

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



***ESTUDIO DEL EFECTO DEL TIPO DE ÁCIDO Y CONCENTRACIÓN
EN LA RECUPERACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO
EN PRESENCIA DE METALES POR EL MÉTODO HPLC-RI***

*Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela, por el Br. Eloy Guillermo
Mijares Echezurúa, para optar al título
de Licenciado en Química.*

Tutora: Dra. Rosa Amaro

Caracas, Marzo de 2013.

RESUMEN

El ácido fítico (IP6) es la principal fuente de almacenamiento de fósforo en las plantas. Se encuentra presente sobre todo en granos, cereales y leguminosas. Posee una fuerte acción quelante para varios metales nutricionalmente importantes como el calcio, hierro, magnesio y zinc, por lo cual contribuye a desarrollar deficiencias de minerales en las personas cuyas dietas se basan en alimentos del tipo vegetales.

Por esta razón, se han desarrollado diversos métodos analíticos para la cuantificación del ácido fítico con el fin de conocer exactamente su concentración en los alimentos, entre los que se destaca la HPLC-RI. Sin embargo, en estos métodos se han reportado pérdidas del analito, principalmente cuando se trabaja con muestras altamente enriquecidas con minerales como lo son los cereales infantiles.

Con el objeto de establecer mejoras en la metodología de análisis de esta especie, se propone un estudio de varios factores que pueden influir en la recuperación en presencia de metales, como son: la concentración, el tipo de ácido empleado para la extracción y el tiempo de contacto entre el analito y dicho ácido.

Se determinó que el efecto de los metales es fuertemente dependiente de la concentración de ácido fítico inicial. Para bajas concentraciones, el uso de ácido tricloroacético o ácido clorhídrico generan baja recuperación en presencia de metales (< 60%), mientras que para altas concentraciones de IP6 los resultados parecen indicar mejoras en la recuperación de IP6 en presencia de metales con TCA (86%) con respecto al HCl (73%).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CEREALES INFANTILES.	3
1.2. ÁCIDO FÍTICO.	5
1.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.	5
1.2.2. PROPIEDADES.	6
1.2.3. BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES.	8
1.2.4. BENEFICIOS.	9
1.2.5. DISTRIBUCIÓN EN LAS PLANTAS.	10
1.2.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN.	12
1.3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA.	14
1.3.1. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO.	16
1.3.2. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO EN FASE NORMAL.	17
1.3.3. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO EN FASE INVERSA.	18
1.3.4. CROMATOGRAFÍA DE PARES IÓNICOS.	18
1.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.	20
1.5. ANTECEDENTES EN LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO POR HPLC- RI.	24
2. OBJETIVOS.	28
2.1. GENERAL	28
2.2. ESPECÍFICOS	28
3. PARTE EXPERIMENTAL.	29
3.1. INSTRUMENTACIÓN Y ACCESORIOS.	29
3.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.	33

3.3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS SINTÉTICAS DE ÁCIDO FÍTICO.....	33
3.3.2. TRATAMIENTO EN EL CARTUCHO DE INTERCAMBIO ANIÓNICO.	34
3.3.3. ELIMINACIÓN DEL DISOLVENTE	34
3.4. ANÁLISIS POR HPLC-RI.	36
3.4.1. FASE MÓVIL	36
3.4.2. PATRONES DE ÁCIDO FÍTICO.	37
3.5. HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO FÍTICO.....	37
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
4.1. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.	42
4.2. RECUPERACIÓN DEL ACIDO FÍTICO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, TIEMPO Y TIPO DE ÁCIDO USADO PARA LA EXTRACCIÓN.....	45
4.2.1. EFECTO DE LOS METALES SOBRE LA RECUPERACIÓN DEL IP6.....	48
4.2.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SOBRE LA RECUPERACIÓN DEL IP6.....	51
4.2.3. EFECTO DE TIPO DE ÁCIDO SOBRE LA RECUPERACIÓN DE IP6.	54
4.2.4. EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN SOBRE LA RECUPERACIÓN DEL IP6.	56
4.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE ÁCIDO FÍTICO SOBRE LA RECUPERACIÓN DE IP6.	58
5. CONCLUSIONES.....	62
6. RECOMENDACIONES.	63
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	64
8. APÉNDICE.	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química aproximada de diversos cereales (por cada 100 g)....	4
Tabla 2. Contenido de fitato en alimentos (mg/g).....	11
Tabla 3. Tiempos de retención aproximados de los diferentes inositoles fosfatos observados en el sistema HPLC-RI	40
Tabla 4. Porcentaje de recuperación de IP6 en muestras de 240 ppm.	46
Tabla 5. Porcentaje de recuperación de IP6 en muestras de 120 ppm extraídas con HCl	46
Tabla 6. Porcentaje de recuperación de IP6 en muestras de 120 ppm extraídas con TCA.	47
Tabla 7. Promedio de los resultados de % IP6 en muestras de 120 ppm tratadas con HCl	48
Tabla 8. Promedio de los resultados de % IP6 en muestras de 120 ppm tratadas con TCA	48
Tabla 9. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de los metales sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con HCl.....	49
Tabla 10. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de los metales sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con TCA.....	50
Tabla 11. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de la concentración de ácido sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con HCl.....	51
Tabla 12. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de la concentración de ácido sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con TCA	52
Tabla 13. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto del tipo de ácido de extracción sobre la recuperación de IP6	54
Tabla 14. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto tiempo de extracción sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con HCl.	56
Tabla 15. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto del tiempo de extracción sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con TCA.	57

Tabla 16. Estudio estadístico con prueba t del efecto de la concentración inicial de ácido fítico sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con HCl.	59
Tabla 17. Evaluación estadística con prueba t del efecto de la concentración inicial de ácido fítico sobre la recuperación de IP6 para muestras extraídas con TCA	60

1. INTRODUCCIÓN.

En muchos de los alimentos que se consumen existen en forma natural una serie de sustancias capaces de reducir e incluso impedir la absorción y utilización por nuestro organismo de determinados nutrientes, tal es el caso del ácido fítico que puede disminuir la biodisponibilidad de ciertos metales en el organismo, tales como Ca, Fe y Zn^[1-2].

En los últimos años, la divulgación dada a los potenciales efectos beneficiosos de dietas bajas en grasas y con alto contenido de fibra, han supuesto un fuerte empuje en el uso de cereales, granos y leguminosas en la alimentación humana. Estos cambios en los hábitos alimentarios hacia una alimentación rica en fibra han conducido a una mayor ingesta de fitatos^[3]. En el caso de la población infantil este problema se acentúa, dado que los depósitos de minerales en el cuerpo de niños de corta edad son naturalmente bajos, por ello las fuentes dietéticas se vuelven muy importantes para satisfacer la necesidad de nutrientes^[4].

Diferentes autores han demostrado que aquellos cereales con bajo contenido de ácido fítico y alto contenido de metales presentan una baja recuperación del ácido fítico cuando son analizados por el método HPLC-RI^[4-5].

Los cereales infantiles poseen una gran cantidad de metales tales como Ca, Fe y Zn; como resultado de la necesidad de brindar los nutrientes requeridos por los infantes para su sano crecimiento. Debido a esto, y a la gran necesidad de cuantificar el ácido fítico para asegurar que el contenido del mismo no sea perjudicial es importante desarrollar metodologías de análisis que permitan resultados confiables.

En la búsqueda de la disminución de los efectos de los metales sobre la recuperación del ácido fólico por el método HPLC-RI, en este trabajo se propone el estudio del efecto de diferentes tipos de ácidos, concentraciones de estos y tiempos de extracción sobre la recuperación de ácido fólico en presencia de metales.

1.1. CEREALES INFANTILES.

Se denominan cereales infantiles a los cereales procesados, considerando la falta de madurez del sistema digestivo de los niños en edad lactante, destinados a la preparación de papillas más o menos espesas para aportar los nutrientes requeridos por los mismos. Este tipo de alimentos contienen esencialmente:

- Almidón tratado por cocción o por fraccionamiento enzimático para hacerlo más digestivo.
- Proteínas y minerales.
- Vitaminas del grupo B (particularmente tiamina).

Estos productos destinados al consumo de los infantes pueden ser elaborados a partir de todo tipo de cereales (trigo, centeno, avena, cebada, arroz, maíz, sorgo, etc.), harinas extraídas de tubérculos (patatas), de raíces (tapioca) o semillas (soya)^[6].

Los cereales infantiles, por sus características nutritivas, constituyen un producto básico en la alimentación del niño y son generalmente el primer alimento sólido que se incorpora en su dieta. Estos son empleados como dieta complementaria a la leche materna a partir del 4^{to} a 6^{to} mes de edad, ya que suministran nutrientes esenciales especialmente hidratos de carbono y son alimentos con bajo contenido en grasa, pero ricos en ácidos grasos esenciales^[7]. Además, son comúnmente recomendados en el comienzo de una dieta complementaria debido a que poseen un elevado contenido de energía (80Kcal/100g)^[8].

La composición química aproximada de algunos de estos cereales se muestra en la tabla 1^[9-10].

Tabla 1. Composición química aproximada de diversos cereales (por cada 100 g)^[9-10]

	Mijo	Maíz	Trigo	Cebada	Centeno	Sorgo	Arroz	Avena
Humedad (g)	13,3	12,0	14,0	11,7	15,0	14,0	11,8	8,9
Proteínas (g)	5,8	8,7	12,7	10,6	8,2	8,3	6,4	12,4
Carbohidratos digeribles (g)	66,3	62,4	77,7	56,1	58,9	59,3	74,3	60,1
Fibra dietética (g)	8,5	11,0	12,6	17,3	14,6	13,8	10,5	10,3
Lípidos (g)	4,6	4,3	2,2	1,6	1,5	3,1	2,4	6,4
Calcio (mg)	17	15	36	50	64	28	10	55
Hierro (mg)	39	-	3,6	6	4,6	10	0,8	-
Cinc (mg)	2,5	2,5	2,4	3,3	1,3	1,4	0,2	4,5

1.2. ÁCIDO FÍTICO.

El ácido fítico (IP6) es el principal antinutriente presente en los cereales. Se conoce que está presente en altas concentraciones en semillas, granos y legumbres (1-2%) y puede inhibir de forma significativa la biodisponibilidad de minerales de interés nutricional como el hierro, calcio, magnesio y cinc, impidiendo su absorción^[11]. Asociado a esto, pueden aparecer problemas en la salud tan importantes como alteraciones en el crecimiento de los niños, anemia, disfunciones reproductivas, enfermedades cardíacas o alteraciones inmunológicas.

1.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.

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-hexakis (dihidrógeno fosfato) (IP6)

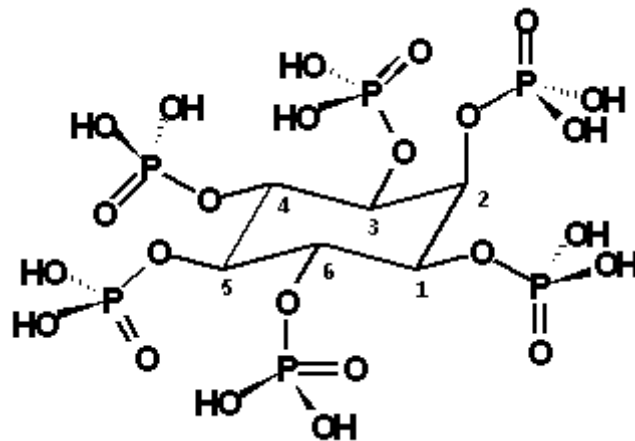


Figura 1. Estructura química del ácido fítico^[4]

Según esta estructura, el IP6, a pH neutro, y al que normalmente presentan los alimentos, es una molécula cargada negativamente y por lo tanto muy reactiva, por

lo que presenta una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas^[12].

1.2.2. PROPIEDADES.

La insolubilidad de los complejos metálicos del IP6 es la principal causa de su comportamiento antinutricional y de sus propiedades fisicoquímicas. Cuando un mineral se une al IP6 se vuelve insoluble, precipita y no será absorbido en el intestino. 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 fosfatos que no se han unido a los metales está relacionado con este parámetro.

La interacción entre el ácido fítico y las proteínas también es dependiente del pH, de la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con los minerales a un pH dado. A bajo pH, se produce una fuerte interacción electrostática entre los grupos amino terminales de las proteínas, y los ésteres fosfatos aniónicos del IP6, formándose un complejo binario. A pH intermedio, se forma 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 amino desprotonado de la proteína, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos. A pH elevado, la interacción entre las proteínas y el IP6 disminuye y los complejos ternarios se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta cuando el pH es elevado^[5].

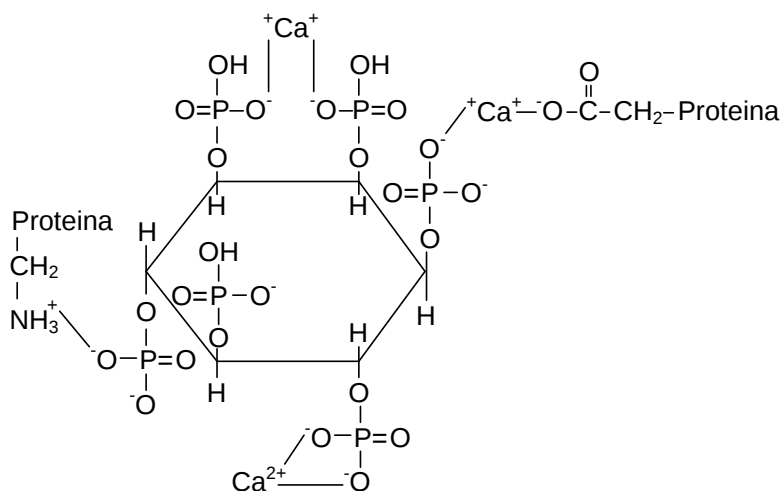


Figura 2. Interacciones del ácido fítico con minerales y proteínas^[5]

Durante el procesamiento y digestión de los alimentos, el ácido fítico puede ser desfosforilado enzimáticamente a myo-inositol pentafofato (IP5), tetra- (IP4), tris- (IP3), bis- (IP2), monofosfatos (IP). Solo el IP6 e IP5 tienen un efecto negativo en la biodisponibilidad de los minerales, los otros productos de hidrólisis formados tienen poca capacidad para unirse a los minerales, o los complejos formados son más solubles^[5].

Esta degradación se puede producir por hidrólisis enzimática o no enzimática. La hidrólisis enzimática usualmente ocurre en el tracto gastrointestinal de los seres vivos, o durante el procesamiento de los alimentos, por la acción de las fitasas (myo-inositol hexafofato fosfohidroxilasas), ya sea que provengan de plantas o de origen microbiano, o ambos. Estas enzimas son capaces de hidrolizar el ácido fítico presente en los vegetales, liberando de forma secuencial hasta 6 grupos ortofosfatos plenamente disponibles para los monogástricos^[13]. Las fitasas hidrolizan únicamente los fitatos en solución, por lo que su actuación requiere de humedad en el medio y

de condiciones determinadas de pH y temperatura que son variables según el tipo de fitasa.

