción: 3 h. La tabla 12 muestra los niveles estudiados para estas variables.

Tabla 12. Factores y niveles del diseño factorial N°3.

	Variables	-	+
A	Tipo de ácido	HCl	TCA
B	Concentración de ácido	baja	alta

En la tabla 13 se especifica las condiciones de la variable de la concentración de ácido.

Tabla 13. Concentración del tipo de ácido de extracción para el diseño factorial N°3.

	Concentración del Ácido [M]	
	Baja	Alta
HCl	0,5	2
TCA	0,6	0,9

En la Tabla 14. se muestran los resultados de la determinación de la concentración ácido fítico en las muestras de cereal de trigo “cerelac” para todos los experimentos realizados según el diseño de factorial 2^2 con su respectiva replica. Se llevó a cabo la evaluación del diseño con el Software estadístico Statgraphics Plus 5.1

Tabla 14. Concentración en mg/L de ácido fítico obtenidas con el diseño factorial N°3.

Experimento	A	B	Replica 1	Replica 2
1	-	-	478	414
2	-	+	365	425
3	+	-	380	324
4	+	+	373	439

A continuación se presenta en la Figura 13. el diagrama de Pareto para la determinación de ácido fítico con el diseño 2^2 .

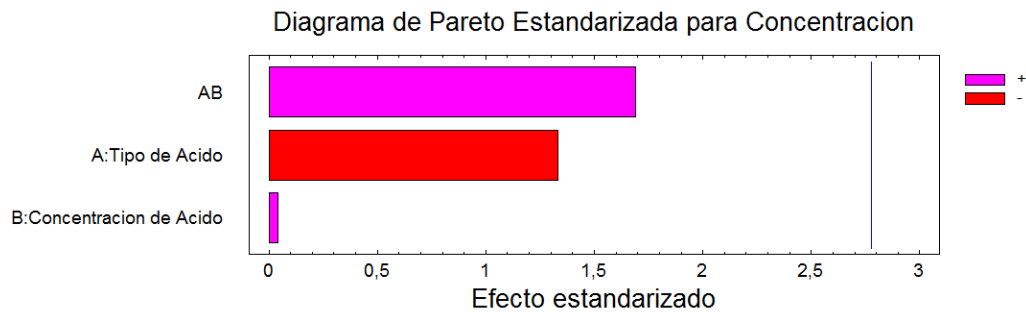


Figura 13. Diagrama de Pareto para el diseño factorial N°3.

Debido al alto error obtenido en el diseño, todas las variables se encuentran por debajo del límite de significación, sin embargo por la magnitud de la interacción AB con respecto a la variable B se puede decir que su efecto es marcadamente importante.

Tomando en cuenta la posible interacción entre A y B se construyó el diagrama de interacciones para determinar bajo qué condiciones se obtiene la mayor respuesta con estas dos variables. En la figura 14. se muestra el diagrama de interacción con los valores promedios de respuesta de acuerdo a las interacciones estimadas.

DIAGRAMA AB
Factor A

	+	
Factor B -	352	406
	446	395
	-	

+

-

Figura 14. Diagrama de interacción para el diseño factorial N°3.

La mayor respuesta se produce cuando los factores interaccionan de la siguiente forma: A(-)= HCl y B(-)= concentración baja. Esto corresponde al experimentos 1.

5.5. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO Y CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.

Se analizaron dos muestras de cada cereal, de peso aproximadamente de 1g cada una y se trataron con 20 mL de HCl 0,5 M en un ultrasonido durante 3 h. Se continuó con los pasos establecidos en la parte experimental y con los resultados obtenidos se procedió al cálculo del porcentaje de recuperación del ácido fítico. Para esta etapa se emplearon los siguientes cereales:

- Cereal de Arroz
- Cereal de Trigo/miel
- Cereal de Trigo “Cerelac”
- Cereal de Trigo partido #1

A manera de comparación debido a que ciertos autores reportan mejorías en los porcentajes de recuperación con el uso del TCA 0,9 M; también se analizaron los cereales indicados con este ácido, utilizando ultrasonido durante 3 h.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación se procedió a agregar en algunas muestras 0,6 mL de la solución madre N°2. De tal manera que la concentración de ácido fítico agregada fuese de aproximadamente 300 mg/mL una vez finalizado el proceso de extracción y análisis para los cereales infantiles, mientras que para el cereal de trigo no procesado fue de aproximadamente 75 mg/L debido a que el volumen final de la muestra fue de 4 mL en vez de 1mL como lo fue para los cereales infantiles.

5.5.1 CEREAL DE TRIGO “CERELAC”.

Únicamente para este cereal también se analizaron dos muestras adicionales a las cuales se les agregó 0,8 mL de la solución madre N°2, de tal manera que la concentración de ácido fítico agregada fuese de aproximadamente 400 mg/mL una vez finalizado el proceso de extracción y análisis, para realizar un estudio de recuperación en dos niveles.

5.5.1.1. EXTRACCIÓN CON ÁCIDO CLORHÍDRICO.

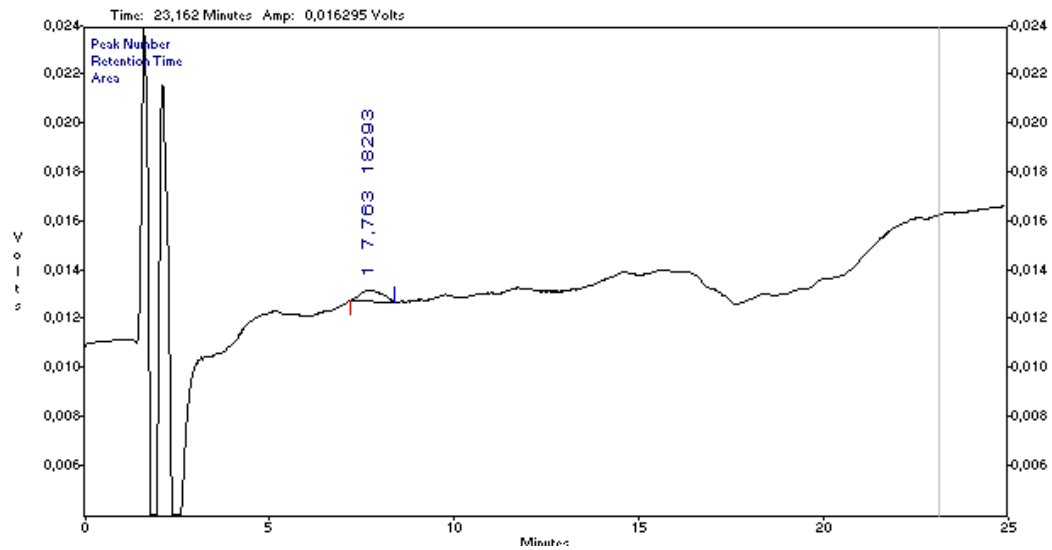
En la siguiente tabla se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta la muestra sin agregado de IP6 (S/A) y las muestras 1 y 2 ambas con el agregado de 300 mg/L de IP6.

Tabla 15. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo “cerelac” con agregado de 300mg/L de IP6 y extracción con HCl 0,5 M.

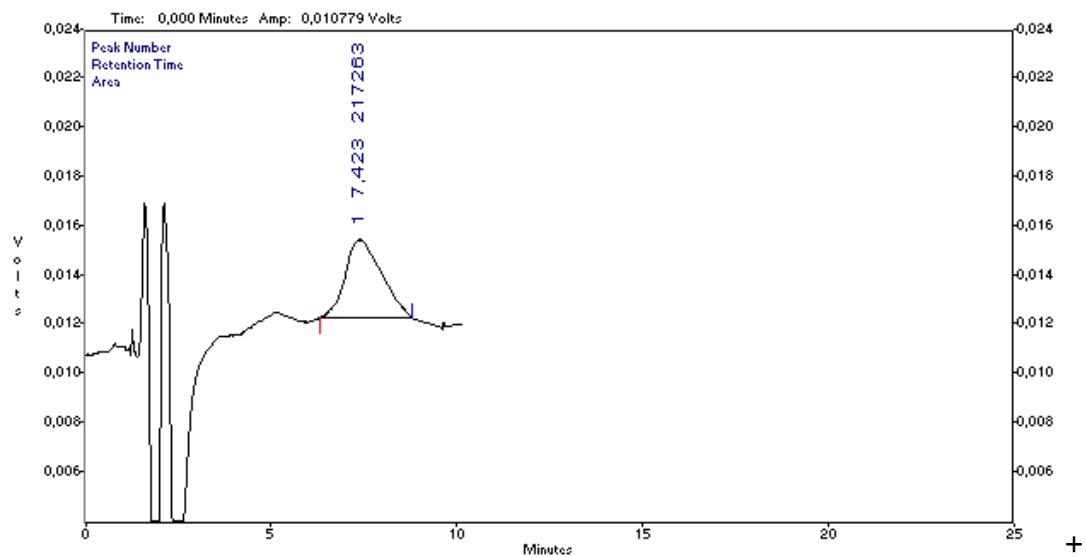
Muestra		S/A	1	2
Concentración de IP6 [mg/L]		146 ± 7	307 ± 18	338 ± 7
Masa de IP6 [mg]	<i>Total</i>	0,73 ± 0,04	1,53 ± 0,09	1,69 ± 0,04
	<i>Producto de la diferencia</i>		0,80 ± 0,09	0,96 ± 0,04
	<i>Agregada</i>		1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
	%Recuperación		54 ± 6	64 ± 2

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de trigo “cerelac” fue de (54 – 64)% con HCl 0,5 M como ácido de extracción. Se observó un bajo porcentaje de recuperación para esta muestra.

