



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE: Marcia Costa L.
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**PROFESOR CO-PATROCINANTE: M. Adela Martínez S.
INSTITUTO DE FARMACIA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**"Determinación y Cuantificación de Mioinositol y Acido Fítico en
Alimento y Contenido Intestinal de Salmón mediante HPLC
acoplado a Detector de índice de Refracción".**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Titulo de Químico Farmacéutico.

CAROLINA ROSSANA GÓMEZ OYARZO

VALDIVIA-CHILE
2005

*Dedicado a mis padres, hermanas y a mis dos
pequeñas sobrinas a quienes quiero con toda
mi alma y también a la persona que llena
mi vida de felicidad a cada momento,
mi gran amor..... Víctor.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la profesora patrocinante de esta tesis, Sra. Marcia Costa L., por el apoyo que me brindó durante todo el proceso de este trabajo, gracias por su orientación y su entrega incondicional.

A la profesora Adela Martínez, gracias por su constante preocupación, ayuda y consejos durante el proceso de tesis. A la profesora Carin Akesson, gracias por aceptar ser parte de la comisión de éste trabajo y por su gran disposición.

Agradezco al Instituto de Farmacia por permitir la realización de la tesis en el laboratorio de farmacia, especialmente al Sr. Joel Pardo por su colaboración.

Quisiera agradecer profundamente al Dr. Humberto Dölz por todos los momentos compartidos durante el periodo académico, por el cariño que siempre me entregó, por sus sabios consejos y experiencias de vida que siempre los llevaré conmigo. Gracias "Doc" por su amistad y no olvide que siempre lo recordará con mucho respeto su: *"deportista de élite"*.

También quisiera agradecer a la tía Paty por su simpatía y su constante ayuda, tanto en lo académico como en lo personal. A mi amiga Mónica, gracias por ser una persona incondicional, te quiero mucho.

A mi familia, especialmente a mi madre, gracias por confiar en mi, gracias por todos tus sacrificios, preocupaciones, consejos, gracias por todo...en realidad gracias por ser mi mamá. Papá, hermanas, cuñado y sobrinas gracias por todo su apoyo, los quiero mucho.

A quien quiero con todas mis fuerzas, Víctor, gracias por tu entrega incondicional hacia mí, gracias por hacerme feliz. Te amo.

Finalmente gracias a Dios por darme salud, sabiduría y todas las herramientas para poder finalizar esta hermosa etapa de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	V
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Características del fitato.....	4
2.2 Consideraciones nutricionales del fitato.....	6
2.3 Generalidades de las fitasas.....	9
2.3.1 Fitasas endógenas vegetales.....	10
2.3.2 Fitasas endógenas intestinales en animales monogástricos.....	11
2.3.3 Fitasas microbianas.....	11
2.3.4 Fitasas microbianas producidas por la flora digestiva.....	13
2.3.5 Características de la fitasa Ronozyme ® P.....	13
2.4 Efecto de la utilización de fitasa en alimentación animal.....	16
2.5 Utilización de fitasa en alimentación de peces.....	19
2.6 Métodos de análisis de ácido fítico.....	22
2.7 Validación de metodologías analíticas.....	23
2.7.1 Linealidad.....	24
2.7.2 Precisión.....	24
2.7.3 Exactitud-Recuperación.....	25

2.7.4 Sensibilidad.....	26
2.7.4.1 Límite de detección.....	26
2.7.4.2 Límite de cuantificación.....	27
2.7.5 Selectividad.....	28
2.8 Hipótesis.....	29
2.9 Objetivos.....	29
2.9.1 Objetivo General.....	29
2.9.2 Objetivos Específicos.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Reactivos.....	31
3.2 Muestras.....	31
3.3 Materiales.....	31
3.4 Metodología analítica.....	32
3.4.1 Condiciones cromatográficas.....	32
3.4.2 Extracción de ácido fólico y mioinositol desde alimento y contenido intestinal de salmón.....	33
3.4.3 Diseño de las curvas de calibración de mioinositol y ácido fólico.....	34
3.4.3.1 Mioinositol.....	34
3.4.3.2 Ácido fólico.....	35
3.4.4 Montaje de la columna de intercambio aniónico (C.I.A).....	35
3.4.5 Validación.....	36

3.4.5.1 Linealidad.....	36
3.4.5.2 Determinación de la precisión del sistema instrumental.....	36
3.4.5.2.1 Determinación de la repetibilidad.....	36
3.4.5.2.2 Determinación de la reproducibilidad.....	37
3.4.5.3 Determinación de la precisión del método.....	37
3.4.5.3.1 Determinación de la repetibilidad.....	37
3.4.5.3.2 Determinación de la reproducibilidad.....	37
3.4.5.4 Exactitud -Recuperación.....	38
3.4.5.5 Sensibilidad.....	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1 Determinación de linealidad.....	40
4.2 Precisión del sistema instrumental.....	42
4.2.1 Repetibilidad del sistema instrumental.....	42
4.2.2 Reproducibilidad del sistema instrumental.....	43
4.3 Precisión del método.....	43
4.3.1 Repetibilidad del método.....	43
4.3.2 Reproducibilidad del método.....	44
4.4 Exactitud -Recuperación.....	44
4.5 Sensibilidad.....	46

4.6 Análisis de muestras.....46

5. CONCLUSIONES.....50

6. BIBLIOGRAFÍA.....52

ANEXOS.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	: ácido fítico.
A.O.A.C	: Association of Oficial Analytical Chemist.
° C	: grados Celsius.
C.I.A	: cromatografía de intercambio aniónico.
C.V.	: coeficiente de variación.
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético.
FTU	: unidad de fitasa.
g	: gramo.
HPAEC	: high performance anion - exchange chromatographic (Cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia).
HPLC	: high performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
hr	: hora.
IR	: índice de refracción.
kg	: kilogramo.
M	: molaridad.
min	: minuto.
mg	: miligramo.
mM	: milimolar.
mV	: milivolt.
mg/ml	: miligramo por mlilitro.
ml	: mililitro.

Nº	: número.
ng	: nanógramo.
PM	: peso molecular.
p/v	: peso volumen.
rpm	: revoluciones por minuto.
S.D.	: desviación estándar.
seg	: segundo.
ug	: microgramo.

ANEXO N° 1: FIGURAS

	Página
Figura 1	Estructura química del ácido fítico.....5
Figura 2	Perfil de actividad enzimática de Ronozyme ®P entre pH 3,0 y 7,0.....14
Figura 3	Modelo Ronozyme ®P.....15
Figura 4	Cromatograma de alimento de salmón sin fitasa.....48
Figura 5	Cromatograma de contenido intestinal de salmones alimentados con <i>pellet</i> sin fitasa.....48
Figura 6	Cromatograma de alimento de salmón con fitasa.....49
Figura 7	Cromatograma de contenido intestinal de salmones alimentados con <i>pellet</i> con fitasa.....49
Figura 8	Curva de calibración ácido fítico.....61
Figura 9	Curva de calibración mioinositol.....61
Figura 10	Curva de sensibilidad para ácido fítico.....62
Figura 11	Determinación de sensibilidad ácido fítico.....62
Figura 12	Curva de Sensibilidad para mioinositol.....63
Figura 13	Determinación de sensibilidad mioinositol.....64

ANEXO N° 2: TABLAS

	Página
Tabla 1: Coeficientes de correlación y de regresión lineal.....	65
Tabla 2: Repetibilidad de patrones para ácido fítico.....	65
Tabla 3: Repetibilidad de patrones para mioinositol.....	65
Tabla 4: Resultados de la determinación de repetibilidad del sistema instrumental.....	66
Tabla 5: Reproducibilidad para patrones de ácido fítico.....	66
Tabla 6: Reproducibilidad para patrones de mioinositol.....	66
Tabla 7: Resultados de la determinación de reproducibilidad del sistema instrumental.....	66
Tabla 8: Repetibilidad del método para ácido fítico en alimento de salmónes.....	67
Tabla 9: Repetibilidad del método para mioinositol en alimento de salmónes.....	67
Tabla 10: Reproducibilidad del método para ácido fítico en alimento de salmónes.....	67
Tabla 11: Reproducibilidad del método para mioinositol en alimento de salmónes.....	68
Tabla 12: Exactitud -Recuperación ácido fítico desde alimento de salmónes.....	68
Tabla 13: Exactitud/ Recuperación mioinositol desde alimento de salmónes.....	69
Tabla 14: Repetibilidad del método para ácido fítico en contenido intestinal de salmón.....	69
Tabla 15: Repetibilidad del método para mioinositol en contenido intestinal de salmón.....	70
Tabla 16: Reproducibilidad del método para ácido fítico contenido intestinal de salmón.....	70

Tabla 17: Reproducibilidad del método mioinositol en contenido intestinal de salmón.....	70
Tabla 18: Exactitud- Recuperación ácido fítico desde contenido intestinal de salmón.....	71
Tabla 19: Exactitud- Recuperación mioinositol desde contenido intestinal de salmón.....	71
Tabla 20: Valores de t_{exp} para ácido fítico y mioinositol en ambas matrices.....	72
Tabla 21: Determinación de ácido fítico en alimento y contenido intestinal de salmón.....	72
Tabla 22: Determinación de mioinositol en alimento y contenido intestinal de salmón.....	72

ANEXO N° 3: EJEMPLOS DE CÁLCULO

	Página
Ejemplo de cálculo 1: Corrección de pesada para curva de calibración.....	73
Ejemplo de cálculo 2: Determinación del t_r para mioinositol en linealidad.....	73
Ejemplo de cálculo 3: Conversión de unidad de concentración (mg/ml) en cantidad (mg).....	74
Ejemplo de cálculo 4: Determinación del porcentaje de recuperación.....	75
Ejemplo de cálculo 5: Determinación de t experimental para ácido fítico en recuperación.....	75
Ejemplo de cálculo 6: Ajuste de datos en base al % de recuperación.....	76

1. RESUMEN

El alimento para salmones constituye aproximadamente un 50% de los gastos de producción de esta industria.

Las materias primas utilizadas para formular el alimento, provienen fundamentalmente de fuentes animales y/o vegetales.

Debido al alto costo de la harina de pescado en alimentación animal, la industria elaboradora de alimentos para peces ha recurrido a utilizar fuentes proteicas de origen vegetal. Sin embargo, esta nueva alternativa presenta como inconveniente la presencia de ácido fítico (AF), el cual es una forma de almacenamiento de fósforo no disponible para animales monogástricos (salmones, pollos, cerdos, etc.) que carecen de la enzima fitasa. Es por esto que la industria salmonera está evaluando la adición de fitasas en la dieta para peces.

Un procedimiento HPLC-IR inédito en Chile para determinar y cuantificar mioinositol y ácido fítico, permitió evaluar el efecto de la utilización de la enzima fitasa en alimento de salmones.

Los resultados obtenidos dan cuenta que los niveles de ácido fítico en contenido intestinal de salmones alimentados con dietas que contenían fitasa en su formulación, fue aproximadamente un 38% menor a los obtenidos en los salmones control. Sin embargo, debido al bajo número de muestras analizadas, estos no serían concluyentes y se debería realizar ensayos con un número mayor de muestras.

SUMMARY

The food for salmonids constitutes approximately 50% of the expenses of production of this industry. The raw materials used to formulate the food, fundamentally come from animal and/or vegetable sources.

Due to the high cost of fish flour in animal feeding, the food industry for fish has chosen to use protein sources of vegetal origin. Nevertheless, this new alternative presents the inconvenience of containing phytic acid (AF), which is a form of phosphorus storage nonavailable for monogastric animals (salmons, chickens, pigs, etc.) because of lack of the enzyme phytase. This is why the salmon industry is evaluating the addition of phytases in the diet for fish.

An HPLC-IR procedure unpublished in Chile to determine and quantify myo-inositol and phytic acid, allowed to evaluate the effect of the use of the enzyme phytase in salmon food. The results indicate that the phytic acid levels in intestinal content of salmons fed with diets that contained phytase in their formulation, were approximately 38 % lower then those obtained in control salmons. Nevertheless, due to the low number of analyzed samples, these are not conclusive and the determination should be carried and with a greater number of samples.

2.- INTRODUCCIÓN

La Industria Salmonera en Chile ha tenido un gran desarrollo durante los últimos veinte años y continúa con un crecimiento sostenido con excelentes proyecciones. Chile se ubica como segundo productor mundial de salmón, después de Noruega, y primero de trucha, cultivados.

El salmón constituye más del 51% de las exportaciones pesqueras chilenas y representa el 5,6% de las exportaciones nacionales, alcanzando US \$1.147 millones en el año 2003. Sin embargo, al considerar los costos de producción un aspecto importante es la alimentación de los salmones que abarca cerca del 50% del total.

La industria de alimentos para salmónidos mueve al año cerca de US\$ 700 millones, requiriendo insumos de diversos rubros económicos, donde la pesca y la agricultura tienen una participación relevante (Salmonchile¹). Las materias primas necesarias para producir el alimento de salmón provienen fundamentalmente de dos fuentes: animal y vegetal. La primera es de procedencia marina, y la más relevante dentro de los insumos. Así, la harina y el aceite de pescado tienen una participación media que sobrepasa 60%. Es importante destacar que uno de los efectos nocivos de la harina de pescado es su elevado contenido de fósforo, en donde la totalidad del fósforo (3,0-3,5%) contenido en cartílago y huesos se encuentra como hidroxapatita o fosfato tricálcico de baja disponibilidad para los peces (Riche y Brown, 1996), con una biodisponibilidad de 30% aproximadamente.

Por lo tanto, debido al alto costo de la harina de pescado en la alimentación animal, la industria elaboradora de alimentos para peces está recurriendo a utilizar fuentes proteicas de origen vegetal más económicas, como soya, canola, trigo, lupino, entre otras, pero esta nueva alternativa presenta un inconveniente que está nuevamente relacionado con la presencia de

fósforo, el cual se encuentra principalmente como ácido fítico (AF), forma que no resulta disponible para animales monogástricos que carecen de la enzima fitasa capaz de hidrolizar los grupos fosfatos a simple mioinositol. De esta forma, todo el fósforo de baja disponibilidad es eliminado por los peces en las excretas contribuyendo así a la contaminación y a un aumento en la eutroficación de las aguas. El AF es además un compuesto con actividad antinutricional, debido a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales y proteínas (Zhou, 1995), convirtiéndolos en no asimilables por el organismo bajo condiciones fisiológicas.

Debido a esto, la industria salmonera está recurriendo a la utilización de la enzima fitasa en dietas para peces, ya que ésta es capaz de hidrolizar el AF presente en las fuentes proteicas de origen vegetal que se están incorporando en las actuales formulaciones. Como resultado se eliminan las características antinutricionales que presenta la molécula de AF, aumenta la biodisponibilidad del fósforo presente y se logra una disminución importante en la contaminación de las aguas.

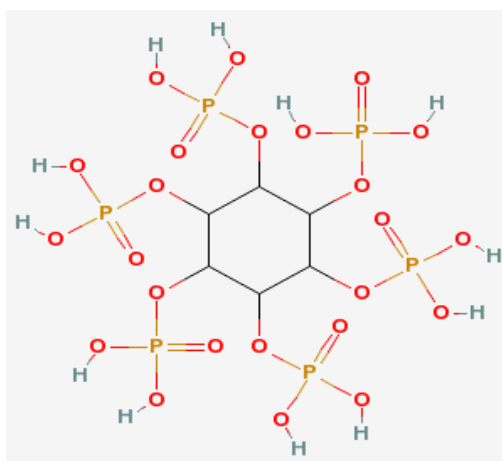
2.1 Características del fitato.

Existen nueve esteroisómeros de inositol (hexadihidrociclohexano), de los cuales siete se han encontrado en la naturaleza. De todos ellos el más frecuente es el mioinositol, el cual se puede encontrar en una amplia variedad de formas polifosforiladas (Robinson, 1991). Químicamente, el ácido fítico se define como mioinositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexahidrógeno fosfato (Figura 1) (Maga, 1982) y es sintetizado a partir del mioinositol-1-fosfato mediante la acción de la fosfoinositol quinasa y las fosfoesterasas (Irving, 1973), siendo el principal componente de fósforo en las plantas, abundante en semillas de oleaginosas, legumbres y cereales de grano

¹ www.salmonchile.cl (02.05)

donde se presenta como una mezcla de sales de magnesio, potasio y calcio, llamados fitatos (Budavari, 1996). Sin embargo, en esta forma el fosfato permanece no disponible para el hombre y animales, 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 (Walsh *et al.*, 1994).