Las fitasas están presentes de forma natural en numerosos cultivos de bacterias y hongos, así como en ciertos granos. También se encuentran en el tracto intestinal de todos los animales, debido bien sea por la ingestión de plantas que las contienen, o a la producción por parte de la microflora intestinal, la mucosa u órganos secretores. Por otro lado, la hidrólisis no enzimática generalmente se produce cuando los alimentos son calentados o tratados con ácidos fuertes.

Con la remoción de los grupos fosfatos del anillo inositol por cualquiera de estas vías (hidrólisis enzimática o no enzimática), disminuye la capacidad del ácido fítico de quelatar minerales, lo que resulta en un aumento de la biodisponibilidad de los mismos^[5].

1.2.3. BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES.

Los efectos adversos del IP6 en la biodisponibilidad de minerales dependen de un gran número de factores entre los que se destacan la concentración del IP6 y la fuerza de su unión con diferentes minerales^[14]. También influyen otros factores como^[3,14].

- Las condiciones del procesado del alimento, así como el tipo de IP6 (endógeno o exógeno) y la concentración de minerales en dicho alimento.

- Si el ácido fítico es ingerido en la misma comida que los minerales o en comidas separadas.
- La concentración de proteínas en la dieta, y por tanto la presencia de proteínas, péptidos o aminoácidos en el intestino que puedan interferir en la formación del complejo fitato-mineral.
- La presencia de otros agentes quelantes como: fibra dietética, ácido oxálico, ácido ascórbico, ácido cítrico o taninos que pueden competir con el IP6 en su unión con minerales.
- La presencia de fitasa, de origen intestinal, bacteriana o de la dieta, así como la inhibición de dicha enzima.
- La adaptación metabólica del individuo a los niveles de IP6.

1.2.4. BENEFICIOS.

Se han descrito algunos efectos positivos del ácido fítico a bajas concentraciones, entre los que destacan: retardo de la digestibilidad del almidón y disminución de la respuesta de la glucosa en la sangre, hipocolesterolemia, prevención de cálculos renales, control de caries dental y cáncer, y mejora de la capacidad de captación de oxígeno de los glóbulos rojos^[3]. Adicionalmente, es considerado un agente antioxidante porque es un potente inhibidor de la reacción de formación, catalizada por hierro, de radicales -OH al quelatar el hierro libre, bloqueando así su sitio de coordinación. Sin embargo, el mecanismo de esta reacción es incierto. Además, los inositol fosfatos más pequeños, tales como IP4 e IP3, pueden desempeñar roles de mediación de respuestas celulares^[4].

Su ingesta es indispensable para una dieta sana y equilibrada, debido a la acción inhibidora en la cristalización de sales cálcicas, tales como fosfatos y oxalatos; evitando por tanto la formación de depósitos minerales patológicos como son los cálculos renales. Otro efecto beneficioso es la reducción de la concentración de colesterol, evitando así problemas cardiovasculares.

Considerando los aspectos positivos y negativos de la ingesta de ácido fítico a través de los alimentos que lo contienen, es necesario resaltar la relevancia de una dieta adecuada, a fin de tener una correcta ingestión de todos los nutrientes que son esenciales para el organismo, especialmente en aquellos grupos de la población donde el impacto de altas concentraciones de fitato puede ser más serio, como son lactantes, niños, mujeres embarazadas y ancianos^[4].

1.2.5. DISTRIBUCIÓN EN LAS PLANTAS.

El ácido fítico se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal. En la mayoría de las plantas, una gran proporción de fósforo (80%) está presente en forma de fitato, especialmente en aquellas semillas en las que se encuentra en concentraciones elevadas (1-7%). El contenido de fitato en los alimentos puede variar con las condiciones de cultivo, madurez, tipo, variedad y fracción del grano que se muele. Así, en las semillas de cereales, oleaginosas y leguminosas los niveles de ácido fítico son elevados y constituyen el mayor porcentaje (60-82%) del fósforo total, varias raíces y tubérculos presentan cantidades moderadas de IP6, siendo el fósforo fítico el 21-25% del total, mientras que en verduras las cantidades de IP6 encontradas son muy pequeñas^[3]. En los cereales el IP6 se encuentra asociado a las estructuras parietales del grano y generalmente se acumula en la capa de células de aleurona. El contenido de fósforo fítico en los cereales presenta valores entre 0,13-0,25% y para los subproductos de estos entre 0,42-1,10%^[13].

La tabla 2 muestra el contenido de fitato en diversos alimentos a base de cereales y legumbres^[15].

Tabla 2. Contenido de fitato en alimentos (mg/g).

Alimento	Contenido de fitato
<i>Cereales</i>	
Pan francés	0,3 - 0,4
Mezcla de harina de pan (70% trigo, 30% centeno)	0,2 - 0,7
Mezcla de harina de pan (30% trigo, 70% centeno)	0 - 0,3
Pan de centeno	0 - 0,3
Pan de trigo integral	4,3 - 6,8
Pan de centeno integral	2,5 - 4,8
Pan de trigo sin levadura	9,2 - 19,5
Pan de maíz	5,2 - 7,1
Pan de maíz sin levadura	11,4 - 16,3
Salvado de avena	12,4 - 29,6
Copos de avena	8,2 - 10,3
Papilla de avena	7,7 - 10,6
Pasta	2,2 - 8,6
Maíz	11,5 - 14,2
Hojuelas o copos de maíz	0,8 - 1,3
Arroz (pulido y cocido)	1,4 - 2,9
Arroz silvestre (cocido)	16,4 - 20,1
Sorgo	5,6 - 9,8
<i>Legumbres</i>	
Garbanzos (cocidos)	4,9 - 6,1
Frijol caupí (cocido)	5,8 - 10,3
Frijoles negros (cocidos)	8,5 - 11,3
Frijoles blancos (cocidos)	9,1 - 10,9
Frijoles rojos (cocidos)	8,9 - 11,2
Soya	9,9 - 14,2
Tofu	8,2 - 9,3
Lentejas (cocidas)	6,5 - 9,3
Guisantes verdes (cocidos)	5,7 - 7,8
Maní	16,5 - 19,1
<i>Otros</i>	
Semillas de ajonjolí (tostadas)	43,2 - 55,1
Proteína de soya aislada	4,3 - 11,7
Proteína de soya concentrada	12,4 - 21,7
Trigo sarraceno	10,3 - 14,1
Grano de amaranto	12,6 - 14,3

1.2.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN.

La elección del método de determinación del IP6, debe realizarse dependiendo del tipo de muestra con que se desea trabajar (granos de cereales, semillas de leguminosas, alimentos procesados, contenido intestinal, tejidos biológicos, etc.), la información que se desea obtener (determinación cualitativa o cuantitativa, contenido total de IP6, determinados inositoles fosfato o algunos de sus isómeros) y la disponibilidad de equipos. Es importante señalar que el espectro de absorción UV-Visible del ácido fítico no permite su identificación, por lo que la determinación de esta especie ha constituido un problema analítico durante mucho tiempo^[3-5].

Entre los métodos cualitativos de identificación del IP6 destacan la cromatografía en papel, la electroforesis y el empleo de un microscopio de luz polarizada^[16]. Los métodos cuantitativos son los más empleados y comprenden desde procedimientos clásicos de precipitación y titulación, hasta métodos fotolorimétricos, cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)^[3-5].

Hasta 1980, el IP6 era exclusivamente determinado por precipitación. El método clásico fue desarrollado por Heubner y Stadler^[17] y se fundamenta en la formación de un complejo insoluble fitato - ion férrico (Fe^{3+}) a pH ácido. El procedimiento consiste en la titulación de los extractos que contienen fitato, con disolución estandarizada de cloruro férrico, usando tiocianato de amonio como indicador interno para detectar el exceso de hierro en solución. De esta forma, el punto final de la titulación es indicado por el color rosado, correspondiente al tiocianato férrico, que persiste durante 5 minutos aproximadamente. Se asume que el IP6 es el único compuesto de fosfato que precipita bajo estas condiciones. Sin embargo, la mayor desventaja de este método radica en la dificultad de detectar un punto final

persistente en presencia del precipitado fitato-hierro de color blanco, o en presencia de sustancias reductoras provenientes de la matriz que transformen el ión férrico en ión ferroso^[18].

Como consecuencia de lo anterior, se han realizado numerosos cambios al método descrito, estableciendo dos tipos de ensayos: los directos en los cuales el fitato férrico es removido y determinado como fósforo o inositol; y los indirectos en los cuales se agrega un exceso de solución de cloruro férrico, de concentración conocida, para precipitar el fitato como fitato férrico, luego el precipitado se calcina o se hidroliza para determinar el contenido total de fósforo. También puede determinarse el IP6 por análisis del exceso de hierro asumiendo una proporción teórica de Fe:P de 4:6^[18].

Los métodos basados en la precipitación del complejo fitato-hierro, dan resultados satisfactorios para granos y semillas con un alto contenido de fitato, pero estos procedimientos son menos adecuados cuando el contenido de fitato es menor. Se han reportado casos en los cuales se sobreestima la cantidad de IP6 como resultado de la presencia en la matriz de sustancias que reducen el Fe^{3+} a Fe^{2+} , tales como el ácido ascórbico y clorogénico^[19]. Además la solubilidad del fitato férrico se incrementa con un exceso de cloruro férrico y pequeñas cantidades de fósforo inorgánico tienden a precipitar^[18, 20].

Entre los métodos que no involucran precipitación resalta el de Harland y Oberleas (1977)^[16]. Estos autores extraen el ácido fítico directamente de la muestra con una disolución de HCl al 1,2% para luego separar el fósforo inorgánico y preconcentrar el IP6 mediante el uso de una resina de intercambio iónico. La cuantificación final se realiza por análisis fotolorimétrico del IP6 como ortofosfato (PO_4^{3-}). Este procedimiento se convirtió en el método oficial de la AOAC^[21-22] a pesar de ser poco

específico para el tratamiento de alimentos procesados que contienen cantidades apreciables de compuestos desfosforilados de ácido fítico.

Tagendjaja y col. (1980)^[23] fueron los primeros en usar HPLC para la determinación de fitato, utilizando una columna de fase inversa (C18) con acetato de sodio en la fase móvil para separar el fitato. A partir de esta investigación, se han publicado numerosos trabajos de cuantificación del IP6 empleando la técnica de HPLC^[4-5, 24-32].

La principal ventaja del método cromatográfico es que permite la separación del IP6 de sus inositoles fosfatos menores. Camire y Clydesdale (1982)^[24] señalaron otras ventajas del método como la eliminación teórica de la relación Fe:P en los cálculos y la reducción de los pasos de centrifugación y lavado del precipitado necesarios en los métodos de determinación indirecta.

1.3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA.

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry) la cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes se distribuyen entre dos fases, una que permanece inmóvil (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección determinada a través de la primera^[33].

La clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basan en el tipo de fase móvil y estacionaria utilizada 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^[34].

La cromatografía líquida (LC) trata una gran variedad de combinaciones de factores como la fase móvil, fase estacionaria, detectores, etc. Como resultado, existen diversas clasificaciones de la LC. Una de las primeras, se refiere a la forma física global de la fase estacionaria, así tenemos por ejemplo: cromatografía en columna (una capa en la superficie interior de una columna) y cromatografía planar (una capa fijada sobre una placa plana o un papel)^[35].

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y de la sociedad en general^[34].

La cromatografía líquida a su vez se puede clasificar de acuerdo a la interacción que se produce entre la fase estacionaria y el soluto. Los cuatro tipos básicos de interacción se denominan: adsorción, reparto, intercambio iónico y exclusión por tamaño^[34].

Es de interés en este trabajo discutir un sobre la cromatografía de reparto con formación de pares iónicos debido a que es el método que se propone para la separación y análisis de la mezcla de inositoles en estudio.

1.3.1. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO.

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 de los sistemas líquido-líquido. Una de esas desventajas es la pérdida de la fase estacionaria por disolución en la fase móvil, lo que hace necesario un periódico recubrimiento de las partículas del soporte. Por otra parte, el problema de la solubilidad de la fase estacionaria impide el uso de rellenos de fase líquida en la elución con gradiente^[34].

En cromatografía de reparto los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 μm . La superficie de la sílice totalmente hidrolizada por calentamiento con HCl 0,1M durante uno o dos días, está constituida por grupos silanol químicamente reactivos (Figura 3)^[34].

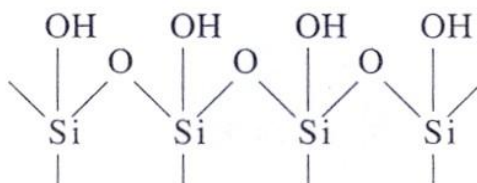


Figura 3. Superficie de la sílice hidrolizada^[34]

Los recubrimientos de fase unida químicamente más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano (Figura 4)^[34].

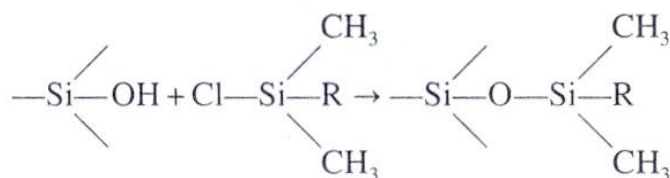


Figura 4. Reacción de formación de los siloxanos^[34]

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

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.

1.3.2. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO EN FASE NORMAL.

Inicialmente la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad, tales como: agua o el trietilenglicol soportadas sobre partículas de sílice o alúmina, y como fase móvil se empleaba un disolvente relativamente apolar como el hexano o el iso-propileter. Por razones históricas, a este método se le conoce como cromatografía en fase normal. En donde el componente menos polar se eluye primero debido a que es más soluble en la fase móvil, y un aumento de la polaridad de dicha fase aumenta el tiempo de elución^[34].

En cuanto a los rellenos comerciales de fase normal unida químicamente, el R en la estructura del siloxano (Figura 4) es un grupo funcional polar, como es el caso de los grupos ciano ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$), diol ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), amino ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$) y los dimetilaminopropil ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$). Las polaridades de estos materiales de relleno varían en un gran intervalo, siendo el tipo ciano el menos polar y el tipo amino el más polar^[34].

1.3.3. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO EN FASE INVERSA.

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, en donde el grupo R del siloxano (Figura 4) es una cadena C8 (n-octilo), o una cadena C18 (n-octadecilo) y la fase móvil es relativamente polar como: el agua, metanol, o el acetonitrilo. En contraste a la anterior, en los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero y un aumento de la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución^[34].

1.3.4. CROMATOGRAFÍA DE PAR IÓNICO.

La cromatografía de pares iónicos (o de parejas de iones) es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. En este método se pueden añadir al eluyente aniones de ácidos alquilsulfónicos; por ejemplo: ácido hexanosulfónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{H}^+$) que cubren la fase estacionaria de la fase inversa, dándole propiedades de intercambiador 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 intercambiador aniónico. Estos aniones y cationes

orgánicos se denominan contraiones porque poseen una carga opuesta a la del analito.