A continuación se presentan los cromatogramas 22 y 23 correspondientes a la muestra sin agregado de IP6 y una de las muestras con el agregado de 300 mg/L de IP6 respectivamente.



Cromatograma 22. Muestra de cereal de trigo “cerelac”, tratada con HCl 0,5 M.



Cromatograma 23. Muestra de cereal de trigo “cerelac” con agregado de 300 mg/L de IP6, tratada con HCl 0,5 M.

En la tabla 16. se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta las muestras 3 y 4 ambas con agregado de 400 mg/L de IP6.

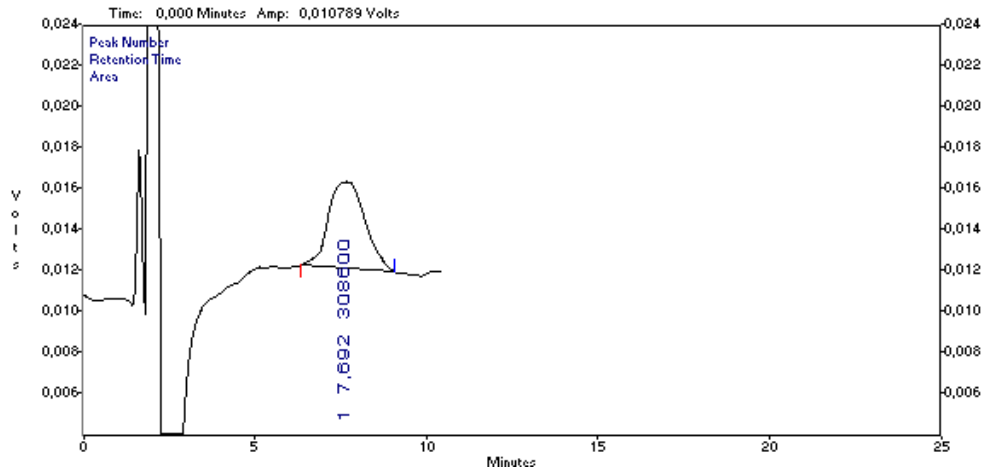
Tabla 16. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo “cerelac” con agregado de 400 mg/L de IP6 agregado y extracción con HCl 0,5 M.

	Muestra	S/A	3	4
	Concentración de IP6 [mg/L]	146 ± 7	321 ± 10	316 ± 2
Masa de IP6 [mg]	<i>Total</i>	0,73 ± 0,04	1,60 ± 0,05	1,582 ± 0,008
	<i>Producto de la diferencia</i>		0,87 ± 0,05	0,853 ± 0,008
	<i>Agregada</i>		2,00 ± 0,03	2,00 ± 0,03
	%Recuperación		44 ± 3	42,6 ± 0,4

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de trigo “cerelac” fue de (42,6 – 44)% con HCl como ácido de extracción. Se observó un bajo porcentaje de recuperación para esta muestra.

Como resultado del análisis de un estudio de dos niveles para el HCl como ácido de extracción, se tiene que no son reproducibles los porcentajes de recuperación para diferentes concentraciones agregadas de ácido fítico en la muestra.

A continuación se presenta el cromatograma correspondiente a una de las muestras con agregado de 400 mg/L de IP6.



Cromatograma 24. Muestra de cereal de trigo “cerelac” con agregado de 400 mg/L de IP6, tratada con HCl 0,5 M.

5.5.1.2. EXTRACCIÓN CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO.

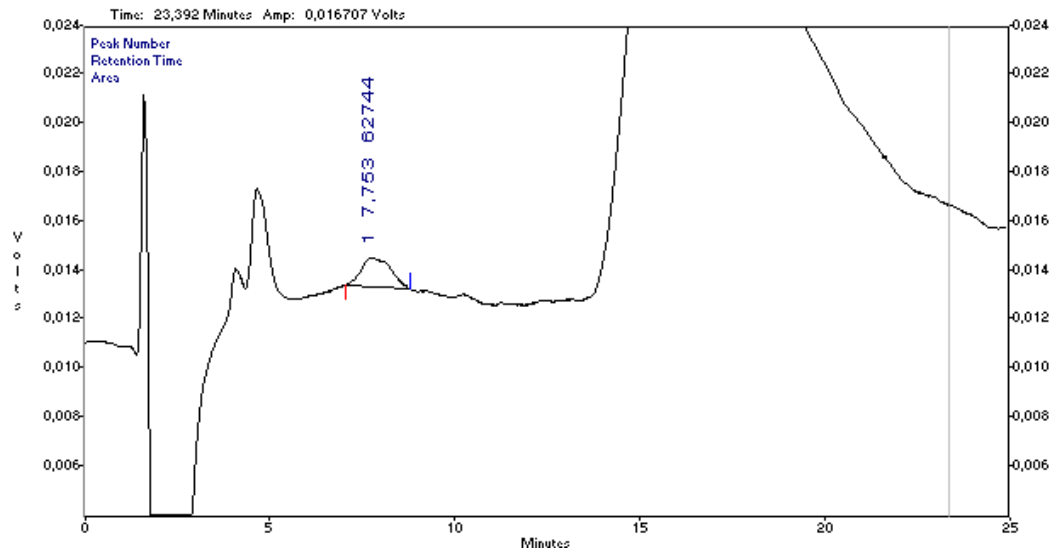
En la siguiente tabla se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta la muestra sin agregado de IP6 (S/A) y las muestras 1 y 2 ambas con agregado de 300 mg/L de IP6 y tratadas con TCA 0,9 M.

Tabla 17. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo “cerelac” con agregado de 300 mg/L de IP6; TCA 0,9 M.

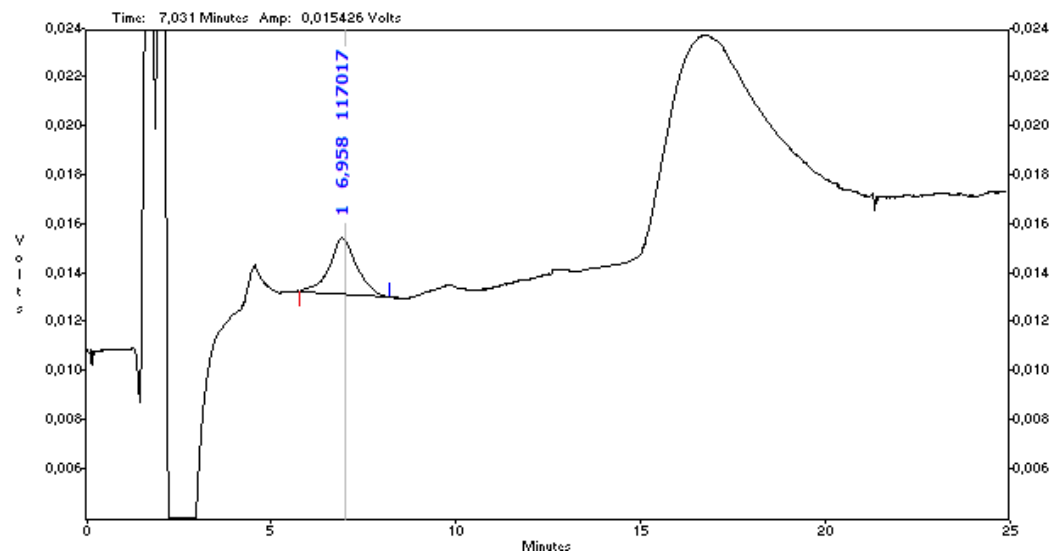
	Muestra	S/A	1	2
	Concentración de IP6 [mg/L]	166 ± 10	292 ± 10	270 ± 5
Masa de IP6 [mg]	<i>Total</i>	0,83 ± 0,05	1,46 ± 0,05	1,35 ± 0,03
	<i>Producto de la diferencia</i>		0,63 ± 0,05	0,52 ± 0,03
	<i>Agregada</i>		1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
	%Recuperación		42 ± 3	34 ± 2

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de trigo “cerelac” fue de (34 – 42)% con TCA 0,9 M como ácido de extracción. Se observó un bajo porcentaje de recuperación para esta muestra.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la muestra sin agregado de IP6 y una de las muestras con agregado de 300 mg/L de IP6.