Figura 1: Estructura química del ácido fítico.



El fitato es ampliamente estable al calor y su destrucción depende del tipo de proteínas y cationes presentes. Al someter por 4 horas a 115° C distintas semillas y preparados proteicos, la desfosforilación de este compuesto es muy variable y no supera el 60% (De Boland *et al.*, 1975). El fitato está cargado fuertemente negativo en la mayoría de la escala de pH, por lo que tiene un gran potencial para complejar las moléculas cargadas positivamente, tales como cationes y proteínas con la formación de complejos que son insolubles. Por lo tanto, la extensión del complejo fitato y proteínas depende del pH y del contenido de iones divalentes; a pH ácido las proteínas de carga neta positiva y el fitato negativamente cargado forman un complejo binario

proteína- fitato. A pH alcalino ambos, proteína y fitato, poseen carga negativa y la interacción es mediada por cationes multivalentes para formar un complejo ternario proteína- catión- fitato, el rompimiento de este complejo requiere la remoción de cationes del sistema mediante el uso de quelantes (Serraino y Thompson, 1984).

El fitato es soluble en agua y, dado que los complejos proteína - fitato pueden romperse mediante el empleo cuidadoso de sales y ajuste de pH, es posible obtener concentrados proteicos con baja concentración de éste (Zhou *et al.*, 1990). Así dietas y alimentos que contienen granos o legumbres procesadas en forma de harinas, pueden tener cantidades apreciables de fitatos parcialmente desfosforilados (Phillipy, 1988).

Las legumbres, cereales y semillas oleaginosas son las que presentan los niveles más altos en el contenido de fitato, llegando en algunos casos a superar el 5,0% en peso (De Boland *et al.*, 1975). Este compuesto se utiliza como reserva y representa 50 a 75% del fósforo total (Nelson *et al.*, 1968), encontrándose en semillas maduras para luego ser consumido durante la germinación (De Boland *et al.*, 1975).

2.2 Consideraciones nutricionales del fitato.

Por su estructura altamente reactiva, el AF es un excelente agente quelante presentando gran afinidad por todos los elementos trazas polivalentes y minerales como Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Mg^{2+} , Ca^{2+} (Sugiura *et al.*, 1999).

Numerosos estudios han llegado a la conclusión de que el fitato reduce la biodisponibilidad de estos iones metálicos, debido a la formación de complejos insolubles entre proteínas, cationes y fitato (Robinson, 1991), reduciendo la absorción de calcio, magnesio, fierro y zinc en el tracto intestinal de los animales y seres humanos (Zyla, 1995).

Los efectos adversos del AF en la biodisponibilidad mineral dependen de un gran número de factores entre los que se destacan la concentración de AF y la fuerza de su unión con los diferentes minerales (Thompson, 1993), también influyen otros factores como:

- La presencia de fitasa de origen intestinal, bacteriana o de la dieta, así como la inhibición de dicha enzima.
- La presencia de otros agentes quelantes como fibra dietética, ácido oxálico, ácido ascórbico, que pueden competir con el AF en su unión con minerales.
- La concentración de las proteínas de la dieta, y por tanto la presencia de proteínas, péptidos o aminoácidos en el intestino que pueden interferir en la formación del complejo fitato - mineral, entre otros (Cheryan, 1980; Thompson, 1993).

Se ha descrito que el efecto inhibitor del fitato depende del grado de fosforilación del inositol, cuando es elevado (5 ó 6 fosfatos) la absorción del calcio y el zinc es inhibida significativamente, sin embargo, a niveles de fosforilación menor este efecto no se observa (Lonnerdal *et al.*, 1989). Cuando el calcio está en concentraciones elevadas se forman complejos con cinco o seis cationes por molécula de fitato, también puede existir otro complejo que incluya cuatro cationes, todo ello dependiendo de la concentración de calcio presente; los complejos hexa- penta- tetra- y tricalcio son insolubles mientras que los complejos mono- y dicalcio son solubles (Gifford *et al.*, 1993). No obstante, la absorción del calcio de los complejos solubles fitato - calcio es muy pobre debido a la alta carga de estas moléculas (Schlemmer *et al.*, 1995). Los complejos insolubles fitato - calcio son también considerados como los principales responsables de la reducción de la biodisponibilidad de otros minerales como fierro y zinc, a

través de la unión de éstos al complejo fitato - calcio para formar un complejo aún menos soluble (Zhou *et al.*, 1995).

La interacción del AF con algunas proteínas ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, su naturaleza no es totalmente conocida. Ciertas enzimas digestivas tales como la pepsina, amilasa y tripsina; se ven afectadas por la presencia de fitato, lo que podría deberse a la unión de éste con la proteína o con los cationes esenciales para la actividad enzimática (Fennema, 2000). La actividad de la tripsina *in vitro* se ve inhibida por la presencia de fitato, lo que se debería a que la conversión del tripsinógeno en enzima activa requiere la presencia del ión calcio, el cual al estar unido al fitato, no puede participar en la reacción, ocasionando una disminución en la disponibilidad de las proteínas *in vivo* (Sing y Krikorian, 1982). Por lo tanto, esto implica que altas concentraciones de fitato pueden causar deficiencia de minerales y reducción en la digestibilidad de proteínas, almidón y lípidos (Zyla *et al.*, 1995).

La digestión del almidón *in vitro* se ve inhibida por la presencia de fitato, el cual podría unirse con la molécula de almidón mediante puentes fosfato o quelando calcio, el cual es necesario para la estabilidad de la amilasa salival (Thompson *et al.*, 1987).

En la interacción entre zinc, calcio y fitato, investigada en cerdos (Maga, 1982), se encontró que altos niveles de calcio, en conjunción con fitato disminuyen la disponibilidad del zinc. En perros, se demostró que la adición de fitato en la dieta reduce la absorción de calcio induciéndose raquitismo como consecuencia. En pollos, se encontró que cuando la dieta no contenía fitato el requerimiento de calcio fue de 0,5% y en dietas naturales que contenían fitatos los requerimientos de calcio incrementaron a un 0,95%; en peces (BASF, 1998), se sugiere que el fitato forma complejos con cationes en el tracto gastrointestinal. La situación empeora cuando el nivel de calcio dietario se incrementa conduciendo a una disminución en la biodisponibilidad del

zinc tanto en mamíferos como en peces. Las consecuencias de altos niveles de AF en peces incluyen además reducción de crecimiento y disminución de la utilización de proteínas de la alimentación. Además, se ha observado anomalías estructurales en el lado epitelial del píloro del intestino del pez, atribuida a los efectos tóxicos del ácido fítico como resultado de la reducción de la disponibilidad del magnesio (Richardson *et al.*, 1985).

2.3 Generalidades de las fitasas.

Estas enzimas son una clase especial de fosfomonoesterasas (mioinositol hexafosfato fosfohidrolasa) capaces de iniciar la liberación de fosfato desde el AF (mioinositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexafosfato), el cual constituye la mayor forma de almacenamiento de fósforo en las plantas. Dentro de ellas se encuentran dos tipos: una mioinositol hexafosfato 3-fosforilasa (EC 3.1.3.8) y una mioinositol hexafosfato 6-fosforilasa (EC 3.1.3.26), ambas ampliamente distribuidas en plantas, microorganismos y algunos tejidos animales (Konietzny y Greiner, 2002). Generalmente la enzima 3 - fosforilasa es de origen microbiano y la 6 - fosforilasa de origen vegetal, pero existen algunas excepciones (Dvorakova, 1998).

Esta enzima, no es la única capaz de desfosforilar el AF, una combinación de fitasa y fosfatasas no específicas están involucradas en el proceso (Maenz, 2001).

Las fitasas hidrolizan únicamente los fitatos en solución, por lo que su actividad requiere humedad en el medio y unas condiciones determinadas de pH y temperatura que son variables según el tipo de fitasa (Wodzinsky y Ullah, 1995).

Numerosos estudios han demostrado que independiente del origen de la fitasa, bacteriana, fúngica o vegetal, para las fitasas ácidas el producto final de degradación del fitato fue identificado como mioinositol monofosfato (Hayakawa *et al.*, 1990; Wyss *et al.*, 1999 Nakano *et*

al., 2000; Greiner *et al.*, 2001; Greiner *et al.*, 2002). Sólo en casos raros el mioinositol libre fue detectado. En cuanto a las fitasas alcalinas no son capaces de hidrolizar mioinositol fosfato con tres o menos residuos de fosfato como sustrato (Hara *et al.*, 1985; Kerovuo *et al.*, 2000). Por lo tanto, el mioinositol trifosfato es el producto final de la degradación del fitato por estas fitasas alcalinas.

2.3.1 Fitasas endógenas vegetales.

Las fitasas de origen vegetal son del tipo 6 - fitasa, cuyo proceso inicial consiste en liberar el grupo ortofosfato en la posición seis de la molécula de inositol (Gibson y Ullah, 1990). El primer intermediario obtenido es el mioinositol 1, 2, 3, 4, 5 pentafosfato. A partir de aquí la fitasa-6 actúa de forma secuencial, desfosforilando la molécula en su totalidad (Wodzinsky y Ullah, 1995). Por tanto, al menos teóricamente, una molécula de AF podría dar lugar a una molécula de mioinositol y 6 moléculas de ortofosfato.

El pH óptimo para la actividad de estas enzimas está entre 4,0 y 7,5, con la mayoría de ellas por encima de 5,0, perdiendo irreversiblemente su actividad a pH comprendidos entre 2,5 y 3,0 (Pointillart, 1993). La temperatura óptima se sitúa entre 45 y 60° C, degradándose rápidamente a temperaturas superiores (Reddy *et al.*, 1982).

Se estima que las fitasas contenidas en las plantas son al menos 10% menos eficientes que las de naturaleza fúngica, la razón podría ser el estrecho rango de pH al cual las fitasas vegetales son activas, ya que los valores óptimos de pH para su máxima actividad son superiores a los encontrados en el estómago de animales monogástricos, principales puntos de acción de las fitasas (Pointillart, 1993).

2.3.2 Fitasas endógenas intestinales en animales monogástricos.

La actividad fitásica de la mucosa intestinal es muy reducida aunque demostrable experimentalmente (Pointillart, 1993). Al menos en el cerdo, las fosfatasas intestinales endógenas sólo son capaces de hidrolizar las moléculas de intermediarios del inositol fosfato con escaso número de iones ortofosfatos (mioinositol trifosfato a mioinositol monofosfato) dando lugar a inositol libre (Kemme *et al.*, 1998). El contenido digestivo del estómago e intestino del cerdo (Yi y Kornegay, 1996) y del buche, estómago e intestino de aves (Liebert *et al.*, 1993) tiene escasa actividad fitásica propia. En cualquier caso, se estima que su interés práctico es muy reducido (Jongbloed *et al.*, 1992).

2.3.3 Fitasas microbianas.

La enzima fitasa es producida por diferentes especies de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. Algunas fitasas se han detectado en bacterias como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Raoutella* sp., *Escherichia coli.*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter*, entre otras (Vohra y Satyanarayana, 2003). En levaduras como *Sacharomyces castelli*, *Sacharomyces cerevisiae* y en hongos como *Apergillus ficuum*, *Aspergillus terreus* y *Apergillus niger* (Nagashima *et al.*, 1999). Recientemente se descubrió que el hongo *Peniophora lycii* también es un productor de la enzima fitasa (Roche²).

Las enzimas de origen fúngico son producidas por varias especies, siendo el género *Aspergillus* el principal microorganismo utilizado como fuente en la actualidad y sus enzimas son del tipo fitasa - 3. La hidrólisis de los fitatos *in vitro* transcurre en forma secuencial, actuando en primer lugar sobre los fosfatos con mayor número de grupos ortofosfato desde mioinositol

² www.roche-vitamins.com (03.05)

hexafosfato hasta mioinositol monofosfato (Kemme *et al.*, 1998). La fitasa - 3 parece no ser capaz de hidrolizar el inositol monofosfato y precisa de la ayuda de otras fosfatasas, bien la fitasa- 6 o las fosfatasas endógenas del animal para completar el proceso. El pH óptimo de estas fitasas se encuentra entre 2,5 y 7,5, siendo activas en un amplio rango de temperaturas, entre 35° y 65° C y son, por lo tanto, los microorganismos de elección actual para la producción de fitasas comerciales (Wodzinsky y Ullah, 1995).

La fitasa producida por *Aspergillus niger* es la más extensamente estudiada y numerosos estudios han demostrado que el pH óptimo de esta fitasa microbiana presenta dos rangos de pH, uno a pH de 5,0 - 5,5 y el segundo de mayor actividad ocurre a pH 2,3 a 2,7 (Simons *et al.*, 1990). La temperatura óptima de actividad se encuentra aproximadamente a los 60° C, lo que hace a esta enzima altamente termoestable (Eeckhout y De Paepe, 1994).

Simons *et al.*, (1990) fue el primero en adicionar fitasa producida por un cultivo de *Aspergillus* sp. en harina de soya, la que fue incubada por 2 a 4 horas a 50° C y usada luego para alimentar pollos, los que mostraron un considerable incremento en el porcentaje de fósforo en los huesos en relación al control. En un segundo experimento una preparación de fitasa producida por *Aspergillus ficuum* fue adicionada a una dieta completa para pollos, en este caso la enzima mostró ser activa en el tracto gastrointestinal, deduciéndose que, las preparaciones de fitasa derivadas de hongos y adicionadas a dietas comerciales para animales monogástricos, mejora la retención de fitato y calcio, con la consecuente disminución del contenido de fósforo en las excretas (Nelson *et al.*, 1968; Simons *et al.*, 1990).

2.3.4 Fitasas microbianas producidas por la flora digestiva.

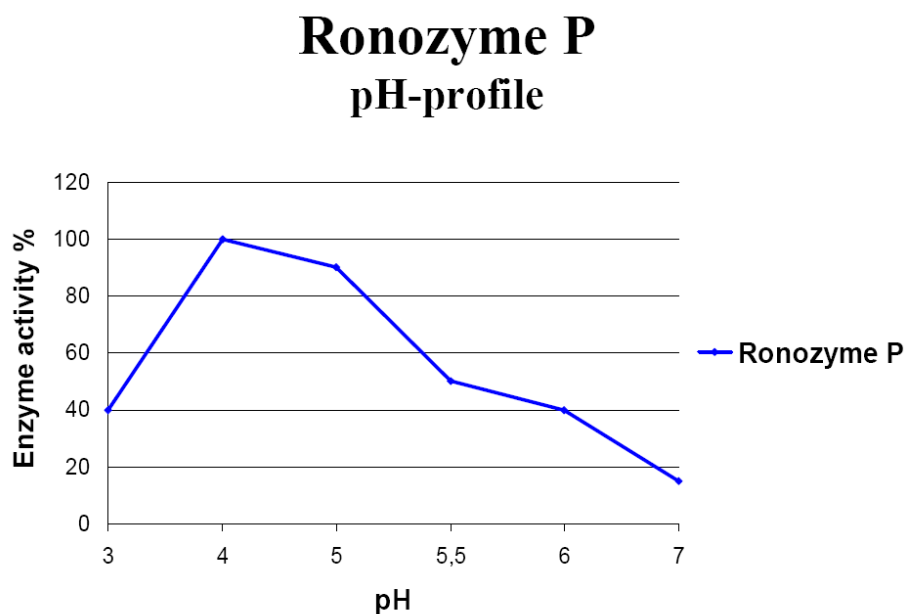
Numerosos hongos y microorganismos presentes en el tracto intestinal producen fitasa - 3. Los rumiantes y parcialmente los animales coprófagos, tales como el conejo, pueden beneficiarse de esta actividad fitásica. Sin embargo, en la mayoría de las especies monogástricas, tales como el cerdo, las aves y los peces, la actividad de la flora microbiana tiene lugar en el intestino grueso. De aquí que, aunque las fitasas microbianas hidrolizan los fitatos y liberen el fósforo inorgánico, el animal no pueda beneficiarse ya que este fósforo se excretará enteramente en las heces (Kempe *et al.*, 1998).