La naturaleza de la cromatografía de par iónico se ilustra en la figura 5. La superficie de la fase estacionaria es cubierta por moléculas de un contraión con carga negativa, esta carga es balanceada por cationes (Na^+) que pueden provenir del mismo reactivo empleado como contraión y/o de un buffer, lo que permite que el analito iónico (base protonada, BH^+) pueda ser retenido en la fase estacionaria.

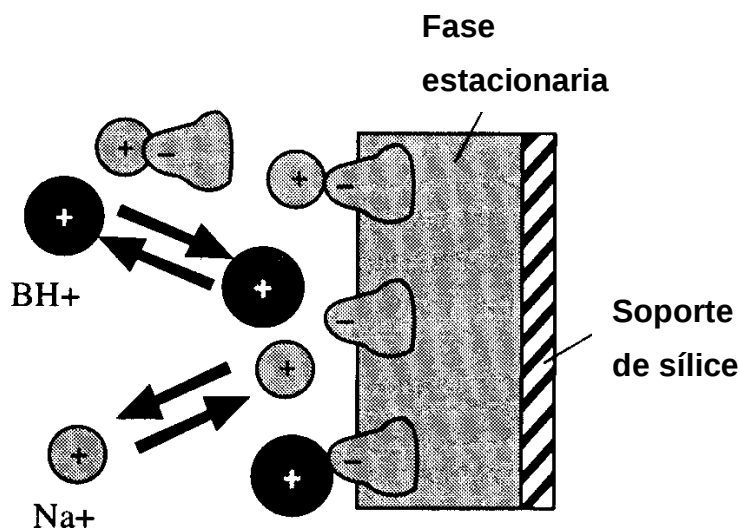


Figura 5. Retención de una base protonada durante una cromatografía de par iónico^[35]

El grado de retardo de los solutos puede ajustarse usando diferentes concentraciones del contraión en el eluyente así como cambiando el poder del eluyente de la fase móvil. Estas opciones proporcionan una flexibilidad añadida en las separaciones de analitos iónicos, permitiendo de esta manera, el análisis de compuestos iónicos de elevada polaridad y solubles en agua^[36].

Otros factores, como el pH, también juegan un papel importante en el proceso de separación de los analitos por cromatografía de pares iónicos. La figura 6 ilustra un ejemplo de esto. Una muestra de ácido carboxílico es tratada por el método de cromatografía de par iónico empleando hidróxido de tetrabutilamonio como contraión y minimizando, de esta manera, la retención de la especie neutra RCOOH . Sin embargo, la carga positiva de la fase estacionaria (como resultado de la absorción de TBA^+) causa una fuerte atracción de la especie con carga negativa RCOO^- . Al graficar la constante de retención de la muestra vs el pH de la fase móvil bajo estas condiciones de par iónico, se observa que la retención máxima de la muestra ocurre a pH alto (cuando la muestra está completamente ionizada) y la retención mínima ocurre a pH bajo (cuando no hay ionización de la muestra).

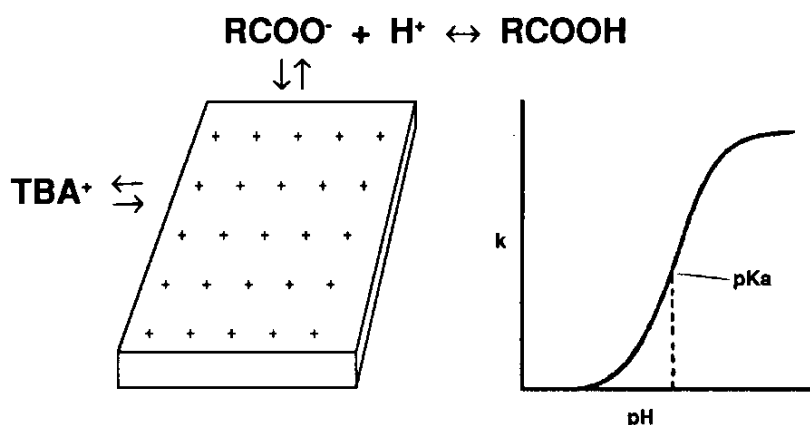


Figura 6. Retención de una muestra de ácido carboxílico en función del pH^[35]

1.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

La extracción en fase sólida (solid phase extraction SPE) es hoy en día una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizada en el caso de matrices líquidas o incluso gaseosas. Mediante la SPE, conseguimos concentrar y/o purificar los analitos mediante su retención en una fase sólida, o una fase líquida inmovilizada sobre un soporte sólido, para a continuación proceder su elución con un disolvente adecuado. Entre las múltiples ventajas que presenta la SPE destacan las siguientes:

- Alto poder de concentración.
- Obtención de extractos purificados con altas recuperaciones.
- Menor consumo de disolventes en comparación con la extracción líquido-líquido convencional.
- Ausencia de emulsiones.
- Posibilidad de automatización.

El adsorbente de extracción en SPE está contenido en tres posibles formatos: discos, cartuchos y jeringas. La selección de alguno de estos diseños puede variar de modo que se ajuste a los requerimientos, con respecto al volumen de muestra, sistemas de introducción de disolventes (jeringas) o automatización. Los discos se utilizan principalmente para concentrar grandes volúmenes de muestra, entre 2 y 4 L, permitiendo flujos de paso de líquido muy elevados debido a la escasa resistencia al paso de muestra que poseen, mientras que los cartuchos y jeringas pueden ser fácilmente integrados en sistemas en línea, con el equipo de medida, generalmente un cromatografo de líquidos. De este modo, la manipulación de la muestra es mínima, aunque los volúmenes concentrados son inferiores^[37].

El proceso de concentración de la muestra en SPE consta de las siguientes etapas básicas, descritas en la figura 7.



Figura 7. Esquema de preparación de muestra mediante SPE^[37].

1.- Acondicionamiento de la fase estacionaria: Se hace pasar a través del cartucho un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, eliminando así las impurezas, hidratando la fase estacionaria y facilitando la transferencia de materia con la muestra.

2.- Paso de la muestra a través del material absorbente: El objetivo de esta etapa es retener cuantitativamente el analito, consiguiendo además un cierto grado de selectividad.

3.- Lavado: Se utilizan disolvente con gran afinidad por las impurezas.

4.- Elución: Con un disolvente apropiado se recupera el analito de la fase adsorbente. Por lo general, se utiliza un volumen pequeño de un disolvente orgánico, aunque también se puede realizar una desorción térmica.

En la extracción en fase sólida se utilizan un gran número de fases estacionarias o adsorbentes. Estas son fabricadas de forma similar a las empleadas en la cromatografía de líquidos, con partículas de una sustancia porosa. Algunos materiales naturales (como sílice porosa o alúmina), tienen propiedades específicas que permiten el proceso de adsorción. Otros materiales son sintéticos y son fabricados a partir de una base, sobre la cual, se unen químicamente ciertos fragmentos orgánicos específicos (fase unida químicamente). Los materiales base más comunes son la sílice porosa y los polímeros orgánicos, tales como el poliestirenodivinilbenceno o acrilatos. Un número significativo de adsorbentes tienen un esqueleto de sílice porosa, el cual es derivatizado con reactivos específicos, para obtener una fase unida químicamente con las propiedades deseadas. La sílice utilizada para este propósito, es típicamente un material amorfo, con un área de superficie comprendida entre 50 y 500 m²/g^[38].

El presente trabajo se enfoca en el uso de fases con grupos aminos (aminopropil), ampliamente usadas para el tratamiento de muestras de ácido fítico. Este adsorbente polar puede interactuar a través de enlaces de hidrógeno y por sus propiedades de intercambiador aniónico. En vista de que el pKa del adsorbente -NH₂ es alrededor de 9,8 a cualquier pH por debajo de este valor, la mayoría de los centros activos se encuentran cargados positivamente por lo cual el ácido fítico se retendrá en el adsorbente con una interacción similar a la que presenta con las proteínas (véase Fig. 2).

1.5. ANTECEDENTES EN LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO POR HPLC-RI.

Sandberg, Carlsson y Svanberg (1989)^[25], desarrollaron un método para la separación y determinación cuantitativa de inositoles tri, tetra, penta y hexafosfatos en cereales. Realizaron la extracción de los inositoles con HCl 0,5 M y emplearon cartuchos de intercambio aniónico para aislar los fitatos del extracto crudo. Para la separación utilizaron una columna de fase inversa C18 y una fase móvil con 0,05 M de ácido fórmico: metanol 49:51 y 0,6% TBA-OH para la formación de pares iónicos, ajustando el pH a 4,3 con H₂SO_{4(c)}. Sus resultados indican que a pH más bajos la separación de los inositoles fosfatos resultaba inadecuada por la falta de resolución entre el inositol trifosfato y el solvente, pero también se producía una mayor separación entre los inositoles penta y hexafosfato. Por otro lado, a pH más alto la resolución entre penta y hexafosfato era inadecuada.

Lehrfeld (1994)^[26] desarrolló un método de cuantificación de ácido fítico empleando la técnica de HPLC en la modalidad de par iónico. Se propuso el uso de columnas en fase inversa de base poliméricas PRP-1 de material PEEK (Polyether ether ketone) para evitar las pérdidas de ácido fítico por la adsorción del mismo en las columnas de acero y se empleó una mezcla metanol-ácido fórmico-TBA-OH en agua a pH 4,3 como fase móvil. En este trabajo se logró la resolución satisfactoria de la mezcla de inositoles de tri a hexafosfatos y se redujo el tiempo de análisis de las muestras, razón por la cual fue ampliamente aceptado.

En trabajos más recientes se han reportado bajos porcentajes de recuperación de ácido fítico en muestras de cereales infantiles por el método HPLC-RI^[5, 27-29]. Este problema se justifica en este tipo de alimentos debido a que se encuentran enriquecidos con minerales que pueden causar interferencias en los pasos de extracción y preconcentración del ácido fítico. Una prueba de esto es demostrado

por **Park y col. (2006)**^[28] que también reportan bajos porcentajes de recuperación del ácido fítico en cereales infantiles cuando se realiza la determinación por cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama (FID), siendo el tratamiento de muestra similar al utilizado en HPLC-RI. Otros autores demuestran que al emplear el método oficial de la AOAC^[21-22] modificado por **Harland y Oberleas (1986)**^[21] se consiguen altos porcentajes de recuperación de IP6 (cerca de 100%) en cereales infantiles, en contraste con los bajos porcentajes de recuperación obtenidos con los métodos cromatográficos (GC-FID y HPLC-RI), observándose la principal diferencia entre ambos métodos en el paso de extracción, ya que en el procedimiento de la AOAC se utiliza HCl 2,4 M y se agrega Na₂EDTA-NaOH en el extracto de muestra antes de ser tratada con una columna tipo AG1-X4 para la preconcentración de los fitatos, a diferencia del método de HPLC-RI en el cual se trabaja con condiciones más suaves de extracción (HCl 0,5 M).

Brooks y Lampi (2001)^[29] compararon los métodos HPLC por par iónico (detección RI) e intercambio iónico (detección UV) para la determinación de ácido fítico en cereales infantiles. Determinaron que el método de intercambio iónico presenta una alta recuperación de IP6 en comparación al de par iónico. Las diferencias más importantes entre ambos fueron: el uso de diferentes ácidos para la extracción del ácido fítico (tricloroacético para intercambio iónico y clorhídrico en el de par iónico) y el uso de un paso adicional de preconcentración de los fitatos en una resina de intercambio aniónico (SAX) y posterior eliminación del ácido clorhídrico para el método de par iónico.

En el estudio realizado por estos autores^[29], se concluye que no existen pérdidas de ácido fítico en el paso de extracción y eliminación del ácido clorhídrico, pero si se presentan problemas en el paso de preconcentración con la resina de intercambio iónico. Se sugiere que la posible causa de esta baja recuperación es la fuerte afinidad que existe entre el ácido fítico y los metales, produciendo así su

precipitación si hay una alta concentración de los mismos, por lo que evaluaron varios procedimientos para evitar la interferencia de los metales como el uso de 40 mM de EDTA y 5 mM de ácido ascórbico, la adición de 8-hidroxiquinolina, o el uso de resina Dowex 50W-X4 para la remoción de los metales. Ninguno de los procedimientos evaluados por estos autores permitió mejorar significativamente los porcentajes de recuperación del ácido fítico en cereales infantiles por el método HPLC-RI.

Asimismo, **Salas D. (2010)**^[4] en un estudio del efecto de los metales en la recuperación del ácido fítico en muestras sintéticas, realizando la cuantificación del analito por la técnica UV-Visible, determinó que la presencia de hierro y calcio en la matriz de la muestra tiende a disminuir en gran medida los porcentajes de recuperación del IP6. Adicionalmente, demostró que el uso de ácido tricloroacético, en lugar de clorhídrico, atenúa el efecto producido por los metales y mejora notoriamente los porcentajes de recuperación (aumentando de 38 a 71%).

Saad y col. (2011)^[30] realizaron un estudio sobre la variación de la concentración de ácido fítico, modificando parámetros de extracción de la muestra como la concentración de ácido, el pH y el tiempo de extracción con diversos tipos de ácidos (tricloroacético, clorhídrico y sulfúrico), en muestras de arroz. Estos autores concluyen que las condiciones óptimas para la extracción del analito se obtienen con altas concentraciones de ácido y tiempos relativamente cortos de extracción. Sus resultados muestran un aumento señal del pico cromatográfico del IP6 al realizar la extracción con H₂SO₄ al 5%, durante 30 min con un pH de solución de 0,6.

Por su parte, **Canan y col. (2011)**^[31] también evalúan la etapa de extracción del ácido fítico en muestras de arroz y como esta se ve afectada por parámetros como: cantidad de muestra, concentración de ácido, temperatura y tiempo de extracción.

Nuevamente en este trabajo, la concentración más elevada de IP6 en el extracto se obtuvo como resultado de realizar la extracción con HCl 1 M durante 1 hora a temperatura ambiente, en contraste con los resultados obtenidos a concentraciones más bajas de ácido y tiempos más largos de extracción. Señalan también que las temperaturas elevadas de extracción generan una fuerte disminución en la concentración del ácido fítico.

2. OBJETIVOS.

2.1. GENERAL

Estudiar el efecto del tipo de ácido, concentración y tiempo de extracción en la recuperación de ácido fólico en presencia de metales por el método HPLC-RI.

2.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar las condiciones óptimas de separación de los inositoles del tri al hexa fosfato en el sistema HPLC-RI.
- ✓ Estudiar y determinar los porcentajes de recuperación del ácido fólico para diferentes concentraciones de ácido tricloroacético y tiempo de extracción en presencia o no de metales.
- ✓ Estudiar y determinar los porcentajes de recuperación del ácido fólico para diferentes concentraciones de ácido clorhídrico y tiempo de extracción en presencia o no de metales.
- ✓ Establecer y proponer las mejores condiciones de trabajo para el estudio de ácido fólico (en presencia de metales) por el método HPLC-RI.