Cromatograma 25. Muestra de cereal de trigo “cerelac” tratada con TCA 0,9 M.



Cromatograma 26. Muestra de cereal de trigo “cerelac” con agregado de 300 mg/L de IP6, tratada con TCA 0,9 M.

En la tabla 18. se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta las muestras 3 y 4 ambas con agregado de 400mg/L de IP6.

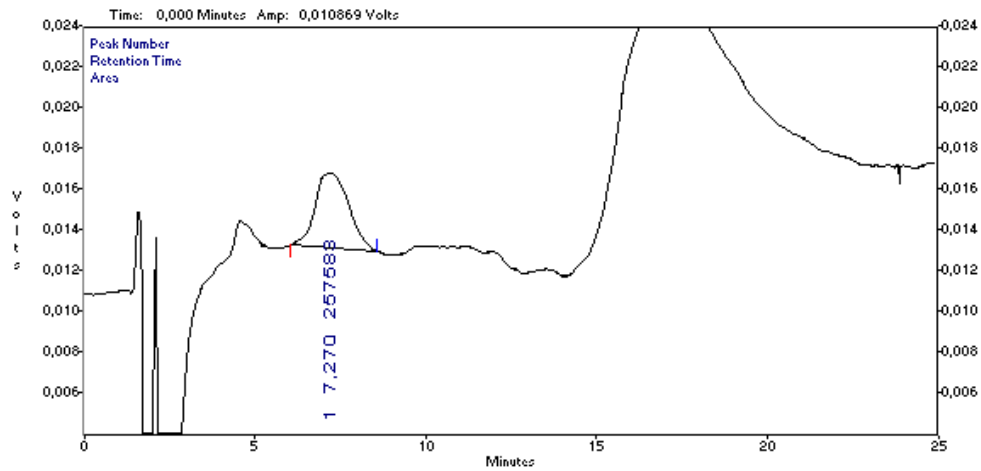
Tabla 18. Resumen de Valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo “cerelac” con agregado de 400 mg/L de IP6; TCA 0,9 M.

Masa de IP6 [mg]	Muestra	S/A	3	4
	Concentración de IP6 [mg/L]	166 ± 10	345 ± 13	306 ± 7
	<i>Total</i>	0,83 ± 0,05	1,73 ± 0,03	1,53 ± 0,03
	<i>Producto de la diferencia</i>		0,89 ± 0,07	0,70 ± 0,03
	<i>Agregada</i>		2,00 ± 0,03	2,00 ± 0,03
	%Recuperación		45 ± 3	35 ± 2

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de trigo “cerelac” fue de (35 – 45)% con TCA 0,9 M como ácido de extracción. Siendo un bajo porcentaje de recuperación.

Como resultado del análisis de recuperación en dos niveles para el TCA como ácido de extracción, se tiene que se encuentran en los mismos ordenes de magnitud los datos obtenidos para diferentes concentraciones de ácido fítico en la muestra con el uso de este ácido, sin embargo las recuperaciones son muy bajas.

A continuación se presenta el cromatograma correspondiente a una de las muestras con agregado de 400 mg/L de IP6.



Cromatograma 27. Muestra de cereal de trigo “cerelac” con agregado de 400 mg/L de IP6, tratada con TCA 0,9 M.

En la tabla 19. se presenta un resumen con los porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo “cerelac” para los diferentes ácidos de extracción estudiados.

Tabla 19. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo “cerelac” con diferentes ácidos de extracción.

	Rango de Porcentaje de Recuperación [%]	
	300 mg/L de IP6 agregado	400 mg/L de IP6 agregado
HCl 0,5 M	54 - 64	42,6 - 44
TCA 0,9 M	34 - 42	35 - 45

Se obtienen bajos porcentajes de recuperación de IP6, lo cual puede deberse a que los parámetros para la extracción del ácido fítico no se encuentran aún en sus valores óptimos. A su vez que la recuperación pudo verse afectada con el alto contenido mineral que presentan los cereales infantiles, como reportan ciertos autores^[27,28,29,30]. Sin embargo los resultados son mayores cuando se utiliza en HCl 0,5 M como ácido de extracción con respecto al TCA 0,9 M, resultado revelado en los diseños factoriales anteriormente realizados.

5.5.2 CEREAL DE TRIGO/MIEL.

5.5.2.1. EXTRACCIÓN CON ÁCIDO CLORHÍDRICO.

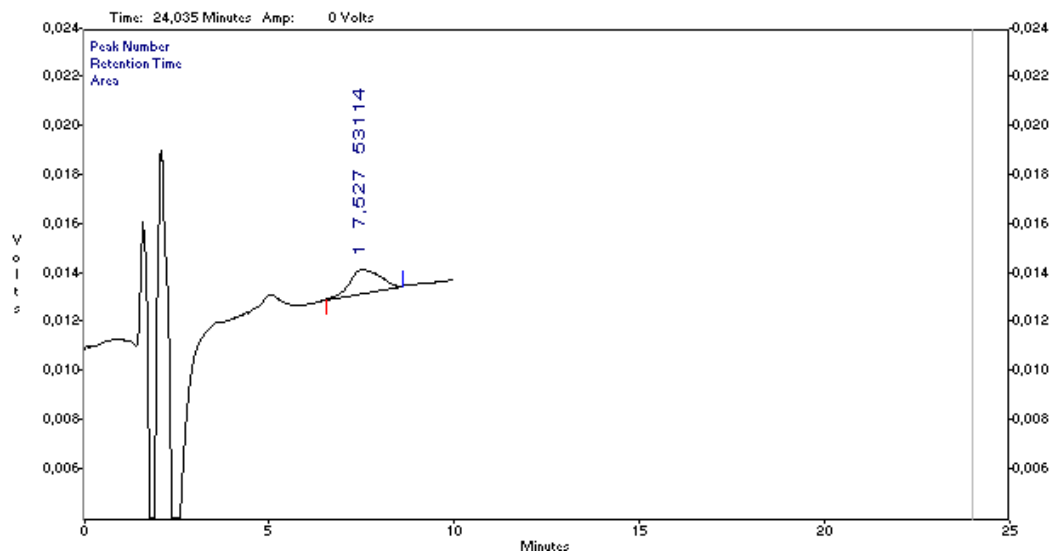
En la siguiente tabla se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta la muestra sin agregado de IP6 (S/A) y las muestras 1 y 2 ambas con agregado de 300 mg/L de IP6 y tratadas con HCl 0,5 M.

Tabla 20. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo/miel; HCl 0,5M.

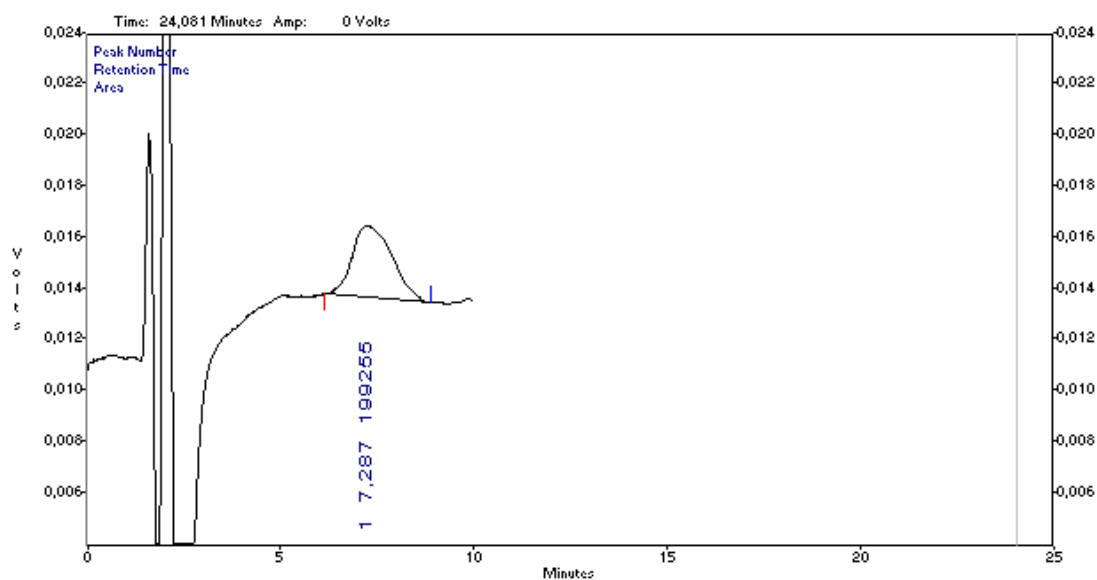
Muestra		S/A	1	2
Concentración [mg/L]		144 ± 4	307 ± 11	293 ± 10
Masa de IP6 [mg]	<i>Total</i>	0,72 ± 0,02	1,54 ± 0,06	1,46 ± 0,05
	<i>Producto de la diferencia</i>		0,82 ± 0,06	0,74 ± 0,05
	<i>Agregada</i>		1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
	%Recuperación		55 ± 4	50 ± 3

