



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**

"Montaje y Validación de un Procedimiento HPLC-IR para Determinar y Cuantificar Mioinositol y Ácido Fítico en Matrices Vegetales".

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

VICTOR HUGO OLAVARRIA CONTRERAS

VALDIVIA-CHILE
2005

Dedico este trabajo con mucho amor y cariño, a mí mamá Edith, a mí papá Arturo, a mis hermanos Yesenia, Arturo, Christopher y a mis sobrinas Camila y Alexandra. Del mismo modo quisiera dedicar este trabajo a mí tierna Carolina.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la profesora patrocinante de esta tesis, Sra. Marcia Costa, por el apoyo y preocupación que entregó durante todo el proceso de este trabajo investigación.

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.

Quisiera agradecer de manera muy especial a Joel Pardo, por su colaboración, conocimientos y contactos aportados en esta tesis.

De manera fundamental quiero agradecer a mis padres pues gracias a su amor, sacrificio, esfuerzo así, como sus consejos, hoy nuevamente soy profesional, así que este Título es por ustedes y para ustedes, los quiero mucho viejitos...

Quisiera agradecer a Carolina Gómez, mí Carolina, por su cariño, amor, entrega, y paciencia, pues solo ella conoce los sacrificios, esfuerzos, tropiezos y muy al final, los triunfos que tuvimos durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	V
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Propiedades del ácido fítico.....	4
2.2 Localización y contenido de ácido fítico.....	7
2.3 Función del ácido fítico en la planta.....	8
2.4 Efectos farmacológicos del ácido fítico.....	8
2.5 Métodos de análisis y determinación de ácido fítico.....	10
2.6 Principio de la cromatografía.....	14
2.7 Detector de índice de refracción.....	16
2.7.1 Fresnel.....	17
2.7.2 Deflexión.....	17
2.7.3 Interferométrico.....	17
2.8 Validación.....	18
2.8.1 Linealidad.....	18
2.8.2 Precisión.....	19
2.8.3 Exactitud-Recuperación.....	20
2.8.4 Sensibilidad.....	21

2.8.4.1 Límite de detección.....	21
2.8.4.2 Límite de cuantificación.....	22
2.8.5 Selectividad.....	23
2.9 Objetivos.....	24
2.9.1 Objetivo General.....	24
2.9.2 Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Reactivos.....	25
3.2 Materiales.....	25
3.3 Metodología analítica.....	26
3.3.1 Condiciones cromatográficas.....	26
3.3.2 Tratamiento de las muestras vegetales.....	26
3.3.3 Diseño de las curvas de calibración de mioinositol y ácido fítico.....	28
3.3.3.1 Mioinositol.....	28
3.3.3.2 Ácido fítico.....	28
3.3.4 Montaje de la columna de intercambio aniónico (C. I. A).....	29
3.3.5. Determinación de la capacidad de la C. I.A.....	30
3.3.6 Validación.....	31
3.3.6.1 Linealidad.....	31
3.3.6.2 Determinación de la precisión del sistema instrumental.....	31

3.3.6.2.1 Determinación de la repetibilidad.....	31
3.3.6.2.2 Determinación de la reproducibilidad.....	32
3.3.6.3 Determinación de la precisión del método.....	32
3.3.6.3.1 Determinación de la repetibilidad.....	32
3.3.6.3.2 Determinación de la reproducibilidad.....	32
3.3.6.4 Exactitud / recuperación.....	33
3.3.6.5 Sensibilidad.....	33
3.3.6.6 Selectividad.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1 Linealidad.....	35
4.2 Precisión del sistema instrumental.....	36
4.2.1 Repetibilidad del sistema instrumental.....	36
4.2.2 Reproducibilidad del sistema instrumental.....	37
4.3 Precisión del método.....	37
4.3.1 Repetibilidad del método.....	37
4.3.2 Reproducibilidad del método.....	38
4.4 Exactitud- Recuperación.....	38
4.5 Sensibilidad.....	39
4.6 Selectividad.....	40

4.7 Montaje y determinación de la capacidad de la C.I.A.....	41
4.8 Análisis de resultados de muestras vegetales.....	42
5. CONCLUSIONES.....	46
6. BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	: ácido fólico.
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.
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.
I	: mioinositol.
IR	: índice de refracción.
kg	: kilogramo.
M	: molaridad.
min	: minuto.
mg	: miligramo.
mM	: milimolar.
mV	: milivolt.
mg/ml	: miligramo por mlilitro.
ml	: mililitro.

ng	: nanógramo.
Nº	: número.
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	Complejo Ternario Ácido Fítico - Ca^{+2} – Proteína.....6
Figura 2	Cromatograma de muestra de trigo.....44
Figura 3	Cromatograma de muestra de Maíz.....44
Figura 4	Cromatograma de muestra de Canola.....45
Figura 5	Cromatograma de muestra de Lupino.....45
Figura 6	Cromatograma de muestra de soya.....45
Figura 7	Curva de Calibración ácido fítico.....55
Figura 8	Curva de Calibración mioinositol.....55
Figura 9	Curva de Sensibilidad para ácido fítico.....56
Figura 10	Determinación de sensibilidad ácido fítico.....56
Figura 11	Curva de Sensibilidad para mioinositol.....57
Figura 12	Determinación de sensibilidad mioinositol.....58

ANEXO N° 2: TABLAS

	Página
Tabla 1: Coeficientes de correlación y de regresión lineal.....	59
Tabla 2: Determinación de la capacidad de la resina Dowex tipo I.....	59
Tabla 3: Repetibilidad de patrones para ácido fítico.....	59
Tabla 4: Repetibilidad de patrones para mioinositol.....	60
Tabla 5: Resultados de la determinación de repetibilidad del sistema instrumental.....	60
Tabla 6: Reproducibilidad para patrones de ácido fítico.....	60
Tabla 7: Reproducibilidad para patrones de mioinositol.....	60
Tabla 8: Resultados determinación de reproducibilidad del sistema instrumental.....	61
Tabla 9: Repetibilidad del método para ácido fítico en matrices vegetales.....	61
Tabla 10: Repetibilidad del método para mioinositol en matrices vegetales.....	61
Tabla 11: Reproducibilidad del método para ácido fítico en matrices vegetales.....	62
Tabla 12: Reproducibilidad del método para mioinositol en matrices vegetales.....	62
Tabla 13: Exactitud -Recuperación ácido fítico matrices vegetales.....	63
Tabla 14: Exactitud/ Recuperación mioinositol desde matrices vegetales.....	64

Tabla 15: Repetibilidad del método para ácido fítico muestras vegetales.....	64
---	----

ANEXO N° 3: EJEMPLOS DE CÁLCULO

	Página
Ejemplo de cálculo 1: Corrección de pesada para curva de calibración.....	65
Ejemplo de cálculo 2: Determinación de la capacidad de la C.I.A.....	65
Ejemplo de cálculo 3: Determinación del t_r para mioinositol en linealidad.....	66
Ejemplo de cálculo 4: Conversión de concentración (mg/ml) en cantidad (mg).....	66
Ejemplo de cálculo 5: Determinación del porcentaje de recuperación.....	67
Ejemplo de cálculo 6: Determinación de t_{exp} para ácido fítico en recuperación.....	68
Ejemplo de cálculo 7: Ajuste de datos en base al % de recuperación.....	69

1. RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado la necesidad por un método reproducible, simple y rápido que sea útil para analizar el contenido del mioinositol y ácido fítico en alimentos, especialmente porque la cantidad de estos analitos a menudo es muy alta.

El foco de interés en los inositoles fosfato en el campo de la ciencia de los alimentos, es la capacidad del fitato (inositol hexafosfato) para quelar metales, tales como hierro, zinc y calcio.

En este trabajo, se desarrolló un método cromatográfico líquido de alta eficiencia para la determinación de ácido fítico y mioinositol en alimentos. Este procedimiento consiste en la extracción de la muestra con 0,5 M HCl, filtración, paso del extracto a través de la resina de intercambio aniónico y elusión del ácido fítico y mioinositol con HCl 2,0 M. Una alícuota del eluato fue llevada a sequedad, se disolvió en acetato de sodio 5 mM, y se analizó por cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia (HPAEC).

La alta sensibilidad, especificidad, precisión, exactitud hacen a este método conveniente para los análisis de rutina de la mayoría de las muestras de alimento.

En trigo se encontró los niveles más altos de ácido fítico por gramo de muestra, así mismo la cantidad de mioinositol presente sugirió la más alta actividad fitasa intrínseca de las cinco muestras analizadas.

SUMMARY

Recent years have seen an increasing need for rapid, simple, and robust methods that can be used to analyze the content of myo-inositol and phytic acid in foods, especially because the sample load often is very high.

The focus of interest in inositol phosphates in the field of food science is the ability of phytate (inositol hexakisphosphate) to chelate metals, such as iron, zinc and calcium.

In this work, a high-performance liquid chromatographic method was developed for the determination of phytic acid and myo-inositol in food. This procedure consists of extraction samples with 0,5 M HCl, filtration, passage of the extract over anion – exchange resin and elution of phytic acid with 2,0 M HCl. An aliquot is taken to dryness, dissolved in 5,0 mM sodium acetate, and analyzed by high performance anion - exchange chromatography (HPAEC).

The high sensitivity, specificity, accuracy and reliability, make this method suitable for routine analyses of most food samples.

In wheat samples the highest phytic acid levels by gram of sample were found, and the amount of mioinositol present suggested the highest intrinsic phytase activity of the five different types of samples analyzed.

2. INTRODUCCIÓN

El ácido fítico (AF) y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en semillas de cereales y leguminosas (Wyatt y col., 1994; Zhou y col., 1995). Sin embargo, en esta forma el P permanece no disponible para el hombre y animales monogástricos (Pettersson y col., 1999; Segueilha y col., 1993) debido a que están desprovistos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas), que sean capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato (Walsh y col., 1994).

El ácido fítico, mioinositol hexaquisfosfato (IP6), y sus sales derivadas constituyen la mayor reserva de fósforo y mioinositol de las semillas. El contenido de ácido fítico varía con el genotipo y las condiciones ambientales del cultivo y oscila de 0,60-1,89% en cereales y de 0,40- 2,06% en leguminosas (Reddy y col., 1982). Desde el punto de vista nutricional, el interés del ácido fítico se debe principalmente a su capacidad de formar complejos con minerales esenciales (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} y Ca^{2+}) lo que disminuye la absorción intestinal y biodisponibilidad de los mismos. Además, los fitatos interaccionan con los residuos básicos de proteínas formando complejos, por lo que muchas reacciones enzimáticas a nivel digestivo se paralizan por la neutralización de lipasas, proteasas, amilasas, etc. (Reddy y col., 1981; Reddy y col., 1982).

Durante el almacenamiento, germinación, fermentación u otros procesos, así como durante su paso por el tracto intestinal, el ácido fítico contenido en los alimentos va siendo defosforilado enzimáticamente mediante la acción de fitasas endógenas o exógenas de origen microbiano, resultando inositoles penta, tetra, tri, di y monofosfato (IP6, IP4, IP3, IP2, IP1) y fosfato inorgánico. Sólo IP5 e IP6 tienen un efecto negativo

sobre la biodisponibilidad de minerales, ya que los inositoles fosfato menos fosforilados (IP1, IP2, IP3 e IP4) tienen baja capacidad para unir cationes inorgánicos, o los complejos que se forman son más solubles (Sandberg y col., 1989).

2.1 Propiedades del ácido fítico.

Se ha propuesto que la molécula de AF tendría seis grupos ortofosfato de ahí a que el nombre químico es mioinositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 –hexaquis dihidrógeno fosfato. Esta molécula se encuentra cargada negativamente y por tanto muy reactiva a pH neutro y al pH que normalmente presentan los alimentos lo cual le confiere una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas (Wang, 1998). La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfatos: estos pueden unirse bien a un solo grupo fosfato, a dos grupos fosfatos de una misma molécula o a grupos fosfatos de distintas moléculas de AF.