3. PARTE EXPERIMENTAL.

ESTUDIO DEL EFECTO DEL TIPO DE ACIDO, CONCENTRACION Y TIEMPO DE EXTRACCION EN LA RECUPERACION DE ÁCIDO FÍTICO EN PRESENCIA DE METALES POR EL METODO HPLC-RI

3.1. INSTRUMENTACIÓN Y ACCESORIOS.

➤ **Instrumentación**

El sistema HPLC a utilizar se muestra en la figura 8 y 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 μL .
- 3.-** Columna de fase inversa tipo PRP-1 de la casa Hamilton, de 5 μm 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 resistente a la presión, poliéter éter cetona (PEEK) para evitar la posibilidad de absorción del analito.

- 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 32×10 RIU (baja sensibilidad) a $1/64 \times 10$ 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 de marca comercial “EZCHROM”.

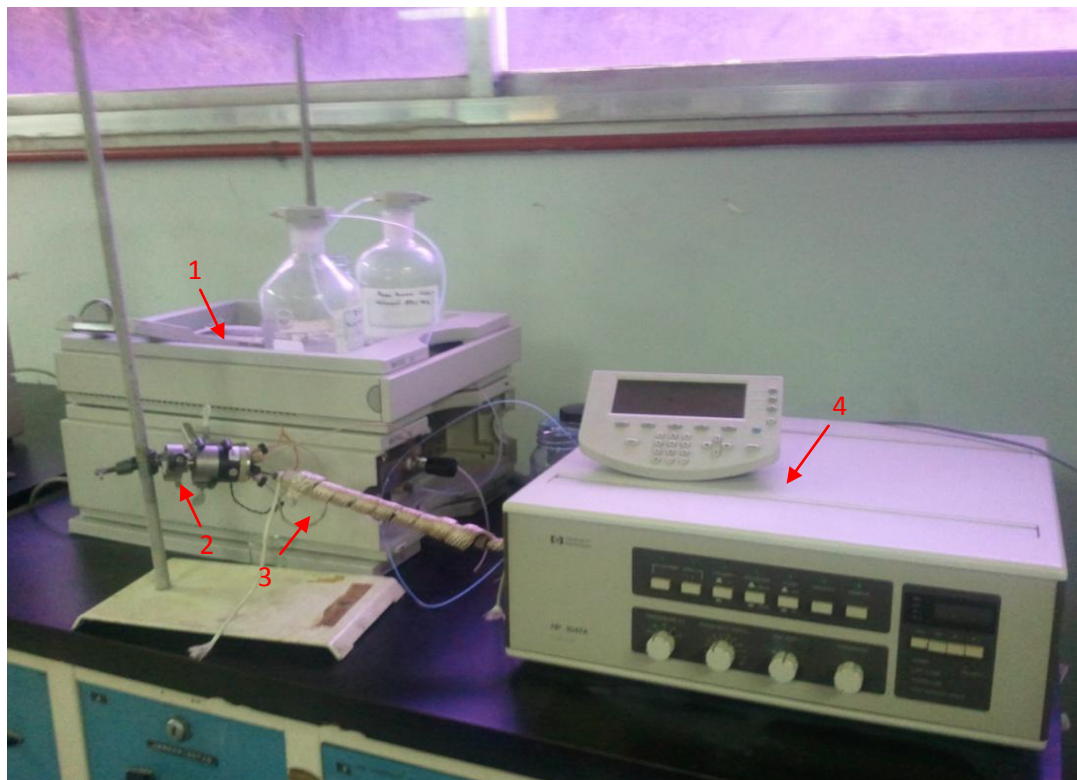


Figura 8. Sistema HPLC empleado para las medidas experimentales.

➤ **Accesorios**

- 1.- Rotaevaporador marca Buchi, modelo R-110, para la eliminación de disolventes ácidos, acoplado a un criostato marca Haake tipo FK-2, para refrigerar el condensador y una bomba de vacío, para ayudar a la evaporación de los disolventes.
- 2.- Ultrasonido marca Cole Palmer, modelo 8890-E MT (20KHz 1000W) para la desgasificación de la fase móvil usada en el sistema cromatográfico.
- 3.- Mezclador Vortex marca Barnstead Thermolyne, modelo M16700.
- 4.- pHmetro marca Hanna Instruments, modelo HI8424.

3.2. REACTIVOS.

1. Sal dipotásica de IP6 hidratada al 95 % de pureza de Sigma-Aldrich.
2. Metanol grado HPLC al 99,9% de Sigma-Aldrich.
3. Hidróxido de tetraetilamonio al 20% marca Merck.
4. Ácido fórmico al 85% de Riedel-De Haën.
5. Agua desionizada de 18 MΩ-cm de resistividad tratada con un sistema marca “Barnstead”, modelo Thermolyne N° 04741.
6. Ácido clorhídrico al 37 % de Riedel-De Haën.
7. Acido tricloroacético al 99,5% de Merck.
8. Amonio y hierro (II) sulfato-6-hidrato (sal de Mohr) al 99% de Riedel-De Haën.
9. Carbonato de calcio entre 98,5-100,5% de Riedel-De Haën.

3.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

3.3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS SINTÉTICAS DE ÁCIDO FÍTICO.

Se prepararon un total de 150 muestras sintéticas que contenían entre 120 y 240 ppm de ácido fítico en medio acuoso y se variaron en ellas las concentraciones de ácido clorhídrico, ácido tricloroacético y el agregado o no de 160 ppm de Ca y 8 ppm de Fe como se muestra en la figura 9.

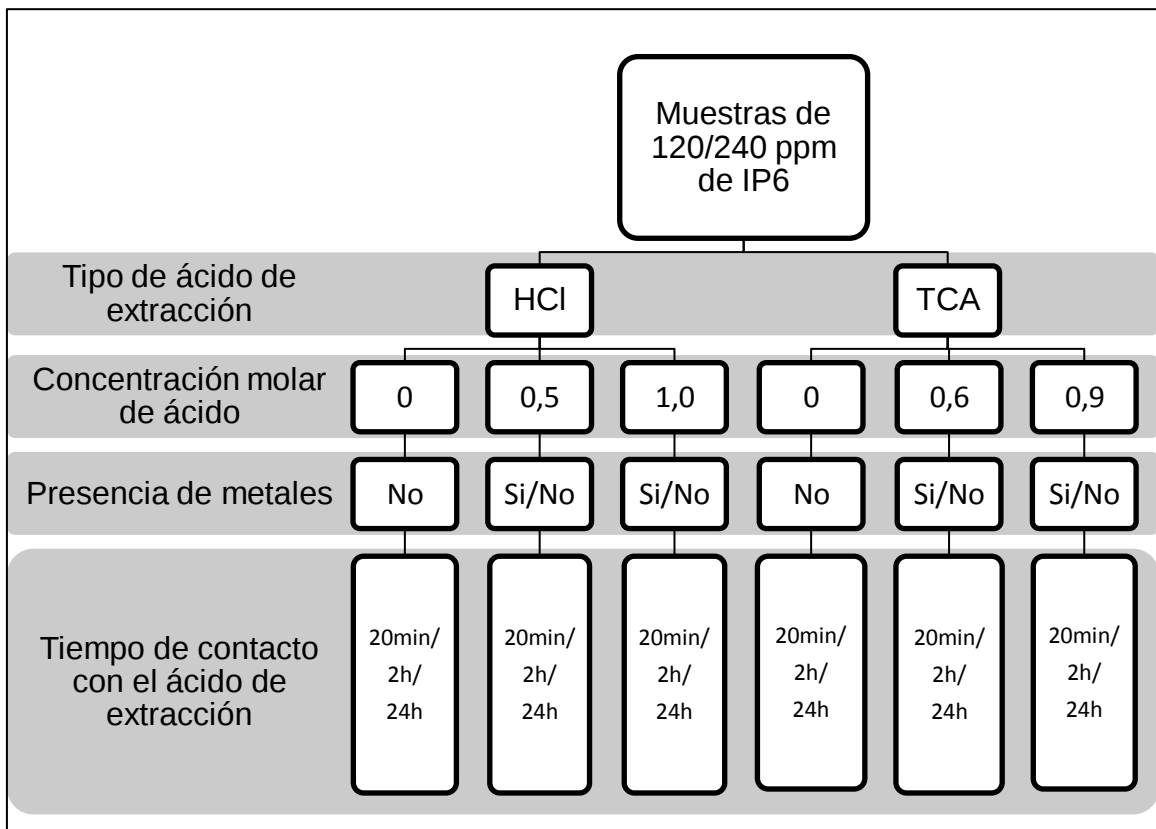


Figura 9. Esquema de las condiciones evaluadas.

3.3.2. TRATAMIENTO EN EL CARTUCHO DE INTERCAMBIO ANIÓNICO.

Cada una de las muestras fueron pasadas a través de cartuchos amino Sep-Pak® NH₂ marca Waters y se lavaron los mismos con una disolución de HCl 0,05 M. Posteriormente, el ácido fítico retenido en la resina fue eluido 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 0,5M; HCl 2,0M; HCl 0,5M y agua desnionizada. Acoplado al cartucho se ubicaron filtros de jeringa marca Millipore con membranas de nylon (diámetro de 25mm y tamaño de poro de 0,45 µm) para evitar así el paso de partículas indeseadas que pudieran ser arrastradas a través del sistema.

3.3.3. ELIMINACIÓN DEL DISOLVENTE

Las muestras fueron llevadas a sequedad en un rotaevaporador con la finalidad de eliminar la matriz ácida de las mismas y finalmente, el residuo fue redisuelto en 2 mL de fase móvil con la ayuda de un mezclador (vortex) para asegurar la homogeneidad de la solución resultante.

Un esquema general del procedimiento seguido para el tratamiento de muestras se presenta en la figura 10.

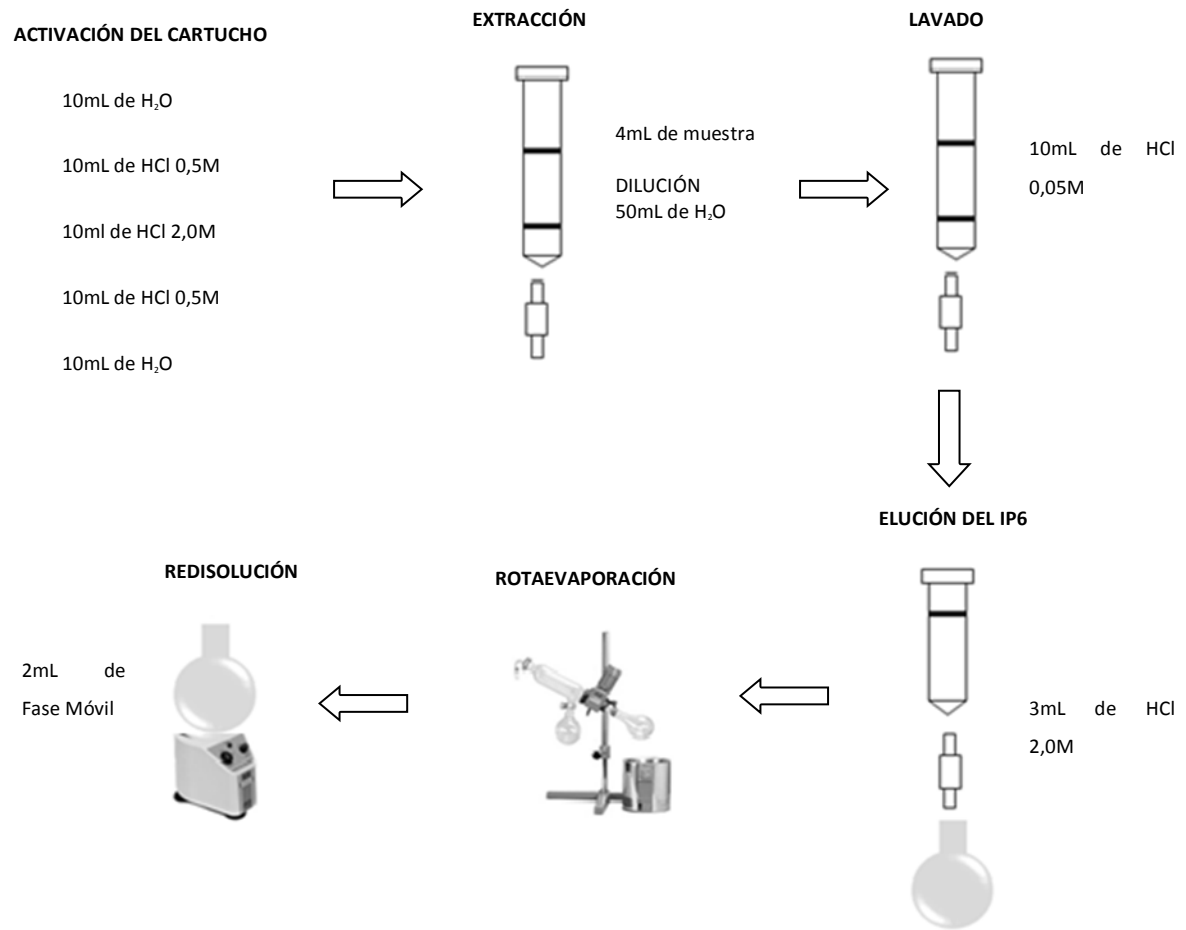


Figura 10. Procedimiento realizado para el tratamiento de las muestras.

En vista de que el procedimiento realizado parte con 4 mL de muestra y finalmente es llevado a un volumen de 2 mL, la concentración final es doble de la inicial, es decir, con este tratamiento inicialmente se tienen muestras de 120 ppm de IP6, las cuales son extraídas, rotaevaporadas y redisueltas en un volumen menor para concentrarlas a un valor de 240 ppm.

En contraste, al trabajar con las muestras preparadas a 240 ppm de IP6 sólo se tomaron 2 mL de las mismas para su tratamiento y su posterior redisolución en la

misma cantidad de volumen, por lo cual la concentración de estas muestras se mantuvo en todo momento.

3.4. ANÁLISIS POR HPLC-RI.

Los parámetros cromatográficos requeridos para la determinación del ácido fólico y algunos de sus posibles inositóles de menor grupo fosfato por HPLC-RI fueron establecidos con la ayuda del trabajo de Caripá D. (2008)^[5] y algunas experiencias previas.

Las muestras fueron inyectadas por triplicado al cromatografo siendo previamente pasadas por un filtro de nylon para jeringa (diámetro de 25 mm y tamaño de poro de 0,45 μm), marca Millipore.

3.4.1. FASE MÓVIL

La fase móvil empleada consistió en una solución al 5% de metanol y 0,28% de hidróxido de tetraetilamonio (agente formador del par iónico) en agua desionizada, con un ajuste del pH a 4 empleando para ello ácido fórmico al 85%. La mezcla una vez preparada fue filtrada por succión a través de un filtro de celulosa con un poro de 0,45 μm y desgasificada en ultrasonido a 20 KHz durante 20 min. El flujo de fase móvil fue establecido en 1,0 mL/min.