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de trigo/miel fue de (50 – 55)% con HCl 0,5 M como ácido de extracción. Se observó un bajo porcentaje de recuperación para esta muestra cereal de trigo/miel.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la muestra sin agregado de IP6 y la muestra con agregado de 300 mg/L de IP6.



Cromatograma 28. Muestra de cereal de trigo/miel, tratada con HCl 0,5 M.



Cromatograma 29. Muestra de cereal de trigo/miel con agregado de 300 mg/L de IP6, tratada con HCl 0,5 M.

5.5.2.2. EXTRACCIÓN CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO.

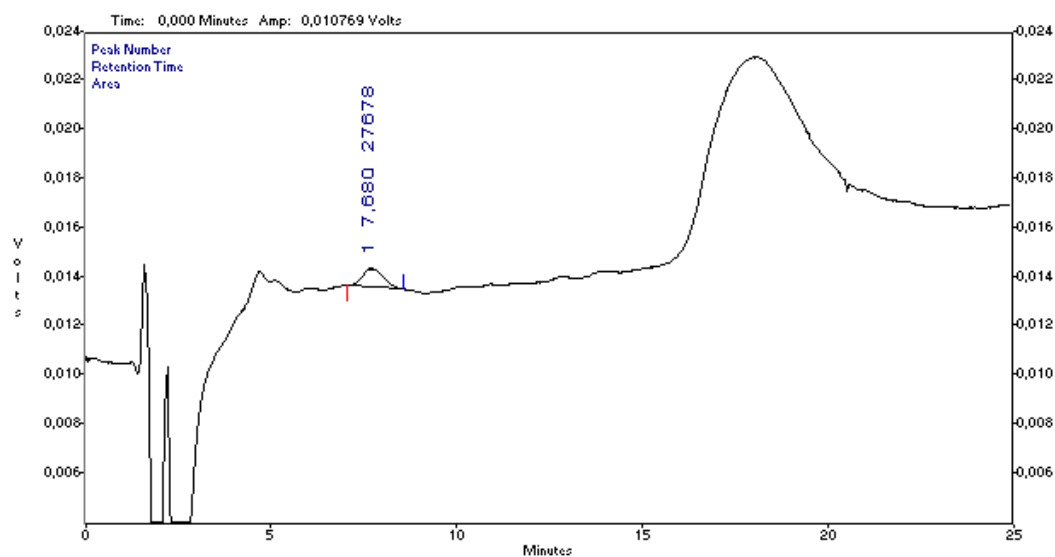
En la siguiente tabla se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta la muestra sin contaminación (S/A) y las muestras 1 y 2 ambas con agregado de 300 mg/L de IP6, tratadas con TCA 0,9 M.

Tabla 21. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo/miel; TCA 0,9 M.

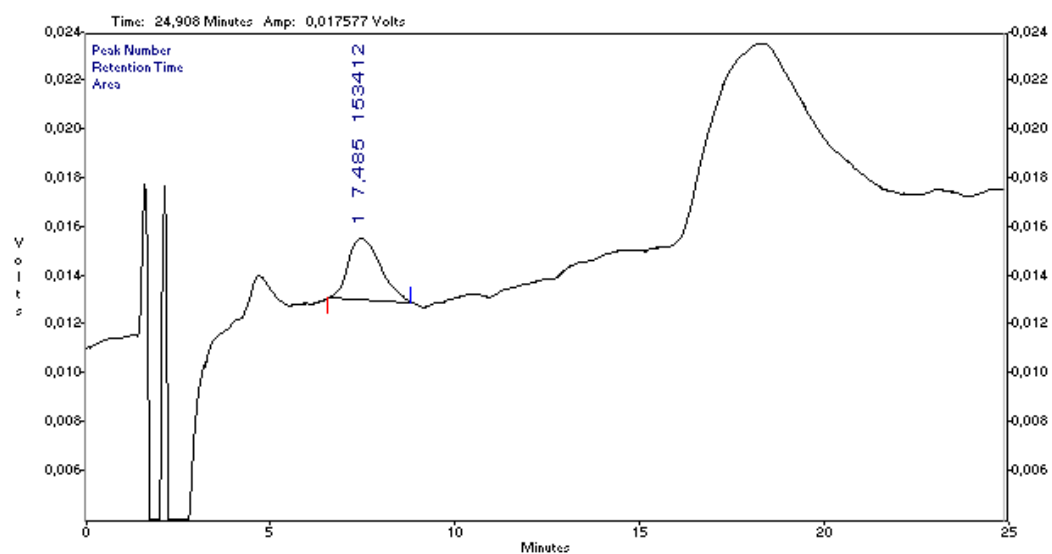
Masa de IP6 [mg]	Muestra	S/A	1	2
	Concentración [mg/L]	142 ± 2	204 ± 11	222 ± 10
	<i>Total</i>	0,71 ± 0,02	1,02 ± 0,05	1,11 ± 0,05
	<i>Producto de la diferencia</i>		0,31 ± 0,05	0,40 ± 0,05
	<i>Agregada</i>		1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
	%Recuperación		21 ± 3	27 ± 3

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de trigo/miel fue de (21 – 27)% con TCA 0,9 M como ácido de extracción. Se observó un bajo porcentaje de recuperación para este cereal.

A continuación se presentan los cromatogramas 30 y 31 correspondientes a la muestra sin agregado de IP6 y una de las muestras con agregado de 300 mg/L de IP6 respectivamente.



Cromatograma 30. Muestra de cereal de trigo/miel, tratada con TCA 0,9 M.



Cromatograma 31. Muestra de cereal de trigo/miel con agregado de 300 mg/L de IP6, tratada con TCA 0,9 M.

En la tabla 22. se presenta un resumen con los porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo/miel para diferentes ácidos de extracción.

Tabla 22. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo/miel con diferentes ácidos de extracción.

	Rango de Porcentaje de Recuperación [%]
HCl 0,5 M	50 - 55
TCA 0,9 M	21 - 27

Nuevamente para este cereal, se obtienen bajos porcentajes de recuperación de IP6, lo cual puede deberse a que los parámetros para la extracción del ácido fítico no se encuentran aún en sus valores óptimos. A su vez que la recuperación pudo verse afectada con el alto contenido mineral que presentan los cereales infantiles, como reportan ciertos autores^[27,28,29,30]. Sin embargo los resultados son mayores cuando se utiliza en HCl 0,5 M como ácido de extracción, resultado revelado en los diseños factoriales realizados anteriormente.

5.5.3 CEREAL DE ARROZ.

5.5.3.1. EXTRACCIÓN CON ÁCIDO CLORHÍDRICO.

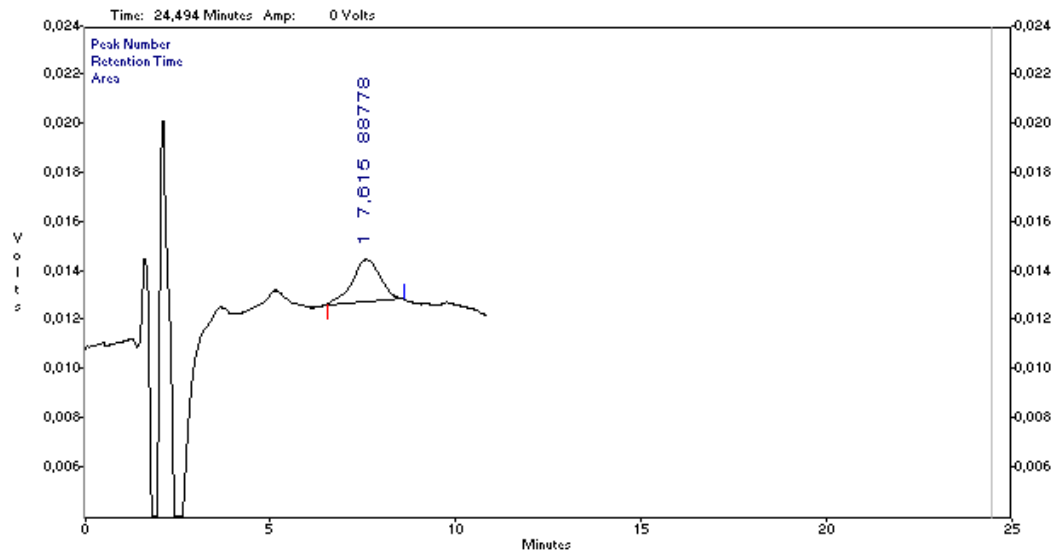
En la siguiente tabla se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta la muestra sin agregado de IP6 (S/A) y las muestras 1 y 2 ambas con agregado de 300 mg/L de IP6, tratadas con HCl 0,5 M.