El término fitina se ha empleado para designar una mezcla de sales de calcio y magnesio del AF, más aún este se encuentra en la semilla como una mezcla de sales con varios otros cationes el K, Mg, Mn y Fe (Bhatty y Slinkard, 1989; Yoshida y col., 1999).

La “insolubilidad” del AF es la principal causa de su comportamiento antinutricional y de sus propiedades fisicoquímicas (Cheryan, 1980; Wang y col., 1992). Sin embargo, es importante considerar que la solubilidad de las sales del AF varía con el pH, ya que el grado de protonación de los grupos fosfato que no se han unido a los

metales está en función de dicho parámetro (Nolan y col., 1987). Las sales de Ca^{+2} y Mg^{+2} son solubles a pH bajos e insolubles a pH elevados, por lo tanto a pH fisiológico serían insolubles, de ahí la menor biodisponibilidad mineral. En general, las sales hidrogenadas y monovalentes del AF son solubles en agua, mientras que las sales metálicas divalentes y trivalentes son bastantes insolubles (Han, 1988).

El grado de interacción entre el AF y proteínas es dependiente de la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con minerales a un pH determinado (Thompson, 1987; Dua y col., 1996). A pH por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el AF negativamente, en estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas y ésteres de fosfato aniónicos del AF, formándose un complejo binario (Thompson, 1987). A pH por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, tanto éstas como el AF presentarían carga negativa y por lo tanto harían imposible una interacción, no obstante, ésta se puede lograr a través de la formación de un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca^{+2} o el Mg^{+2} . (Figura 1).

Es conocido que el AF inhibe las enzimas, α -amilasa de diferentes orígenes, tripsina y pepsina. A diferencia de lo que ocurre con la pepsina, la interacción con la tripsina y la quimiotripsina no sólo depende del pH, sino también de otros factores entre los que se encuentra la relación proteína/fitato. A pH 3,0 el fitato forma complejos insolubles tanto con la tripsina como con la quimiotripsina, sin embargo, a pH 7,0 – 8,0 en el que la actividad de estas enzimas es algo mayor, es necesario el Ca^{+2} para la

formación de estos complejos, no obstante las condiciones a la que se producen fuertes interacciones rara vez se dan *in vivo* (Deshpande y Damodaran, 1989).

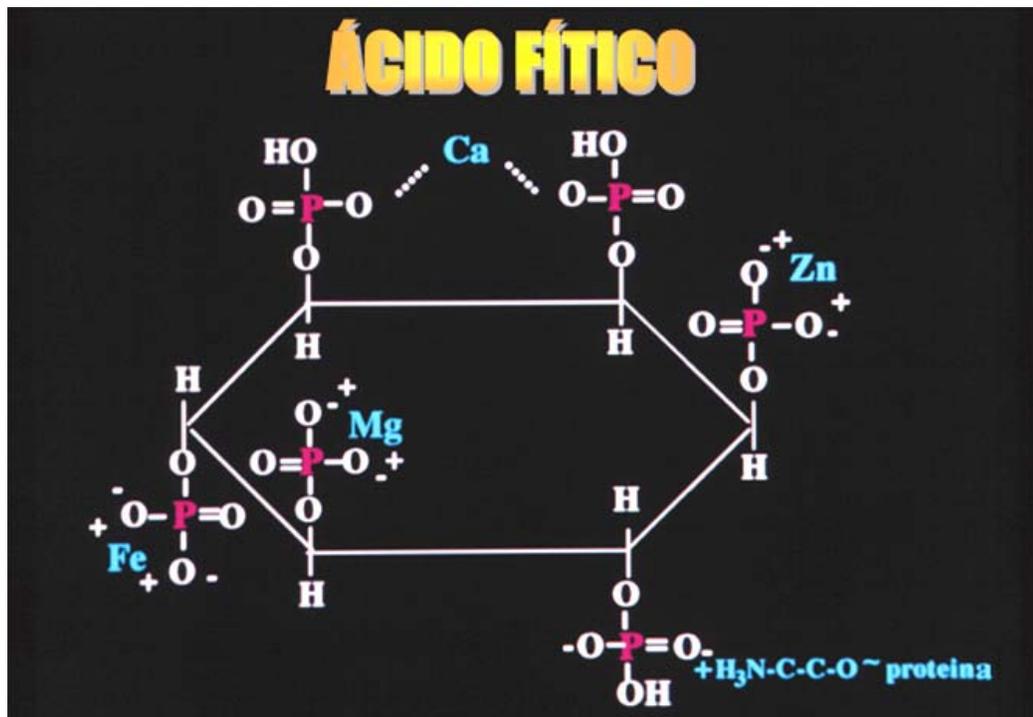


Figura 1: Complejo Ternario Ácido Fítico - Ca^{+2} - Proteína.

Una cuestión clave a tener en cuenta para entender el efecto antinutricional del AF sería conocer cuanto fitato está aún disponible tras el procesamiento de alimentos ricos en cereales y/o leguminosas. Si se considera la fuerte afinidad del AF hacia varios cationes y el tipo de interacciones que supone su asociación con proteínas de la dieta, así como el efecto del procesamiento de los alimentos, la degradación térmica de los ésteres de inositol y el pH, se podría suponer que habría poco fitato libre que

reaccionaría con enzimas y sistemas digestivos para causar una influencia significativa (Deshpande y Damodaran, 1989).

2.2 Localización y contenido de ácido fítico.

El AF se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal y se localiza fundamentalmente en el cotiledón y ejes embrionarios (Reddy y Salunkhe, 1981), en la mayoría de las plantas una gran proporción de P (80%) está presente en forma de fitato (Sugiura y col., 1999), especialmente en aquellas semillas en las que el AF se encuentra en concentraciones elevadas, desde 1-7 % (Graf y Eaton, 1990). Así en las semillas de cereales, oleaginosas y leguminosas los niveles de AF son elevados y constituyen el mayor porcentaje (60-82%) del P total, mientras que en verduras las cantidades de AF encontradas son muy pequeñas (Ravindran y col., 1994).

Los niveles de AF (g/100g) encontrados en el arroz entero (*Orize sativa*) oscilan desde un 0,86-0,99 %, en donde el 80 % del fitato se encuentra en la capa externa del salvado, en el sorgo (*Sorghum vulgare*) se han encontrado valores de 0,82-0,96 % siendo los niveles de AF mayores en las variedades coloreadas (Ravindran y col., 1994). En la cebada (*Hordeum vulgare*) y en la avena (*Avena sativa*) los niveles de AF obtenidos son del 0,99 % y 0,77%, respectivamente (Cheryan, 1980). En habas (*Vicia faba*) los niveles de AF oscilan entre 0,71-1,15 % (Carnovale y col., 1988), localizándose fundamentalmente en el cotiledón, mientras que la cáscara contiene tan sólo entre un 0,06 a un 0,20 % del AF (Griffiths, 1982). En otras semillas oleaginosas, como girasol (*Helianthus annuus*), cacahuate (*Arachis hypogaea*) y algodón (*Gossypium herbaceum*), el AF se encuentra en subestructuras del tipo cristaloides o

globoide (Cheryan, 1980). En general en las harinas de semillas oleaginosas el fósforo fítico es el 60 a 77 % del total, siendo los niveles de AF muy elevados, desde 1,7 % en la harina de cacahuete hasta 4,8 % en la semilla de algodón (Cheryan, 1980; Ravindran y col., 1994).

2.3 Función del ácido fítico en la planta.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto un incremento en la acumulación de AF con la maduración de la semilla. Aunque dicha acumulación ha sido interpretada por algunos autores como una manera de prevenir niveles excesivamente altos de P inorgánico durante la maduración, la mayoría coincide en que su función principal es el almacenamiento de P (Wang y col., 1992), el cual junto con el Mg^{+2} son movilizados durante la germinación para la síntesis de ácidos nucleicos (Yoshida y col., 1999; Schelemmer y col., 1995). Por otro lado, el AF es un importante precursor de los polisacáridos de la pared celular, así como de los fosfolípidos incluidos en la señal de transducción, además se hace mención de la participación del AF en aumentar el tiempo de latencia de la semilla, ya que previene la peroxidación de lípidos (Graf y col., 1987).

2.4 Efectos farmacológicos del ácido fítico.

Se ha descrito algunos efectos positivos del ácido fítico a bajas concentraciones, entre ellos destacan; retardo en la digestibilidad del almidón y disminución de la respuesta a la glucosa en sangre, hipocolesterolemia, prevención de cálculos renales, control de las caries dentales y del cáncer (Thompson, 1987; Graf y

Eaton, 1990; Wyatt y Triana, 1994; Graf y Eaton, 1993; Vucenik y col., 1998). También se ha descrito el papel del AF como antídoto frente a la intoxicación aguda por plomo, debido principalmente a su capacidad de unirse a minerales (Thompson, 1993).

Estudios realizados en animales y en el hombre han mostrado que la inclusión en la dieta de salvado de trigo supone un papel protector frente a diversos tipos de cáncer, especialmente de colon y mama, sin embargo, en un principio no estaba claro si este efecto era debido exclusivamente a la fibra o a otros componentes como el AF (Ferguson y Harris, 1999). Experimentos realizados en ratas alimentadas con AF muestran una relación negativa significativa entre los niveles de AF (0,6-2,0 %) y la proliferación de células epiteliales en el colon ascendente y descendente (Nielsen y Thompson, 1987), luego se postula que el AF disminuye el riesgo de cáncer a través de varios mecanismos (Thompson, 1993; Graf y Eaton, 1990; Newmark y Lupton, 1990; Phillippy y Graf, 1997), a saber:

- a)** La unión del AF con el Fe disminuye la formación de radicales libres durante la oxidación de los lípidos, ya que ésta es catalizada por dicho ión.
- b)** La unión del AF con el Zn^{+2} , necesario para la síntesis de ADN, reduce indirectamente la proliferación celular.
- c)** Cuando el AF bloquea a la α -amilasa se retarda la digestión del almidón, luego cuando este último llega al colon, por acción bacteriana se producen ácidos grasos de cadena corta, los que están documentados por su acción protectora de cáncer (Shamsuddin, 1999).

Por último Shamsuddin y col. (1999) han llegado a la conclusión de que el AF incrementa la diferenciación de células malignas que a menudo resulta en una reversión al fenotipo normal.

Estudios *in vivo*, *in vitro* y clínicos, han mostrado claramente que el fitato juega un papel importante como inhibidor de la cristalización de sales cálcicas en fluidos biológicos, siendo considerado una alternativa clara en el tratamiento de la litiasis renal (Grases y Costa, 1999).

2.5 Métodos de análisis y determinación de ácido fítico.

Dado que el ácido fítico no tiene un espectro de absorción característico, y por tanto no existen reactivos específicos para su identificación, su determinación ha constituido un problema analítico durante mucho tiempo (Maga, 1982). Básicamente se ha realizado una determinación indirecta de la medición de inositol o fosfato mediante una relación estequiométrica entre el fitato y algún catión relativamente fácil de medir (Maga, 1982).

La mayoría de los métodos para la determinación de fitato son derivados del método de Heubner y Stadler (1982), que se basan en la precipitación de fitato con ión férrico, debido a que el fitato forma un complejo insoluble con este ión en solución ácida.

Estos métodos han sido divididos en métodos directos en los cuales el fitato férrico es removido y determinado como fósforo o inositol (Maga, 1982) y métodos

indirectos en los cuales se agrega un exceso de cloruro férrico para precipitar el fitato y el hierro como fitato férrico. Así, la concentración de fitato es determinada a partir de estos resultados usando una proporción teórica de Fe: P de 4:6 (Camire y Clydesdale, 1982) o a través de la determinación de hierro residual en solución luego de la precipitación de fitato férrico de una concentración conocida de sal férrica en solución ácida.

Para calcular la cantidad de ácido fítico en el extracto original, se asume que la precipitación del fitato es cuantitativa y no ocurre contaminación del precipitado con otros ésteres de fosfato. Cuando el cálculo se realiza por análisis de Fe, se asume que la proporción molar Fe: P- fítico es definida, lo que depende del número de lavados realizados al precipitado.