3.4.2. PATRONES DE ÁCIDO FÍTICO.

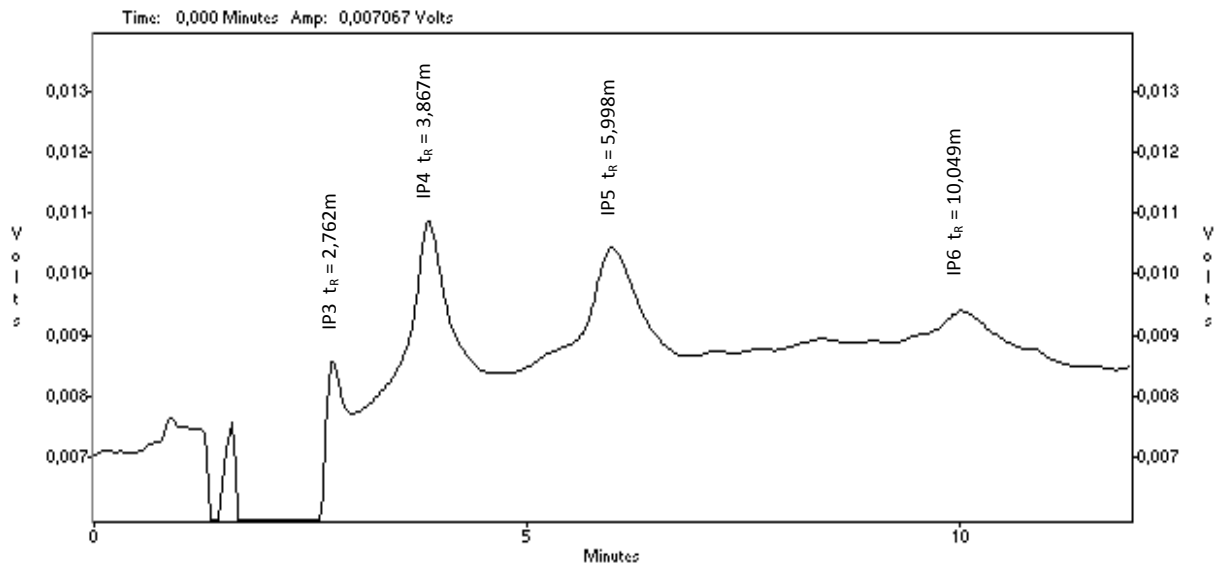
Se preparó una solución madre de 1930 ± 3 ppm de IP6, pesando exactamente $0,2032 \pm 0,0003$ g de la sal al 95% de ácido fítico y disolviéndolos en 100 mL de agua desionizada. A partir de esta disolución se tomaron alícuotas de 2, 4, 6 y 8 mL y se enrasaron cada una en balones de 50mL para obtener respectivamente, patrones de 80, 160, 240 y 320 ppm de concentración de IP6.

Mediante estos patrones se construyeron las curvas de calibración necesarias para la cuantificación del IP6 en las muestras analizadas. En estas curvas se gráfico el área de pico cromatográfico vs concentración del patrón con la finalidad de obtener la concentración exacta de IP6 en las muestras por medio de una regresión lineal y seguidamente el porcentaje de recuperación. Debido a las variaciones en la sensibilidad de la técnica, el equipo se calibró siempre antes de iniciar un análisis para asegurar que los resultados obtenidos y la cuantificación del analito fuesen correctos.

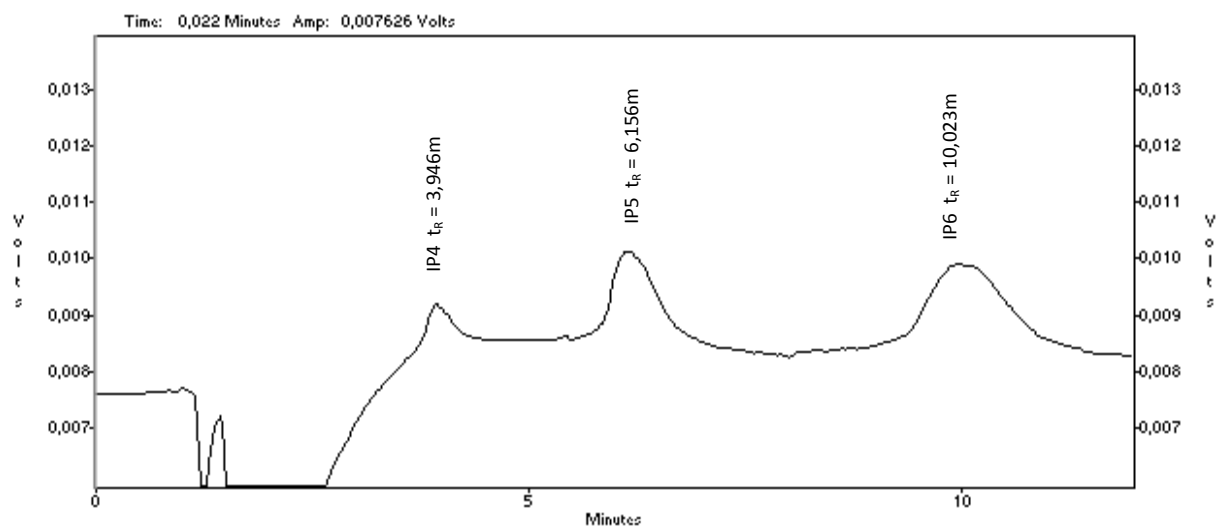
3.5. HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO FÍTICO.

Con el propósito de conocer los tiempos de retención del IP6 y los inositoles fosfatos menores en el sistema cromatográfico, se procedió a inyectar una mezcla de estas especies obtenida a partir de la hidrólisis de la sal dipotásica de ácido fítico. La experiencia en cuestión se efectuó de la siguiente manera: Se tomaron 25 mL de una disolución de 2000 ppm de IP6 y se colocó en reflujo a una temperatura aproximada de 95 °C durante 8 horas, en un primer ensayo, y durante 2 horas en un experimento posterior. Las soluciones resultantes se enrasaron a un volumen de 100 mL y fueron inyectadas en el sistema HPLC bajo las condiciones cromatográficas

citadas anteriormente. Los cromatogramas correspondientes a estas experiencias (cromatogramas 1 y 2) se muestran a continuación:



Cromatograma 1. Hidrólisis de ácido fólico durante 8 horas



Cromatograma 2. Hidrólisis de ácido fólico durante 2 horas

En estos cromatogramas se puede notar claramente como el tiempo de calentamiento afecta la cantidad de IP6 hidrolizado, generando así una disminución en la concentración de esta especie. En el cromatograma correspondiente a una hidrólisis de 2 horas (Cromatograma 2) se observan los insotoles IP6, IP5 e IP4, mientras que en la hidrólisis de 8 horas (Cromatograma 4) se produce una degradación mayor del ácido fítico e incluso puede verse el pico correspondiente al IP3.

Para establecer los tiempos de hidrólisis del ácido fítico en los ensayos realizados anteriormente se tomó como base la figura 11 ^[32] que representa la relación de áreas de los inositoles fosfatos presentes contra el tiempo de hidrólisis del IP6 (en horas). Puede notarse que a un tiempo de aproximadamente 2 horas las especies predominantes son IP6, IP5, IP4 y una mezcla de fosfatos constituidos por la degradación total de ácido fítico, mientras que a 8 horas se encuentran presentes tanto el IP6 como todos los inositoles fosfatos menores.

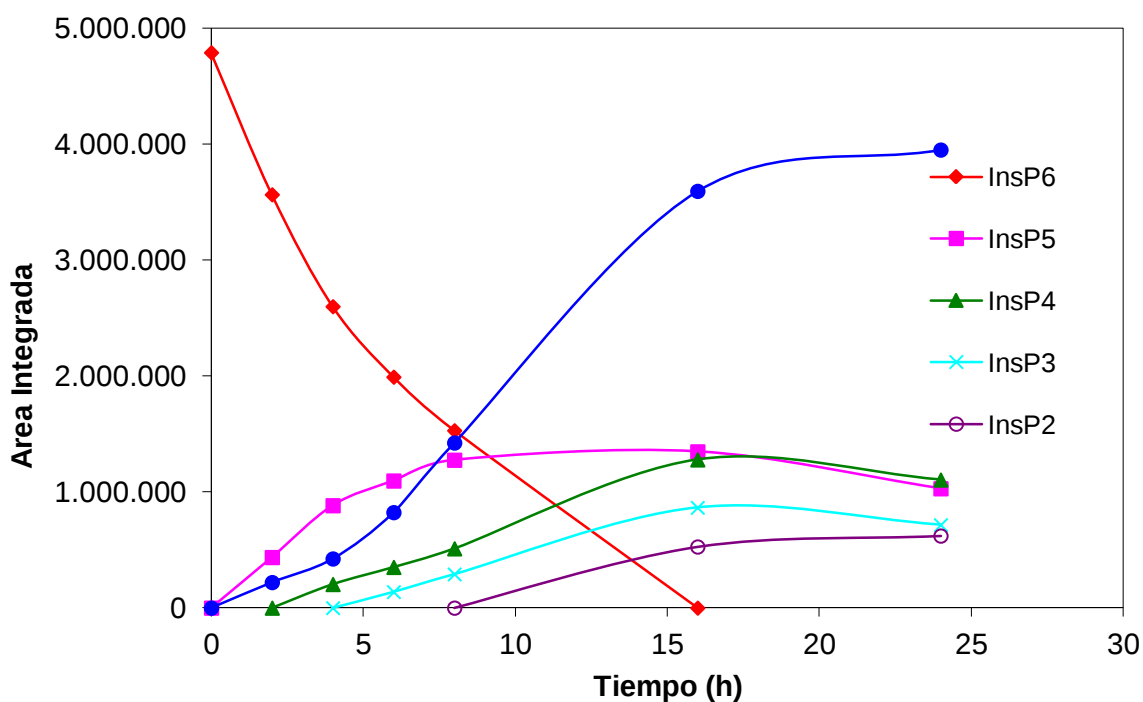


Figura 11. Seguimiento de la hidrólisis del ácido fítico en el tiempo^[32].

Cabe destacar que los datos necesarios para la realización de este gráfico fueron determinados en un sistema acoplado HPLC-ICP-OES, por lo cual se pudieron detectar especies como el IP2 o incluso mezclas de IP y fosfatos inorgánicos, a diferencia del sistema HPLC-RI empleado en este trabajo, en donde sólo se puede detectar los inositoles del tri al hexafosfato por interferencia de la señal de la fase móvil.

En la tabla 3 se muestra un resumen de los t_R aproximados para los inositoles fosfatos del IP3 al IP6.

Tabla 3. Tiempos de retención aproximados de los diferentes inositoles fosfatos observados en el sistema HPLC-RI

	IP3	IP4	IP5	IP6
t_R (min)	2,8	3,9	6,0	10,0

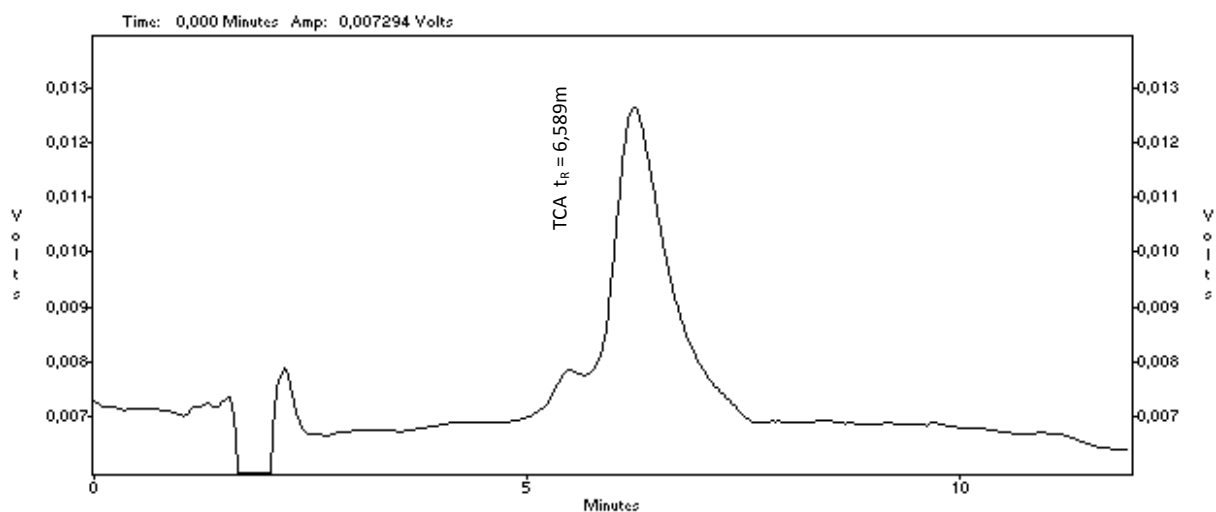
La determinación de los tiempos de retención de los diferentes inositoles fosfatos en el sistema cromatográfico evaluado es de gran importancia para la identificación correcta de los distintos picos que se pueden observar en cada uno de los cromatogramas obtenidos durante el análisis de las diferentes muestras. Sin embargo, la reproducibilidad de estos tiempos no estuvo garantizada durante nuestro trabajo, debido a que se encontraba dañado, en el equipo, el sistema de arranque automático de corrida con la inyección de muestra.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

4.1. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

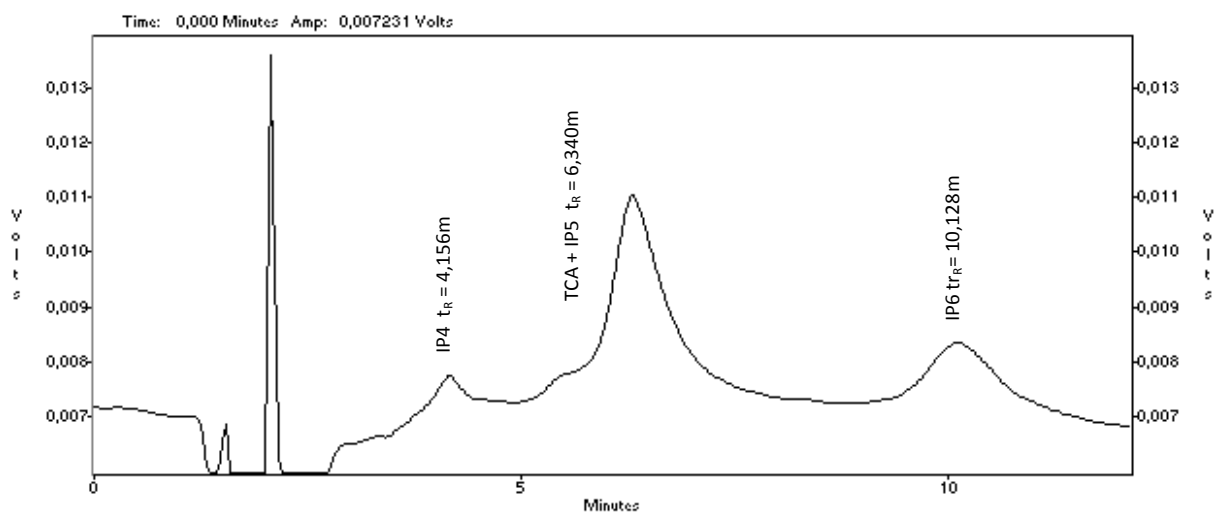
Durante el análisis de las muestras extraídas con ácido tricloroacético, se observó en los cromatogramas un pico adicional en comparación a los obtenidos para las muestras con HCl, el tiempo de retención observado para dicho pico era similar al que se presentaba para el IP5, sin embargo, su área no era reproducible entre muestras, originando algunas veces señales tan altas que no corresponderían con una posible descomposición del IP6 a IP5 por acción del ácido tricloroacético, hecho que conlleva a pensar que esta señal pudiera ser propia del TCA. Por esta razón se procedió a preparar un patrón que tuviera únicamente el TCA al 0,9 M y se le realizó a este patrón el mismo tratamiento de las muestras analizadas anteriormente.