2.3.5 Características de la fitasa Ronozyme ® P.

Se trata de una fitasa microbiana altamente activa, relativamente nueva (año 2001) de nombre comercial Ronozyme ® P comercializada por el laboratorio Roche y es derivada de un hongo de la clase Basidiomycetes llamado *Peniophora lycii*. Es una fitasa - 6, la cual es capaz de liberar fósforo desde el ácido fítico comenzando desde la posición 6 del anillo inositol. Por tener actividad fitasa, Ronozyme ® P, se está utilizando como suplemento en dietas animales con alto contenido de proteína vegetal lo cual mejora la biodisponibilidad del fósforo en cerdos, aves y peces y disminuye la excreción de fósforo en un 30% aproximadamente.

Esta enzima, tiene un rango de actividad superior al 40%, entre pH 3,5 y 5,5 (Figura 2). En tanto que la actividad óptima (100% de actividad) de la enzima se encuentra a pH 4,0, luego en estas condiciones se ha observado muy buena cinética enzimática en tracto digestivo de aves, cerdo y peces.

Figura 2: Perfil de actividad enzimática de Ronozyme P entre pH 3,0 y 7,0.



Claramente, enzimas con una alta actividad en medios ácidos, como es Ronozyme[®] P, son ventajosas para la aplicación en alimentación animal.

La principal ventaja de esta enzima es su termoestabilidad, ya que está formulada como un granulado revestido termorresistente (CT), diseñado específicamente para proteger a la enzima durante el procesamiento hidrotérmico de los alimentos. En estudios realizados se observó que a 85° C permanece casi el 100% de la actividad enzimática en tanto que a 95° C se ha determinado aproximadamente un 70% de la misma (Roche). Por lo tanto esta enzima puede utilizarse en casi todas las condiciones de granulación comerciales empleadas actualmente, sin pérdida significativa de su actividad. La presentación comercial de la enzima para temperaturas superiores a los 90°C es en forma líquida la cual se aplica sobre los *Pellets* por rociada o aspersión (aplicación post-*pelleting*).

Numerosos estudios y ensayos han demostrado que a pesar de algunas diferencias en las propiedades catalíticas y de estabilidad de Ronozyme[®] P, no existen factores que la diferencien

en actividad biológica y bioeficacia con otras fitasas a las dosis recomendadas. Luego, la ventaja que presenta ésta respecto de otras enzimas, se debe a su revestido termorresistente, que le permite sobrevivir a las modernas técnicas de procesamiento del alimento.

Es importante mencionar que las diferencias existentes en las dosis recomendadas entre la fitasa de *Peniophora* (Figura 3) y las fitasa de *Aspergillus*, se deben a las diferencias en las características propias y en el origen de las fitasas y no a las características de granulado termorresistente en que se presenta Ronozyme P. Las dosis recomendadas para el producto líquido son las mismas que para el producto CT (Roche).

Figura 3: Modelo Ronozyme ® P.



Las enzimas, en este caso las fitasas, son definidas por su actividad, pero su estructura puede ser totalmente diferente. Ronozyme ® P y *Aspergillus* catalizan la misma reacción, la hidrólisis de fitato para liberar fosfato inorgánico, pero sus secuencias aminoacídicas son

claramente diferentes. La razón que se utilice una dosis 50% extra comparada con la fitasa de *Aspergillus niger* es porque la fitasa de *P. lycii* es diferente a la mencionada anteriormente en términos de escala de pH, cinética de reacción y origen.

La unidad de fitasa (FTU) corresponde a la cantidad de enzima que libera un μmol de fósforo inorgánico por minuto de un exceso de fitato de sodio a 37° C y pH 5,5 (Engelen, *et al.*, 1994).

2.4 Efecto de la utilización de fitasa en alimentación animal.

Las enzimas como aditivos en alimentación han tenido un gran impacto en la industria, no sólo porque mejoran la utilización de dietas que contienen cereales como trigo, avena, cebada (Campbell y Bedford, 1992) y maíz (O' Quinn, 1997), lo que ha sido probado ampliamente para aves y cerdos, sino también porque a la vez mejora la calidad medio ambiental, por reducir la eliminación de contaminantes en las excretas como fosfato, nitrógeno y amonio (Marquard y Bedford, 1997).

Los rumiantes son capaces de digerir el fitato sin problemas, lo cual se debe a la actividad microbiana presente en el rumen. En animales monogástricos la actividad de la fitasa es muy reducida, por lo que estudios realizados muestran que la suplementación enzimática tiene el potencial de mejorar el valor nutritivo de los alimentos para animales monogástricos (Spring *et al.*, 1996). Para lograr efectos beneficiosos, las enzimas tienen que estar biológicamente activas cuando reaccionan en el tracto gastrointestinal, ya que la enzima puede ser alterada por exposición al calor, pH extremos, etc. por lo que su aplicación debe ser controlada.

El primer estudio del efecto de la fitasa en animales se realizó en pollos de un día, donde se pretrató un preparado de soya líquido con fitasa a 50° C por 24 horas, lográndose un 97% de hidrólisis. Luego de alimentar a las aves por varias semanas se observó un incremento importante en el porcentaje de cenizas de los huesos con respecto al control, que no contenía ningún suplemento de fósforo (Nelson *et al.*, 1968). En un estudio posterior, la enzima se adicionó en forma directa a la dieta, obteniéndose porcentajes de cenizas de huesos similares a aquellas que tenían suplementos de fósforo inorgánico. Debido a esto, se descubrió que la fitasa tenía actividad en el tracto gastrointestinal (Nelson *et al.*, 1971), permitiendo el desdoblamiento del fitato en la parte ácida del estómago (Engelen *et al.*, 1994). Se aprecia que tanto la tasa de crecimiento, como la disponibilidad del fósforo total y la tasa de conversión alimenticia, aumentan. También se observa una disminución del 50% en el contenido de fósforo en las fecas. Estos efectos podrían deberse a:

- La liberación de minerales esenciales, que forman complejos con el fitato.
- A una mejor utilización del fósforo presente.
- A un posible incremento en la digestibilidad del almidón (Simons *et al.*, 1990).

En dietas basadas en mezclas de maíz y soya, bajas en fósforo disponible, administradas durante dos semanas en pollos de pocos días, no se observó un mejoramiento en la ganancia de peso. En gallinas de 21 semanas, las cuales fueron alimentadas con harina de soya y maíz por cuatro meses, se observó una baja frecuencia de la puesta de huevos por la falta de fósforo disponible. Al adicionar 600 unidades de fitasa/kg de alimento, hubo un aumento importante en

la producción de huevos y en la dureza de la cáscara, comparables a las dietas con suplementos de fósforo (Haichen y Hui, 1997).

En un estudio de la fitasa de *Aspergillus niger* (*var ficuum*) en dietas para cerdos, la fitasa microbiana no afectó significativamente la concentración de fósforo total en el contenido duodenal, pero la concentración de AF fue reducida y los complejos de fitato fueron hidrolizados en el estómago. Entre un 60% a 74% del fitato pudo ser hidrolizado en el intestino y en dietas no suplementadas sólo el 10% fue hidrolizado. Por acción de la fitasa presente en el maíz, un 38% del fitato fue absorbido en el estómago y aproximadamente 55% fue absorbido en los intestinos. Es evidente que la digestibilidad es debida a muchos factores, como la composición de la dieta, cantidad de alimento consumido, suministro de agua, estrés, anatomía gastrointestinal, etc. (Jongbloed *et al.*, 1992).

El pH determina la eficacia de las fitasas de la dieta (endógenas y exógenas) e influye en la solubilización de los fitatos y de los fosfatos minerales de baja calidad (Sauveur, 1989), mientras que tiempos de permanencia prolongados permiten una mayor extensión de la actividad.

El lugar de acción de la fitasa en el aparato digestivo es distinto en aves y en cerdos. Liebert *et al.* (1993) demostraron que en pollos la hidrólisis de AF tiene lugar fundamentalmente en el buche (69 a 86% de la actividad fitásica añadida) y en menor medida en el proventrículo (31- 38%), no detectándose actividad en el intestino delgado. En porcino la fitasa actúa mayoritariamente en el estómago (Kemme *et al.*, 1998). Yi y Kornegay (1996) observaron que un 40-50% de la actividad de las fitasas, añadidas a la dieta de cerdos, se detecta en el estómago y sólo entre 16 y 30% en el tramo superior del intestino delgado.

2.5 Utilización de fitasa en alimentación de peces.

El fósforo es considerado un mineral esencial para todas las formas de vida, incluyendo los peces. Estos pueden obtener un número sustancial de minerales necesarios directamente de su alimentación acuática, pero el fósforo es un mineral esencial que debe ser suplido a través de la dieta (Lall, 2002). El fósforo es un componente estructural de los tejidos duros como huesos y dientes, además es un constituyente de varias coenzimas, fosfolípidos y ácidos nucleicos y también está involucrado en el metabolismo energético. Los requerimientos dietarios de fósforo en diferentes especies de peces han sido reportados en un rango bastante amplio entre 0,3 y 0,9% en la dieta (Lall, 2002). En general, para los peces salmonídeos se necesita un aporte real en la dieta de 0,5%- 0,6% para una normal mineralización de los huesos y óptimo crecimiento (Ketola y Richmond, 1994).

En estudios realizados con salmón atlántico, la retención de fósforo no supera el 22%, por lo que cerca del 80% de éste se elimina en las excretas. El tratamiento o manejo de efluentes por si solo, no necesariamente reduciría la cantidad de fósforo presente, debiéndose realizar de todas formas la eliminación o reducción del fitato en las dietas (Ketola y Harland, 1993).

El fósforo excedente, incrementa el crecimiento del fitoplancton y el crecimiento de las algas, lo que reduce el oxígeno disuelto a través del aumento de la respiración bacteriana que descompone la materia orgánica. La disminución de la calidad del agua deja a los peces más propensos a adquirir enfermedades, lo que significa aumentar los costos de producción por las necesidades de medicarlos con antibióticos. Otro efecto importante es el desarrollo de sabores y pigmentación no deseada en la carne del pez, ocasionado principalmente por la ingestión de

protozoos y microalgas, organismos que son más abundantes en aguas con baja concentración de oxígeno (Robinson *et al.*, 1996).

Una estrategia para reducir el exceso de fósforo dietario, es reemplazar la harina de pescado en la dieta por fuentes proteicas alternativas. Fuentes promisorias incluyen ingredientes como harina de canola o proteína de canola concentrada, que han demostrado ser equivalente en aminoácidos esenciales y de alta aceptabilidad en dietas de truchas y salmones. Estos concentrados generalmente tienen entre un 5,5- 7,5% de ácido fítico (Forster y Higgs, 1999). También se están utilizando el trigo, el lupino, la soya, entre otras.

La principal desventaja de las proteínas vegetales es que, aunque contienen mucho menos fósforo, alrededor de 60 a 70% de éste se encuentra en la forma de fósforo fítico que no puede ser digerido por los animales monogástricos incluyendo los peces (Ketola y Richmond, 1994).

Suplementar con fitasas microbianas el alimento para peces con alto contenido de proteína vegetal, incrementa la biodisponibilidad del fósforo (Cain y Garlin, 1995; Eya y Lovell, 1997; Li y Robinson, 1997; Sugiura *et al.*, 2001).

Experimentos con carpa, mostraron mejorar la utilización del fósforo fítico así como la reducción de fósforo en la excreción. En un experimento realizado con pez gato de 6,5 g de peso y alimentados con cinco dietas diferentes que contenían ya sea 1, 50, 1000, 2000, 4000, FTU por kg de dieta durante 10 semanas, se encontró que en los peces alimentados con dietas que contenían más de 500 FTU de fitasa microbiana por kilo de alimento consumido, el incremento de peso fue mayor comparado con los peces, alimentados con la dieta basal sin la suplementación de fitasa. En cuanto a la supervivencia de los peces no hubo diferencia entre los tratamientos.

Estos resultados mostraron que la ganancia de peso, eficiencia alimenticia, mineralización y fósforo de los huesos fue más elevada y la relación conversión - alimentación fue más alta para peces alimentados con dietas suplementadas con fitasa en comparación a las dietas no suplementadas. La concentración de fósforo en las fecas disminuyó linealmente con el aumento en el nivel de fitasa, con lo que se demuestra que la utilización de fitasa comercial es efectiva para mejorar la disponibilidad del fósforo fítico (Jackson *et al.*, 1996).

Yan y Reigh, en el 2002 demostraron, en un nuevo estudio en pez gato (*Ictalurus punctatus*), que dietas con alto contenido de proteína vegetal y con altas concentraciones de cenizas, calcio, fósforo y manganeso, al suplementarla con 500 unidades de fitasa por kilo de alimento, fue suficiente para mejorar la retención de éstos minerales y su utilización por el pez.

Cabe mencionar que los salmones mantienen una reserva de fósforo en los tejidos duros que puede ser liberado en periodos cortos de tiempo para compensar una inadecuada entrega de este mineral en la dieta, por lo tanto, cuando los salmones son alimentados con una dieta deficiente de fósforo, ellos sacan y utilizan sus reservas del cuerpo hasta que son agotadas (Hardy *et al.*, 1993).

En salmonídeos, el nivel efectivo de inclusión de fitasa en dietas que contienen altas concentraciones de ácido fítico no ha sido definido. Sin embargo, se sugiere que las altas temperaturas usadas en el procesamiento de extrusión de dietas peletizadas para salmones, deben reducir drásticamente la actividad de la enzima fitasa. Por lo tanto, se recomienda que la enzima no se incorpore a la dieta antes de la extrusión, sino que debe ser aplicada externamente al “*pellet*” (Forster y Higgs, 1999).

En animales terrestres, la fitasa es adicionada al alimento terminado y su acción ocurre en el intestino del animal, la temperatura de éstos es de 37° C donde la actividad de la enzima es cercana a un 60%. En salmones las temperaturas que se trabajan en los viveros son bajas, donde la actividad de la enzima es de aproximadamente 10 a 30% (Engelen *et al.*, 1994). Debido a esto, se hace necesario estudiar tratamientos previos del alimento para peces, otorgando a la enzima condiciones más adecuadas y controladas.

2.6 Métodos de análisis de ácido fítico.

El AF no tiene un espectro de absorción característico y por tanto su determinación ha constituido un problema analítico durante muchos años. Hasta 1980, el AF era exclusivamente determinado a través de métodos de precipitación no específicos o de intercambio iónico. En la actualidad, aunque algunos de los métodos anteriores siguen vigentes, el empleo de procedimientos en los que se incluyen HPLC en fase reversa, cromatografía de par iónico o RMN son muy utilizados.

Debido a que los inositoles fosfatos no tienen un espectro de absorción característico, su detección mediante análisis HPLC (*High Performance Liquid Chromatographic*) está limitada a métodos que emplean monitoreo del índice de refracción, determinación de productos de reacción postcolumna o detección indirecta, entre otros (Xu *et al.*, 1992). En muchos de ellos la etapa inicial de obtención de fitatos se realiza mediante intercambio iónico o precipitación. Así el método desarrollado por Graf y Dintzis (1982) combina un método de intercambio iónico (Kaur y Kapoor, 1990) con HPLC en una columna C₁₈, la técnica utilizada por Camire y Clydesdale (1982) se basa en la precipitación del AF como fitato férrico, seguida de su conversión en fitato sódico antes de ser inyectado en una columna C₁₈ y en el método de Lehrfeld y Morris (1992) la

separación de los inositoles fosfatos se realiza según el método de Harland y Oberleas (1986) en donde la solución resultante es concentrada y analizada por HPLC. Recientemente, Talamond *et al.* (2000) desarrollaron un método HPLC con intercambio aniónico para la detección del AF en alimentos, empleando la conductividad como sistema de detección.

Entre las ventajas que presenta el HPLC en la determinación del AF, se debe destacar que los distintos inositoles fosfatos son determinados como entidades independientes, permitiendo la cuantificación del AF, mioinositol e incluso los distintos isómeros en diversas mezclas (Lehrfeld y Morris, 1992).