Los métodos basados en la precipitación del complejo fitato - hierro, dan resultados satisfactorios para granos y semillas con un alto contenido de fitato, pero estos procedimientos son menos adecuados cuando los contenidos de fitato son menores.

Una de las desventajas de los métodos de precipitación con hierro es que no sólo el fitato (inositol hexafosfato) sino que otros componentes que contienen fósforo son precipitados. De Boland y col., (1975), encontró que todos los inositoles fosfatos de la forma di a hexafosfatos forman complejos insolubles con hierro. Sin embargo, mono, di y trifosfatos son apreciablemente solubles y no son cuantitativamente precipitados. De acuerdo a Sandberg y Adherine (1986) inositol mono y difosfatos no son medidos analíticamente por métodos de precipitación con ión férrico.

En todos estos métodos puede ocurrir una gran variación de resultados, debido a que la proporción de P/Fe puede variar de 1,5 - 2,4. Además, la solubilidad del fitato férrico se incrementa con un exceso de cloruro férrico y pequeñas cantidades de fosfato inorgánico tienden a precipitar (Graf y Dintziz, 1982).

Al evaluar los solventes de extracción de ácido fítico, en estudios realizados en afrecho de trigo, se compararon H₂SO₄ 3%, TCA 3%, ácido acético 3% y acetato de amonio 1M, todos resultaron ser más efectivos que el ácido sulfúrico (Camire y Clydesdale, 1982). Al comparar la extracción con HCl 0.8M y TCA 3%, el TCA entregó valores más bajos para el fitato, lo que se explica debido a que el TCA es utilizado a menudo para la desnaturalización de proteínas y el fitato tiene una alta afinidad por la proteínas con alta polaridad lo que puede resultar en una oclusión del ácido fítico que puede ser eliminado en los pasos de filtración posterior (Boss, 1991).

Un método más promisorio ha sido reportado por Latta y Eskin (1980), éste involucra la extracción de fitato con HCl 2,4% por una hora a temperatura ambiente, seguido por purificación mediante una resina de intercambio aniónico y de una reacción con cloruro férrico y ácido sulfosalicílico, la medición del color resultante se realiza espectrofotométricamente.

Entre los métodos que no involucran precipitación se incluye la determinación por hidrólisis del fitato seguida por determinación de fosfato (Graf y Dintziz, 1982).

Un método espectrofotométrico directo para determinar ácido fítico sin digestión ácida, es el basado en la precipitación del fitato como fitato férrico seguido por

conversión a fitato de sodio, luego éste reacciona a una determinada temperatura con un reactivo cromogénico, formando un complejo de color azul (Mohamed y col., 1986).

Tagendaja y col., (1980) fue el primero en usar HPLC para la determinación de fitato, utilizando una columna C-18 en fase reversa con acetato de sodio como fase móvil para separar fitato de mioinositol. Los resultados obtenidos con este procedimiento fueron poco confiables debido a que las respuestas del detector, para inyecciones sucesivas de estándar, disminuyeron en un 25-40%.

Camire y Clydesdale (1982) cuantificaron el ácido fítico en alimentos después de su extracción con ácido sulfúrico, filtración, precipitación con cloruro férrico y redisolución con NaOH previo a la detección por HPLC, señalan como ventajas del método cromatográfico, la eliminación de la proporción teórica Hierro: Fósforo en los cálculos y la reducción de los pasos de centrifugación y lavado necesarios en los métodos de determinación indirecta. Graf y Dintziz (1982) usaron una resina de intercambio aniónico para purificar las muestras de alimento previo a la detección del fitato por HPLC, mientras que Knuckles y col. (1982) usó el mismo procedimiento, pero utilizando KH_2PO_4 , en la fase móvil ajustada a un pH 6,0, para evitar el deterioro de la columna por el bajo pH del extracto. Lee y Abendroth (1983), desarrollaron un procedimiento en el cual el error debido a la coelución del fitato con el solvente se eliminaba al usar tetra-butil amonio hidróxido y ácido fórmico para la fase móvil de pH 7,2, en una cromatografía de apareamiento iónico.

Sandberg y Ahderinne (1986), desarrollaron un método para la separación y determinación cuantitativa de inositol tri, tetra, penta y hexafosfatos. La extracción de

inositol se realiza con HCl y cromatografía de intercambio aniónico para la separación de inositol fosfato del extracto crudo. Utilizaron una columna C₁₈ en fase reversa, donde el inositol fosfato fue determinado mediante su índice de refracción, se usó como fase móvil 0,05M de ácido fórmico: metanol 49:51 y 0,6 % de TBA-OH, para apareamiento iónico, ajustado a pH 4,30 con H₂SO₄.

Ellos encontraron, que a pH más bajos la separación de inositoles fosfatos resultaba inadecuada por la falta de resolución entre el inositol trifosfato y el solvente, pero también se producía una mayor separación entre el inositol penta y hexafosfato. Por otro lado, a pH más alto la resolución entre penta y hexafosfato era inadecuada.

Este método para HPLC proporciona valores reproducibles de inositoles tri a hexafosfato en alimentos y muestras biológicas, pero no se sabe si la presencia de nucleótidos puede causar algún grado de interferencia (Phillippy y Johnston, 1985).

2.6 Principio de la cromatografía.

La cromatografía líquida es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Las bases de la separación cromatográfica se sustentan en la participación de tres componentes o especies; la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria. En el caso más simple, el cromatógrafo líquido esta constituido por:

- ❖ Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- ❖ Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.

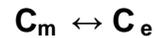
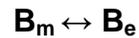
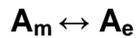
- ❖ Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- ❖ Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- ❖ Un sistema de registro de los datos provenientes del detector.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

- ❖ Un gráfico, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elusión.
- ❖ Un eluido o eluato, el fluido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada, contiene la fase móvil e idealmente, los componentes de la muestra separados.

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de las especies. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones bipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así, el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir (es decir, en salir de la columna: A) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes (C).

Para cada caso, en la columna se establecerá un equilibrio que involucra la fracción de cada especie “disuelta” por cada fase en equilibrio. Por ejemplo, para A, B y C los siguientes equilibrios:



Con el subíndice “m” se representa la fracción del soluto disuelta en la fase móvil y con el subíndice “e” la disuelta en la fase estacionaria. Las características químicas de las especies A, B y C pueden ser, en relación a las moléculas de solvente y a los grupos funcionales de la fase estacionaria, lo suficientemente diferentes como para ser atraídas con distinta fuerza por ésta última. Como resultado, en este ejemplo hipotético, las moléculas de C viajarán a mayor velocidad que las de B y éstas a mayor velocidad que las de A. Para que A eluya de la columna, será necesario que un determinado volumen de fase móvil (eluyente), llamado volumen de elusión, atraviese la columna. El volumen de elusión será entonces diferente y creciente para C, B y A. Por otra parte, si se trabaja a volumen constante (la modalidad habitual en HPLC), el volumen de elusión de cada especie será proporcional a un tiempo conocido como tiempo de retención o de elusión.

2.7 Detector de índice de refracción.

Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal, ya que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente. Como contrapartida es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura. No se puede utilizar con programación de solventes porque el cambio de la composición de la fase móvil se acompaña del cambio de su índice de refracción, como consecuencia no se estabiliza la línea base. Existen

tres tipos diferentes de detectores de Índice de Refracción: Fresnel, Deflexión e Interferométrico.

2.7.1 Fresnel.

Es un detector diferencial que utiliza dos celdas, una de medición que es atravesada por el eluído de la columna, y una celda de referencia por la cual fluye la fase móvil pura. Opera según la ley de Fresnel, que establece que “la cantidad de luz reflejada en una interfase líquido/vidrio varía con el ángulo de incidencia y con el índice de refracción del líquido”. Posee una celda de medición pequeña, del orden de los 3 μl que está constituida por un prisma, una base de acero pulido y un sello de teflón entre ambos. Para cubrir todo el rango de índice de refracción ($n = 1,33$ a $1,63$) se utilizan dos prismas. Además, con el propósito de evitar el calentamiento de la celda por la radiación entre ésta y la lámpara se coloca un filtro infrarrojo.

2.7.2 Deflexión.

Es un detector diferencial que, a diferencia del Fresnel, sólo usa un prisma para todo el rango de índices de refracción, pero emplea celdas de mayor tamaño, del orden de 8 a 10 μl .

2.7.3 Interferométrico.

La luz emitida por la fuente luminosa se polariza y divide en dos haces por un divisor de onda. Luego se localizan ambas ondas y atraviesan la celda de referencia y la de medida. Finalmente se recombinan por una segunda lente y por un divisor de

onda, para llegar al fotomultiplicador. Cuando se produce una diferencia entre los índices de refracción de ambas celdas tiene lugar un cambio de fase entre ambas ondas y esto origina una diferencia en la intensidad de la luz que llega al fotomultiplicador (Quattocchi y col., 1992)

2.8 Validación.

Una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, deberá validarse, es decir se debe confirmar y documentar que los resultados producidos son confiables. En un ensayo de validación deben considerarse los siguientes parámetros:

- Linealidad.
- Precisión.
- Exactitud - Recuperación
- Sensibilidad.
- Selectividad.

2.8.1 Linealidad.

Se entiende por linealidad a la proporcionalidad entre la concentración del analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio.

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones patrón del analito, como en muestras problema que contengan concentraciones crecientes de analito, efectuándose posteriormente el tratamiento matemático de los resultados analíticos. Esto último, se realiza mediante el diseño de una curva de calibración que relaciona respuesta (áreas, altura, absorbancia, etc.) con concentración o cantidad de analito. Generalmente se halla la recta de regresión por el método de ajuste de los “mínimos cuadrados”. En algunos casos se necesita alguna transformación matemática previa (logaritmos, etc.) para obtener funciones de calibración lineal.

La recta de calibración es del tipo: $y = bx + a$, donde x = corresponde a la concentración; y = la respuesta; b = el valor de la pendiente; a = el término independiente (Castro y col., 1989).

2.8.2 Precisión.

El concepto de precisión se refiere al grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o en otras palabras se refiere a la distribución de los valores analíticos alrededor de su media.

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. La idea de la precisión viene expresada por la media para el valor central y la desviación estándar para la dispersión de los resultados.

Un estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre una muestra, la cual se denomina “precisión del método” puesto que incluye todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta la lectura instrumental. La precisión del “sistema instrumental” también se puede determinar buscando la variabilidad de respuesta de una solución patrón. 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 y col., 1989; Torroba y Vivino, 2000).

2.8.3 Exactitud-Recuperación.

Este parámetro es también llamado error sistemático o tendencia y corresponde al grado de concordancia entre los resultados de las pruebas generadas por el método y el valor verdadero. Este procedimiento 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.

$$R = (X/X_0) \times 100$$

Donde X corresponde al valor medio y X_0 el valor verdadero.

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 y col., 1989; Torroba y Vivino, 2000).

2.8.4 Sensibilidad.

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo o que puede determinarse en una muestra con razonable precisión y seguridad. Los parámetros a evaluar cuando se define la sensibilidad son:

2.8.4.1 Límite de detección.

Es 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.

2.8.4.2 Límite de cuantificación.

Es 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.

Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse analizando una serie de blancos de la muestra (≥ 10) y se calcula la media 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.

$$L(x) = \underline{X_b + K \times S_b}$$

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)

2.8.5 Selectividad.

Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la 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 y col., 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, luego 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 y col., 1992).

2.9 OBJETIVOS.

2.9.1 Objetivo General.

Implementar y validar un método de extracción y cuantificación desde matrices vegetales para mioinositol (I) y ácido fítico (IP6) por cromatografía de intercambio aniónica de alta resolución acoplado a detector de índice de refracción.

2.9.2 Objetivos Específicos.

1. Desarrollar un método de extracción de mioinositol y ácido fítico a través de cromatografía de intercambio aniónico desde matrices vegetales, trigo y soya.
2. Desarrollar un método para la determinación y cuantificación de I e IP6 en distintos vegetales, mediante la técnica de cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a la detección con índice de refracción (HPIC – IR).
3. Validar el método analítico mediante la determinación de la precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad.
4. Determinar niveles de mioinositol y ácido fítico en trigo, soya, lupino, maíz y canola.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos.