En el cromatograma 3 se puede comprobar que el ácido tricloroacético produce en el sistema cromatográfico una señal que se encuentra a los 6 min y que debido a su tamaño podría superponerse con otros picos de interés como el IP5.

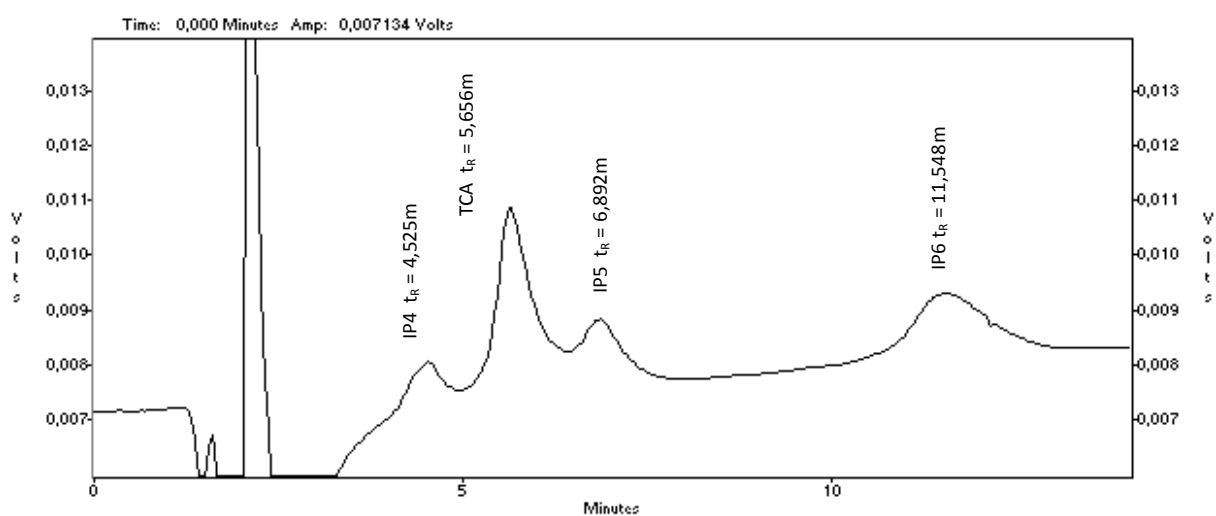


Cromatograma 3. Patrón de ácido tricloroacético 0,9 M

Para corregir esta interferencia se realizó un cambio en el pH de la fase móvil con la finalidad de variar ligeramente los tiempos de retención de los diferentes inositoles fosfatos, tal como se indica en el trabajo de Sandberg y col (1989)^[25]. Para ello se disminuyó la cantidad de ácido fórmico empleada en la fase móvil para obtener un pH = 5, lo cual permitió aumentar los tiempos de retención de los distintos inositoles fosfatos y lograr una resolución exitosa de estos con respecto al TCA. Los siguientes cromatogramas corresponden a mezclas de inositoles del IP4 al IP6 (hidrólisis 2 horas) contaminadas con el patrón de TCA e inyectados en el sistema antes y después de cambiar el pH de la fase móvil.



Cromatograma 4. Mezcla de IP4, IP5, IP6 y TCA inyectados a pH = 4.



Cromatograma 5. Mezcla de IP4, IP5, IP6 y TCA inyectados a pH = 5.

De acuerdo con la problemática inicialmente estudiada (baja recuperación del método HPLC-RI para cereales infantiles) se mantienen las condiciones de pH 4 en la fase móvil para los análisis cuando se utiliza HCl que es el punto inicial de nuestra evaluación y se modifica el pH a 5 cuando se trabaja con el TCA.

4.2. RECUPERACIÓN DEL ÁCIDO FÍTICO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, TIEMPO Y TIPO DE ÁCIDO USADO PARA LA EXTRACCIÓN.

En esta sección se muestra como se ve afectada la recuperación del ácido fítico con el uso de los ácidos clorhídrico y tricloroacético, la presencia o no de metales y el tiempo empleado para realizar la extracción del analito. En primer lugar, se trabajó con una serie de muestras sintéticas de 240 ppm de IP6 y se determinó que bajo estas condiciones de concentración, el método no conduce a grandes diferencias en la recuperación del IP6 al modificar de cada una de las variables estudiadas. Por esta razón, se procedió a realizar un análisis con muestras de 120 ppm de ácido fítico, con las cuales sí se observaron cambios significativos al variar cada una de las condiciones experimentales a examinar, lo que permitió realizar una mejor evaluación de sistema en estudio.

En la Figura 12 se muestra un esquema general de las muestras preparadas y la nomenclatura utilizada para las mismas.

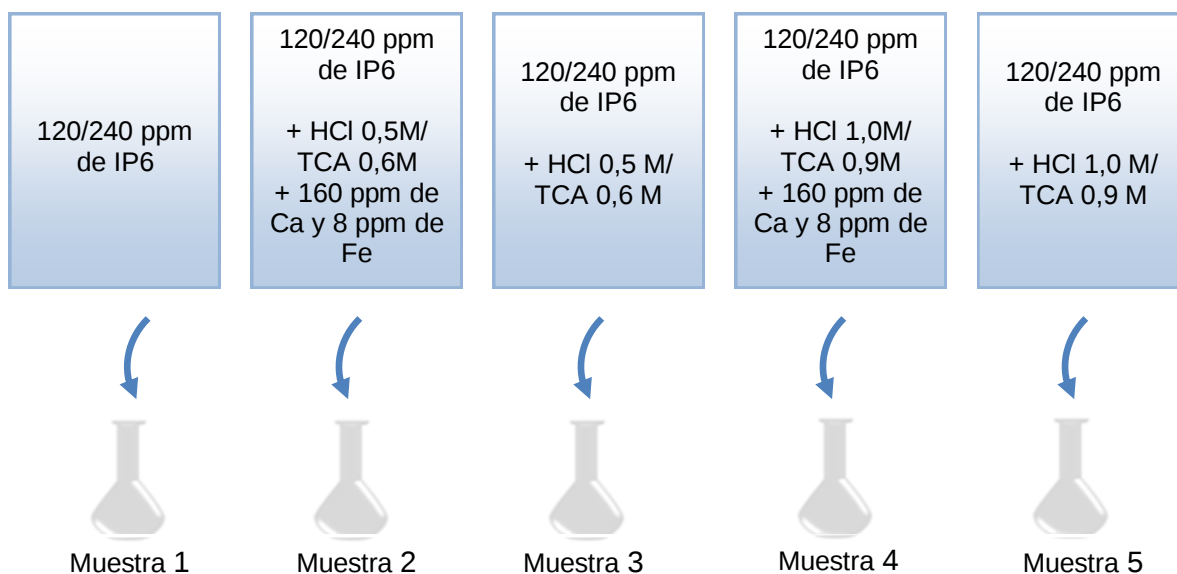


Figura 12. Esquema de las muestras preparadas.

En la tabla 4 se presentan los resultados de porcentaje de recuperación de IP6 obtenidos cuando la concentración del mismo es de 240 ppm para diferentes tipos de ácido, concentraciones y tiempos de extracción. Estas muestras no fueron replicadas.

Tabla 4. Porcentaje de recuperación de IP6 en muestras de 240 ppm.

Muestra N°	Muestras extraídas con HCl			Muestras extraídas con TCA		
	20 minutos	2 horas	24 horas	20 minutos	2 horas	24 horas
1	90	91	94	99	94	95
2	73	73	77	90	88	70
3	91	95	98	99	97	101
4	80	78	66	86	85	74
5	97	99	92	98	97	95

Las tablas 5 y 6 muestran los resultados de porcentaje de recuperación de IP6 obtenidos, cuando la concentración del mismo es de 120 ppm, para diferentes tipos de ácido, concentraciones y tiempos de extracción. Estas muestras fueron replicadas 4 veces.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación de IP6 en muestras de 120 ppm extraídas con HCl

Muestra N°	Replica N° 1			Replica N° 2		
	20 minutos	2 horas	24 horas	20 minutos	2 horas	24 horas
1	83	92	104	83	100	92
2	45	53	43	48	58	60
3	90	85	94	91	95	95
4	53	58	47	50	54	48
5	93	90	92	86	85	88
Muestra N°	Replica N° 3*			Replica N° 4**		
	20 minutos	2 horas	24 horas	20 minutos	2 horas	24 horas
1	111	60	66	82	94	82
2	54	44	38	54	59	60
3	70	62	68	93	97	103
4	52	45	49	60	65	54
5	83	100	68	90	91	92

* La réplica N° 3 fue descartada.

**La réplica N° 4 se realizó con cartuchos Sep-Pak® NH₂ nuevos, en reemplazo a los usados en las otras réplicas.

Tabla 6. Porcentaje de recuperación de IP6 en muestras de 120 ppm extraídas con TCA.

	Replica N° 1			Replica N° 2		
Muestra N°	20 minutos	2 horas	24 horas	20 minutos	2 horas	24 horas
1	94	81	79	100	88	77
2	35	39	58	46	34	50
3	86	81	88	75	81	76
4	43	44	65	44	44	63
5	82	77	81	76	81	69
	Replica N° 3			Replica N° 4*		
Muestra N°	20 minutos	2 horas	24 horas	20 minutos	2 horas	24 horas
1	67	43	70	84	82	79
2	29	31	38	39	36	46
3	68	45	60	76	81	83
4	40	44	39	45	49	59
5	62	34	46	70	72	69

*La réplica N° 3 fue descartada.

**La réplica N° 4 se realizó con cartuchos Sep-Pak® NH₂ nuevos, en reemplazo a los usados en las otras réplicas.

De estas experiencias se puede indicar que para la réplica N° 3 se observó una gran desviación de los resultados, tanto para la muestra que se considera como referencia (Muestras N° 1) como para las que tienen metales y ácido, por lo que se decidió realizar un cambio de los cartuchos Sep-Pak® NH₂ utilizados hasta el momento y se efectuó una 4ta réplica, obteniendo mejores resultados y demostrando el daño de los cartuchos en la experiencia anterior. Debido a esto la réplica N° 3 fue descartada y se procedió a realizar los cálculos de promedio y desviación estándar para todas las muestras en todas las condiciones analizadas.

Las tablas 7 y 8 muestran los resultados promedio y desviaciones estándar obtenidas para los diferentes ácidos evaluados y condiciones experimentales.

Tabla 7. Promedio de los resultados de % IP6 en muestras de 120 ppm tratadas con HCl

Muestra N°	20 minutos	2 horas	24 horas
1	83 ± 1	95 ± 4	93 ± 9
2	49 ± 4	57 ± 3	54 ± 9
3	91 ± 2	92 ± 6	97 ± 5
4	54 ± 5	59 ± 5	50 ± 4
5	90 ± 4	89 ± 3	91 ± 2

Tabla 8. Promedio de los resultados de % IP6 en muestras de 120 ppm tratadas con TCA

Muestra N°	20 minutos	2 horas	24 horas
1	93 ± 8	84 ± 4	78 ± 1
2	40 ± 5	36 ± 2	51 ± 6
3	79 ± 6	81 ± 1	82 ± 6
4	44 ± 1	46 ± 3	62 ± 3
5	76 ± 6	77 ± 4	73 ± 6

A continuación se realiza una la evaluación de los posibles efectos de cada variable sobre el porcentaje de recuperación del IP6 mediante un estudio del tipo univariado, en donde el efecto de cada variable se evalúa moviendo una a la vez mientras las demás se mantienen fijas Este tipo de estudio tiende a ser largo y requiere un mayor número de experimentos sin embargo, cuando no se tiene una idea general de cómo influye cada variable sobre el sistema evaluado, el estudio univariado permite ver con mejor claridad en que condición las variables pueden tener un mayor efecto, dado que no se centra en una zona particular del estudio sino que toma en cuenta todo el sistema en evaluación.

4.2.1. EFECTO DE LOS METALES SOBRE LA RECUPERACIÓN DEL IP6.

Entre los parámetros estudiados en el presente trabajo está la adición de metales en la matriz de las muestras, esto debido a que se ha reportado la posible formación de complejos con estos metales y una consecuente precipitación del analito ^[4,5, 27-32].

Es de indicar que para lograr evaluar los efectos de cada condición en cada estudio estadístico se trato de fijar variables comunes de tal forma de examinar exclusivamente un efecto en particular. Por ejemplo, en este caso en donde se quiere estudiar el efecto de los metales se agrupan los resultados de las experiencias primero por concentración de ácido y después por tiempo de extracción de tal forma de mantener estas dos variables sin cambio en cada grupo de estudio y observar exclusivamente el efecto de los metales.

De esta forma, en las tablas 9 y 10 se presentan los resultados correspondientes a la comparación estadística de los porcentajes de recuperación del ácido fítico para muestras con y sin metales con pruebas F y t.

Tabla 9. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de los metales sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con HCl. $P(0,05)$ $F_{teórico} = 39$

Concentración de ácido	Tiempo	Presencia de metales	% IP6	s	s ²	F _{exp}	t _{exp}	t _{teórico}
0,5 M	20 min	No	91	2	4	4,00	16,27	2,78
		Sí	49	4	16			
	2 h	No	92	6	36	4,00	9,04	
		Sí	57	3	9			
	24 h	No	97	5	25	3,24	7,23	
		Sí	54	9	81			
1,0 M	20 min	No	90	4	16	1,56	9,74	2,78
		Sí	54	5	25			
	2 h	No	89	3	9	2,78	8,91	
		Sí	59	5	25			
	24 h	No	91	2	4	4,00	15,88	
		Sí	50	4	16			

Tabla 10. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de los metales sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con TCA. $P(0,05)$ $F_{teórico} = 39$

Concentración de ácido	Tiempo	Presencia de metales	% IP6	s	s ²	F _{exp}	t _{exp}	t _{teórico}
0,6 M	20 min	No	79	6	36	1,44	8,65	2,78
		Sí	40	5	25			
	2 h	No	81	1	1	4,00	34,86	
		Sí	36	2	4			
	24 h	No	82	6	36	1,00	6,33	
		Sí	51	6	36			
0,9 M	20 min	No	76	6	36	36,00	9,11	2,78
		Sí	44	1	1			
	2 h	No	77	4	16	1,78	10,74	
		Sí	46	3	9			
	24 h	No	73	6	16	1,78	3,81	
		Sí	62	3	9			

En todas las experiencias los valores de F_{exp} obtenidos fueron menores a $F_{teórico}$ 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, indiferentemente del tipo de ácido se obtuvo siempre $t_{exp} > t_{teórico}$, lo que indica que es significativo el efecto producido por los metales en la etapa de extracción.