El HPLC permite además la cuantificación de inositol fosfato en presencia de nucleótidos, que en otros métodos de análisis pueden interferir en la determinación del AF (Phillippy *et al.*, 1992). En los alimentos que contiene carne, pescado, extracto de levadura o cereales germinados, los nucleótidos se encuentran de forma natural y en algunos alimentos procesados es común su adición como potenciadores del sabor. Por lo tanto en los alimentos procesados (los cuales generalmente contienen inositol parcialmente fosforilados como consecuencia de la hidrólisis del AF) la determinación del AF debería realizarse por HPLC (Lehrfeld y Morris, 1992).

2.7 Validación de metodologías analíticas.

La validación es el proceso usado para confirmar que un procedimiento analítico empleado para un test específico es adecuado al uso proyectado. Esto proporciona un alto grado de confiabilidad y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados obtenidos.

Los parámetros que se incluyen en el proceso de validación son: Linealidad, Precisión, Exactitud/ Recuperación, Sensibilidad y Selectividad.

2.7.1 Linealidad.

La linealidad corresponde a la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado, y por lo tanto indica la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta.

La prueba de linealidad se puede realizar sobre soluciones patrón del analito o muestras problema que contengan concentraciones crecientes de analito, efectuándose posteriormente el tratamiento estadístico de los resultados analíticos. Para esto se realiza una curva de calibración que relaciona la concentración o cantidad de analito con la respuesta generada (áreas, altura, etc.). Se determina la curva de regresión del tipo $y = bx + a$, donde y es la respuesta, b la pendiente, x la concentración y a el término independiente (Castro *et al.*, 1989).

2.7.2 Precisión.

La precisión es un parámetro relacionado con la dispersión de las medidas con respecto a su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de la misma muestra.

La precisión indica el grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de trabajo, es decir la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra.

Un estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre una muestra. La precisión así obtenida se denomina “del método” puesto que incluye todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta la lectura instrumental. También se puede determinar la precisión del “sistema instrumental” hallando la variabilidad de respuesta de una solución patrón (Castro *et al.*, 1989; Torroba y Vivino, 2000).

Dentro del término precisión del método se pueden distinguir tres tipos de estudios:

- Repetibilidad: es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un corto intervalo de tiempo.
- Reproducibilidad: es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.).
- Robustez: el estudio de robustez evalúa los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico (Castro *et al.*, 1989; Torroba y Vivino, 2000).

2.7.3 Exactitud-Recuperación.

Este parámetro, también llamado error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. La exactitud describe la veracidad de los resultados experimentales y la capacidad del método analítico para dar resultados lo más

próximos posibles al valor verdadero. Se determina aplicando el método a muestras que contienen cantidades iguales y conocidas del analito en la matriz (valor verdadero). Este parámetro se determina mediante los porcentajes de recuperación (**R**) del analito y se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\mathbf{R} = (\mathbf{X}/\mathbf{X}_0) \times 100$$

Donde **X** corresponde al valor medio y **X₀** el valor verdadero.

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de Porcentaje de Recuperación del analito presente en la muestra. Estadísticamente se realiza un *t Student* para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinada (Castro *et al.*, 1989; Torroba y Vivino, 2000).

2.7.4 Sensibilidad.

La sensibilidad es un parámetro que da cuenta de la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo o que puede determinarse en una muestra con razonable precisión y seguridad. Este parámetro se evalúa determinando:

2.7.4.1 Límite de detección.

Corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc). Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supera la relación señal/ruido en un factor de 2 ó 3 (Quattrocchi *et al.*, 1992).

2.7.4.2 Límite de cuantificación.

Corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración. Se mide la señal de fondo (relación señal/ruido), efectuando mediciones repetidas sobre un blanco o placebo, se mide su desviación estándar y se calcula el límite de cuantificación multiplicando esa desviación estándar por un factor igual a 10. El valor resultante se valida por análisis de un número variable de muestras de concentración cercana al límite fijado (Quattrocchi *et al.*, 1992).

Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse analizando una serie de blancos de la muestra ($n = 10$) y se calcula la media \bar{X}_b y la desviación estándar S_b de las respuestas obtenidas. A partir de estos valores, existen diferentes expresiones en las que interviene la sensibilidad (pendiente de la recta de calibración) y que dan una estimación de los límites de detección y cuantificación expresados en unidades de concentración (C.E.E., 1999).

Para el límite de detección y cuantificación se aplica la siguiente fórmula en el caso de procedimientos cromatográficos, tales como HPLC.

$$L(x) = \bar{X}_b + K \cdot S_b$$

b

$L(x)$ = Límite de cuantificación o detección.

K = constante ≥ 3 .

Usualmente $K = 3$ para el límite de detección y $K = 10$ para el límite de cuantificación.

S_b = Desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración a bajas concentraciones (C.E.E., 1999).

2.7.5 Selectividad.

La selectividad de un método analítico es la capacidad de medir un analito en presencia de interferencias que puedan estar presentes en la matriz de la muestra, así también como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra. La selectividad de un método analítico se puede determinar comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con los resultados del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias (Castro *et al.*, 1989).

Una de las formas de determinar la selectividad es analizando el tiempo de retención, éste sirve como primera base para la identificación del pico, pero esto no siempre resulta. En el caso de disponer de estándares, la coinyección de éstos y la comparación cuidadosa de los cromatogramas resultantes puede servir como primera aproximación (Quattrocchi *et al.*, 1992).

2.8 Hipótesis.

El alto contenido de proteína vegetal utilizada en la formulación de alimentos para peces produce efectos antinutricionales, principalmente por la presencia de ácido fítico y sus derivados altamente fosforilados. La incorporación de la enzima fitasa en los *pellets* de alimentos para salmones, disminuye los niveles de ácido fítico y sus derivados.

2.9 Objetivos.

2.9.1 Objetivo General.

Modificar y validar un método de cuantificación para ácido fítico y mioinositol, por Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alta Resolución acoplada a detector de Índice de Refracción (IR) y determinar la presencia y cantidad de estos analitos tanto en alimentos como en contenido intestinal de salmones.

2.9.2 Objetivos Específicos.

- Desarrollar un método de extracción de ácido fítico y mioinositol a través de Cromatografía de Intercambio Aniónico desde *pellets* de alimentos para salmones.
- Desarrollar un método de extracción de ácido fítico y mioinositol a través de Cromatografía de Intercambio Aniónico desde contenido intestinal de salmones.
- Realizar modificaciones, si fuese necesario, del método de separación, identificación y cuantificación de ácido fítico y mioinositol mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alta Resolución acoplada a detector de Índice de Refracción.

- Validar mediante los parámetros de precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, los procedimientos de extracción y cuantificación de ácido fólico y mioinositol tanto en alimentos como en contenido intestinal de salmón.
- Aplicar el método a dos tipos de matrices, alimento y contenido intestinal de salmón, con el propósito de evaluar el efecto de la actividad de la fitasa en la formulación.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos.

- Acetato de sodio de Merck.
- Acido acético de Merck.
- Ácido clorhídrico de Caledon Laboratories L.T.D.
- Agua desionizada de Merck.
- Éter de petróleo de Merck.
- Hidróxido de Sodio de Arquimed.
- Inositol Hexafosfato de Sigma Chemical Co.
- Mioinositol de Sigma Chemical Co.
- Resina Dowex tipo I (Trimethylbenzyl ammonium) de Sigma Chemical Co.

3.2 Muestras.

- Alimento de Salmón formulado con y sin la enzima Fitasa Ronozyme® P (CETECSAL S.A.).
- Contenido intestinal de Salmón alimentados con *pellets* con fitasa y/o *pellets* de alimento control (CETECSAL S. A).

3.3 Materiales.

- Agitador magnético VWR modelo 320.
- Balanza analítica digital AA 200 de ARQUIMED.
- Baño de agua BM 100 Yamato.
- Bomba cuaternaria Jasco PU – 2089 plus de IVENS S.A.
- Bomba de vacío Lammert 10302.

- Centrífuga P. Selecta Mixtasel 96.
- Columna KR 100 – 5NH₂ Kromasil, tamaño 250 X 4,6 mm de IVENS.
- Detector: RI – 71 Differential refractometer (Merck).
- Filtros 0.22 µm Millipore de Advantec MFS.
- Material usual de laboratorio: baguetas, micropipetas, espátulas, etc.
- PH METER Microprocessor HI 9321 de HANNA instruments.
- Rotavapor Yamato RE 200.
- Software Jasco ChromPass Chromatography Data System connection V. 1.7.403.1.
- Sonicador Ultrasonik modelo 20 T/H.

3.4 Metodología analítica.

3.4.1 Condiciones cromatográficas.

Fase móvil.

Acetato de sodio 35 mM ajustada a pH = 7,0 con ácido acético 5,0 % p/v. Esta solución fue preparada con agua desionizada grado HPLC y luego fue filtrada con filtro 0,22 µm y desgasificada por sonicación durante 10 minutos.

Fase estacionaria.

- Columna:

Kromasil®, KR 100 – 5NH₂, tamaño 250 x 4,6 mm (5 µm). La columna se estabiliza por un periodo de 20 – 30 minutos con la fase móvil.

- Bomba cuaternaria Jasco PU – 2089 plus equipada con loop de 20 µl e inyector Rheodyne modelo 7125.

- Detector RI – 71 Differential refractometer (Merck).
- Velocidad de flujo: 0,8 ml/min.
- Temperatura ambiente.

3.4.2 Extracción de ácido fítico y mioinositol desde alimento y contenido intestinal de salmón.

1. Se pesó 1,0 gramo de alimento y/o contenido intestinal de salmón.
2. Se agregaron 20 ml de HCl 0,5 M y la mezcla fue sonicada por 30 minutos (Lehrfeld, 1989).
3. La mezcla fue sometida a agitación constante por una hora.
4. Transcurrido este tiempo la totalidad de la mezcla es centrifugada a 6.000 rpm por 30 minutos.
5. Después de esta etapa se filtró la suspensión en papel W-N° 1 y la solución obtenida fue neutralizada con NaOH 0,250 M/ EDTA 5mM (Graf y Dintzis, 1982).
6. El volumen total de esta última solución se mezcló con igual volumen de éter de petróleo en embudo de decantación y transcurridos 15 minutos de agitación vigorosa, se procedió a recuperar la fase acuosa.
7. La fase acuosa fue nuevamente filtrada en papel W- N° 1 y por último se realizó una filtración en filtro 0,22 μm .
8. La muestra filtrada fue sometida a una cromatografía de intercambio aniónico con el propósito de purificar y concentrar la muestra. Para esto el volumen total, aproximadamente 20 ml, de la solución filtrada, en el punto 7, se hizo pasar a través de la columna con resina Dowex tipo I que había sido previamente equilibrada con HCl 50 mM.

9. Después de la aplicación de la muestra, la resina fue lavada con tres alícuotas de 5 ml de NaCl 100 mM, a continuación se hicieron pasar 20 ml de agua desionizada.
10. Para eluir los inositoles retenidos en la resina se adicionaron 10 ml de HCl 2,0 M a un flujo aproximado de 0,5 ml/min.
11. Una alícuota de 6 ml del eluato (aprox. 10 ml) fue evaporada a sequedad completa en rotavapor a 40 ° C (2 horas).
12. El residuo final fue reconstituido en 4 ml de fase móvil y analizado por HPLC-IR.

3.4.3. Diseño de las curvas de calibración de mioinositol y ácido fítico.

3.4.3.1 Mioinositol.

Para diseñar esta curva de calibración se tomó como referencia valores de mioinositol obtenidos por Olavarría (2005) para distintas muestras vegetales. Se estimó que, en promedio, la formulación de alimento para salmón contiene aproximadamente un 35% de materias primas vegetales (BASF), por lo tanto se probaron una serie de concentraciones de estándares: 0,20 mg/ml, 0,40 mg/ml, 0,60 mg/ml y 0,80 mg/ml, esto con el propósito de verificar en las dos matrices en estudio (alimento y contenido intestinal de salmón), si esta curva de calibración era útil para los niveles de mioinositol presente en ellas.

Cada punto de esta curva de calibración se realizó por triplicado y se utilizó como solvente la fase móvil acetato de sodio 35 mM pH 7,0. Una vez preparada, cada solución, se filtró con filtros 0,22 µm y se inyectó al sistema, el cual había sido previamente equilibrado con la misma fase móvil.

3.4.3.2 Ácido fítico.

Para el diseño de la curva de calibración de ácido fítico, básicamente se utilizaron los mismos criterios que para mioinositol, es decir, extrapolaciones obtenidas desde análisis de matrices vegetales (Olavarría, 2005) y los antecedentes bibliográficos reportados por industrias alimenticias del rubro (BASF). Con esta información se diseñó una curva de calibración con cuatro niveles y cada uno de ellos fue realizado en triplicado: 0,50 mg/ml, 1,00 mg/ml, 1,50 mg/ml y 2,00 mg/ml. Es importante señalar que se contaba con un estándar de fitato de sodio, por lo tanto se debió hacer una corrección en el cálculo y pesada a la hora de preparar cada nivel (Ejemplo de cálculo 1, en anexo N° 3). Al igual que con el estándar de mioinositol, cada uno de los niveles de ácido fítico fue disuelto en fase móvil.

3.4.4 Montaje de la columna de intercambio aniónico (C.I.A).

Para mayor purificación del extracto obtenido, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico utilizándose una resina Dowex tipo I.

- Se pesó 3,0 gramos de resina y se colocaron en una columna de vidrio de 10 cm de longitud por 1,2 cm de diámetro interno en cuyo extremo había un filtro de lana de vidrio.
- Con la finalidad de estabilizar e hidratar la resina se lavó con 250 ml de HCl 50 mM asimismo cada vez que la columna no se utilizaba se dejaba cubierta con este mismo ácido.
- Esta columna fue de vital importancia para la purificación y concentración de los inositoles extraídos desde las matrices en estudio (3.4.2).

3.4.5. Validación.

3.4.5.1 Linealidad.

Para determinar la linealidad del mioinositol se inyectó el analito en concentraciones 0,20 mg/ml, 0,40 mg/ml, 0,60 mg/ml y 0,80 mg/ml por triplicado. En tanto que para el caso del ácido fólico las concentraciones fueron 0,50 mg/ml, 1,00 mg/ml, 1,50 mg/ml y 2,00 mg/ml. Las condiciones en que se realizó el procedimiento fueron el mismo instrumento y reactivos, además la inyección fue hecha por un solo analista en un solo día y en cortos intervalos de tiempo entre cada análisis. A continuación, con los datos obtenidos, se determinó los coeficientes de correlación (r), (r^2) y el grado de significación con una tabla de prueba de coeficiente de correlación.

3.4.5.2 Determinación de la precisión del sistema instrumental.

3.4.5.2.1 Determinación de la repetibilidad.

Para determinar este parámetro se utilizaron las concentraciones 0,40 mg/ml y 0,60 mg/ml para mioinositol, en tanto que para ácido fólico se usó 0,50 mg/ml, y 1,50 mg/ml. Luego la determinación de la precisión se realizó evaluando la dispersión de 10 inyecciones por cada nivel de concentración en condiciones de repetibilidad, mezclando las cantidades de analitos necesarias para obtener 0,40 mg/ml de mioinositol con 0,50 mg/ml de ácido fólico y 0,60 mg/ml de mioinositol con 1,50 mg/ml de ácido fólico, respectivamente.

Los estimadores de la precisión del sistema instrumental son la desviación estándar (S.D.) y coeficiente de variación (C.V.), que permiten evaluar la incertidumbre (error aleatorio) en la estimación de la medida.

3.4.5.2.2 Determinación de la reproducibilidad.

Esto se determina a través del coeficiente de variación y se considera suficiente efectuar ensayos tomando en cuenta solamente la variable de tiempo entre los análisis. La metodología se basó en inyectar, por duplicado, durante cinco días diferentes una mezcla de mioinositol y ácido fólico de concentraciones 0,80 mg/ml y 2,00 mg/ml, respectivamente. A partir de estos resultados se determinó el promedio, la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.V.).