- Acetato de sodio de Merck.
- Acido acético de Merck.
- Acido Clorhídrico de Caledon Laboratories L.T.D.
- Agua desionizada de Merck.
- Hidróxido de Sodio de Arquimed.
- Inositol hexafosfato de Sigma & Aldrich Chemical Co.
- Mioinositol de Sigma & Aldrich Chemical Co.
- Resina Dowex tipo I (Trimethylbenzyl ammonium) de Sigma & Aldrich Chemical Co.

3.2 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.

3.3 Metodología analítica.

3.3.1 Condiciones cromatográficas.

El análisis mediante la técnica HPLC – IR se desarrolló utilizando una bomba cuaternaria Jasco PU – 2089 plus equipada con un loop de 20 µl e inyector Rheodyne modelo 7125. Para la separación y cuantificación cromatográfica de los analitos se utilizó una columna KR 100 – 5NH₂ Kromasil, tamaño 250 X 4,6 mm y un detector RI – 71 Differential refractometer (Merck).

La fase móvil utilizada fue Acetato de sodio 35 mM, la cual se ajustó a pH 7,00 con ácido acético 5,0 % p/v. Esta solución se preparó con agua desionizada grado HPLC y cada vez que se realizó ensayos en el equipo fue filtrada con filtros 0,22 µm y desgasificada por sonicación durante 10 minutos.

Mediante inyecciones sucesivas de los estándares (ácido fítico y mioinositol) en diferentes concentraciones y flujos de fase móvil, se determinó como condición de trabajo, un flujo de 0,8 ml/min a temperatura ambiente.

3.3.2 Tratamiento de las muestras vegetales.

1. Se pesaron 0,5 gramos (0,25 gramos en recuperación) de muestra vegetal.
2. Se agregó 20 ml de HCl 0,5 M y la mezcla fue sonicada por 30 minutos (Lehrfeld, 1989).
3. A continuación, la mezcla fue sometida a agitación constante por una hora.

4. Transcurrido este tiempo el total de la mezcla es centrifugado 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.
6. La solución neutralizada fue nuevamente filtrada en papel W- N° 1 y por último se realizó una filtración en filtro 0,22 µm.
7. La muestra filtrada fue sometida a una cromatografía de intercambio aniónico (C.I.A) con el propósito de purificar y concentrar los analitos. Para esto, el volumen total, aproximadamente 20 ml, de la solución filtrada, en el punto 6, se hizo pasar a través de la columna con resina Dowex tipo I que había sido previamente equilibrada con HCl 50 mM.
8. 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.
9. 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.
10. Una alícuota de 4 ml del eluato (10 ml) fue evaporada a sequedad completa en rotavapor a 40° C (2 horas).

El residuo final fue reconstituido en 4 ml de fase móvil y analizado por HPLC-IR.

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

3.3.3.1 Mioinositol.

Debido a que en la bibliografía no hay datos de la cantidad de mioinositol presente en los vegetales, básicamente porque este es el pilar inicial para la síntesis de inositoles parcialmente fosforilados y ácido fítico, se pensó encontrar un remanente de la síntesis de ácido fítico o de una actividad fitasa endógena en la matriz vegetal que pudiese eventualmente dar origen a niveles bajos de inositol cuantificables.

En el diseño de una curva de calibración para mioinositol, se tuvo en cuenta la baja sensibilidad del detector de índice de refracción y por lo tanto, se decidió probar una serie de concentraciones bajas de estándares: 0,30 mg/ml, 0,60 mg/ml, 0,90 mg/ml y 1,20 mg/ml. Luego se verificó, a partir de la extracción de los analitos desde muestras vegetales, si esta curva de calibración era útil para los niveles de inositol presente en ellos. Cada punto de la 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.

3.3.3.2 Ácido fítico.

La bibliografía da a conocer un amplio y heterogéneo nivel del ácido fítico presente en las diversas matrices vegetales. Esto puede deberse a dos razones básicas y fundamentales, ellas son en primer lugar las diferencias en el procedimiento utilizado para la extracción del ácido fítico, los cuales varían en el número de etapas

que conlleva el método, pero por sobretodo a que muchos de estos procedimientos son publicados sin mostrar información concerniente a un estudio de validación estadística del método.

En segundo lugar, se debe tener presente los distintos detectores que hoy en día se utilizan para cuantificar el ácido fítico (detector de fluorescencia, de resonancia magnética nuclear, de masas, etc.) que, sin duda, tienen mayor sensibilidad que el detector de índice de refracción. Como consecuencia de esto, se diseñó una curva de calibración con cuatro niveles y cada uno de ellos fue realizado en triplicado: 1,00 mg/ml, 2,00 mg/ml, 3,00 mg/ml y 4,00 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 de concentración (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.

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

La finalidad de utilizar una columna de intercambio aniónico fue purificar y concentrar los inositoles extraídos desde las matrices vegetales.

El procedimiento para montar esta columna consistió en pesar aproximadamente 3,0 gramos de resina Dowex tipo I y resuspenderla en HCl 50 mM. En forma paralela se aseguró una columna de vidrio a un soporte universal, en cuyo extremo contenía un filtro de lana de vidrio prensada y una llave que abría o cerraba el paso de la solución depositada en el interior. Esta columna de vidrio, de 10 cm de

longitud por 1,2 cm de diámetro interno, se llenó con HCl 50 mM y a medida que se agregaba por un extremo la suspensión de resina, por el otro se facilitaba la salida del ácido clorhídrico a través de la llave. Así, lentamente la resina se fue depositando en el fondo de la columna hasta quedar como una estructura de apariencia compacta en la cual se retendrían los inositoles. A continuación, se hicieron pasar aproximadamente 250 ml de HCl 50 mM por la columna con el propósito de lavar y equilibrar la resina, asimismo, cada vez que ésta no se utilizaba se dejaba cubierta con este mismo ácido.

3.3.5 Determinación de la capacidad de la C.I.A.

Para concentrar y purificar los inositoles extraídos desde las matrices vegetales se montó la columna de intercambio iónico, junto a esto, fue fundamental y prioritario determinar la capacidad aproximada de saturación de la C.I.A. Este procedimiento se realizó tanto para mioinositol como para ácido fítico y consistió básicamente en disolver seis cantidades de ambos analitos en 10 ml de HCl 0,5 M por separado y en duplicado. A continuación, cada una de las soluciones se neutralizó con NaOH 0,250 M/ EDTA 5,0 mM y se hicieron pasar por la columna de intercambio iónico, seguido a esto, se adicionó 15 ml de NaCl 100 mM y 20 ml de agua. Para eluir los inositoles adheridos a la resina, se colocó 10 ml de HCl 2,0 M y a continuación, 4 ml del eluato se secaron con rotavapor. El producto final fue reconstituido en 4 ml de acetato de sodio 35 mM pH 7,00 e inyectado al sistema HPLC – IR previamente equilibrado (Ejemplo de cálculo 2, en anexo N° 3).

3.3.6. Validación.

3.3.6.1 Linealidad.

Para determinar la linealidad del mioinositol se inyectó el analito en concentraciones 0,30 mg/ml, 0,60 mg/ml, 0,90 mg/ml y 1,20 mg/ml, por triplicado. En tanto que, para el caso del ácido fítico las concentraciones fueron 1,00 mg/ml, 2,00 mg/ml, 3,00 mg/ml y 4,00 mg/ml. Las condiciones experimentales del procedimiento fueron realizadas en 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 determinaron los coeficientes de correlación (r), (r^2) y el grado de significación con una tabla de prueba de coeficiente de correlación.

3.3.6.2 Determinación de la precisión del sistema instrumental.

3.3.6.2.1 Determinación de la repetibilidad.

Para determinar este parámetro se utilizó las concentraciones 0,60 mg/ml y 1,20 mg/ml para mioinositol, en tanto que, para ácido fítico se usó 1,00 mg/ml, y 4,00 mg/ml. Luego la determinación de la precisión se llevó a cabo evaluando la dispersión de 10 inyecciones por cada nivel de concentración en condiciones de repetibilidad, mezclando las cantidades de analitos necesarias para obtener 0,60 mg/ml de mioinositol con 1,00 mg/ml de ácido fítico y 1,20 mg/ml de mioinositol con 4,00 mg/ml de ácido fítico.

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.

3.3.6.2.2 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 concentración 0,90 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.).

3.3.6.3 Determinación de la precisión del método.

3.3.6.3.1 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.

Se realizó 6 determinaciones para 0,50 gramos de trigo y soya y se calculó el promedio de las lecturas, la S.D. y el C.V.

3.3.6.3.2 Determinación de la reproducibilidad.

Para la determinación de este parámetro, se realizó análisis en duplicado para 0,50 gramos de trigo y soya. 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.

3.3.6.4 Exactitud- Recuperación.

Para realizar este ítem se hizo mediciones de mioinositol y ácido fítico en muestras de trigo y soya, por triplicado. Una vez conocida la cantidad de estos analitos en 0,5 gramos de cada muestra, se realizó la recuperación de 15 y 30 mg para el caso de ácido fítico y de 10 mg para inositol.

Una vez que se pesó cada cantidad del analito, 10 mg para el caso del inositol y 15 y 30 mg para el caso del ácido fítico, se mezcló con 0,25 gramos de cada vegetal y a continuación se realizó el procedimiento de extracción y cuantificación.

Finalmente los resultados de la cantidad promedio de las muestras mezcladas con cantidades definidas de los analitos, se les restó la cantidad promedio del ácido fítico e inositol que estaban presentes de manera constitutiva en las muestras vegetales. Luego se procedió a calcular el promedio, S.D., C.V. y porcentaje de recuperación.

3.3.6.5 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 0,15 mg/ml, 0,30 mg/ml, 0,45 mg/ml y 0,60 mg/ml, en tanto que, para ácido fítico se usó 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 1.7.4.

3.3.6.6 Selectividad.

Para la determinación de la selectividad se efectuaron modificaciones en las condiciones cromatográficas, variando primero el pH de la fase móvil, así como la fuerza iónica de la misma. Más aún, con el propósito de mejorar la selectividad incluso se probó distintas columnas ya sea porque estas ofrecían distintas características de empaque y/o aminoraban el efecto “tailing”.

Desde el punto de vista experimental, cuando se trabajó con muestras de vegetales y hubo duda respecto del pico en cuestión, se procedió a agregar determinada cantidad del estándar respectivo (mioinositol o ácido fítico).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Linealidad.

Es importante señalar que, al momento de diseñar y estructurar esta técnica para detectar y cuantificar mioinositol y ácido fólico, se contaba con extensa bibliografía que sólo hacía alusión a los niveles de éste último analito presente en diversas matrices vegetales, pero no así a la presencia de mioinositol. Más aún, la información en relación a niveles de ácido fólico variaba de una fuente a otra e incluso en algunos casos de dos a tres veces (Tangendjaja y col., 1980; Graf y Dintzis., 1982; Carlsson y col., 2001).

Para poder construir la curva de calibración definitiva de este estudio, se debió en primer lugar estimar las cantidades de ácido fólico presente en las matrices vegetales a analizar (trigo, soya, lupino, canola, maíz). Esto se realizó, mediante la extracción de este analito desde los vegetales y paralelamente a través del diseño de una curva de calibración tentativa a partir de la información presente en la bibliografía. Se hizo un procedimiento similar para el caso de mioinositol.

Finalmente el ensayo de linealidad se efectuó sobre la mezcla de mioinositol y ácido fólico en las concentraciones que se describen en métodos 3.3.3.1 y 3.3.3.2. Los resultados de estas curvas de calibración se muestran en las figuras 7 y 8 (Anexo N° 1), de las cuales se obtuvo las respectivas ecuaciones de regresión con sus valores (r) y (r^2).

Según estos datos se puede concluir que:

- Para ácido fólico la variable independiente explica un 99,73% de la varianza total de y .
- Para mioinositol la variable independiente explica un 99,78% 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 (Ejemplo de cálculo 3, en anexo N° 3), en este caso $p = 0,05$ y probabilidad superior al 95% (Castro y col., 1989).