Resulta evidente que la presencia de estos metales representa un serio problema en la recuperación del ácido fítico, sobre todo al tratar con muestras de cereales infantiles que se encuentran enriquecidos con una gran cantidad de minerales.

Cabe destacar que una vez que el ácido fítico y los metales son mezclados, la formación de quelatos entre ellos ocurre en un lapso de tiempo pequeño, dado que las pérdidas del analito por precipitación se observan incluso al realizar la extracción de las muestras a los 20 minutos de preparadas.

4.2.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SOBRE LA RECUPERACIÓN DEL IP6.

La tabla 11 presenta los resultados de la comparación estadística entre las dos concentraciones de ácido clorhídrico evaluadas experimentalmente como medio de extracción del ácido fítico y de manera análoga, en la tabla 12 se muestran los valores obtenidos con el ácido tricloroacético.

Tabla 11. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de la concentración de ácido sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con HCl. $P(0,05) F_{\text{teórico}} = 39$

Tiempo	Presencia de metales	Conc. de HCl (M)	% IP6	s	s ²	F _{exp}	t _{exp}	t _{teórico}
20 min	No	0,5	91	2	4	4,00	0,39	2,78
		1,0	90	4	16			
	Sí	0,5	49	4	16	1,56	1,35	
		1,0	54	5	25			
2 h	No	0,5	92	6	36	2,25	1,76	
		1,0	81	9	81			
	Sí	0,5	57	3	9	2,78	0,59	
		1,0	59	5	25			
24 h	No	0,5	97	5	25	6,25	1,93	
		1,0	91	2	4			
	Sí	0,5	54	9	36	2,25	0,96	
		1,0	50	4	16			

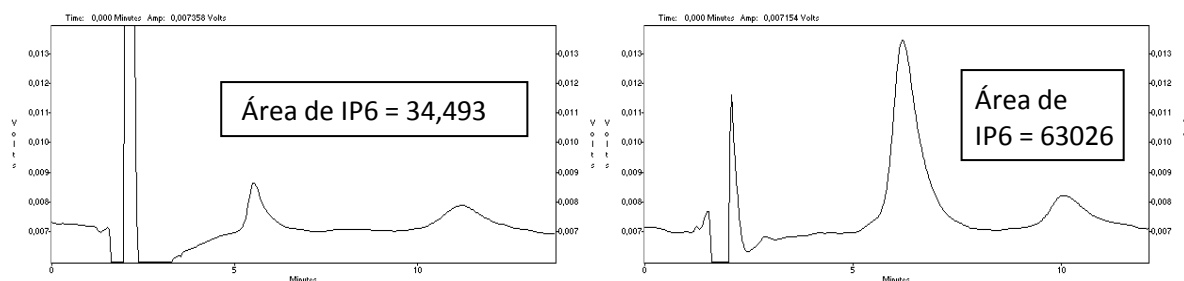
Tabla 12. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto de la concentración de ácido sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con TCA. $P(0,05) F_{\text{teórico}} = 39$

Tiempo	Presencia de metales	Conc. de TCA (M)	%IP6	s	s ^s	F _{exp}	t _{exp}	t _{teórico}
20 min	No	0,6	79	6	36	1,00	0,61	2,78
		0,9	76	6	36			
	Sí	0,6	40	5	25	25,00	1,36	
		0,9	44	1	1			
2 h	No	0,6	81	1	1	16,00	1,68	
		0,9	77	4	16			
	Sí	0,6	36	2	4	2,25	4,80	
		0,9	46	3	9			
24 h	No	0,6	82	6	36	1,00	1,84	
		0,9	73	6	36			
	Sí	0,6	51	6	36	9,00	3,01	
		0,9	62	3	4			

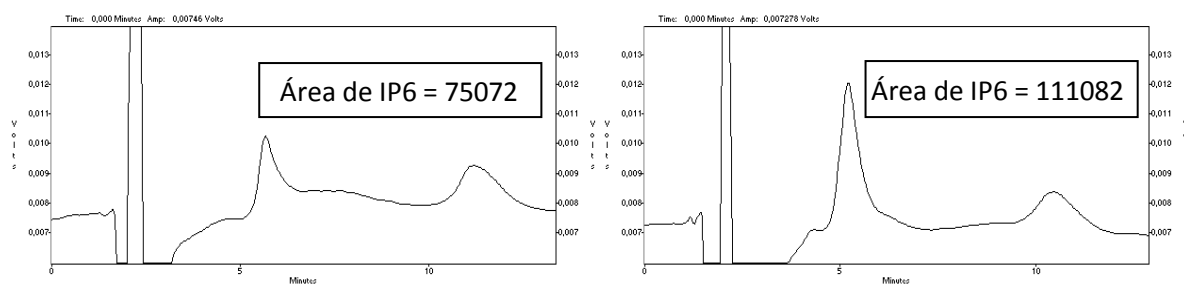
En la tabla 11 los resultados indican que para los cambios en la concentración de HCl, en todos los casos $t_{\text{exp}} < t_{\text{teórico}}$, es decir, que no se encuentran diferencias significativas con el aumento de la concentración de este ácido entre 0,5 y 1,0 M, por lo que la variabilidad en los valores de recuperación de IP6 es debida a errores aleatorios.

En el caso de la tabla 12, al estudiar el uso de ácido tricloroacético entre 0,6 y 0,9 M se encuentra que sólo existen diferencias significativas ($P=0,05$) cuando se realiza la extracción en presencia de metales durante largos tiempos de extracción (2 y 24 horas), siendo en ambos casos la condición de mayor concentración de TCA (0,9 M) la que conlleva a una mejor recuperación de IP6. Este hecho puede atribuirse a la redisolución del complejo fitato-mineral al permanecer tanto tiempo en contacto con este ácido, lo cual disminuye las pérdidas del IP6 por precipitación en la fase de extracción y tiende a aumentar la recuperación de esta especie.

Los cromatogramas 6, 7, 8 y 9 ilustran las diferencias que se observan en la tabla 12



Cromatogramas 6 y 7. Muestras de IP6 y metales extraídas luego de 2 horas con TCA 0,6 y 0,9 M respectivamente.



Cromatogramas 8 y 9. Muestras de IP6 y metales extraídas luego de 24 horas con TCA 0,6 y 0,9 M respectivamente.

4.2.3. EFECTO DE TIPO DE ÁCIDO SOBRE LA RECUPERACIÓN DE IP6.

La tabla 13 muestra la comparación estadística entre los resultados obtenidos al realizar la posible extracción del ácido fítico con ácido clorhídrico o con ácido tricloroacético.

Tabla 13. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto del tipo de ácido de extracción sobre la recuperación de IP6. $P(0,05) F_{\text{teórico}} = 39$

Muestra	Tiempo	Ácido	% de IP6	s	s ²	F _{exp}	t _{exp}	t _{teórico}
2	20 min	HCl	49	4	16	1,56	2,43	2,78
		TCA	40	5	25			
	2 h	HCl	57	3	9	2,78	10,09	
		TCA	36	2	4			
	24 h	HCl	54	9	81	2,25	0,48	
		TCA	51	6	36			
3	20 min	HCl	91	2	4	9,00	3,29	2,78
		TCA	79	6	36			
	2 h	HCl	92	6	36	36,00	3,13	
		TCA	81	1	1			
	24 h	HCl	97	5	25	1,44	3,33	
		TCA	82	6	36			
4	20 min	HCl	54	5	25	25,00	3,40	2,78
		TCA	44	1	1			
	2 h	HCl	59	5	25	2,78	3,86	
		TCA	46	3	9			
	24 h	HCl	50	4	16	1,78	4,16	
		TCA	62	3	9			
5	20 min	HCl	90	4	16	2,25	3,36	2,78
		TCA	76	6	36			
	2 h	HCl	89	3	9	1,78	4,16	
		TCA	77	4	16			
	24 h	HCl	91	2	4	9,00	4,93	
		TCA	73	6	36			

Los resultados presentados en la tabla 13 resaltan las grandes diferencias entre el uso de un ácido u otro para la extracción del IP6, ya que en sólo dos experiencias, los valores fueron estadísticamente iguales (muestra N° 2 extraída a 20 min y a 24 h).

En primer lugar, al realizar la extracción de la muestra N° 2 luego de 2 horas de preparada, se hace importante el efecto de hidrólisis que genera el TCA sobre el ácido fítico, a tal punto que ocurre una disminución importante en la recuperación de esta especie en comparación al resultado que se obtiene al hacer el mismo tratamiento con HCl (el porcentaje de recuperación disminuye de 57 a 36%), esto aunado a la precipitación del ácido fítico, como consecuencia de la presencia de metales en esta muestra, conlleva a una baja señal del IP6 en el sistema HPLC-RI y a diferencias significativas ($P = 0,05$) entre el uso del ácido clorhídrico o el tricloroacético en esta experiencia. Este hecho sin embargo, no ocurre al realizar la toma de la muestra N° 2 luego de 24 horas, ya que en este caso, tiene lugar la redisolución del complejo fitato-mineral y por ende mejora la recuperación del IP6, de manera tal que ambos ácidos conducen a resultados estadísticamente iguales, aún estando presente el efecto adicional de hidrólisis del IP6 por parte del TCA.

En segundo lugar, el ácido clorhídrico demostró ser significativamente mejor que el tricloroacético para la extracción del IP6, tanto para las muestras que tienen metales como para las que no los tienen, lo cual está relacionado a la degradación que produce este último sobre el analito al tratarse de un ácido más fuerte. Sólo en una experiencia (Muestra N° 4), a altas concentraciones de ácido y metales y tiempos de extracción largos el TCA generó una mayor recuperación del ácido fítico en comparación con el HCl, lo que nos lleva a inferir que se trata precisamente de la mejor condición para el uso de TCA en presencia de metales.

4.2.4. EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN SOBRE LA RECUPERACIÓN DEL IP6.

Las tablas 14 y 15 muestran el análisis estadístico de los resultados obtenidos al realizar la posible extracción del ácido fítico a varios tiempos, con HCl como y TCA respectivamente.

Tabla 14. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto tiempo de extracción sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con HCl. $P(0,05) F_{\text{teórico}} = 39$

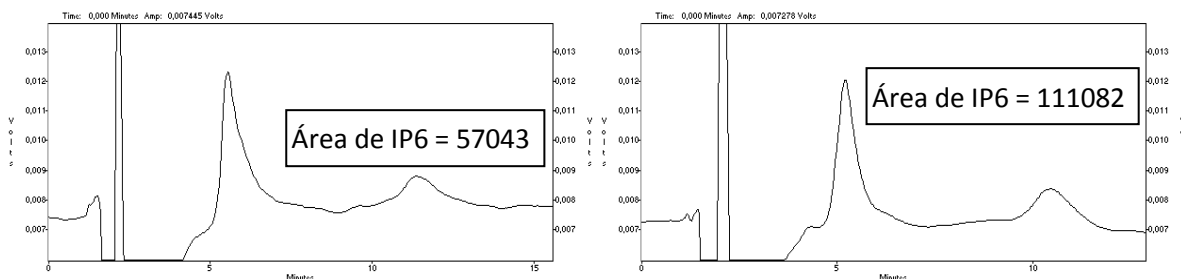
Muestra	Tiempo	%IP6	s	s ²	F _{exp}	t _{exp}	t _{teórico}
2	20 min	49	4	16	1,78	2,77	2,78
	2 h	57	3	9			
	20 min	49	4	16	5,06	0,88	
	24 h	54	9	81			
3	20 min	91	2	4	9,00	0,27	2,78
	2 h	92	6	36			
	20 min	91	2	4	6,25	1,93	
	24 h	97	5	25			
4	20 min	54	5	25	1,00	1,22	2,78
	2 h	59	5	25			
	20 min	54	5	25	1,56	1,08	
	24 h	50	4	16			
5	20 min	90	4	16	1,78	0,35	2,78
	2h	89	3	9			
	20 min	90	9	81	20,25	0,19	
	24 h	91	2	4			

Tabla 15. Estudio estadístico con pruebas F y t del efecto del tiempo de extracción sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con TCA. $P(0,05) F_{\text{teórico}} = 39$

Muestra	Tiempo	%IP6	s	s ²	F _{exp}	t _{exp}	t _{teórico}
2	20 min	40	5	25	6,25	1,29	2,78
	2 h	36	2	4			
	20 min	40	5	25	1,44	2,44	
	24 h	51	6	36			
3	20 min	79	6	36	36,00	0,57	2,78
	2 h	81	1	1			
	20 min	79	6	36	1,00	0,61	
	24 h	82	6	36			
4	20 min	44	1	1	9,00	1,10	2,78
	2 h	46	3	9			
	20 min	44	1	1	9,00	12,05	
	24 h	62	3	9			
5	20 min	76	6	36	2,25	0,24	2,78
	2h	77	4	16			
	20 min	76	6	36	1,00	0,61	
	24 h	73	6	36			

Para el HCl, en todas las muestras $t_{\text{exp}} < t_{\text{teórico}}$, lo cual señala que no existen diferencias significativas ($P = 0,05$) al variar el tiempo de contacto entre el ácido y el analito. Para el TCA, también los resultados muestran que la recuperación del IP6 no se ve afectada por el tiempo de extracción, con la excepción encontrada en la muestra N° 4, en la cual, como se explicó anteriormente, existe la particularidad de un incremento importante en la recuperación al realizar posible la extracción del ácido fítico luego de 24 horas.

Los cromatogramas 10 y 11 muestran las diferencias entre las áreas de los picos correspondientes al IP6 al realizar su extracción en 20 minutos y en 24 horas.



Cromatogramas 10 y 11. Muestras de IP6 y metales extraídas con TCA 0,9 M luego de 20 minutos y 24 horas respectivamente.

De los resultados obtenidos en estas experiencias se puede decir que con el uso de altas concentraciones de TCA durante tiempos prolongados se logra una recuperación del 62% en comparación con la condición común de trabajo del HCl (0,5 M y 2 horas de extracción) que permite una recuperación del 57%, lo cual indica poco cambio entre el uso de un ácido u otro a bajas concentraciones de IP6.