3.4.5.3 Determinación de la precisión del método.

3.4.5.3.1 Determinación de la repetibilidad.

Para determinar este parámetro se realizó un estudio bajo condiciones de repetibilidad, a todo el método analítico, el cual se llevó a cabo en un periodo aproximado de seis días y en condiciones de repetibilidad, es decir: mismo equipo, laboratorio analista, etc. En este estudio se trabajó con dos matrices diferentes, alimento para salmones y contenido intestinal de salmón, por lo cual se debió realizar la repetibilidad del método para cada una de ellas. Para ello se realizaron 6 determinaciones para 1,0 gramo de alimento de salmones y 1,0 gramo de contenido intestinal de salmón, de las cuales se determinó mioinositol y ácido fólico y se calculó el promedio de las lecturas, la S.D. y el C.V.

3.4.5.3.2 Determinación de la reproducibilidad.

Para la determinación de este parámetro, se realizó análisis en duplicado para 1,0 gramo de alimento y 1,0 gramo de contenido intestinal de salmones. Este procedimiento se realizó en cuatro días diferentes y se consideró el tiempo como única variable, luego a partir de los resultados obtenidos se determinó el promedio, la S.D. y el C.V.

3.4.5.4 Exactitud –Recuperación.

Para realizar este ítem se hicieron mediciones de mioinositol y ácido fólico en las dos matrices en estudio, alimento y contenido intestinal de salmón, por triplicado. Una vez conocida la cantidad de estos analitos en 1,0 gramo de cada matriz, se realizó la recuperación de 5,0 y 10,0 mg para el caso de ácido fólico y de 2,5 y 5,0 mg para mioinositol.

Una vez que se pesó la cantidad del analito, 2,5 y 5,0 mg para el caso del mioinositol y 5,0 y 10,0 mg para el caso del ácido fólico, se mezcló con 1,0 gramo de cada matriz y a continuación se realizó el procedimiento de extracción y cuantificación.

Finalmente a los resultados de la cantidad promedio de las muestras mezcladas con cantidades definidas de los analitos, se les resto la cantidad promedio del ácido fólico y mioinositol que estaban presentes de manera constitutiva en cada matriz. Luego se procedió a calcular el promedio, S.D., C.V. y porcentaje de recuperación.

3.4.5.5 Sensibilidad.

Para la determinación de la sensibilidad se aplicó el método de análisis repetido del blanco de la muestra.

Se realizó una curva de calibración a baja concentración para ambos analitos. Para inositol se trabajó con 0,10 mg/ml, 0,20 mg/ml, 0,30 mg/ml y 0,40 mg/ml, en tanto que para ácido fólico se usaron los siguientes niveles: 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml, 0,75 mg/ml y 1,00 mg/ml. Cada nivel, en ambas curvas de calibración fue inyectado por triplicado y de la ecuación de esa recta se determinó la pendiente b .

A continuación, se realizó el análisis de 10 blancos de la muestra, calculando la media de la respuesta del blanco (Y_{bl}) y la desviación estándar de las respuestas obtenidas (S_{bl}). Con todos estos datos se calculó el Límite de detección y el Límite de cuantificación como está indicado en el punto 1.6.4.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de Linealidad.

El objetivo principal de este estudio fue determinar cuantitativamente niveles de ácido fítico, en formulaciones de alimento para salmones que contienen proteína vegetal, cuando éstas estaban en presencia y/o ausencia de la enzima fitasa. Los antecedentes bibliográficos de similares experimentos, realizados en otras especies animales, como aves y cerdos (Young *et al.*, 1993; Akyurek *et al.*, 2005), mostraron importantes e interesantes resultados que avalaban la utilización de este tipo de formulación en animales monogástricos.

En Chile, no existen estudios similares que describan el efecto de la adición de la enzima fitasa en el alimento de salmón, lo cual es una contradicción puesto que hoy en día las nuevas formulaciones de *pellets* contienen altos porcentajes de proteínas vegetales.

Una gran limitante para llevar a cabo estos ensayos fue la inexistencia de un método analítico tipo HPLC que fuese capaz de cuantificar ácido fítico en matrices complejas. Sin embargo, Olavarría (2005) modificó y desarrolló un método de determinación, separación y cuantificación de ácido fítico y mioinositol desde matrices vegetales, lo cual dio pie para la realización de este estudio.

Este procedimiento HPLC fue realizado en matrices vegetales, por lo tanto, para hacer este estudio fue necesario validar el procedimiento en matrices tales como *pellets* y contenido intestinal de salmón, antes de poder obtener resultados que indicaran el efecto del uso de fitasa en las formulaciones.

Uno de los problemas de esta investigación, fue el hecho de que no se contaba con bibliografía que señalara los porcentajes aproximados de los analitos presentes en las formulaciones de *pellets*. Por lo tanto, para diseñar la curva de calibración de mioinositol y ácido fólico se partió de la base que las actuales formulaciones de alimentos para salmones contienen aproximadamente un 35 % de proteína vegetal (BASF) y además, de los resultados obtenidos por Olavarría (2005) en diferentes matrices vegetales. Con estos datos se realizó la suposición de que los *pellets* contenían ácido fólico provenientes, sólo de la matriz con mayor nivel de éste analito (trigo, 44 mg/g), es decir, aproximadamente 15,4 mg/g de *pellet*. Luego, a partir de esta estimación se realizó la curva de calibración según punto 3.4.3.2. Para el caso de la curva de calibración de mioinositol las aproximaciones realizadas fueron similares a las del primer analito, por lo cual, en esta matriz se estimó un valor aproximado de 4,2 mg/g de mioinositol y se realizó la curva según punto 3.4.3.1.

Mediante la extracción de los inositoles desde alimento y contenido intestinal de salmón y su posterior análisis a través de HPLC se encontró que los niveles de ácido fólico y mioinositol en su gran mayoría, entraban en los rangos de concentración establecidos. De ahí a que se utilizara las mismas curvas de calibración para ambas matrices.

Una vez establecidos los rangos de concentración de análisis para cada analito, se realizó el ensayo de linealidad a la mezcla de mioinositol y ácido fólico en las concentraciones que se describen en métodos 3.4.3.1 y 3.4.3.2. Los resultados de estas curvas de calibración se muestran en las figuras 8 y 9 (Anexo N° 1), de las cuales se obtuvieron las respectivas ecuaciones de regresión tanto con sus valores (r) y (r^2) (Tabla 1, en anexo N° 2).

Según estos datos se puede concluir que:

- Para ácido fítico la variable independiente explica un 99,71% de la varianza total de y .
- Para mioinositol la variable independiente explica un 99,67% de la varianza total de y .

Sin embargo, el mejor indicador de modelo lineal no es (r) sino un t estadístico, en el cual se calcula el valor de un t_r con $n-2$ grados de libertad y se compara con el t tabulado para el nivel de confianza requerido, en este caso $p = 0,05$ y probabilidad superior al 95% (Quattrocchi *et al.*, 1992).

Los valores de t_r obtenidos para mioinositol y ácido fítico son (Ejemplo de cálculo 2, en anexo N° 3):

- ácido fítico t_r **58,64** >> t_{tabla} **2,228**
- mioinositol t_r **54,95** >> t_{tabla} **2,228**

Así, se puede afirmar con un 95% de confianza que existe correlación entre los datos obtenidos en la curva de calibración, por lo tanto, para las concentraciones entre 0,20 - 0,80 mg/ml para mioinositol y 0,50 - 2,00 mg/ml para ácido fítico hay una linealidad aceptable.

4.2 Precisión del sistema instrumental.

4.2.1 Repetibilidad del sistema instrumental.

Las tablas 2, 3 y 4 (Anexo N° 2) muestran que todos los valores de coeficientes de variación promedio (C.V.), de la determinación de repetibilidad del sistema instrumental, son inferiores a 1,0% para ambos analitos y la USP indica en general un coeficiente de variación del sistema de no más de 2,0% como criterio de aceptación.

Los valores de C.V promedio se compararon con una tabla de concentración de analito versus precisión de la A.O.A.C. (Association of Oficial Analytical Chemist) y se encontró que los

valores estaban dentro del rango aceptable, puesto que para las concentraciones que van de 0,10 a 1,00 mg/ml el C.V. tiene que ser inferior a un 5,3 o 3,7%. Por lo tanto, el sistema es preciso bajo condiciones de repetibilidad.

4.2.2 Reproducibilidad del sistema instrumental.

Los valores de coeficiente de variación promedio de las lecturas en duplicado, tanto para mioinositol como para ácido fólico, 0,80 mg/ml y 2,00 mg/ml respectivamente, realizado durante 5 días, están dentro del rango aceptado por la A.O.A.C, el cual se encuentra entre 5,3 y 3,7% para concentraciones que van entre 0,10 y 1,00 mg/ml (Tablas 5, 6 y 7, en anexo N° 2).

4.3 Precisión del método.

4.3.1 Repetibilidad del método.

La repetibilidad del método se realizó para las dos matrices en estudio, alimento y contenido intestinal de salmón, como se describe en métodos punto 3.4.2. En las tablas 8, 9, 14 y 15 (Anexo N° 2) se informaron las cantidades de los analitos extraídos desde estas dos matrices (Ejemplo de cálculo 3, en anexo N° 3).

A partir de estos valores se calculó el coeficiente de variación, tanto para mioinositol como para ácido fólico y luego de compararlos con la tabla de referencia de la A.O.A.C., se concluyó que estaban dentro del rango aceptado.

4.3.2 Reproducibilidad del método.

La determinación de la reproducibilidad del método se realizó en duplicado durante 4 días para cada una de las matrices, alimento y contenido intestinal de salmón. El método se consideró preciso bajo condiciones de reproducibilidad, ya que teniendo en cuenta la variable tiempo, se obtuvo para mioinositol y ácido fítico un C.V. aceptado por la A.O.A.C. (Tablas 10, 11, 16 y 17, en anexo N° 2).

4.4 Exactitud/ Recuperación.

El ensayo de exactitud/ recuperación consistió en determinar por triplicado la cantidad de los analitos en 1,0 gramo de cada una de las matrices en estudio. Con este dato se mezcló cantidades fijas de alimento y contenido intestinal de salmón (1,0 g), con los analitos en sus cantidades correspondientes (3.4.5.4).

A continuación, se realizó la extracción de mioinositol y ácido fítico desde cada mezcla y se calculó los porcentajes de recuperación. Las tablas 12 y 13 (Anexo N° 2) promedian un 86% de recuperación para el alimento de salmón en tanto, que en las tablas 18 y 19 (Anexo N° 2) se puede apreciar un 89% de recuperación para contenido intestinal (Ejemplo de cálculo 4, en anexo N° 3). Estos valores para el nivel de cantidad/ concentración versus recuperación de los analitos, están fuera del rango aceptado por la A.O.A.C., el cual se encuentra entre el 90 -105% de recuperación.

Con el propósito de confirmar el resultado obtenido, se aplicó como segunda metodología de análisis, el método de *t de student*. Para ello se calculó el t_{exp} de cada uno de los analitos (Tabla 20, en anexo N° 2 y ejemplo de cálculo 5, en anexo N° 3) y se comparó con el t_{tabla} con $p = 0,05$ y $n-1$ grados de libertad, para ácido fítico y mioinositol, el cual es de 2,571.

El t_{exp} para el ácido fólico y mioinositol fue de 11,32 y 8,16 respectivamente en alimento de salmón, en tanto que los valores de t_{exp} en contenido intestinal fueron de 9,68 para el ácido fólico y de 7,12 para mioinositol. Estos valores son mayores al t_{tabla} por lo tanto, existen diferencias significativas entre las recuperaciones medias y 100%, por lo cual el método no tiene la exactitud requerida.

Así, se confirma por dos métodos estadísticos que el procedimiento de análisis de inositoles desde estas matrices, no es exacto. Esto puede deberse a las características de las matrices en estudio, principalmente en el alimento de salmón, cuya composición presenta altos niveles de grasa, las cuales aumentan el número de etapas del proceso de extracción de los analitos y probablemente generan pérdidas considerables de los mismos.

Desde el punto de vista analítico se requiere idealmente que un método de análisis sea preciso y exacto, sin embargo, cuando esta última característica no es obtenida, el método igualmente es válido si presenta la precisión de acuerdo al tipo de análisis para el cual fue diseñado y/o a los límites establecidos por la A.O.A.C. Así, esto es fácil de entender si se toma en cuenta un número determinado de ensayos en los cuales existe una buena precisión, pero no son exactos en relación al valor verdadero, luego esto se podría corregir adecuando los límites de eficiencia del sistema de modo que exista la menor diferencia posible experimental, entre el valor verdadero y el medido. Por otro lado, en un método solamente exacto es posible que un porcentaje determinado de los ensayos corresponda al valor verdadero, sin embargo, al carecer de precisión el método no sería confiable para un determinado número de análisis.

4.5 Sensibilidad.

Los resultados de la determinación de sensibilidad se aprecian en las figuras 10 a 13 (Anexo N° 1). Si bien los límites de detección y cuantificación para cada uno de los analitos son distintos entre ellos, todos se encuentran sobre el límite de detección del equipo, el cual corresponde a 0,1 – 1,0 ug.

4.6 Análisis de muestras.

Las tablas 21 y 22 (Anexo N° 2) muestran los resultados obtenidos en relación a los niveles de mioinositol y ácido fítico, detectados en alimento y contenido intestinal de salmón, ajustados en base al porcentaje de recuperación respectivo (Ejemplo de cálculo 6, en anexo N° 3). La diferencia entre los niveles de ácido fítico en *pellets*, con y sin fitasa, fue en promedio de un 21,0%, es decir, el primero de estos mostró una disminución de 1,1 mg de ácido fítico posiblemente por la acción de la enzima (fitasa) (Figuras 4 y 6). Sin embargo, cuando se comparó la diferencia en las cantidades de mioinositol obtenidos para ambas formulaciones de *pellets*, ésta fue sólo de un 7,0 %. Este último resultado podría sugerir que la actividad enzimática de la fitasa generaría bajos niveles de mioinositol en las condiciones en las que se encuentra el *pellet*.

Al observar las figuras 4, 5, 6 y 7, se puede apreciar que entre el pick de ácido fítico y de mioinositol hay presencia de otros analitos que perfectamente podrían ser inositoles parcialmente fosforilados, luego esto apoyaría la posibilidad de que la hidrólisis del ácido fítico es producida tanto, por la acción de la fitasa adicionada a los *pellets*, como por las altas temperaturas utilizadas durante la formulación de los *pellets*, luego el producto de esta reacción no sería necesariamente mioinositol, sino más bien inositoles en diversos estados de fosforilación.

Por otro lado, la presencia de los niveles de mioinositol relativamente constantes en ambas formulaciones de alimentos e incluso en ambas matrices, podría deberse sólo al contenido de proteína vegetal utilizada como materia prima y a la actividad fitásica endógena (Olavarría, 2005).

Al comparar el contenido intestinal de salmones alimentados con *pellets* sin fitasa versus los alimentados con *pellets* con la enzima, se observó una gran disminución en los niveles de ácido fítico, que alcanzó un valor aproximado de un 57,0%.

No obstante, la mayor diferencia fue evidente al comparar las dietas utilizadas, es decir, *pellets* y contenido intestinal sin fitasa versus *pellets* y contenido intestinal con fitasa. En esta última dieta, se obtuvo un 54,0% de disminución de ácido fítico con respecto al nivel inicial del *pellet*, mientras que en la formulación sin fitasa se obtuvo un valor aproximado de un 15,4%. Este último podría sugerir el nivel de hidrólisis normal que sufre el ácido fítico a través del tracto digestivo del salmón, ya sea por actividad de fosfatasas endógenas y/o de fitasas bacterianas propias el intestino grueso del pez. Por lo tanto, si esto fuese así, la actividad de la fitasa adicionada a la dieta sería el resultado de la diferencia entre el 54,0% y 15,4%, es decir, la enzima reduciría en un 38,0% el ácido fítico presente en los *pellets*.

Esta reducción no implicaría necesariamente la hidrólisis completa hasta mioinositol, pues si se observa en la tablas 21 y 22 (Anexo N° 2), éste analito no varía significativamente, en tanto que aumentarían los inositoles parcialmente fosforilados, tal y como, se sugiere en todos los cromatogramas.

Finalmente, es importante señalar que los resultados obtenidos se deben tomar como una aproximación y no como valores concluyentes, puesto que el número de muestras estudiadas fue muy bajo debido a una serie de otros problemas técnicos.

Figura 4: Cromatograma de alimento (*pellet*) de salmón sin fitasa.