Los valores de t_r obtenido para mioinositol y ácido fítico son (Tabla 1, en anexo N° 2):

- ácido fítico t_r **60,78** >> t_{tabla} **2,228**

- mioinositol t_r **67,34** >> 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 0,30 y 1,20 mg/ml para mioinositol y 1,00 y 4,00 mg/ml para ácido fítico hay una linealidad aceptable.

4.2 Precisión del sistema instrumental.

4.2.1 Repetibilidad del sistema instrumental.

Las tablas 3, 4 y 5 (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 para ambos analitos.

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 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.

Para la determinación de la reproducibilidad del sistema instrumental los valores del coeficiente de variación promedio de las lecturas en duplicado tanto para mioinositol como para ácido fítico, 0,90 mg/ml y 2,00 mg/ml respectivamente, realizado durante 5 días, estuvieron dentro del rango aceptado por la A.O.A.C., el cual se encuentra entre 3,7 y 5,3% para concentraciones que van entre 0,10 y 1,00 mg/ml (Tabla 6, 7 y 8, en anexo N° 2).

4.3 Precisión del método.

4.3.1 Repetibilidad del método.

La repetibilidad del método se realizó con dos tipos de matrices vegetales, trigo y soya tal como se describe en método 3.3.6.3.1. En las tablas 9 y 10 (Anexo N° 2) se informó la cantidad de los analitos extraídos desde estas matrices vegetales (Ejemplo de cálculo 4, en anexo N° 3).

A partir de estos valores se calculó el coeficiente de variación, tanto para mioinositol como para ácido fítico 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 las muestras de trigo y soya.

En ensayos preliminares de cuantificación de ambos inositoles en estas matrices, se encontró importantes diferencias en relación al contenido de estos analitos.

Desde el punto de vista analítico era predecible un resultado de estas características, básicamente porque se estaba analizando materia sólida donde no existe una distribución homogénea comparada con la que existe normalmente en una solución. Con el propósito de aminorar esta alta dispersión de los resultados obtenidos entre análisis, se tomaron como medidas previas, homogeneizar el tamaño de las partículas a través del uso de un mortero de vidrio, seguido de un tamizaje para descartar partículas de mayor e irregular tamaño. A continuación, la muestra vegetal molida y tamizada se mezcló con una punta de espátula de rojo de carmín hasta obtener una distribución homogénea.

A partir de este producto final, se obtuvo las cantidades necesarias para hacer los análisis de precisión del método.

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 (Tabla 11 y 12, en anexo N° 2).

4.4 Exactitud- Recuperación.

El análisis de exactitud/recuperación tiene como propósito evaluar la capacidad que tiene el método para extraer los analitos desde la matriz en particular.

Básicamente, existen dos metodologías para desarrollar este ensayo; la primera requiere de un estándar externo, el cual debe tener similares características fisicoquímicas al analito en estudio, más aun debe poseer idénticas propiedades de detección y/o características cromatográficas para este caso. Sin embargo, en este estudio no se contó con esta alternativa de análisis. Luego se debió emplear la segunda estrategia, la cual consistió en determinar por triplicado la cantidad de cada uno de los analitos en las matrices a estudiar y luego con este dato, se mezcló cantidades determinadas de vegetal con los analitos en sus cantidades correspondientes.

A continuación, se realizó la extracción de mioinositol y ácido fólico desde esta mezcla y se calculó los porcentajes de recuperación. Como se puede apreciar en las tablas 13 y 14 (Anexo N° 2) estos valores promedian un 92% (Ejemplo de cálculo 5, en anexo N° 3), lo cual para el nivel de cantidad/ concentración de los analitos están dentro del rango aceptado por la A.O.A.C. el cual se encuentra entre el 90 -105%.

Para probar la afirmación anterior, se aplicó el método de *t de student*. Se calculó el t_{exp} de cada uno de los analitos (Ejemplo de cálculo 6, en anexo N° 3). El t_{tabla} para $p = 0,05$ y $n-1$ grados de libertad es de 2,201 para ácido fólico y 2,571 para mioinositol. El t_{exp} para el ácido fólico fue de 10,08 y para mioinositol de 6,45, valores que son mayores al t_{tabla} correspondiente. Por lo tanto, existen diferencias significativas entre las recuperaciones medias y 100%, por lo cual el método no tiene la exactitud requerida.

4.5 Sensibilidad.

Los resultados de la determinación de sensibilidad se aprecian en las figuras 9 a 12 (Anexo N° 1). Si bien los límites de detección y de cuantificación para cada uno

de los analitos son distintos entre ellos, todos se encuentran dentro del rango de detección del equipo, el cual se encuentra entre los valores de 0,1 a 1,0 ug.

4.6 Selectividad.

Este método analítico es capaz de detectar y cuantificar los analitos cuando se analizan los estándares separados, en combinación o cuando son extraídos desde cada una de las muestras vegetales. Es importante señalar, que desde el punto de vista cromatográfico mioinositol y ácido fítico presentaron tiempos de retención próximos entre sí.

En la práctica, se probó todas las combinaciones posibles para tratar de mejorar la resolución entre estas moléculas, por ejemplo, se probaron cuatro columnas cromatográficas que se diferenciaban en proveedor, longitud y empaque, además se analizaron diversas fases móviles que diferían en fuerza iónica, concentración del aditivo orgánico y pH, e incluso se probaron distintas temperaturas y bombas HPLC, pero no se logró mejorar este factor analítico.

Sin embargo, los resultados cuantitativos obtenidos luego de estandarizar el procedimiento, dan cuenta que esta metodología de análisis posee los niveles de aceptación requeridos por la A.O.A.C. cuando se aplica en las condiciones que fue validada. Por ejemplo si se analizaran muestras que eventualmente tuvieran niveles muy elevados de los analitos, sería fundamental realizar una etapa de dilución previa, de la muestra, pues de lo contrario se perdería la resolución de los analitos y la linealidad de la determinación.

4.7 Montaje y determinación de la capacidad de la C.I.A.

Una etapa fundamental de este procedimiento de análisis fue el montaje y la determinación de la capacidad de la resina de intercambio aniónico (C.I.A), esto debido a dos importantes razones. La primera corresponde al hecho de trabajar con un sistema de detección basado en el índice de refracción, el cual aparte de su baja sensibilidad, presenta como requisito primordial, que el analito a detectar se encuentre disuelto en el mismo solvente que se está utilizando como referencia (fase móvil).

En el proceso de extracción de inositoles desde matrices vegetales, se utiliza HCl, además de otras soluciones en distintas concentraciones. Sin embargo, éstas deben ser eliminadas y el analito ser disuelto en la solución de referencia para no producir perturbaciones en el sistema de detección.

El HCl 2 M, se utiliza para eluir los inositoles desde la C.I.A, luego, si se realiza la inyección directa de esta solución al sistema HPLC- IR, sin haber eliminado el ácido, se produce una saturación de la señal de detección perdiéndose la resolución y cuantificación del analito en estudio, además de generar daño en el equipo por el efecto corrosivo del HCl en metales.

La segunda razón, se refiere exclusivamente a la determinación de la capacidad de la resina Dowex 1 de retener inositoles. Esta información fue de vital importancia a la hora de evaluar con que cantidad de muestra (matriz) trabajar, más aún fue relevante en todas las etapas de validación del proceso.

Con el propósito de determinar la capacidad aproximada de la C.I.A, se adicionaron cantidades crecientes de mioinositol y de ácido fítico, tal como se señala en

la tabla 2 (Anexo N° 2) y se evaluó la cantidad de analito que fue retenida luego de ser sometida a los correspondientes lavados (método 3.3.2).

Los resultados (Tabla 2, en anexo N° 2) muestran que a niveles por sobre los 20 mg de mioinositol se produce una recuperación inferior al 90%, en tanto que, para el límite máximo establecido para este ensayo (30 mg), el ácido fítico se retiene en valores aproximados al 95%. Una posible explicación de la diferencia, en los resultados de retención de los analitos por parte de la resina, radicaría en las diferencias estructurales de los grupos funcionales que presentan ambas moléculas. Mioinositol podría presentar un número máximo de 6 cargas negativas que en determinadas condiciones favorecerían su retención en la resina, en tanto, que el ácido fítico podría llegar a presentar 12 sitios de disociación de protones (Cheryan, 1980; Thompson, 1987; Maenz, 2001), lo cual aumentaría al doble la probabilidad de ser retenido por la resina. Estos resultados son de alguna manera, corroborados con los obtenidos de los perfiles cromatográficos, en los cuales se observa mayores tiempos de retención para el ácido fítico al utilizar la columna propilamino.

4.8 Análisis de resultados de muestras vegetales.

El ácido fítico es un componente esencial de todas las semillas, donde constituye una reserva de fósforo y otros minerales que se liberan durante la germinación (Wosdzinski y Ullah, 1995).

Por otro lado, se han descrito numerosas aplicaciones para el ácido fítico en medicina humana, tales como prevención de caries dentales, agentes

hipocolesterolémico, reductor de crecimiento tumoral y potente antioxidante (Graf, 1987). No obstante, su alto potencial quelante impide la absorción a nivel intestinal de una serie de iones divalentes (Sauveur, 1989), así como también se ha descrito inhibición de algunas enzimas importantes en el proceso de digestión.

Todas estas características hacen de alguna manera necesario contar con una metodología analítica que permita la cuantificación de este analito. Por lo tanto, desde ese punto de vista, en este trabajo de investigación, se planteó como objetivo fundamental diseñar y/o modificar, a partir de la bibliografía existente, un sistema de detección y cuantificación de ácido fítico en muestras vegetales.

En la tabla 15 (Anexo N° 2), se muestra las cantidades de ácido fítico y mioinositol de las cinco muestras vegetales analizadas (trigo, maíz, soya, lupino y canola). Como es de notar, hay niveles muy heterogéneos para el caso de ácido fítico, lo cual de acuerdo a la bibliografía se debe a características propias de las distintas especies vegetales.

Desde el punto de vista fisiológico las semillas a través de su maduración presentan distintos niveles de actividad fitásica intrínseca, lo cual podría explicar la diferencia en los niveles de ácido fítico y mioinositol presentes (Silva y Trugo, 1996) en estas matrices.

En canola y trigo se encontraron los niveles más altos de ácido fítico, en este último además, la cantidad de mioinositol encontrada fue la más alta entre las muestras vegetales analizadas (Figuras 2 a 6). Este resultado concuerda de algún modo con lo citado en la bibliografía en la cual se atribuye la mayor actividad fitásica endógena al trigo (Ravindran y col., 1995).

Este procedimiento analítico, presenta como una de sus etapas, la purificación y concentración de los inositoles a través de la C.I.A, la cual es fundamental para poder cuantificar los analitos y además disminuir al máximo la presencia de interferentes, esta última virtud es fácilmente apreciada al ver los cromatogramas.

Finalmente, para informar la cantidad de los analitos presentes (Tabla 15, en anexo N° 2) se debió realizar un ajuste de datos en cuanto al % recuperación, tal como se muestra en el ejemplo de cálculo 7 (Anexo N° 3).

Figura 2: Cromatograma de Muestra de Trigo.

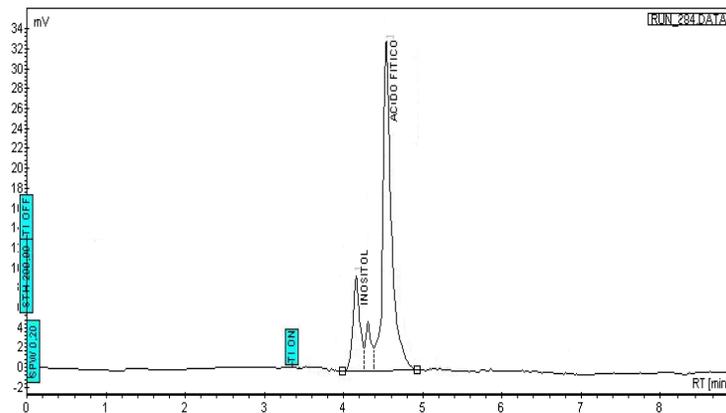


Figura 3: Cromatograma de Muestra de Maíz.