Tabla 23. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de arroz; HCl 0,5 M.

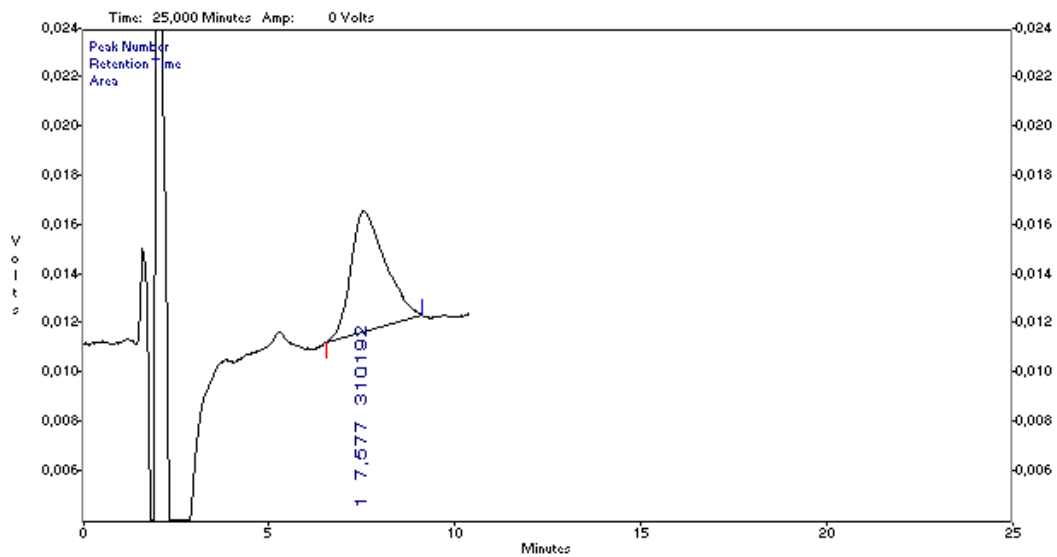
	Muestra	S/C	1	2
	Concentración [mg/L]	198 ± 8	430 ± 25	448 ± 25
Masa de IP6 [mg]	<i>Total</i>	0,99 ± 0,04	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
	<i>Producto de la diferencia</i>		1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
	<i>Agregada</i>		1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
	%Recuperación		77 ± 9	83 ± 8

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de arroz fue de (77 – 83)% con HCl 0,5 M como ácido de extracción. Se observó un porcentaje de recuperación alto para esta muestra de cereal.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la muestra sin agregado de IP6 y una de las muestras con agregado de 300 mg/L.



Cromatograma 32. Muestra de cereal de arroz, tratada con HCl 0,5 M.



Cromatograma 33. Muestra de cereal de arroz con agregado de 300 mg/L de IP6, tratada con HCl 0,5 M.

5.5.3.2. EXTRACCIÓN CON ÁCIDO TRICLOACÉTICO.

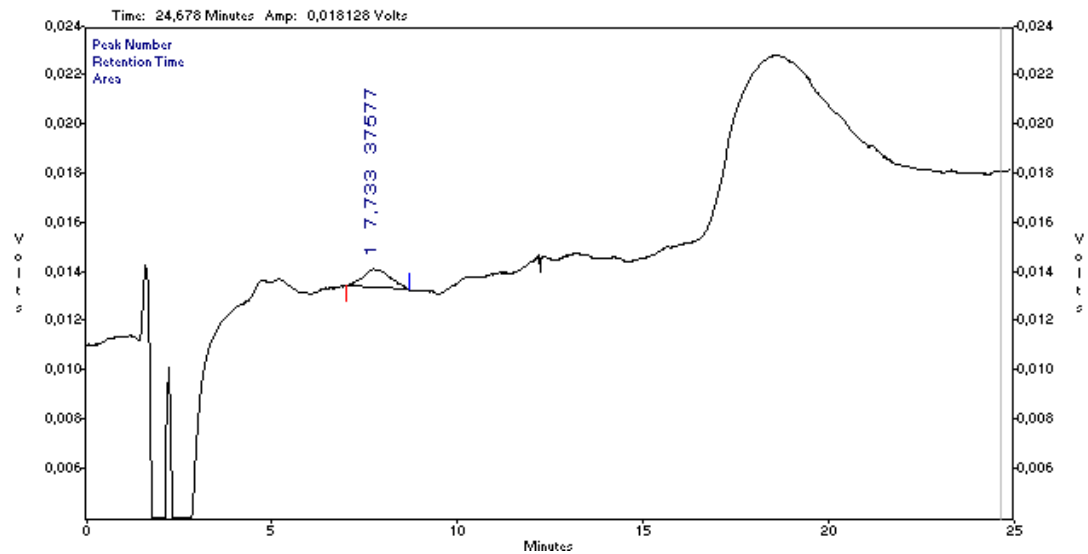
En la siguiente tabla se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta la muestra sin agregado de IP6 (S/A) y las muestras 1 y 2 ambas con agregado de 300 mg/L de IP6, tratadas con TCA 0,9 M.

Tabla 24. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de arroz; TCA 0,9 M.

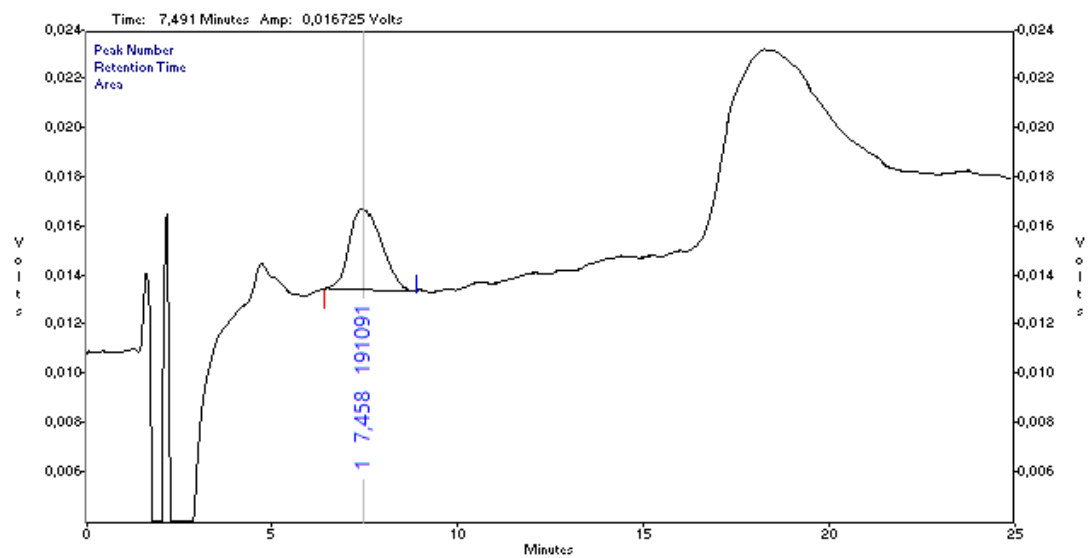
	Muestra	S/C	1	2
	Concentración [mg/L]	160 ± 4	303 ± 9	304 ± 9
Masa de IP6 [mg]	<i>Total</i>	0,80 ± 0,02	1,52 ± 0,05	1,52 ± 0,05
	<i>Producto de la diferencia</i>		0,72 ± 0,05	0,72 ± 0,05
	<i>Agregada</i>		1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
	%Recuperación		48 ± 3	48±3

El porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de arroz fue de (48 ± 3)% con TCA 0,9 M como ácido de extracción. Se observó un bajo porcentaje de recuperación para esta muestra de cereal con este ácido.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la muestra sin agregado de IP6 y una de las muestras con agregado de 300 mg/L de IP6.