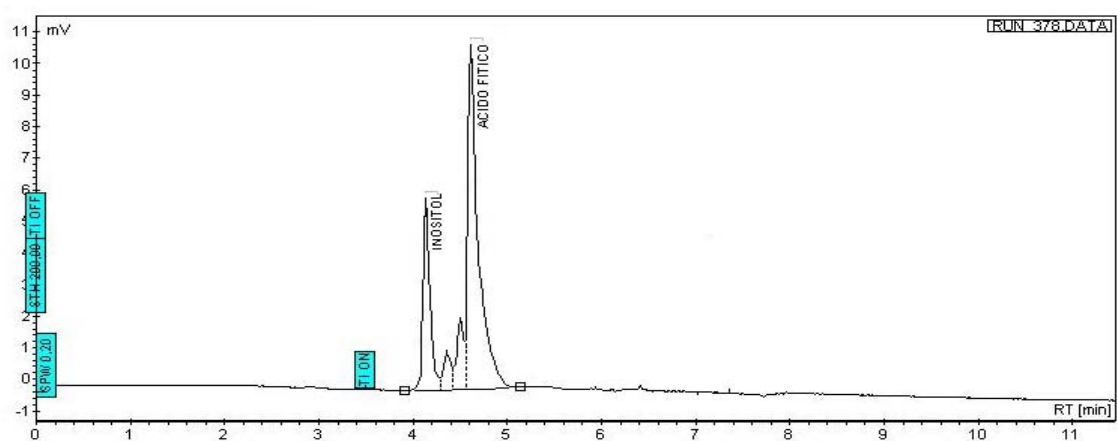


Figura 5: Cromatograma de contenido intestinal de salmones alimentados con *pellet* sin fitasa.

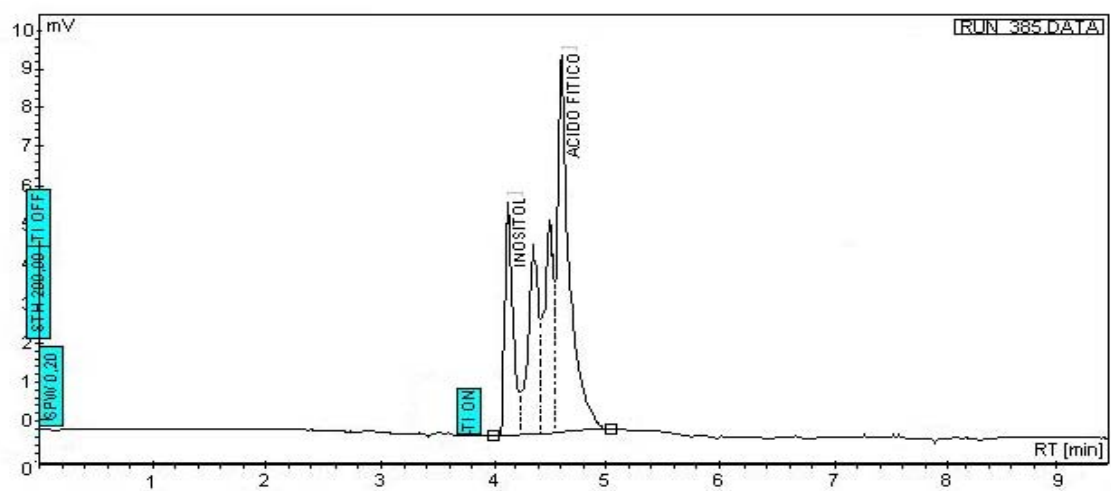


Figura 6: Cromatograma de alimento (*pellet*) de salmón con fitasa.

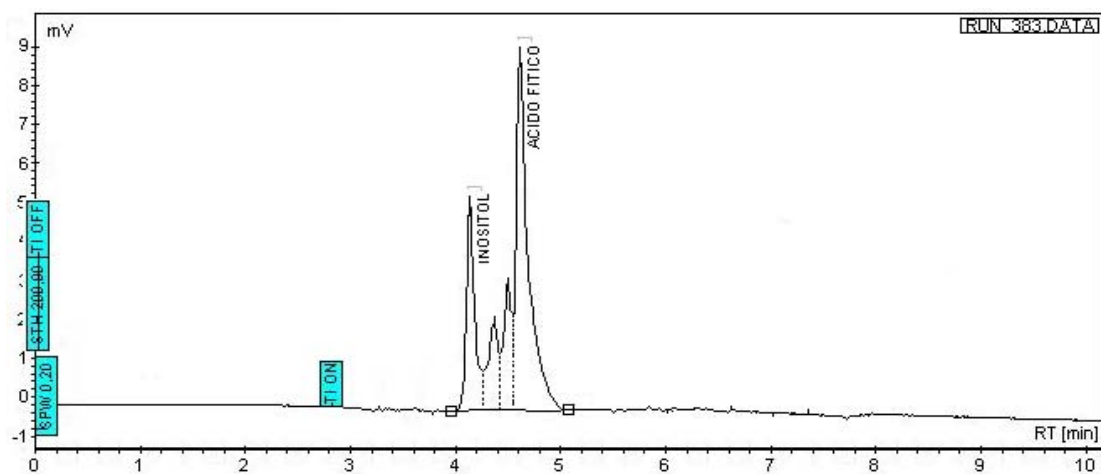
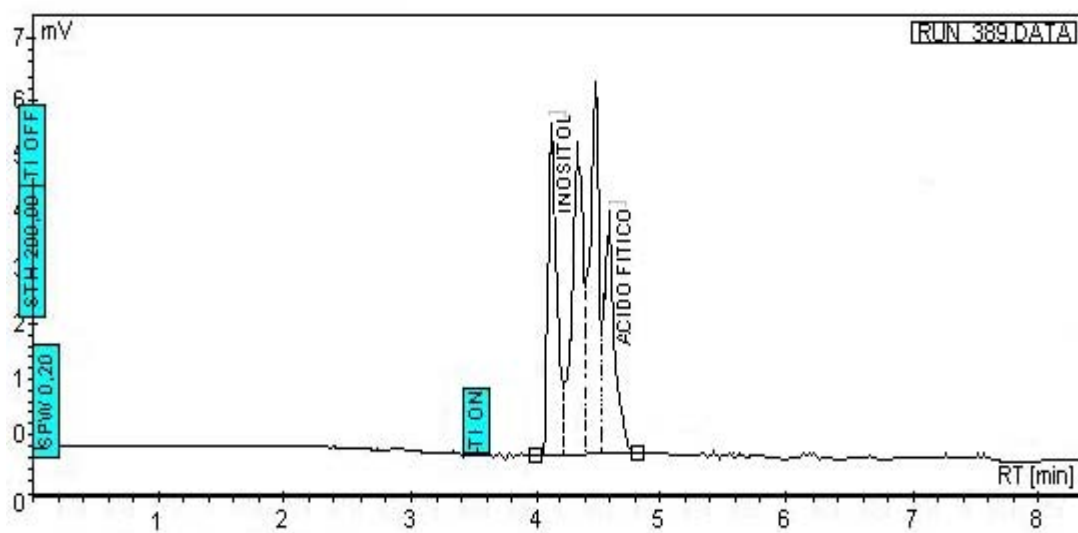


Figura 7: Cromatograma de contenido intestinal de salmones alimentados con *pellet* con fitasa.



5. CONCLUSIONES

- Se desarrolló y validó un método para la determinación y cuantificación de mioinositol y de ácido fítico desde alimento y contenido intestinal de salmón, a través de un sistema HPLC-IR.
- Este método presenta una linealidad aceptable para el rango de concentraciones de los analitos estudiados.
- La precisión del procedimiento (sistema instrumental y método), se encuentran dentro del rango aceptado por la A.O.A.C.
- Los límites de detección y cuantificación obtenidos son adecuados tanto para las cantidades presentes de los analitos en las matrices, como para el límite de detección del detector de índice de refracción.
- Los resultados de recuperación obtenidos para mioinositol y ácido fítico fueron de 86,0% en alimento de salmón y de un 89,0% en contenido intestinal.
- Los resultados obtenidos muestran que los niveles de ácido fítico en contenido intestinal de salmónes alimentados con dietas que contenían fitasa en su formulación, fueron aproximadamente un 38,0% menor a los obtenidos en los salmónes control.
- Los resultados obtenidos con respecto a la actividad de la enzima fitasa, en las formulaciones estudiadas, sugieren un nivel importante de disminución del ácido fítico, sin embargo, debido al bajo número de muestras analizadas (3 muestras), estos no serían concluyentes y se debería realizar ensayos con un número mayor de muestras.

Proyecciones.

- La aplicación del procedimiento analítico HPLC-IR para determinar y cuantificar ácido fítico y mioinositol en alimento y contenido intestinal de salmón, ha abierto una gran variedad de posibilidades, en cuanto a las proteínas vegetales que pueden ser utilizadas en formulaciones de alimentos para peces, con el propósito final de encontrar la mejor alternativa desde el punto de vista económico y de productividad. En otras palabras, el uso de una determinada matriz vegetal puede, eventualmente, disminuir los costos de alimentación, tener bajos índices de ácido fítico y por lo tanto menos efectos nocivos en la nutrición del pez.
- Este procedimiento, de la misma forma, permite evaluar el uso de nuevas y distintas fitasas, tendientes a disminuir los niveles de ácido fítico, presente en las formulaciones de alimento de salmón que contienen un alto porcentaje de proteína vegetal.
- Este estudio también puede ser aplicado a otros modelos animales tales como, aves y cerdos con el propósito final de disminuir la contaminación ambiental producida por lo altos niveles de fósforo excretados y además para aumentar la productividad.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Akyurek, H., Senkoylu, N., Levent, M. (2005) Effect of microbial phytase on growth performance and nutrients digestibility in broilers. *J. Nutr.*, 4, 22-26.
- Basf. (1998) Use of Phytase in Fish Nutrition. KC- 9601. 8 pp.
- Budavari, S. (1996) The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 12^a. Ed. New York. 1271 pp.
- Cain, K.D., Garling, D.L. (1995) Pretreatment of soybean meal with phytase for Salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. *Prog. Fish Cult.*, 57, 114- 119.
- Campbell, G., Bedford, M. (1992) Enzyme applications for monogastric feeds a reviews. *J. Anim. Sci.*, 72, 449- 466.
- Camire, A., Clydesdale, F. (1982) Analysis of phytic acid in foods by HPLC. *J. Food. Sci.*, 47, 575-578.
- Castro, M., Gascón, F., Pujol, M., Josep, M., Sans, R., Pla, V. (1989). Validación de métodos analíticos. Monografía AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de la industria). Barcelona, España.
- CEE. (1999) Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Reglamento CE N° 508/1999 de la comisión. L60/16. Bruselas.
- Cheryan, M. (1980) Phytic acid interactions in food systems. *Food Sci. Nutr.*, 13, 297- 235.
- De Boland, A., Garner, G., O'dell, B. (1975). Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. *J. Agric. Food Chem.*, 23, 1186- 1189.
- Dvorakova, J. (1998) Phytase: sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiology.*, 43, 323- 338.

- Eeckhout, W., De Paepe, M. (1994) Total phosphorus, phytate- phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 47, 19-29.
- Engelen, A., Van Der Heeft, F. Randsorp, P., Smit, E. (1994) Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.*, 77, 760- 764.
- Eya, J.S., Lovell, R.T. (1997) Net absorption of dietary phosphorus from various inorganics sources and effect of fungal phytase on net absorption of plant phophorus by channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Wor. Aquac. Soc.*, 28, 386-391.
- Fennema, O. (2000) *Química de los Alimentos*. 2ª Ed. Editorial Acribia, España. 1126-1127 pp.
- Forster, I., Higgs, D. (1999) Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*oncorchyncus mykiss*) held in 11° C fresh water. *Aquaculture.*, 179, 109- 125.
- Gibson, D. M., Ullah, A.B. (1990) En: Inositol metabolism in plants. New York. 77-92 pp.
- Gifford, S., Clydesdale, F. (1993) Effects of varying concentrations of phytate, calcium, and zinc on the solubilty of protein, calcium, zinc, and phytate in soy protein concentrate. *J. Food. Protect.*, 56, 43- 46.
- Graf, E., Dintzis, R. (1982) Determination of phytic acid in foods by high- performance liquid chromatography. *J. Agric. Food. Chem.*, 30, 1094-1097.
- Greiner, R., Larsson, M., Carlsson, N. (2001) Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate desphosphorylation by a phytate degrading enzyme of baker`s yeast. *J Agric. Food Chem.*, 49, 2228- 2233.

- Greiner, R., Larsson, M., Carlsson, N., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M., Goyoaga, C. (2002) Pathway of desphosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6865- 6870.
- Haichen, T., Hui, F. (1997) Avance de la fitasa en piensos para gallinas ponedoras. *Biotimes*. N° 4.
- Hara, A., Ebina, S., Kondo, A., Fanaguma, T. (1985) A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Food Chem.*, 49, 2228- 2233.
- Hardy, R., Fairgrieve, W., Scott, T. (1993) Periodic feeding of low- phosphorus diet and phosphorus retention in rainbow trout. *Aquaculture Magaz.*, 50, 25-28.
- Harlad, B.F., Oberleas, D. (1986) Anion exchange method for determination of phytate in foods: a collaborative study. *J. AOCS.*, 69, 667-670.
- Hayakawa, T., Suzuki, K., Miura, H., Ohno, T., Iguae, I. (1990) Myo- inositol polyphosphate intermediates in the desphosphorilation of phytic acid by acid phosphatase with phytase activity from rice bran. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 279- 286.
- Irving, J. (1973) Calcium and phosphorus metabolism. New York Academic. P.240.
- IUPAC-IUB. (1976). Enzyme Nomenclature Recommendations. Supplement I. *Biochem. Biophys. Acta* 429, 1-45.
- Jackson, L., Li, M., Robinson, E. (1996) Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus Punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus. *J. Aquaculture Soc.*, 27, 309- 313.
- Jongbloed, A., Mroz, Z., Kemme, P. (1992) The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of drye matter, total phosphorus and phytic acid in different sections of the alimentary tract. *J. Anim. Sci.*, 70, 1159- 1168.

- Kaur, D., Kapoor, A. (1990) Some antinutritional factors in rice bean (*Vigna umbellata*): effects of domestic processing and cooking methods. *J. Agric. Food. Chem.*, 37, 171- 179.
- Kemme, P., Jongbloed, A., Mroz, Z., Beynen, A. (1998) Diurnal variation in degradation of phytic acid by plant phytase in the pigs stomach. *Livest. Prod. Sci.*, 54, 33- 44.
- Kerovuo, J., Rouvinen, J., Hatzack, F. (2000) Hydrolysis of phytic acid by *Bacillus* phytase. *Biochem. J.*, 352, 623- 628.
- Ketola, G., Harland, B. (1993) Influence of phosphorus in rainbow trout for dietary phosphorus discharges in effluents water. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 122, 1120- 1126.
- Ketola, G., Richmond, M. (1994) Requirement of rainbow trout diets on phosphorus and its relationship to the amount discharged in hatchery effluents. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 123, 587- 594.
- Konietzny, U., Greiner, R. (2002) Molecular and catalytic properties of phytase- degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37, 791- 812.
- Lall, S.P. (2002) The Minerals. New York. pp. 259- 308.
- Lehrfeld, J. (1989) High- performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH- stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem.*, 66, 510-515.
- Lehrfeld, J., Morris, E. (1992) Overestimation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method. *J. Agric. Food. Chem.*, 40, 2208-2210.
- Li, M.H., Robinson, E.H. (1997) Microbial phytase can replace inorganic phosphorus supplements in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets. *J. Wor. Aquac. Soc.*, 28, 402-406.
- Lonnerdal, B., Sandberg, A., Sandstorm, B., Kunz, C. (1989) Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J. Nutr.*, 119, 211- 14.