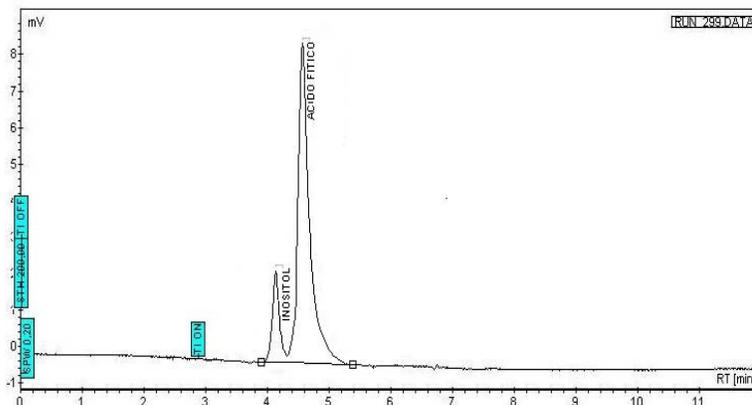


Figura 4: Cromatograma de Muestra de Canola.

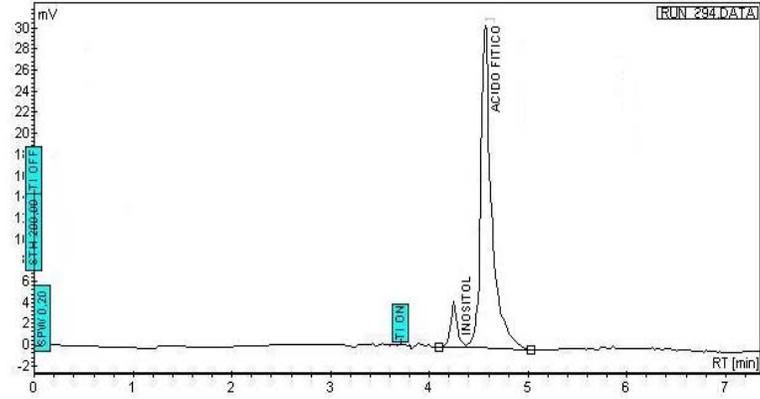


Figura 5: Cromatograma de Muestra de Lupino.

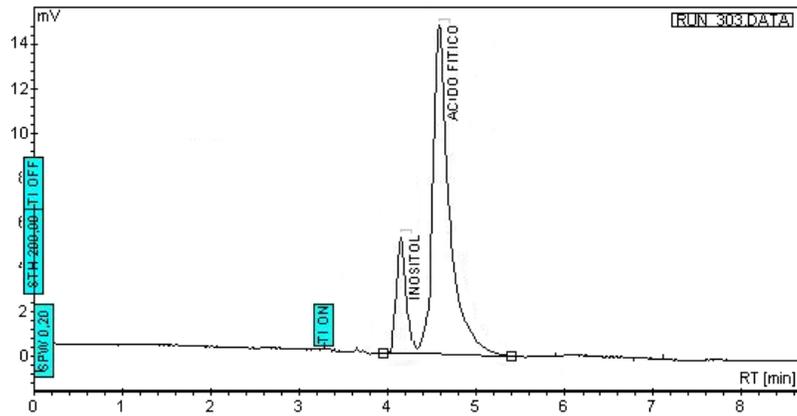
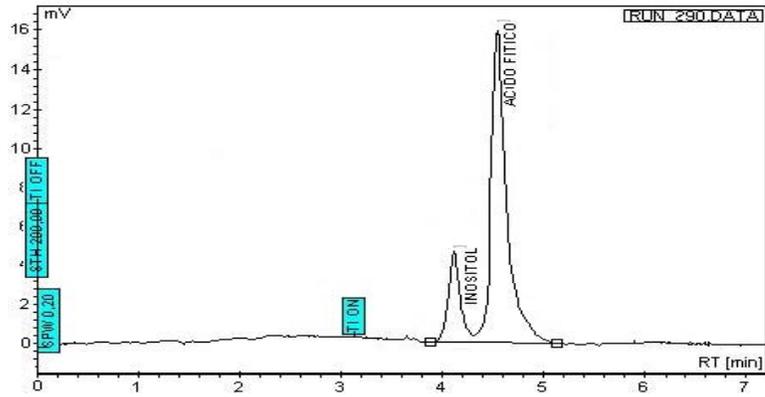


Figura 6: Cromatograma de Muestra de Soya.



5. Conclusiones

- Este procedimiento analítico es capaz de detectar y cuantificar mioinositol y ácido fítico en muestras vegetales con alta eficiencia. Esta última, se logra a través de la combinación de la purificación y concentración de los analitos (mioinositol y ácido fítico) por la columna de intercambio aniónico (C.I.A) y a la cromatografía de intercambio aniónica de alta resolución (H.P.A.E.C).
- Este procedimiento fue validado y posee linealidad, sensibilidad y precisión dentro de los rangos establecidos por la A.O.A.C.
- La exactitud/ recuperación del procedimiento se encontró dentro de los rangos de aceptación de la A.O.A.C, sin embargo, cuando los datos se evaluaron a través del método *t student* el procedimiento no presentó una exactitud adecuada.
- Las muestras de canola y trigo, presentaron los mayores niveles de ácido fítico, además en ésta última, la cantidad de mioinositol fue superior a las demás muestras analizadas, lo que podría sugerir una importante actividad fitásica intrínseca.
- En todas las muestras vegetales analizadas se encontraron niveles de mioinositol, lo cual podría deberse a la actividad fitásica intrínseca y/o niveles constitutivos de este analito en estas matrices.

Proyecciones.

- Existen antecedentes de que el fitato reduce la biodisponibilidad mineral e inhibe enzimas proteolíticas y amilolíticas. De ahí a que hoy en día sea de vital importancia el determinar de manera exacta y reproducible la cantidad de ácido fítico presente en cada una de las matrices vegetales que se utilicen en industria de alimentos (legumbres, cereales, etc.). Esto resulta de mayor importancia sobre grupos vulnerables de la población como por ejemplo, niños en desarrollo, mujeres en periodo reproductivo e incluso en los vegetarianos estrictos.
- Este procedimiento podría ser aplicado a cualquier matriz que en su composición contenga proteínas vegetales, por ejemplo alimento para animales (peces, cerdos, aves, etc), con el propósito de detectar y cuantificar ácido fítico y mioinositol.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Bhatta, R.S., Slinkard, A.E. (1989) Relationship between phytic acid and cooking quality in lentil. *Can. Inst. Food sci. Technol. J.*, 22, 137-142.
2. Bos, P. (1991). Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility in feedstuffs for broilers. *Poultry Sci.*, 78, 689-706.
3. Camire, A.L., Clydesdale, F.M. (1982) Analysis of phytic acid in foods by HPLC. *J. Food Sci.*, 47, 575-578.
4. Carnovale, E., Lugaro, E., Lombardi-Boccia, G. (1988) Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem.*, 65, 114-117.
5. Carlsson, N., Bergman, E., Skoglund, E., Hasselblad, K., Sandberg, A. (2001) Rapid analysis of inositol phosphates. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1695-1701.
6. 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.
7. CEE. (1999) Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Reglamento CE Nº 508/1999 de la comisión. L60/16. Bruselas.
8. Cheryan, M. (1980) Phytic acid interactions in food systems. *C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 13,297-335.
9. 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.
10. Deshpande, S.S., Damodaran, S. (1989) Effect of phytate on solubilty, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *J. Food Sci.*, 54, 695-699.

11. Dua, S., Mahajan, A. (1996) Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. Toria) preparations by chemical modifications. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 706-710.
12. Ferguson, E.L., Gibson, R.S., Thompson, L.U., Ounpuu, S., Berry, M. (1988) Phytase, zinc, and calcium content of 30 East African foods and their calculated phytate: Zn, Ca: phytate and Ca-Phytate/Zn molar ratios. *J. Food Comp. Anal.*, 1, 316-325.
13. Graf, E., Dintzis, F. (1982) High performance liquid chromatographic method for the determination of phytate. *An. Biochem.*, 119, 413-417.
14. Graf, E., Empson, K.L., Eaton, J.W. (1987) Phytic acid: a natural antioxidant. *J. Biol. Chem.*, 262, 11647-11650.
15. Graf, E., Eaton, J.W. (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Rad. Biol. Med.*, 8, 61-69.
16. Graf, E., Eaton, J.W. (1993) Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr. Cáncer.*, 19, 11-19.
17. Grases, F., Costa-Bausa, A. (1999) Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Res.*, 19, 3717-3722.
18. Griffiths, D.W. (1982) The phytate content and iron-binding capacity of various field bean (*Vicia faba*) preparations and extracts. *J. Sci. Food Agric.*, 33, 847-851.
19. Han, Y.W. (1988) Removal of phytic acid from soybean and cottonseed meals. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 1181-1183.

20. Knuckles, B. E., Betschart, A. (1982) HPLC analysis of phytic acid in selected foods and biological samples. *J. Food Sci.*, 47, 1257-1258.
21. Latta, M., Eskin, M. (1980) A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1313-1315.
22. Lee, K., Abendroth, A. (1983) High performance liquid chromatographic determination of phytic acid in foods. *J. Food Sci.*, 48, 1344-1345.
23. Lehrfeld, J. (1989) High- performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH- stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem.*, 66, 510-515.
24. Maenz, D. D. (2001). Enzymatic Characteristics of Phytases as they Relate to their Use in Animal Feeds. New York. 61-84 pp.
25. Maga, J. (1982). Phytate. Its chemistry, occurrence food interactions nutritional significance and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1- 9.
26. Mohamed, A.I., Perera, P.A., Hafez, Y.S. (1986) New chromophore for phytic acid determination. *Cereal Chem.*, 63, 475-478.
27. Newmark, H.L., Lupton, J.R. (1990) Determinants and consequences of colonic pH: implications for colon cancer. *Nutr. Cancer.*, 14, 161-173.
28. Nolan, K.B., Duffin, P.A., MacWeeny, D.J. (1987) Effects of phytate on mineral bioavailability. *In vitro* studies on Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Cd. Solubilities in presence of phytate. *J. Food Agric.*, 40, 79-85.
29. Petterson, D.F., Harris, D.J., Rayner C.J., Blakeney, A.B., Choct, M. (1999) Methods for the analysis of premium livestock grains. *J. Agric. Res.*, 50, 775–787.
30. Phillipy, B.Q., Johnston, M.R, (1985) Determination of phytic acid in foods by ion chromatography with post- column derivation. *J. Food. Sci.*, 50, 541-542.

31. Phillipy, B.Q., Graf, E. (1997) Antioxidant functions inositol 1, 2, 3- triphosphate and inositol 1,2,3,4- tetrakisphosphate. *Free Rad. Biol. Med.*, 6, 939-946.
32. Quattrocchi, O.A. Adelaíra de Andrizzi, S.I. Laba, R.F (1992). Introducción al H.P.L.C. aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina. 28-29, 40-42, 203-235, 242-265, 302-327, 330-381.
33. Ravindran, V., Ravindran, G., Sivalogan, S. (1994) Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem.*, 50, 133-136.
34. Ravindran, V., Bryden, W.L., Kornegay, E.T. (1995) Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poultry Avian Biol. Rev.*, 6, 125-143.
35. Reddy, N.R., Salunke, D.K. (1981) Interaction between phytate, protein, and minerals in whey fractions of black gram. *J. Food Sci.*, 46, 564-570.
36. Reddy, N., Pierson, M., Salunkhe, D. (1982) Legumes- based fermented foods. *Food Sci. Nutr.*, 17, 335- 370.
37. Sandberg, A.S., Ahderinne, R. (1986) HPLC method for determination of inositol tri- tetra- penta y hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. *J. Food Sci.*, 54, 159-161.
38. Sandberg, A.S., Carlsson, N., Svanberg, U. (1989) Effects of inositol tri- penta y hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. *J. Food Sci.*, 54, 559-561.
39. Schlemmer, U., Müller, H., Jany, K.L. (1995) The degradation of phytic acid in legumes prepared by different methods. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 49, 207-210.