Cromatograma 34. Muestra de cereal de arroz, tratada con TCA 0,9 M.



Cromatograma 35. Muestra de cereal de arroz con agregado de 300 mg/L de IP6, tratada con TCA 0,9 M.

En la tabla 25. Se presenta un resumen con los porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de arroz.

Tabla 25. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de arroz.

	Rango de Porcentaje de Recuperación [%]
HCl 0,5 M	77 - 83
TCA 0,9 M	48

Para este cereal de arroz, se obtienen mejores porcentajes de recuperación de IP6 con respecto a los cereales a base de trigo con el uso de HCl 0,5 M; no así con TCA 0,9 M que sigue siendo muy bajo. Este resultado puede estar influenciado por el tipo de matriz de la muestra que permite una mayor extracción del ácido fítico con el HCl o al requerimiento de diferentes condiciones de extracción en función de la concentración inicial del ácido fítico en el cereal como lo reporto Mijares, E.^[30] en 2013.

5.5.4 CEREAL DE TRIGO PARTIDO #1.

Es importante resaltar para estos cálculos, que la disolución de la muestra se realizó en forma diferente, ya que el volumen final fue de 4 mL en vez de 1mL como en las muestras anteriores.

5.5.4.1. EXTRACCIÓN CON ÁCIDO CLORHÍDRICO.

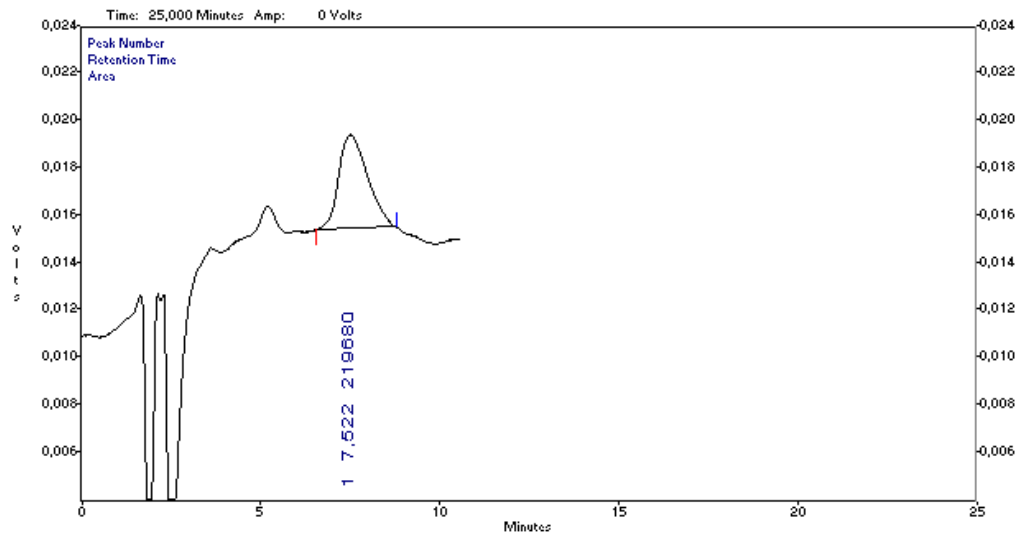
En la siguiente tabla se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta la muestra sin agregado de IP6 (S/A) y las muestras 1 y 2 ambas con agregado de 75 mg/L de IP6, tratadas con HCl 0,5 M.

Tabla 26. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo partido #1; HCl 0,5 M.

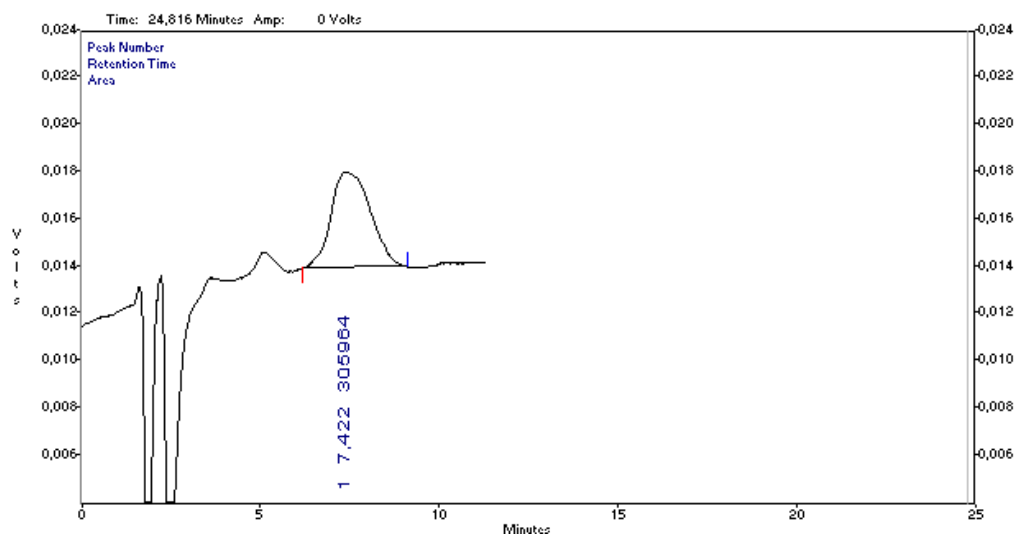
Masa de IP6 [mg]	Muestra	S/A	1	2
	Concentración [mg/L]	288 ± 8	318 ± 9	335 ± 8
	<i>Total</i>	5,8 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,7 ± 0,2
	<i>Producto de la diferencia</i>		0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,2
	<i>Agregada</i>		1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
	%Recuperación		40 ± 16	62 ± 11

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 para el cereal de trigo partido #1 fue de (40 – 62)% con HCl 0,5 M como ácido de extracción. Se observó un bajo porcentaje de recuperación para esta muestra de cereal.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la muestra sin agregado de IP6 y una de las muestras con agregado de 75 mg/L de IP6.



Cromatograma 36. Muestra de cereal de trigo partido #1, tratada con HCl 0,5 M.



Cromatograma 37. Muestra de cereal de trigo partido #1 con agregado de 75 mg/L de IP6, tratada con HCl 0,5 M.

5.5.4.2. EXTRACCIÓN CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO.

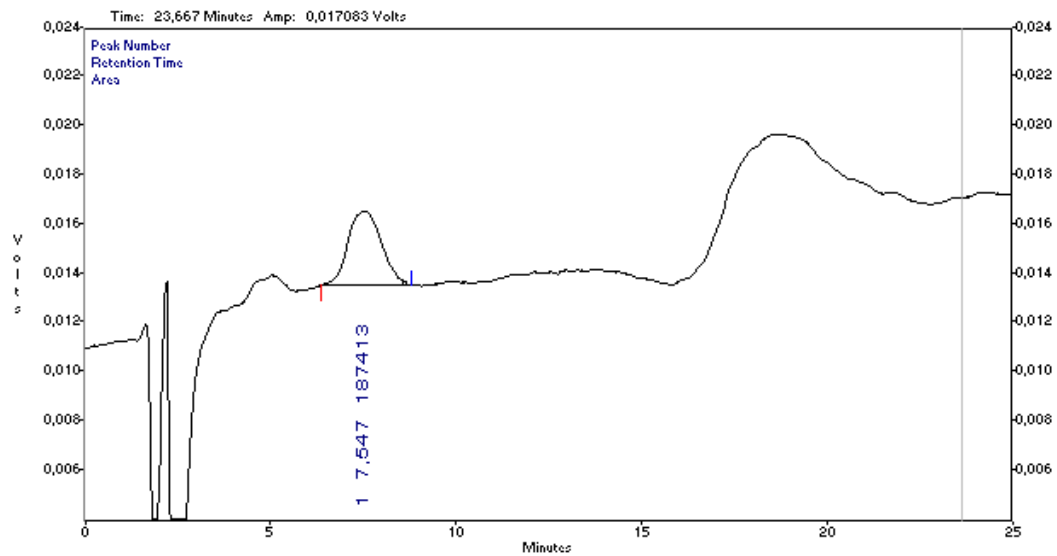
En la siguiente tabla se presenta un resumen de los valores obtenidos y el porcentaje de recuperación tomando en cuenta la muestra sin agregado de IP6 (S/A) y las muestras 1 y 2 ambas con agregado de 75 mg/L de IP6, tratadas con TCA 0,9 M.