- Maenz, D. D. (2001) Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. New York. pp. 61-84.
- Maga, J. (1982) Phytate. Its chemistry, occurrence food interactions nutritional significance and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1- 9.
- Nagashima, T., Tange, T., Anazaura, H. (1999) Desphosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus niger* Phytase with a high affinity for phytate. *A. Environmental Micr.*, 65, 4682- 4684.
- Nakano, T., Joh, T., Narita, K., Hayakawa, T. (2000) The pathway desphosphorylation of myo- inositol hexakisphosphate by phytases from wheat bran of *Triticum aestivum L.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 995- 1003.
- Nelson, T., Shieh, T., Wodzinski, R., Ware, J. (1968) The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poultry Sci.*, 47, 1842- 1848.
- Nelson, T., Shieh, T., Wodzinski, R., Ware, J. (1971) Effect of supplemental phytase on the utilization of the phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr.*, 101, 1289- 1293.
- Olavarría, V.H. (2005) Montaje y validación de un procedimiento HPLC-IR para determinar y cuantificar mioinositol y ácido fítico en matrices vegetales. Tesis Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 26-30, 42-46 pp.
- O' quinn, P., Knabe, D., Gregg, E. (1997) Efficacy of nathupos in based diets of finishing swine. *J. Anim. Sci.*, 75, 1299- 1307.
- Phillipy, B., Johnston, M., Tao, S., Fox, M. (1988) Inositol phosphates in processed foods. *J. AOAC.*, 74, 32- 36.
- Pointillart, A. (1993) Importance of cereal phytase activity for phytate phosphorus utilization by growing pigs fed diets containing triticale or corn. *J. Nutr.*, 29, 907- 912.

- Quattrocchi, O.A., Adelaíra de Andrizzí, S.I. Laba, R.F (1992). Introducción al H.P.L.C. aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina. 40-42, 203-235, 242-265, 302-327, 330-381 pp.
- Reddy, N., Pierson, M., Salunkhe, D. (1982) Legumes- based fermented foods. *Food Sci. Nutr.*, 17, 335- 370.
- Richie, M., Brown, P. (1996) Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.*, 142, 262- 289.
- Richardson, N., HiggS, D., Beames, R., Mc Bride, J. (1985) Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc an sodiun phytate level on caract incidence, growth and histopathology juvenile chinook salmon (*oncorhynchus tshawytscha*). *J. Nutr.*, 115, 553- 567.
- Robinson, D. (1991) Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza 531p.
- Robinson, E., Jackson, S., Li, M. (1996) Supplemental phytase in catfish diets. *Aquaculture.*, 143, 80-83.
- Schlemmer, U., Müller, H., Jany, K. (1995) The degradation of phytic acid in legumes prepared by different methods. *Eur. J. Clin Nutr.*, 49, 207-210.
- Serraino, M.R., Thompson, L. (1984) Removal of phytic acid and protein- phytic acid interactions in rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 38-40.
- Sugiura, S., Raboy, V., Young, K., Dong, F., Hardy, R. (1999) Avaibility of phosphorus and trace- elements in low- phytate varieties of barley and corn for rainbow- trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.*, 170, 285- 296.
- Sugiura, S., Gabaudan, J., Dong, F., Hardy, R. (2001) Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal- based diets. *Aquac. Resear.*, 32, 583- 592.

- Simons, P., Versteegh, H., Jongbloed, A. (1990) Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Brit. J. Nutr.*, 64, 525- 540.
- Sing, M., Krikorian, A. (1982) Inhibition of tripsin activity in vitro by phytate. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 799-800.
- Spring, P., Newman, K., Wenk, R. (1996) Effect of pelleting temperature on the activity of different enzymes. *Poultry Sci.*, 75, 357-361.
- Talamond, P., Doubeau, S., Rochette, I., Guyot, J. (2000) Anion - exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. *J Chromatogr. A.*, 871, 7- 11.
- Thompson, L. (1993) Potencial health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food. Res. Int.*, 26, 131- 149.
- Thompson, L., Button, C., Jenkins. (1987) Phytic acid and calcium effect the in vitro rate navy bean starch digestion and blood glucose response in human. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 46, 467-473.
- Torroba, J.E., Vivino, E.C. (2000). Curso de técnicas estadísticas de validación de métodos químicos para el control de alimentos del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ), Chile.
- Vohra, A., Satyanarayana, T. (2003) Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 29- 60.
- Walsh, G., Power, R., Headon, D. (1994). Enzymes in the animal feed industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 5, 81-87.

- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., OEsterhelt, G., Lehmann, M. (1999) Biochemical characterization of fungal phytases (Myo- inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): catalytic properties. *Appl. Environm. Microbiol.*, 65, 367- 373.
- Xu, P., Price, J., Aggett, P. (1992) Recent advances in methodology for analysis of phytate and inositol phosphates in foods. *Prog. Food. Nutr. Sci.*, 16, 245-262.
- Yan, W., Reigh, R. (2002) Effects of fungal phytase on utilization of dietary protein and minerals, and dephosphorylation of phytic acid in the alimentary tract of channel catfish *Ictalurus punctatus* fed an all- plant- protein diet. *J. World Aqua. Soc.*, 33, 10-22.
- Yi, Z., Kornegay, E. (1996) Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 61, 361- 368.
- Young, L., Leunissen, M., Atkinson, J. (1993) Adition of microbial phytase to diets of young pigs. *J. Anim. Sci.*, 71, 2147-2150.
- Zhou, J., Erdman, J. (1995) Phytic acid in health and disease. *Food Sci. Nutr.*, 35, 495-508.
- Zhou, B., Yu, H., Mukherjee, D. (1990) Proteins from double- zero rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 690-694.
- Zyla, K., Ledoux, D., García, A., Zeum, T. (1995) An in vitro procedure for studing enzymic desphosphorylation of phytate in maize-soybean feeds for turkey pouts. *Brit .J. Nut.*, 74, 3-17.

ANEXOS

ANEXO N° 1: Figuras.

Figura 8: “Curva de calibración ácido fítico”.

Acido Fítico	
Concentración	Área (mV.Min)
0,5 mg/ml	1,21
0,5 mg/ml	1,20
0,5 mg/ml	1,19
1,0 mg/ml	2,46
1,0 mg/ml	2,50
1,0 mg/ml	2,47
1,5 mg/ml	3,87
1,5 mg/ml	3,89
1,5 mg/ml	3,91
2,0 mg/ml	4,98
2,0 mg/ml	4,94
2,0 mg/ml	4,96

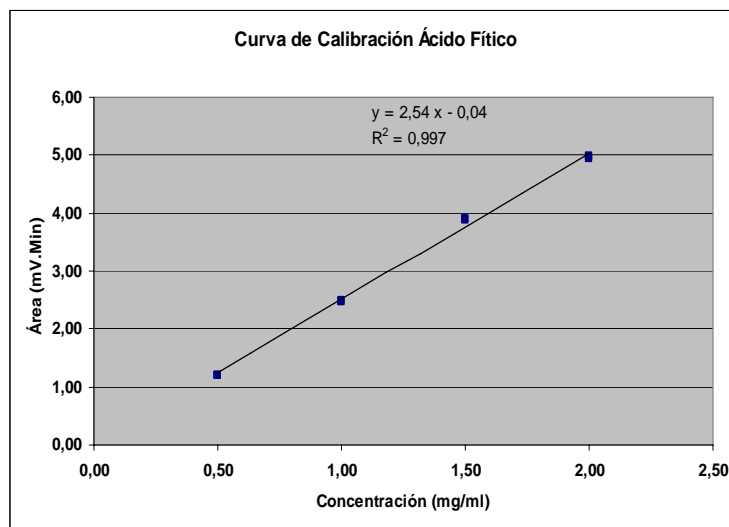


Figura 9: “Curva de calibración mioinositol”.

Mioinositol	
Concentración	Área (mV.Min)
0,2 mg/ml	0,45
0,2 mg/ml	0,43
0,2 mg/ml	0,44
0,4 mg/ml	0,87
0,4 mg/ml	0,84
0,4 mg/ml	0,83
0,6 mg/ml	1,34
0,6 mg/ml	1,33
0,6 mg/ml	1,35
0,8 mg/ml	1,72
0,8 mg/ml	1,69
0,8 mg/ml	1,73

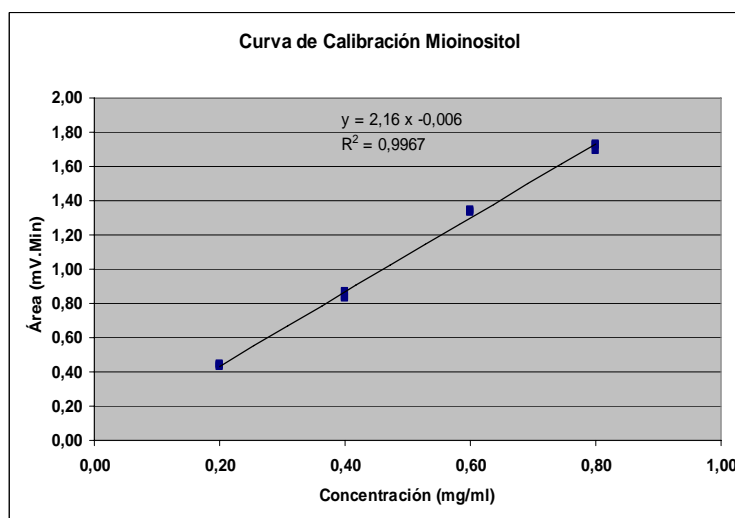


Figura 10: “Curva de sensibilidad para ácido fítico”.

Ácido Fítico	
Concentración	Área (mV.Min)
0,25 mg/ml	0,62
0,25 mg/ml	0,58
0,25 mg/ml	0,61
0,50 mg/ml	1,22
0,50 mg/ml	1,19
0,50 mg/ml	1,21
0,75 mg/ml	1,74
0,75 mg/ml	1,71
0,75 mg/ml	1,73
1,00 mg/ml	2,48
1,00 mg/ml	2,44
1,00 mg/ml	2,46

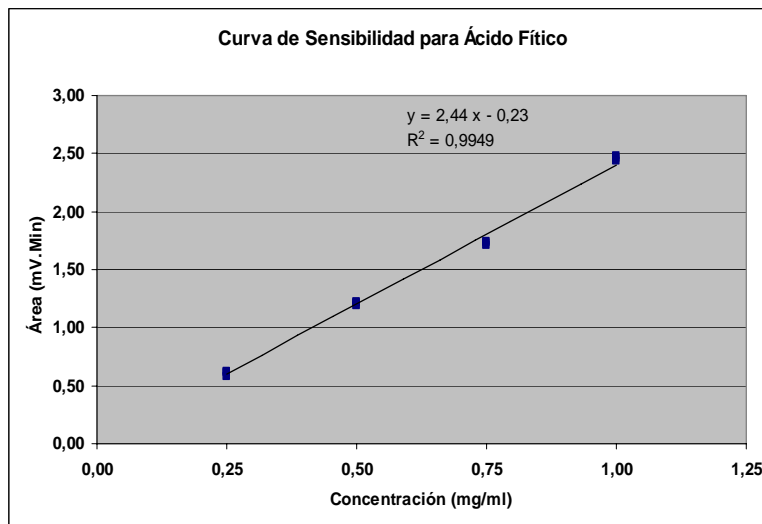


Figura 11: “Determinación de sensibilidad para ácido fítico”.

Blanco	Respuesta (Área)
1	0,08
2	0,09
3	0,05
4	0,08
5	0,07
6	0,08
7	0,07
8	0,09
9	0,06
10	0,07
Promedio (YbI)	0,07
Desviación estándar (SbI)	0,01

$b = 2,44$, se obtuvo de la ecuación de la recta de ácido fítico a bajas concentraciones (Figura 10).

Límite de detección: $0,07 + (3 \times 0,01)$

2,44

Límite de detección: 0,041 mg/ml

Límite de cuantificación: $0,07 + (10 \times 0,01)$

2,44

Límite de cuantificación: 0,070 mg/ml

Figura 12: “Curva de sensibilidad para mioinositol”.

Mioinositol	
Concentración	Área (mV.Min)
0,1 mg/ml	0,21
0,1 mg/ml	0,23
0,1 mg/ml	0,20
0,2 mg/ml	0,44
0,2 mg/ml	0,42
0,2 mg/ml	0,43
0,3 mg/ml	0,65
0,3 mg/ml	0,64
0,3 mg/ml	0,63
0,4 mg/ml	0,85
0,4 mg/ml	0,87
0,4 mg/ml	0,84

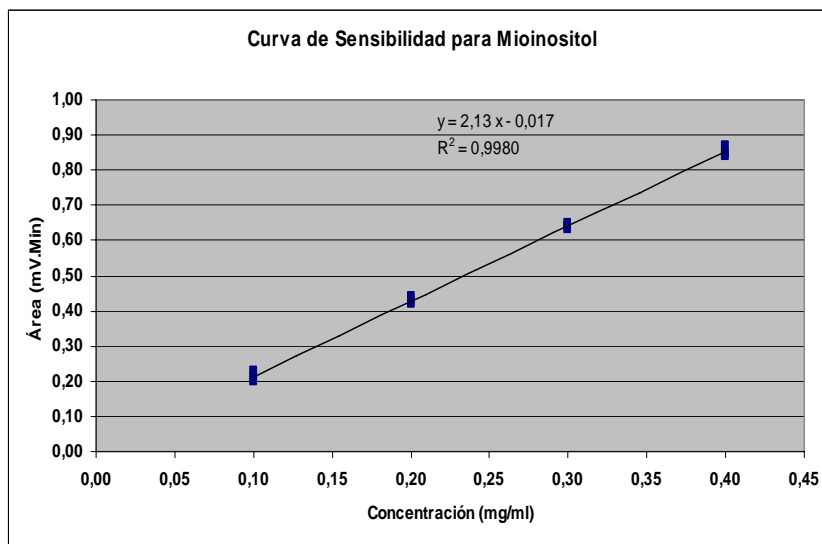


Figura 13: “Determinación de sensibilidad para mioinositol”.

Blanco	Respuesta (Área)
1	0,07
2	0,05
3	0,08
4	0,12
5	0,09
6	0,11
7	0,06
8	0,10
9	0,09
10	0,07
Promedio (YbI)	0,08
Desviación estándar (SbI)	0,02

b = 2,13, se obtuvo de la ecuación de la recta de mioinositol a bajas concentraciones (Figura 12).

Límite de detección: $\frac{0,08 + (3 \times 0,02)}{2,13}$

2,13

Límite de detección: 0,066 mg/ml

Límite de cuantificación: $\frac{0,08 + (10 \times 0,02)}{2,13}$

2,13

Límite de cuantificación: 0,13 mg/ml

ANEXO N° 2: Tablas.

Tabla 1: “Coeficientes de correlación y de regresión lineal”.

Analito	(r)	(r ²)
Mioinositol	0,9986	0,9971
Ácido. Fítico	0,9983	0,9967

Precisión del Sistema Instrumental

A.- Repetibilidad

Tabla 2: “Repetibilidad de patrones para ácido fítico”.

Concentración	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área
0,5 mg/ml	1,20	1,22	1,21	1,19	1,20	1,19	1,21	1,22	1,20	1,19
1,5 mg/ml	3,86	3,89	3,87	3,86	3,88	3,89	3,88	3,87	3,86	3,87

Concentración	Promedio	S.D	% C.V	Prom. % C.V
0,5 mg/ml	1,20	0,01	0,83	0,55 %
1,5 mg/ml	3,87	0,01	0,26	

Tabla 3: “Repetibilidad de patrones para mioinositol”.

Concentración	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área
0,4 mg/ml	0,84	0,87	0,86	0,84	0,85	0,86	0,84	0,86	0,85	0,84
0,6 mg/ml	1,36	1,33	1,35	1,34	1,33	1,36	1,34	1,35	1,34	1,33

Concentración	Promedio	S.D	% C.V	Prom. % C.V
0,4 mg/ml	0,85	0,01	1,18	0,97 %
0,6 mg/ml	1,34	0,01	0,75	

Tabla 4: “Resultados de la determinación de repetibilidad del sistema instrumental”.