40. Segueilha, L., Moulin, G., Galkzy, P. (1993) Reduction of phytate content in wheat bran and glandless cotton flour by *Schwanniomyces castelli*. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2451–2454.
41. Shamsuddin, A.M. (1999) Metabolism and cellular function of IP6: a review. *Anticancer Res.*, 19, 3733-3736.
42. Shamsuddin, A.M., Vucenik, I. (1999) Mammary tumor inhibition by IP6: a review. *Anticancer Res.*, 19, 3671-3674.
43. Silva, P., Trugo, L. (1996). Characterization of Phytase Activity in Lupin Feed. *J. Food Biochem.*, 20, 329- 340.
44. Sugiura, S. H., Raboy, V., Young, K.A., Dong, F.M., Hardy, R.W. (1999). Availability of phosphorus and trace- elements in low- phytate varieties of barley and corn for rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacul.*, 170, 285- 296.
45. Tajendjaja, B., Buckle, K.A., Wootton, M. (1980) Analysis of phytic acid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography.*, 197, 274-277.
46. Thompson, L.U. (1987) Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *J. AOCS.*, 64, 1712-1717.
47. Thompson, L.U. (1993) Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res. Int.*, 131-149.
48. 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.

49. Vucenik, I., Kalebic, T., Tantivejkul, K., Shamsuddin, A.M. (1998) Novel anticancer function of inositol hexaphosphate- inhibition of human rhabdomyosarcoma *in- vitro*. *Anticancer Res.*, 18, 1377-1384.
50. Walsh, G.A., Power, R.F., Headon, D.R. (1994) Enzymes in the animal – feed industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 5, 81–87.
51. Wang, J. (1998) Improvement of citric-acid production to beet molasses. *Bioresource Technol.*, 65, 243-245.
52. Wang, C.F., Tsay, S.M., Lee, C.Y., Liu, S.M., Aras, N.K. (1992) Phytate content in taiwanese diet determined by P Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1030-1033.
53. Wyatt, C.J., Triana, A. (1984) Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca and phytates in foods commonly consumed in northern México. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2204-2209.
54. Yoshida, K.T., Wada, T., Koyama, H., Mizobuchi, Fukuoka, R., Naito, S. (1999) Temporal and spatial patterns accumulation of the transcript of myo-inositol-1-phosphate synthase and phytin- containing particles during seed development in rice. *Plant Physiol.*, 119, 65-72.
56. Zhou, J., Erdman, J. (1995). Phytic acid in health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 495-508.

ANEXOS

ANEXO N° 1: Figuras.

Figura 7: “Curva de calibración ácido fítico”.

Ácido Fítico	
Concentración	Área (mV.Min)
1,0 mg/ml	2,48
1,0 mg/ml	2,50
1,0 mg/ml	2,46
2,0 mg/ml	5,07
2,0 mg/ml	5,03
2,0 mg/ml	5,05
3,0 mg/ml	7,95
3,0 mg/ml	7,94
3,0 mg/ml	7,96
4,0 mg/ml	10,17
4,0 mg/ml	10,12
4,0 mg/ml	10,15

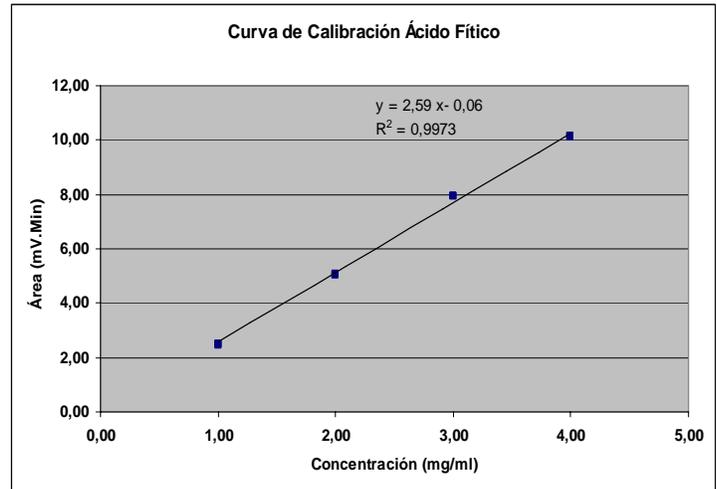


Figura 8: “Curva de calibración mioinositol”.

Mioinositol	
Concentración	Área (mV.Min)
0,3 mg/ml	0,65
0,3 mg/ml	0,63
0,3 mg/ml	0,62
0,6 mg/ml	1,27
0,6 mg/ml	1,29
0,6 mg/ml	1,30
0,9 mg/ml	1,90
0,9 mg/ml	1,94
0,9 mg/ml	1,95
1,2 mg/ml	2,72
1,2 mg/ml	2,66
1,2 mg/ml	2,69

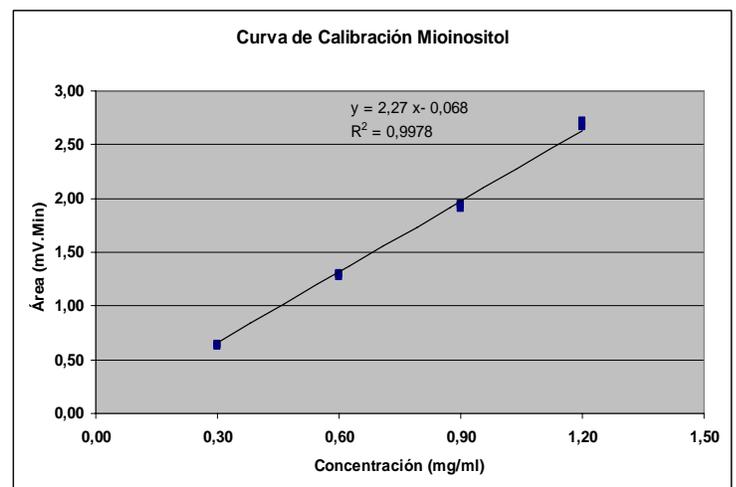


Figura 9: “Curva de sensibilidad para ácido fítico”.

Ácido Fítico	
Concentración	Área (mV.Min.)
0,25 mg/ml	0,55
0,25 mg/ml	0,58
0,25 mg/ml	0,59
0,50 mg/ml	1,20
0,50 mg/ml	1,24
0,50 mg/ml	1,22
0,75 mg/ml	1,86
0,75 mg/ml	1,89
0,75 mg/ml	1,84
1,00 mg/ml	2,35
1,00 mg/ml	2,33
1,00 mg/ml	2,37

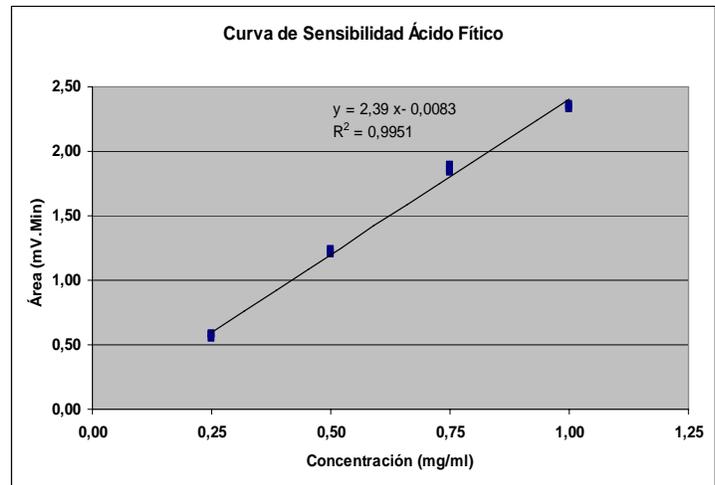


Figura 10: “Determinación de sensibilidad para ácido fítico”.

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

$b = 2,39$, se obtuvo de la ecuación de la recta de ácido fítico a bajas concentraciones (Figura 9).

Límite de detección: $\frac{0,07 + (3 \times 0,01)}{2,39}$

2,39

Límite de detección: 0,042 mg/ml \Rightarrow **0,84 ug.**

Límite de cuantificación: $\frac{0,07 + (10 \times 0,01)}{2,39}$

2,39

Límite de cuantificación: 0,071 mg/ml \Rightarrow **1,42 ug.**

Figura 11: “Curva de sensibilidad para mioinositol”.

mioinositol	
Concentración	Área (mV.Min)
0,15 mg/ml	0,33
0,15 mg/ml	0,30
0,15 mg/ml	0,31
0,30 mg/ml	0,63
0,30 mg/ml	0,65
0,30 mg/ml	0,66
0,45 mg/ml	1,01
0,45 mg/ml	1,04
0,45 mg/ml	0,99
0,60 mg/ml	1,29
0,60mg/ml	1,32
0,60 mg/ml	1,28

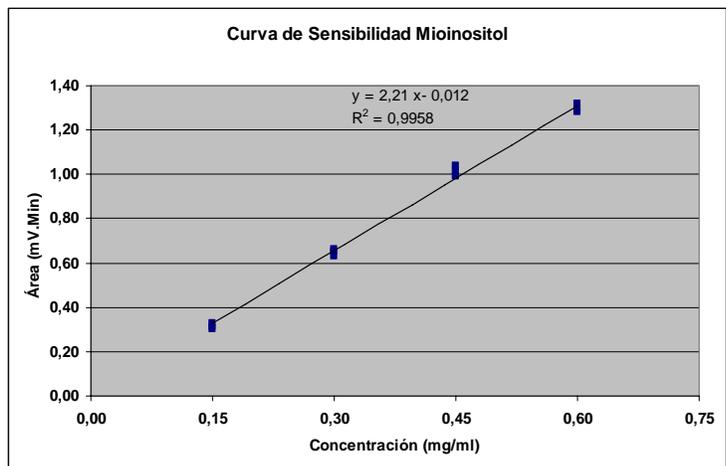


Figura 12: “Determinación de sensibilidad para mioinositol”.

Blanco	Respuesta (Área)
1	0,08
2	0,07
3	0,09
4	0,16
5	0,07
6	0,08
7	0,09
8	0,05
9	0,08
10	0,07
Promedio (Ybl)	0,07
Desviación estándar (Sbl)	0,01

b = 2,21, se obtuvo de la ecuación de la recta de mioinositol a bajas concentraciones (Figura 11).

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

2,21

Límite de detección: 0,045 mg/ml \Rightarrow **0,9 ug.**

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

2,21

Límite de cuantificación: 0,077 mg/ml \Rightarrow **1,5 ug.**

ANEXO N° 2: Tablas.

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

Analito	(r)	(r ²)
Mioinositol	0,9989	0,9978
Ácido Fítico	0,9987	0,9973

Tabla 2: “Determinación de la capacidad de la resina Dowex tipo I”.

Analito por duplicado	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg
Cantidad de mioinositol prom. (mg)	4,60	9,10	13,80	18,20	21,25	24,30
Recuperación de mioinositol (%)	92%	91%	92%	91%	85%	81%
Cantidad de Ácido Fítico prom. (mg)	4,85	9,70	14,63	19,20	24,13	28,50
Recuperación de Ácido Fítico (%)	97%	97%	97,5%	96%	96,5%	95%

PRESICIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

A. REPETIBILIDAD:

Tabla 3: “Repetibilidad de patrones para ácido fítico”.

Concentración	Área									
1,0 mg/ml	2,51	2,48	2,52	2,49	2,46	2,52	2,50	2,47	2,51	2,48
4,0 mg/ml	10,12	10,09	10,18	10,15	10,10	10,07	10,13	10,09	10,14	10,19

Concentración	Promedio	S.D.	% C.V	Promedio % C.V.
1,0 mg/ml	2,49	0,02	0,80	0,60 %
4,0 mg/ml	10,13	0,04	0,40	

Tabla 4: “Repetibilidad de patrones para mioinositol”.