Tabla 27. Resumen de valores obtenidos y porcentaje de recuperación para el cereal de trigo partido #1; TCA 0,9 M.

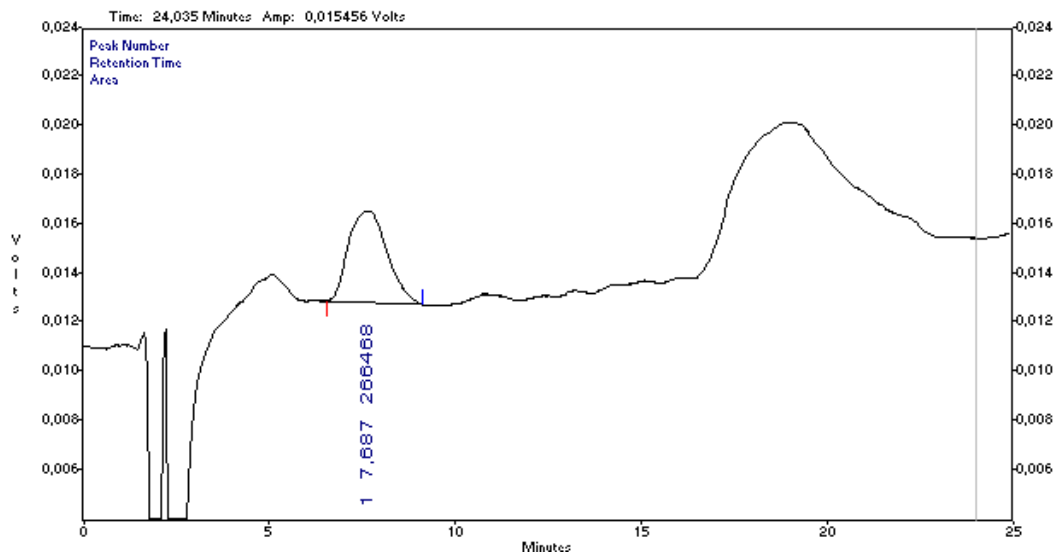
Masa de IP6 [mg]	Muestra	S/A	1	2
	Concentración [mg/L]	247 ± 23	344 ± 9	347 ± 8
	<i>Total</i>	4,9 ± 0,2	6,9 ± 0,2	6,9 ± 0,2
	<i>Producto de la diferencia</i>		1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,2
	<i>Agregada</i>		1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
	%Recuperación		129 ± 17	133 ± 14

El rango de porcentaje de recuperación de IP6 obtenido para el cereal de trigo partido #1 fue de (129 – 133)% con TCA 0,9 M como ácido de extracción.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la muestra sin agregado de IP6 y una de las muestras con agregado de 75 mg/L de IP6.



Cromatograma 38. Muestra de cereal de trigo partido #1, tratada con TCA 0,9 M.



Cromatograma 39. Muestra de cereal de trigo partido #1 con agregado de 75 mg/L de IP6, tratada con TCA 0,9 M.

A continuación se presenta un resumen con los porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo partido #1.

Tabla 28. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para el cereal de trigo partido #1.

	Rango de Porcentaje de Recuperación [%]
HCl 0,5 M	40 - 62
TCA 0,9 M	129 - 133

Los resultados en este cereal evidencian que se alcanzó la condición óptima de trabajo dado a la obtención de buenos porcentajes de recuperación de ácido fólico con el uso del TCA, lo que sugiere que cuando en la matriz no están presente los metales, este es el mejor ácido de extracción. Sin embargo para el HCl aún se obtienen porcentajes bajos, lo que advierte que es necesario seguir buscando la condición óptima para este ácido.

Los valores superiores al 100% pueden deberse a que la contaminación de las muestras en la etapa de optimización se realizó con un patrón de la sal dipotásica de ácido fólico de 95% de pureza, que no fue analizado por ICP-OES, para la certificación de su porcentaje de pureza.

En la siguiente tabla se establece un resumen con los porcentajes de recuperación de ácido fólico para todos los cereales analizados.

Tabla 29. Resumen de porcentajes de recuperación obtenidos para todos los cereales analizados para diferentes ácidos de extracción.

Cereal	Rango de Porcentaje de Recuperación [%]	
	HCl 0,5 M	TCA 0,9 M
Cerelac	54 - 64	34 - 42
Trigo/miel	50 - 55	21 - 27
Arroz	77 - 83	48
Trigo partido #1	40 - 62	129 - 133

Para las muestras de cereal a base de trigo (cerelac, trigo/miel y trigo partido #1), el ácido clorhídrico generó bajos porcentajes de recuperación, lo que evidenció que aún en ausencia de metales, para el uso de este ácido no se está en presencia de las condiciones óptimas de trabajo para la extracción del ácido fítico. Para el cereal a base de arroz, los valores fueron mayores lo que sugiere que la matriz de la muestra es una variable a considerar además de la concentración inicial de ácido fítico.

Aunque con el ácido tricloroacético se obtiene alto porcentaje de recuperación de IP6 en el cereal de trigo partido #1, los resultados de recuperación fueron muy inferiores a los obtenidos con HCl para los diferentes cereales infantiles evaluados sin importar la matriz del mismo. Esto refleja que la alta concentración de metales es un factor importante a tomar en cuenta, cuando se trabaja con cereales infantiles, así como la posible degradación del IP6 en sus inositoles fosfatos menores debido a la fuerza ácida del TCA.

6. CONCLUSIONES

- A mayores tiempos de extracción se logran concentraciones de ácido fítico superiores tanto con el uso del ácido clorhídrico, como para el ácido tricloroacético.
- La matriz del cereal y la alta concentración de metales son factores importantes que pueden causar interferencias en la extracción del ácido fítico.
- Se logró la optimización del método analítico para la determinación de ácido fítico, en un cereal no procesado de trigo por HPLC-RI, con el uso del ácido tricloroacético, mientras que con el HCl la recuperación fue baja.
- No se logró obtener porcentajes de recuperación aceptables para los cereales infantiles con los ácidos evaluados, bajo las condiciones de análisis estudiadas. Sin embargo las recuperaciones con HCl fueron mayores que con TCA.
- Los porcentajes de recuperación para los cereales infantiles con el uso del ácido clorhídrico fueron de (50 – 83) %
- Los porcentajes de recuperación para los cereales infantiles con el uso del ácido tricloroacético fueron de (21 – 48) %

7. RECOMENDACIONES

- Emplear tiempos más largos de extracción utilizando ácido clorhídrico, en cereales no procesados de trigo, arroz, maíz, etc y en cereales infantiles.
- Emplear optimizaciones con diseño experimental multiplex para el estudio de las condiciones óptimas de extracción con HCl y TCA en diferentes tipos de cereales infantiles.
- Emplear otros sistemas de detección de mayor sensibilidad, ya sea con un detector más actualizado o con la técnica de UV-Visible con reacción post-columna.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Chan, S., Ferguson, E., Bailey, K., Fahmida, U., Harper, T., Gibson, R. 2007. The concentration of iron, calcium, zinc and phytate in cereals and legumes habitually consumed by infants living in East Lombok, Indonesia. *Journal of Food Composition and Analysis*. **20**. 609-617.
2. Ojeda A., Villavicencio I., Linares Z. 2012. Fósforo fítico y actividad de fitasa en fórmulas infantiles basadas en cereales. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. **62 N° 4**.
3. Frontela C., Martínez C., Perez D., Ros G. 2008. Phytic acid and inositol phosphates in raw flours and infant cereals: The effect of processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. **21**. 343–350.
4. Garcia R., Guerra E., Garcia B. 1999. Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Research International*. **32**. 217-221.
5. Zhou J., Erdman J. 1995. Phytic acid in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **35**. 495-508.
6. Febles C., Arias A., Hardisson A., Rodriguez-Alvarez C., Sierra A. 2001a. Phytic acid levels in wheat flours. *Journal of cereals science*. **36**. 19-23.
7. Febles C., Arias A., Hardisson A., Rodriguez-Alvarez C., Sierra A. 2001b. Phytic acid levels in infant flours. *Food chemistry*. **74**. 437-41.