Analito	Concentración	Promedio 10 lecturas	S.D.	% C.V.	Promedio % C.V.
Ácido Fóico	0,5 mg/ml	1,20	0,01	0,83	0,55
	1,5 mg/ml	3,87	0,01	0,26	
Mioinositol	0,4 mg/ml	0,85	0,01	1,18	0,97
	0,6 mg/ml	1,34	0,01	0,75	

B.- Reproducibilidad**Tabla 5: “Reproducibilidad para patrones de ácido fóico”.**

Concentración	Área	Área	Área	Área	Área	Promedio	S.D.	%C.V.	Prom% C.V.
2,0 mg/ml	4,96	4,93	4,98	4,94	4,97	4,96	0,02	0,40	0,51 %
2,0 mg/ml	4,92	4,97	4,93	4,99	4,95	4,95	0,03	0,61	

Tabla 6: “Reproducibilidad para patrones de mioinositol”.

Concentración	Área	Área	Área	Área	Área	Promedio	S.D.	%C.V.	Prom% C.V.
0,8 mg/ml	1,70	1,73	1,67	1,71	1,69	1,70	0,02	1,18	0.89 %
0,8 mg/ml	1,69	1,71	1,70	1,68	1,70	1,69	0,01	0,59	

Tabla 7: “Resultados de la determinación de reproducibilidad del sistema instrumental”.

Analito	Concentración	Promedio 10 lecturas	S.D.	% C.V.	Promedio % C.V.
Ácido Fóico	2,0 mg/ml	4,96	0,02	0,40	0,51
	2,0 mg/ml	4,95	0,03	0,61	
Mioinositol	0,8 mg/ml	1,70	0,02	1,18	0,89
	0,8 mg/ml	1,69	0,01	0,59	

Precisión del Método en Alimento de Salmones

A.- Repetibilidad

Tabla 8: “Repetibilidad del método para ácido fítico en alimento de salmones”.

<i>Pellet (1 g)</i>	1	2	3	4	5	6	Promedio (mg)	S.D.	% C.V.
Concentración (mg/ml)	0,66	0,69	0,65	0,67	0,68	0,66	4,46	0,10	2,24
Cantidad (mg)	4,40	4,60	4,33	4,47	4,53	4,40			

Tabla 9: “Repetibilidad del método para mioinositol en alimento de salmones”.

<i>Pellet (1 g)</i>	1	2	3	4	5	6	Promedio (mg)	S.D.	%C.V.
Concentración (mg/ml)	0,31	0,29	0,32	0,30	0,28	0,30	2,00	0,09	4,50
Cantidad (mg)	2,07	1,93	2,13	2,00	1,87	2,00			

B.- Reproducibilidad

Tabla 10: “Reproducibilidad del método para ácido fítico en alimento de salmones”.

Matriz (1 g)	Unidad	1	2	3	4	Promedio (mg)	S.D.	%C.V.
<i>Pellet</i>	Conc. (mg/ml)	0,65	0,70	0,68	0,66	4,48	0,15	3,35
	Cantidad (mg)	4,33	4,67	4,53	4,40			
<i>Pellet</i>	Conc. (mg/ml)	0,67	0,65	0,64	0,69	4,42	0,14	3,17
	Cantidad (mg)	4,47	4,33	4,27	4,60			

Tabla 11: “Reproducibilidad del método para mioinositol en alimento de salmones”.

Matriz (1 g)	Unidad	1	2	3	4	Promedio	S.D.	%C.V
<i>Pellet</i>	Conc. (mg/ml)	0,33	0,29	0,31	0,32	2,08	0,11	5,29
	Cantidad (mg)	2,20	1,93	2,07	2,13			
<i>Pellet</i>	Conc. (mg/ml)	0,30	0,28	0,32	0,30	2,00	0,10	5,00
	Cantidad (mg)	2,00	1,87	2,13	2,00			

Exactitud / Recuperación en Alimento de Salmones

Tabla 12: “Exactitud/ Recuperación ácido fólico desde alimento de salmones”.

<i>Pellet</i> (1 g)	1	2	3	Promedio (mg)	S.D.	% C.V.
Concentración (mg/ml)	0,67	0,70	0,66	4,51	0,14	3,10
Cantidad (mg)	4,47	4,67	4,40			

Matriz (1 g)	Unidad	1	2	3	Prom.	S.D.	%C.V.	% R.
<i>Pellet</i> + 5mg Fólico	mg/ml	1,29	1,36	1,32	8,82	0,24	2,72	86,20
	mg	8,60	9,07	8,80				
<i>Pellet</i> + 10mg Fólico	mg/ml	1,89	2,02	1,97	13,07	0,44	3,37	85,60
	mg	12,60	13,47	13,13				
PROMEDIO						0,34	3,05	85,90

Tabla 13: “Exactitud/ Recuperación mioinositol desde alimento de salmones”.

<i>Pellet</i> (1 g)	1	2	3	Promedio (mg)	S.D.	% C.V.
Concentración (mg/ml)	0,32	0,31	0,29	2,04	0,10	4,90
Cantidad (mg)	2,13	2,07	1,93			

Matriz (1 g)	Unidad	1	2	3	Prom.	S.D.	%C.V.	% R.
<i>Pellet</i> + 2,5mg Mioinositol	mg/ml	0,60	0,62	0,66	4,18	0,20	4,78	85,60
	mg	4,00	4,13	4,40				
<i>Pellet</i> + 5mg Mioinositol	mg/ml	0,91	0,98	0,95	6,33	0,24	3,79	85,80
	mg	6,07	6,53	6,40				
PROMEDIO							4,29	85,70

Precisión del Método en Contenido Intestinal de Salmón.

A.- Repetibilidad

Tabla 14: “Repetibilidad del método para ácido fítico en contenido intestinal de salmón”.

Cont. Intestinal (1 g)	1	2	3	4	5	6	Promedio (mg)	S.D.	% C.V.
Concentración (mg/ml)	0,57	0,59	0,60	0,58	0,60	0,56	3,89	0,11	2,83
Cantidad (mg)	3,80	3,93	4,00	3,87	4,00	3,73			

Tabla 15: “Repetibilidad del método para mioinositol en contenido intestinal de salmón”.

Cont. Intestinal (1 g)	1	2	3	4	5	6	Promedio (mg)	S.D.	%C.V.
Concentración (mg/ml)	0,33	0,32	0,34	0,33	0,31	0,34	2,19	0,08	3,65
Cantidad (mg)	2,20	2,13	2,27	2,20	2,07	2,27			

B.- Reproducibilidad**Tabla 16: “Reproducibilidad del método para ácido fítico contenido intestinal de salmón”.**

Matriz (1 g)	Unidad	1	2	3	4	Promedio (mg)	S.D.	%C.V.
C. Intestinal	Conc. (mg/ml)	0,57	0,59	0,61	0,60	3,95	0,12	3,04
	Cantidad (mg)	3,80	3,93	4,07	4,00			
C. Intestinal	Conc. (mg/ml)	0,60	0,56	0,58	0,61	3,92	0,15	3,83
	Cantidad (mg)	4,00	3,73	3,87	4,07			

Tabla 17: “Reproducibilidad del método mioinositol en contenido intestinal de salmón”.

Matriz (1 g)	Unidad	1	2	3	4	Promedio (mg)	S.D.	%C.V.
C. Intestinal	Conc. (mg/ml)	0,31	0,35	0,32	0,33	2,18	0,11	5,05
	Cantidad (mg)	2,07	2,33	2,13	2,20			
C. Intestinal	Conc. (mg/ml)	0,34	0,32	0,30	0,33	2,13	0,11	5,16
	Cantidad (mg)	2,27	2,13	2,00	2,13			

Exactitud / Recuperación en Contenido Intestinal de Salmón

Tabla 18: “Exactitud/ Recuperación ácido fólico desde contenido intestinal de salmón”.

Cont. Intestinal (1 g)	1	2	3	Promedio (mg)	S.D.	% C.V.
Concentración (mg/ml)	0,60	0,56	0,59	3,89	0,14	3,60
Cantidad (mg)	4,00	3,73	3,93			

Matriz (1 g)	Unidad	1	2	3	Prom.	S.D.	%C.V.	% R.
C. Int. + 5mg Fólico	mg/ml	1,21	1,28	1,26	8,33	0,24	2,88	88,80
	mg	8,07	8,53	8,40				
C. Int. + 10 mg Fólico	mg/ml	1,88	1,91	1,98	12,82	0,34	2,65	89,30
	mg	12,53	12,73	13,20				
PROMEDIO							2,77	89,05

Tabla 19: “Exactitud/ Recuperación mioinositol desde contenido intestinal de salmón”.

Cont. Intestinal (1 g)	1	2	3	Promedio (mg)	S.D.	% C.V.
Concentración (mg/ml)	0,35	0,34	0,32	2,24	0,10	4,46
Cantidad (mg)	2,33	2,27	2,13			

Matriz (1 g)	Unidad	1	2	3	Prom.	S.D.	%C.V.	% R.
C. Int. + 2,5 mg Mioinositol	mg/ml	0,65	0,70	0,66	4,47	0,18	4,03	89,20
	mg	4,33	4,67	4,40				
C. Int. + 5 mg Mioinositol	mg/ml	0,97	1,04	0,99	6,67	0,24	3,60	88,60
	mg	6,47	6,93	6,60				
PROMEDIO							3,82	88,90

Tabla 20: “Valores de t_{exp} para ácido fítico y mioinositol en ambas matrices”.

Matriz (1 g)	Analito	t_{exp}
<i>Pellet</i>	ácido fítico	11,32
Contenido Intestinal	ácido fítico	9,68
<i>Pellet</i>	mioinositol	8,16
Contenido Intestinal	mioinositol	7,12

Tabla 21: “Determinación de ácido fítico en alimento y contenido intestinal de salmón”.

Matriz (1 g)	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	% C.V.
<i>Pellet sin fitasa</i>	5,19	5,03	5,35	5,19	0,16	3,08
<i>Pellet con fitasa</i>	4,10	3,95	4,19	4,08	0,12	2,94
Contenido Intestinal sin fitasa	4,49	4,27	4,42	4,39	0,11	2,51
Contenido Intestinal con fitasa	1,88	1,94	1,79	1,87	0,08	4,27

Tabla 22: “Determinación de mioinositol en alimento y contenido intestinal de salmón”.

Matriz (1 g)	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	% C.V.
<i>Pellet sin fitasa</i>	2,41	2,33	2,24	2,33	0,09	3,86
<i>Pellet con fitasa</i>	2,24	2,16	2,09	2,16	0,08	3,70
Contenido Intestinal sin fitasa	2,40	2,31	2,24	2,32	0,08	3,48
Contenido Intestinal con fitasa	2,47	2,42	2,27	2,39	0,10	4,18

ANEXO N° 3: Ejemplos de cálculo.

Ejemplo de cálculo 1: Corrección de pesada de fitato de sodio para curva de calibración de ácido fítico.

Para el nivel 1: 0,5 mg/ml de ácido fítico (25 ml).

Fitato de Sodio ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$) PM: 923,8

0,5 mg/ml X 25 ml = 12,5 mg de ácido fítico.

924 mg fitato de sodio \Rightarrow generan 660 mg de ácido fítico

X mg fitato de sodio \Rightarrow generan 12,5 mg de ácido fítico

X = 17,5 mg de fitato de sodio.

Ejemplo de cálculo 2: Determinación del t_r para mioinositol en linealidad.

Para poder conocer si la curva de calibración de mioinositol posee una linealidad aceptable se debe realizar el cálculo de un t estadístico (t_r) con los datos obtenidos de la regresión lineal. Esto se realiza considerando $n-2$ grados de libertad y se compara con el t tabulado para el nivel de confianza requerido ($p = 0,05$), el cual corresponde para este caso a un $t_{tab} = 2,228$.

$$r = 0,9983$$

$$r^2 = 0,9967$$

$$n = 12$$

$$\text{Por lo tanto: } t_r = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{0,9983 \sqrt{10}}{\sqrt{1-0,9967}}$$

$t_r = 54,95 > t_{tab} 2,228$, linealidad aceptable.

Ejemplo de cálculo 3: conversión de unidad de concentración (mg/ml) en cantidad (mg) de las lecturas obtenidas por el equipo HPLC-IR.

Luego de realizar la extracción (3.4.2) de los analitos desde las matrices, en este caso alimento de salmón, estos se concentraron y purificaron mediante C.I.A. y a continuación se tomaron 6 ml de la solución en HCl 2M y procedió a eliminar el ácido utilizando rotavapor. Finalmente el extracto seco se reconstituyó en 4 ml de fase móvil y alícuotas de esta solución se cuantificaron mediante HPLC-IR.

La primera determinación para alimento de salmón (Tabla N° 8, en anexo N° 2), muestra 4,40 mg de ácido fítico, la cual fue calculada a través de la concentración entregada por el equipo. En este caso particular, la concentración entregada fue de 0,66 mg/ml, por lo tanto:

$$0,66 \text{ mg/ml} \times 4 \text{ ml} = 2,64 \text{ mg}$$

$$2,64 \text{ mg} / 6 \text{ ml} = 0,4 \text{ mg/ml}$$

$$0,4 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} = \mathbf{4,40 \text{ mg de ácido fítico.}}$$

De otra forma sería:

$$\mathbf{\text{Factor de concentración}} = 6 \text{ ml} / 4 \text{ ml} = \mathbf{1,5}$$

$$\text{Cantidad de ácido fítico} = 0,66 \text{ mg/ml} / 1,5 \times 10 \text{ ml} = \mathbf{4,40 \text{ mg ácido fítico.}}$$

De la misma forma se realizó el cálculo de la cantidad de ácido fítico y mioinositol en todas las etapas de validación en ambas matrices, alimento y contenido intestinal de salmón.

Ejemplo de cálculo 4: Determinación del porcentaje de recuperación de los analitos desde las matrices, alimento y contenido intestinal de salmón.

El primer paso a seguir fue determinar por triplicado la cantidad del analito presente, de forma constitutiva, en 1,0 gramo de matriz, luego se tomó como referencia el valor promedio de este análisis para posteriores ensayos.

En este caso se mezcló 1,0 gramo de contenido intestinal de salmón con 5 mg de ácido fítico, lo cual entregó como resultado un 88,80 % de recuperación (Tabla 18, en anexo N° 2). El valor fue calculado de la siguiente manera:

El promedio de ácido fítico en 1,0 gramo de contenido intestinal de salmón fue de 3,89 mg, aproximadamente. Esto implica, que al mezclar esta cantidad de contenido intestinal con 5 mg de ácido fítico se esperaría un total aproximado de 8,89 mg del analito.

El valor de cantidad promedio para este ensayo, luego de realizar la extracción según método 3.4.2, fue de 8,33 mg de ácido fítico, por lo tanto:

$$(8,33 - 3,89) \text{ mg} = 4,44 \text{ mg de ácido fítico.}$$

$$(4,44 \text{ mg} / 5,00 \text{ mg}) \times 100 = \mathbf{88,80 \% \text{ de recuperación.}}$$

Ejemplo de cálculo 5: Determinación de t experimental para ácido fítico en recuperación.

Para este ejemplo de cálculo se utilizaron los valores de recuperación obtenidos para contenido intestinal de salmón (Tabla 18, en anexo N° 2).

$$\text{Promedio \% C.V} = 2,77\%$$

$$\% \text{ Recuperación promedio obtenida} = 89,05 \%$$

$$t_{\text{tabla}} = 2,571 \text{ para } p = 0,05 \text{ y } n-1 \text{ grados de libertad}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{(100 - R) \sqrt{n}}{\text{C.V.}} = \frac{(100 - 89,05) \sqrt{6}}{2,77}$$

$t_{\text{exp}} = 9,68 > t_{\text{tabla}} = 2,571$, método no tiene exactitud requerida.

Ejemplo de cálculo 6: Ajuste de los valores de ácido fítico y mioinositol en base al % de recuperación, de las muestras analizadas.

El porcentaje de recuperación de ácido fítico en alimento de salmón fue aproximadamente un 86%. Luego de realizar el proceso de extracción de ácido fítico desde 1,0 gramo de alimento de salmón sin fitasa (*Pellet*), en triplicado, se obtuvo un valor promedio de 4,46 mg de ácido fítico, por lo tanto:

$$\begin{aligned} 4,46 \text{ mg} &\Rightarrow 86\% \\ X \text{ mg} &\Rightarrow 100\% \end{aligned}$$

$$X = 5,186 \sim \mathbf{5,19 \text{ mg/g (Tabla 21)}}$$

Todos los valores informados en las tablas 21 y 22 (Anexo N° 2) están ajustados en base al porcentaje de recuperación.