Concentración	Área									
0,6 mg/ml	1,28	1,29	1,28	1,27	1,29	1,26	1,28	1,26	1,28	1,26
1,2mg/ml	2,68	2,71	2,69	2,66	2,64	2,68	2,67	2,65	2,69	2,67

Concentración	Promedio	S.D.	% C.V	Promedio % C.V.
0,6 mg/ml	1,28	0,01	0,78	0,77
1,2 mg/ml	2,67	0,02	0,75	

Tabla 5: “Resultados de la determinación de repetibilidad del sistema instrumental”.

Analito	Concentración	Promedio 10 lecturas	S.D.	% C.V.	Promedio % C.V.
Ácido Fítico	1,00 mg/ml	2,49	0,02	0,80	0,60 %
	4,00 mg/ml	10,13	0,04	0,40	
Mioinositol	0,60 mg/ml	1,28	0,01	0,78	0,77 %
	1,20 mg/ml	2,67	0,02	0,75	

B. REPRODUCIBILIDAD

Tabla 6: “Reproducibilidad para patrones de ácido fítico”.

Concentración	Área	Área	Área	Área	Área	Promedio	S.D.	%C.V	Promedio %C.V.
2,00 mg/ml	5,09	5,04	5,07	5,05	5,08	5,07	0,02	0,39	0,40 %
2,00 mg/ml	4,98	5,01	5,03	4,99	5,02	5,01	0,02	0,40	

Tabla 7: “Reproducibilidad para patrones de mioinositol”.

Concentración	Área	Área	Área	Área	Área	Promedio	S.D.	%C.V	Promedio %C.V.
0,90 mg/ml	1,94	1,92	1,95	1,93	1,90	1,93	0,02	1,04	0,78 %
0,90 mg/ml	1,91	1,93	1,90	1,92	1,92	1,91	0,01	0,52	

Tabla 8: “Resultados determinación de reproducibilidad del sistema instrumental”.

Analito	Concentración	Promedio 10 lecturas	S.D	% C.V.	Promedio % C.V.
Ácido Fítico	2,0 mg/ml	5,07	0,02	0,39	0,40 %
	2,0 mg/ml	5,01	0,02	0,40	
Mioinositol	0,9 mg/ml	1,93	0,02	1,04	0,78 %
	0,9 mg/ml	1,91	0,01	0,52	

PRESICIÓN DEL MÉTODO

A. REPETIBILIDAD

Tabla 9: “Repetibilidad del método para ácido fítico en matrices vegetales”.

Matriz (0,5 g)	mg	mg	mg	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	%C.V.	Prom.%C.V
Trigo	20,90	19,90	20,70	21,20	20,50	20,10	20,55	0,49	2,38	2,79 %
Soya	9,90	9,20	10,10	9,80	9,60	9,70	9,72	0,31	3,19	

Tabla 10: “Repetibilidad del método para mioinositol en matrices vegetales”.

Matriz (0,5 g)	mg	mg	mg	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	%C.V.	Prom. %C.V
Trigo	5,50	5,40	5,60	5,30	5,70	5,60	5,52	0,15	2,72	3,46%
Soya	2,40	2,50	2,30	2,40	2,50	2,30	2,41	0,10	4,19	

B. REPRODUCIBILIDAD

Tabla 11: “Reproducibilidad del método para ácido fítico en matrices vegetales”.

Matriz (0,5 g)	mg	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	% C.V.	Prom. % C.V
Trigo	20,40	21,00	20,00	21,20	20,65	0,55	2,66	3,10 %
Trigo	20,10	20,20	21,20	20,80	20,58	0,52	2,53	
Soya	9,90	10,30	9,50	9,80	9,88	0,33	3,34	
Soya	9,50	9,90	9,30	10,10	9,70	0,37	3,81	

Tabla 12: “Reproducibilidad para del método para mioinositol en matrices vegetales”.

Matriz (0,5 g)	mg	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	% C.V.	Prom. % C.V
Trigo	5,30	5,70	5,40	5,60	5,50	0,18	3,27	3,37 %
Trigo	5,50	5,40	5,70	5,30	5,48	0,17	3,10	
Soya	2,50	2,30	2,40	2,30	2,38	0,09	3,78	
Soya	2,40	2,50	2,40	2,30	2,40	0,08	3,33	

EXACTITUD - RECUPERACIÓN DEL MÉTODO

A. ÁCIDO FÍTICO:

Tabla 13: “Exactitud/ Recuperación ácido fítico desde matrices vegetales”.

Matriz (0,5 g)	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	% C.V.
Trigo	20,50	20,10	21,20	20,60	0,56	2,72
Soya	9,60	10,30	10,00	9,97	0,35	3,51

Matriz (0,5 g)	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	% C.V.	% Recuperación
Trigo + 15 mg Fítico	24,70	23,40	24,00	24,03	0,65	2,70	91,53
Soya + 15 mg Fítico	18,30	18,80	19,50	18,87	0,60	3,18	92,53
Trigo + 30 mg Fítico	37,00	38,90	38,00	37,97	0,95	2,50	92,23
Soya + 30 mg Fítico	31,90	33,50	32,30	32,57	0,83	2,55	91,93
Promedio					0,76	2,73	92,06

B. MIOINOSITOL:**Tabla 14: “Exactitud/ Recuperación mioinositol desde matrices vegetales”.**

Matriz (0,5 g)	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	% C.V.
Trigo	5,50	5,70	5,40	5,53	0,15	2,71
Soya	2,40	2,50	2,30	2,40	0,10	4,17

Matriz (0,25 g)	mg	mg	mg	Prom.	S.D.	% C.V.	% Recuperación
Soya + 10 mg Mioinositol	10,00	10,70	10,40	10,37	0,35	3,38	91,70
Trigo + 10 mg Mioinositol	12,30	11,90	11,60	11,93	0,35	2,93	91,65
Promedio					0,35	3,16	91,68

Tabla 15: “Determinación de los niveles de mioinositol y ácido fítico en muestras vegetales”.

Matriz (1,0 g)	Cantidad ácido fítico (mg)	Cantidad mioinositol (mg)
TRIGO	44,60	12,00
SOYA	21,40	5,20
CANOLA	39,80	4,40
MAÍZ	12,60	2,30
LUPINO	18, 20	6,8

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: 1mg/ml de ácido fítico (25 ml).

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

1mg/ml X 25 ml = 25 mg de ácido fítico.

924 mg fitato de sodio → generan 660 mg de ácido fítico

X mg fitato de sodio → generan 25 mg de ácido fítico

X = 35 mg de fitato de sodio.

Ejemplo de cálculo 2: Determinación de la capacidad de la C.I.A.

10 mg de ácido fítico previamente corregido en la pesada (14 mg de fitato de sodio) se disolvieron en 20 ml de HCl 0,50 M, esta solución se cargó en la C.I.A. y luego de los correspondientes lavados (punto 8, método 3.3.2) se eluyó con 10 ml de HCl 2,0 M. Posteriormente 4 ml del eluato fue llevado a sequedad mediante el uso de rotavapor, el residuo sólido se disolvió en 4,0 ml de fase móvil y se realizó la medición de ácido fítico en el equipo HPLC.

Concentración arrojada por el equipo: 0,97 mg/ml de ácido fítico (en los 4 ml de solución, que es la misma que posee los 10 ml del eluato).

0,97 mg/ml X 10 ml = 9,7 mg de ácido fítico.

9,7 mg / 10mg X100 = 97,0 % de recuperación.

Ejemplo de cálculo 3: Determinación del t_r para ácido fítico en linealidad.

Para poder conocer si la curva de calibración del ácido fítico 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 $t_{\text{tab}} = 2,228$.

$$r = 0,9987$$

$$r^2 = 0,9973$$

$$n = 12$$

Por lo tanto:

$$t_r = \frac{r \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} = \frac{0,9987 \sqrt{10}}{\sqrt{(1-0,9973)}}$$

$$t_r = 60,78 > t_{\text{tab}} 2,228, \text{ linealidad aceptable.}$$

Ejemplo de cálculo 4: conversión de unidad de concentración (mg/ml) en cantidad (mg) de las lecturas obtenidas por el equipo HPLC-IR

Después de realizar la extracción (3.3.2) de los analitos desde la matriz vegetal, en este caso trigo, estos se concentraron y purificaron mediante C.I.A y a continuación se tomó 4 ml de la solución en HCl 2 M y se procedió a eliminar el ácido utilizando rotavapor. Finalmente el extracto seco, se disolvió en 4 ml de fase móvil y alícuotas de esta solución se cuantificaron mediante HPLC-IR.

La primera determinación para el trigo, tabla número 9 (Anexo N° 2), muestra 20,90 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 2,09 mg/ml, por lo tanto:

$2,09 \text{ mg/ml} \times 4 \text{ ml} = 8,36 \text{ mg}$ de ácido fítico (volumen reconstituido).

$2,09 \text{ mg/ml} \times 6 \text{ ml} = 12,54 \text{ mg}$ de ácido fítico (volumen restante en HCl 2M).

Total de ácido fítico = 20,90 mg

De la misma forma se realizó el cálculo de la cantidad de ácido fítico y mioinositol en las etapas de validación que fue necesario.

Ejemplo de cálculo 5: Determinación del porcentaje de recuperación de los analitos desde matrices vegetales.

El primer paso a seguir fue determinar por triplicado la cantidad del analito presente, de forma constitutiva, en 0,50 g de muestra vegetal, luego se tomó como referencia el valor promedio de este análisis para posteriores ensayos.

Es fundamental señalar que el procedimiento se desarrolló con 0,25 gramos de muestra vegetal. El propósito de esto, fue evitar pérdidas considerablemente altas de los analitos, producto de la saturación de la resina (3.3.5), pues se debe tener presente que la cantidad total de inositoles que interaccionan con la resina son los presentes constitutivamente en la matriz vegetal y los que son adicionados para el ensayo de recuperación.

La mezcla de 0,25 gramos de trigo con 15 mg de ácido fítico entregó como resultado un 91,53 % de recuperación. Este valor fue calculado de la siguiente manera:

El promedio de ácido fólico en 0,50 gramos de trigo fue de 20,60 mg, por lo tanto la cantidad del analito en 0,25g de la misma muestra sería de 10,30 mg aproximadamente. Esto implica, que al mezclar esta cantidad de trigo con 15 mg de ácido fólico se esperaría un total aproximado de 25,30 mg del analito.

El valor de cantidad promedio para este ensayo, luego de realizar la extracción según método 3.3.2, fue de 24,03 mg de ácido fólico, por lo tanto:

$$(24,03 - 10,30) \text{ mg} = \mathbf{13,73 \text{ mg de ácido fólico.}}$$

$$(13,73 \text{ mg} / 15,00 \text{ mg}) \times 100 = \mathbf{91,53 \% \text{ de recuperación.}}$$

Ejemplo de cálculo 6: Determinación de t experimental para ácido fólico en recuperación.

De la tabla 13 (Anexo N° 2) se obtuvieron los valores para realizar esta medición.

Promedio % C.V = 2,73%

% Recuperación obtenida = 92,06 %

$t_{\text{tabla}} = 2,201$ para $p = 0,05$ y $n-1$ grados de libertad

$$t_{\text{exp}} = \frac{(100 - R) \sqrt{n}}{\text{C.V.}} = \frac{(100 - 92,06) \sqrt{12}}{2,73}$$

$t_{\text{exp}} = \mathbf{10,08} > t_{\text{tabla}} = 2,201$, método no tiene exactitud requerida.

Ejemplo de cálculo 7: Ajuste de datos en base al % de recuperación.

El porcentaje de recuperación obtenido para esta metodología fue de un 92%. Después de la extracción de ácido fítico desde 0,50 g de trigo, se obtuvo un valor de 20,50 mg (Tabla 15, en anexo N° 2) por lo tanto:

$$20,50 \text{ mg} \rightarrow 92\%$$

$$X \text{ mg} \rightarrow 100\%$$

$$X = 22,28 \approx \mathbf{22,30 \text{ mg}}$$

Por lo tanto: para 1,00 gramo de trigo la cantidad de ácido fítico presente es de **44,60 mg**.