4.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE ÁCIDO FÍTICO SOBRE LA RECUPERACIÓN DE IP6.

Para la evaluación estadística de este parámetro se tomaron como referencia las muestras preparadas con una concentración inicial de 240 ppm de IP6 en el cálculo del estadístico t, ya que estas muestras no fueron replicadas y por ende no podía establecerse una media de valores con dicha condición de concentración.

La tabla 16 refleja los resultados comparativos de los porcentajes de recuperación de IP6 en las experiencias realizadas con muestras de 120 y 240 ppm tratadas con HCl.

Tabla 16. Estudio estadístico con prueba t del efecto de la concentración inicial de ácido fítico sobre la recuperación de IP6 para muestras tratadas con HCl. P(0,05)

Muestra	Tiempo	Conc. inicial de IP6 (ppm)	%IP6	s	t _{exp}	t _{teórico}
2	20 min	120	49	4	20,78	4,30
		240	73	-		
	2 h	120	57	3	16,00	
		240	73	-		
	24 h	120	54	9	13,28	
		240	77	-		
3	20 min	120	91	2	0,00	4,30
		240	91	-		
	2 h	120	92	6	2,12	
		240	95	-		
	24 h	120	97	5	0,77	
		240	98	-		
4	20 min	120	54	5	20,14	4,30
		240	80	-		
	2 h	120	59	5	14,72	
		240	78	-		
	24 h	120	50	4	13,86	
		240	66	-		
5	20 min	120	90	4	6,06	4,30
		240	97	-		
	2 h	120	89	3	10,00	
		240	99	-		
	24 h	120	91	2	1,22	
		240	92	-		

En este caso, se observan claras diferencias en los porcentajes de recuperación en todas las muestras que contienen metales, por lo cual se debe destacar la importancia de la relación fitato/mineral. Un aumento en la proporción de ácido fítico tiende a mejorar la eficacia del procedimiento en la etapa de extracción dado que disminuye la estabilidad de los quelatos formados entre el IP6 y los metales presentes.

Del mismo modo, la tabla 17 muestra el análisis estadístico de los resultados de la extracción de IP6 en muestras de 120 y 240 ppm tratadas con TCA.

Tabla 17. Evaluación estadística con prueba t del efecto de la concentración inicial de ácido fítico sobre la recuperación de IP6 para muestras extraídas con TCA. P(0,05)

Muestra	Tiempo	Conc. inicial de IP6 (ppm)	%IP6	s	t _{exp}	t _{teórico}
2	20 min	120	40	5	38,73	4,30
		240	90	-		
	2 h	120	36	2	63,69	
		240	88	-		
	24 h	120	51	6	13,43	
		240	70	-		
3	20 min	120	79	6	14,14	4,30
		240	99	-		
	2 h	120	81	1	27,71	
		240	97	-		
	24 h	120	82	6	13,44	
		240	101	-		
4	20 min	120	44	1	72,75	4,30
		240	86	-		
	2 h	120	46	3	39,00	
		240	85	-		
	24 h	120	62	3	12,00	
		240	74	-		
5	20 min	120	76	6	15,56	4,30
		240	98	-		
	2 h	120	77	4	17,32	
		240	97	-		
	24 h	120	73	6	15,56	
		240	95	-		

Indudablemente, en muestras extraídas con TCA, la concentración inicial de ácido fítico es una variable a considerar ya que los porcentajes de recuperación de IP6 mejoran notablemente cuando las muestras tienen mayores cantidades de fitato.

Adicionalmente, considerando los resultados obtenidos en las muestras N° 3 y 5 (muestras sin metales) se puede inferir que la cantidad inicial de ácido fítico también atenúa el efecto de hidrólisis producido por el TCA y conduce a una mejora de alrededor del 20 % en los porcentajes de recuperación de IP6 en estas muestras.

Realizando la misma comparación del punto anterior, se tiene que en presencia de metales y empleando TCA 0,9 M, la mejor recuperación de IP6 se obtiene a tiempos cortos (86%), mientras que con HCl 0,5 M y 2 horas de tratamiento de la muestra con este ácido, la recuperación es del 73%.

En magnitud, todas las respuestas obtenidas con TCA son mayores que con HCl sin embargo, al no tener replicas de estas muestras no se pudo realizar un estudio estadístico para determinar si estas diferencias son significativas.

.

5. CONCLUSIONES.

- Se logró una separación apropiada de los picos correspondientes a los inositoles del tri al hexa fosfato en el sistema HPLC-RI empleando una fase móvil compuesta por una mezcla de agua, 5% metanol y 0,28% hidróxido de tetraetilamonio a pH = 4,3 sin embargo, al usar ácido tricloroacético como medio de extracción del IP6, se modificó el pH hasta un valor de 5 para evitar solapamientos con la señal correspondiente a este ácido.
- La presencia de metales en la matriz de las muestras causan interferencias importantes en la etapa de extracción del ácido fítico, produciendo su precipitación y disminuyendo de manera importante la recuperación final del IP6 a pesar de esto, el efecto de los metales es menor mientras mayor es la concentración de ácido fítico.
- La selección del ácido parece mostrar mejoras, en muestras que contienen metales, cuando su concentración es alta y se emplea durante tiempos de extracción prolongados.
- En muestras con bajo contenido de fitato y presencia de metales, el uso ácido clorhídrico o tricloroacético resultó ser indiferente, dado que ninguno de los dos mejora los porcentajes de recuperación los cuales son menores al 60%.

6. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda emplear la técnica de análisis por adición de estándar para el estudio de muestras de ácido fítico que contengan una elevada concentración de metales para, de esta manera, mejorar los porcentajes de recuperación de IP6 en el método de análisis por aumento de la relación fitato/mineral.
- Realizar un estudio de la recuperación de IP6 en muestras de cereales infantiles de diversas marcas comerciales, para evaluar así otros efectos pertinentes debidos a la matriz general de la muestra.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Mitjavila S. Sustancias naturales nocivas en los alimentos. In R. Derache, Toxicología y seguridad de los alimentos. Barcelona, España: Omega; 1990.
2. Aletor V., Adeogun O. Nutrient and antinutrient components of some tropical leafy vegetables. Food Chemistry. 1995; Vol. 53. (4): 375-9.
3. Martínez D., Ibáñez G. Victoria M., Rincón L. Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. Archivos latinoamericanos de nutrición. Universidad de Córdoba- Córdoba, España: 2002; Vol. 52. (3).
4. Salas, D. Estudio del efecto de los metales en la etapa de extracción en fase sólida del ácido fítico, empleando muestras sintéticas que simulen cereales infantiles. T.E.G. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2010.
5. Caripá, D. Determinación de minerales y ácido fítico por HPLC-RI en cereales infantiles. T.E.G Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 2008.
6. Fricker J., Dartois A., Du Fraysseix M. Guía de la alimentación del niño. Akal; 2004: 282-6.
7. Febles C., Arias A., Hardisson A., Rodriguez-Alvarez C., Sierra A. Phytic acid levels in infant flours. Food Chemistry. 2001; Vol. 74: 437-41.
8. Favier, A. Nutritional and clinical factors affecting the bioavailability of trace elements in humans. In U. Schelemmer (Ed.), Proceedings of the international conference bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability; 1993: 202-12.

9. FAO (Food and Agriculture Organization). Improving nutrition through home gardening. Nutrition programmes. Proximate composition of foods, ISBN 92-5-104388-4. Roma, Italia; 2001.
10. Villanova-Ruiz G., Hernández B. Tratado de Nutrición. Tomo II, capítulo 2-6. ISBN 84-88336-12-X. Grupo Acción Médica. Madrid, España; 2005.
11. Hurrell F., Juillerat, A., Reddy B., Lynch R., Dassenko A., Cook D. Soy protein, phytate and iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992; (56): 573-8.
12. Wang J. Improvement of citric-acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. *Bioresource Technol.* 1998; (65): 243-5.
13. Godoy S., Chicco C. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. 2005; (8).
14. Thompson LU. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res.* 1993; (26): 131-49.
15. Konietzny U., Greiner R. Phytic Acid: Nutritional Impact. *Encyclopedia of food sciences*. Second Edition. 2003: 4555-63.
16. Harland B., Oberleas D. Analytical methods for phytate In: Graf E.(ed.) *Phytic Acid: Chemistry and applications*. Minneapolis: Pilatus press; 1977: 77-100.
17. Heubner W., Stadler H. *Biochemische Zeitschrift, Zur Chemischen Physiologie and Pathologie*. 1994: 422-37.
18. Reddy R., Pierson M., Sathe S., Salunkhe, K. *Phytates in cereals and legumes*. E.U.A.: CRC Press, Inc.; 1989.
19. Samouts, B., Schwimmer, S. Effect of maturity & storage on distribution of phosphorus among starch & other components of potato tuber. *American Society of Plant Biologists*. 1992: 519-22.
20. Graf E., Dintzis F. High performance liquid chromatographic method for the determination of phytate. *An. Biochem.* 1982: 119, 413-17.

21. Harland B., Oberleas D. Anion exchange methods for determination of phytates in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1986: 667-70.
22. AOAC. Official Methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International. Vol. 1-2. W. Horwitz. AOAC International. Washington, D.C. 1990.
23. Tagendjaja B., Buckle A. Woolton M. Analysis of phytic acid by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography.* 1980: 274-7.
24. Camire L., Clydesdale M. Analysis of phytic acid in foods by HPLC. *Journal of Food Science.* 1982; (47): 575-8.
25. Sandberg A., Carlsson N., Svanberg U. Effects of inositol tri - penta y hexafosfates on in vitro estimation of iron availability. *Journal of Food Science.* 1989; (54): 559-61.
26. Lehrfeld, J. HPLC Separation and quantization of phytic acid of some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1994; (12): 2726-31.
27. Amaro R., Caripa D., Escalona A. & Murillo M. Evaluation of phytic acid recovery and Ca, Fe and Zn content in infant cereals: problems associated with HPLC-RI method. Abstracts of 34th International Symposium of High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2009: 369.
28. Park H., Ahn H., Kim S., Lee C., Byun M., Lee G. *Journal of Food Control.* 2006; (17): 727-32.
29. Brooks S. & Lampi B. Problems associated with measuring phytate in infant cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2001; (49): 564-9.
30. Saad N., Esa N., Ithnin H. Shafie N. Optimization of optimum condition for phytic acid extraction from rice bran. *African Journal of Plant Science.* 2011; Vol. 5 (3): 168-76.

31. Canan C., Lisboa F., Delaroza F., Casagrande R., Mendes C., Shimokomaki M. Ida E. Studies on the extraction and purification of phytic acid from rice bran. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011; (24): 1057-63.
32. Amaro, R. Estudio del acoplamiento de la cromatografía de alta eficiencia y la espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado con nebulización hidráulica de alta presión. Tesis Doctoral. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Mayo de 2000. Pag 141.
33. Sierra Alonso Isabel. Análisis Instrumental. Netbiblio (Ed.) ISBN 8497453778. 2010: 140-4.
34. Skoog D., Holler F., Nieman T. Principios de Análisis Instrumental. Madrid; Mc Graw Hill 5ª ed. 2001; 26-28: 730-814.
35. Snyder L., Kirkland J., Glajch J. Practical HPLC Method Development. New York. John Wiley & Sons, Inc. 2nd ed. 1997: 317-320.
36. Robinson K., Robinson J. Análisis Instrumental. Madrid; Prentice Hall. 2001; 14: 636-51.
37. Harris C., Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. Reverté 6ª ed. 2007; 28: 699-703.
38. Moldoveanu S. C., David V. Sample preparation in chromatography. *Journal of Chromatography Library*. Elsevier. Vol. 65.

8. APÉNDICE.

- Cálculo de concentración de patrones para curva de calibración:

➤ Masa pesada de sal dipotásica de IP6: $0,2032 \pm 0,0003$ g

Concentración de la solución madre:

$$[IP6] = 0,2032g \text{ sal} \times \frac{95g \text{ IP6}}{100g \text{ sal}} \times \frac{1}{100ml} \times \frac{10^6 ppm}{g/ml} = 1903,4ppm$$

Concentración de patrones:

$$\text{Patrón N° 1: } [IP6] = 1903,4ppm \times \frac{2ml}{50ml} = 77,2ppm$$

$$\text{Patrón N° 2: } [IP6] = 1903,4ppm \times \frac{4ml}{50ml} = 154,4ppm$$

$$\text{Patrón N° 3: } [IP6] = 1903,4ppm \times \frac{6ml}{50ml} = 231,6ppm$$

$$\text{Patrón N° 4: } [IP6] = 1903,4ppm \times \frac{8ml}{50ml} = 308,9ppm$$

- Ejemplo de cálculo de porcentaje de recuperación de una muestra de 120 ppm de IP6 y metales extraída con HCl 0,5 M (1ra réplica de la muestra N° 2)

➤ Áreas de picos cromatográficos:

$$A_1 = 20675$$

$$A_2 = 19856$$

$$A_3 = 29955$$

$$A_4 = 21692$$

$$A_5 = 27886$$

$$A_{\text{promedio}} = 24012,8$$

➤ Ecuación de la curva de calibración:

$$y = 703,85x - 51726$$

$$\Rightarrow [IP6] = \frac{A_{\text{promedio}} + 51726}{703,85} = 107,61$$

$$\Rightarrow \% \text{ recuperación de IP6} = \frac{107,61}{240,00} \times 100\% = 44,84\%$$

- Ejemplo de cálculo de estadísticos F y t para muestras con y sin metales extraídas luego de 20 min con HCl 0,5 M (Contraste de dos medias experimentales)
- $M_1 = (91 \pm 2) \%$; $M_2 = (49 \pm 4) \%$; $P = 0,05$
 - $F_{\text{teórico}} = 39$, H_0 = No hay diferencias significativas entre las desviaciones de ambas muestras.
 - $t_{\text{teórico}} = 2,78$, H_0 = No hay diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de ambas muestras.

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_2^2}{s_1^2} = \frac{16}{4} = 4 < F_{\text{teórico}} \Rightarrow \text{Se acepta } H_0$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$\text{donde } s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}} = \sqrt{\frac{2 \times 4 + 2 \times 16}{4}} = 3,16$$

$$\Rightarrow t_{\text{exp}} = \frac{(91 - 49)}{3,16 \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = 16,27 > t_{\text{teórico}} \Rightarrow \text{Se rechaza } H_0$$

- Ejemplo de cálculo de estadísticos F y t para muestras de 120 y 240 ppm de IP6, sin metales, extraídas luego de 20 min con TCA 0,6 M (Comparación de una media experimental con un valor de referencia)

➤ $M_1 = (79 \pm 6) \%$; $M_2 = 99$; $P = 0,05$

➤ $t_{\text{teórico}} = 4,30$, $H_0 =$ No hay diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de ambas muestras.

$$t_{\text{exp}} = (\bar{x} - \mu) \sqrt{n/s} = (99 - 79) \sqrt{3/6} = 14,14 > t_{\text{teórico}} \Rightarrow \text{Se rechaza } H_0$$