8. Martínez D., Ibáñez G. Victoria M., Rincón L. 2002. Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. **52**. N°3.
9. Chichester C., Mrak E., Stewart G. 1982. *Advances in food research*. Academic Press, Inc. New York, New York.
10. Dost, K., Tokul O. 2006. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. *Analytical Chemical Acta*. **558**. 22-27.
11. Park H., Ahn H., Kim S., Lee C., Byun M., Lee G. 2006. Determination of phytic acid levels in infant flours using different analytical methods. *Journal of Food Control*. **17**. 727-732.
12. Nehir S., Karakaya S., Simsek S. 2010. Effect of phytic acid on iron bioavailability in fortified infant cereals. *Nutrition and food science*. **40**. N°5. 485-493.
13. Wu P., Walker C., Wang F. 2009. Determination of phytic acid in cereals. *International journal of food science and technology*. 1671-1676.
14. Robinson K., Robinson J. 2001. *Análisis Instrumental*. Prentice Hall. Madrid, España.
15. Barquero M. 2004. *Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño*. Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica.
16. Skoog D., Holler F., Nieman T. 2001. *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill. 5ª ed. Madrid, España.

17. Harris D. 1991. Análisis químico cuantitativo. Grupo editorial Iberoamérica. 3^{ra} ed. D.F, Mexico.
18. Snyder L., Kirkland J. 1979. Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley & Sons, Inc. 2nd ed. New York, United State of America.
19. Żwir-Ferenc A., Biziuk M. 2006. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*. **15**. N°5. 677-690.
20. Ramírez J. 2006. Liofilización de Alimentos. ReCiTeLa. **6**. N°2. Cali, Colombia.
21. Mnerie G., Mnerie D., Sikolya L. 2012. Lyophilization - unconventional technology of foodstuffs drying. *Romanian Association of Nonconventional Technologies*. 42-45.
22. Lehrfeld J. 1989. High-performance Liquid Chromatography Analysis of Phytic Acid on a pH-Stable, Macroporous Polymer Column. *Cereal Chemistry*. **66**. N°6. 510-515.
23. Lehrfeld, J. 1994. HPLC Separation and quantization of phytic acid of some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **42**. N°12. 2726-2731.
24. Brooks S. & Lampi B. 2001. Problems Associated with Measuring Phytate in Infant Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**. N°2. 564-9

25. Rodríguez, J. 2003. Extracción, reconcentración y cuantificación de ácido fítico en trigo y algunos productos a base de trigo por HPLC-RI. T.E.G Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
26. Hernández, L. 2006. Evaluación de las diferentes etapas del pre-tratamiento de muestras sintéticas para el análisis de ácido fítico en trigo por HPLC-RI, y su aplicación en muestras reales. T.E.G Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
27. Caripá, D. 2008. 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.
28. Liang, J., Han B., Nout M., Hamer R. 2010. In vitro solubility of calcium, iron and zinc in relation to phytic acid levels in rice-based consumer products in China. *International journal of food science and technology*. **61**. 40-51.
29. Salas, D. 2010. 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.
30. Mijares, E. 2013. 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.

9. APÉNDICE

9.1 Cálculo de la concentración de la solución madre N°1 de ácido fítico de (2000 ± 2) mg/L.

Se preparó a partir de la sal dipotásica de ácido fítico $C_6P_6O_{24}H_{16}K_2$ al 92% de pureza.

Gramos de sal= (0,6047 ± 0,0003) g

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

PM del ácido fítico= 660,03 g/mol

Concentración de la solución madre:

$$[IP6] = 0,6047g \text{ sal} \times \frac{92g \text{ IP6}}{100g \text{ sal}} \times \frac{660g \text{ IP6/mol}}{736,20g \text{ sal/mol}} \times \frac{1}{250ml} \times \frac{10^6 ppm}{g/ml} = 2000mg/L$$

9.2. Cálculo de la concentración de la solución madre N°2 de ácido fítico de (2504 ± 4) mg/L.

Se preparó a partir de la sal dipotásica de ácido fítico $C_6P_6O_{24}H_{16}K_2$ al 95% de pureza.

Gramos de sal= (0,2940 ± 0,0003) g

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

PM del ácido fítico= 660,03 g/mol

Concentración de la solución madre:

$$[IP6] = 0,2940g \text{ sal} \times \frac{95g \text{ IP6}}{100g \text{ sal}} \times \frac{660g \text{ IP6/mol}}{736,20g \text{ sal/mol}} \times \frac{1}{100ml} \times \frac{10^6 ppm}{g/ml} = 2504mg/L$$

9.3. Cálculo de la concentración de los patrones de ácido fítico a partir de la solución madre N°2.

Los patrones de ácido fítico empleados para construir la curva de calibración se prepararon a partir de la solución de $(2504 \pm 4) \text{ mg/L}$.

$$\text{Patrón N° 1: } [IP6] = 2504mg/L \times \frac{4ml}{50ml} = 200,3mg/L$$

$$\text{Patrón N° 2: } [IP6] = 2504mg/L \times \frac{6ml}{50ml} = 300,5mg/L$$

$$\text{Patrón N° 3: } [IP6] = 2504mg/L \times \frac{8ml}{50ml} = 401mg/L$$

$$\text{Patrón N° 4: } [IP6] = 2504mg/L \times \frac{10ml}{50ml} = 501mg/L$$

$$\text{Patrón N° 5: } [IP6] = 2504ppm \times \frac{12ml}{50ml} = 601mg/L$$

9.4. Cálculo del porcentaje de recuperación del ácido fítico.

9.4.1 Cereal de trigo/miel, tratado con HCl 0,5M.

- Muestra de trigo/miel N°1 sin contaminar

Muestra N°1= (1,0010 ± 0.0003) g

Área promedio= 57721

Ecuación de la recta: $Y = 989,31X - 87126$ $R^2 = 0.9894$

Concentración de IP6 = $(Y + 87126) \cdot 989,31$

Concentración de ácido fítico en la muestra= (146 ± 13) mg/L

$$\text{Masa de IP6 total} = 146 \text{ mg/L} \times 0,00002 \text{ L} \times \frac{1}{0,02} \times \frac{50 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 0,73 \text{ mg}$$

Masa de IP6 inicial = (0,73 ± 0.07) mg IP6

- Muestra de trigo/miel N°2 sin contaminar

Muestra N°2 = (1,0009 ± 0,0003) g

Área promedio = 52363

El cálculo de la concentración, la masa total y el porcentaje de IP6 en la muestra se realizó de la misma forma.

Concentración de ácido fítico en la muestra= (141 ± 14) mg/L

Masa de IP6 inicial = $(0,72 \pm 0,07)$ mg IP6

- Masa promedio de IP6 inicial = $(0,72 \pm 0,02)$ mg

Para calcular el porcentaje de recuperación de ácido fítico se contaminaron dos muestras de cereal de trigo/miel con 0,6 mL de la solución madre N°2 de (2504 ± 4) mg/L.

$$\text{Masa de contaminación} = 2504 \text{ mg/L} \times 0,6 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} = 1,50 \text{ mg}$$

Masa de contaminación = $(1,50 \pm 0,03)$ mg IP₆

- Muestra de trigo/miel N°3 contaminada

Muestra N°3 = $(1,0016 \pm 0,0003)$ g

Área promedio = 245357

Ecuación de la recta: $Y = 1039,4X - 74180$ $R^2 = 0.9989$

$$X = (Y + 74180) / 1039,4$$

Concentración de ácido fítico en la muestra= (307 ± 11) mg/L

$$Masa\ de\ IP6\ total = 307mg/L \times 0,00002L \times \frac{1}{0,02} \times \frac{50ml}{10ml} = 1,5mg$$

Masa de IP6 en la muestra = (1,54 ± 0,06) mg IP6

- Porcentaje de recuperación de IP6

$$\% \text{ de recuperacion} = \frac{Masa\ de\ IP6\ en\ la\ muestra - Masa\ de\ IP6\ inicial}{Masa\ de\ contaminacion} \times 100$$

$$\% \text{ de recuperacion} = \frac{1,54 - 0,72}{1,5} \times 100 = 55$$

% de recuperación de IP₆ = (55 ± 4) %

- Muestra de trigo/miel N°4 contaminada

Muestra N°4 = (1,0012 ± 0,0003) g

Área promedio = 229917

Concentración de ácido fítico en la muestra = (293 ± 11) mg/L

$$Masa\ de\ IP6\ total = 293mg/L \times 0,00002L \times \frac{1}{0,02} \times \frac{50ml}{10ml} = 1,46mg$$

Masa de IP6 en la muestra = $(1,46 \pm 0,05)$ mg IP6

- Porcentaje de recuperación de IP6

$$\% \text{ de recuperacion} = \frac{\text{Masa de IP6 en la muestra} - \text{Masa de IP6 inicial}}{\text{Masa de contaminacion}} \times 100$$

$$\% \text{ de recuperacion} = \frac{1,46 - 0,72}{1,5} \times 100 = 49$$

% de recuperación de IP₆ = (49 ± 3) %

- Rango de porcentaje de recuperación de IP₆ obtenido para el trigo/miel es de = $(49 - 55)\%$