



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y  
NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

Trabajo de tesis de grado para obtener el grado académico de  
**LICENCIADA EN QUÍMICA.**

**“VALORACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO EN GRANOS Y SUBPRODUCTOS  
MEDIANTE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS”**

**MARÍA FLORENCIA COLAZO ARREGUI**

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2014

# PREFACIO

---

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, durante el período comprendido entre Julio y Diciembre, bajo la dirección de la Lic. PATTACINI Silvia Haydée.

**María Florencia Colazo Arregui.**

Diciembre 2014

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

## RESUMEN

---

Los alimentos de origen vegetal contienen una serie de sustancias denominadas factores antinutricionales capaces de disminuir la disponibilidad de nutrientes. A este grupo de sustancias pertenece el ácido fítico (AF) o ácido mioinositol hexafosfórico (IP6) presente en granos de cereales y leguminosas. Es considerado un factor antinutricional debido a que reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales ya que es un excelente agente quelante. Asimismo, el fósforo presente en la molécula de fitato, no es asimilado por los animales porque el organismo no produce la enzima fitasa necesaria para hidrolizar el ácido fítico y liberar así, el fósforo de este compuesto. La eficiencia de un método colorimétrico depende de su capacidad para detectar y/o estimar la presencia o ausencia de un compuesto. Debido a que existen métodos colorimétricos que arrojan diferencias en los resultados de la medición del ácido fítico se propone como objetivo de este trabajo, un estudio comparativo de tres pruebas colorimétricas a partir del análisis de materias primas de origen vegetal con el fin de establecer la mejor eficacia y eficiencia de cada uno para detectar y cuantificar indirectamente la presencia de ácido fítico.

# INDICE

---

Capítulo 1.....	5
1. Introducción.....	5
1.1 Análisis de ácido fítico.....	9
Capítulo 2.....	13
2. Objetivo.....	13
Capítulo 3.....	14
3. Materiales y métodos.....	14
3.1 Muestras.....	14
3.2 Determinación de AF.....	15
Capítulo 4.....	18
4. Resultados y discusión.....	18
Capítulo 5.....	20
5. Conclusiones.....	20
Capítulo 6.....	21
6. Referencias bibliográficas citadas y consultadas.....	21
Capítulo 7.....	24
7. Anexo.....	24

# Capítulo 1

## 1. Introducción

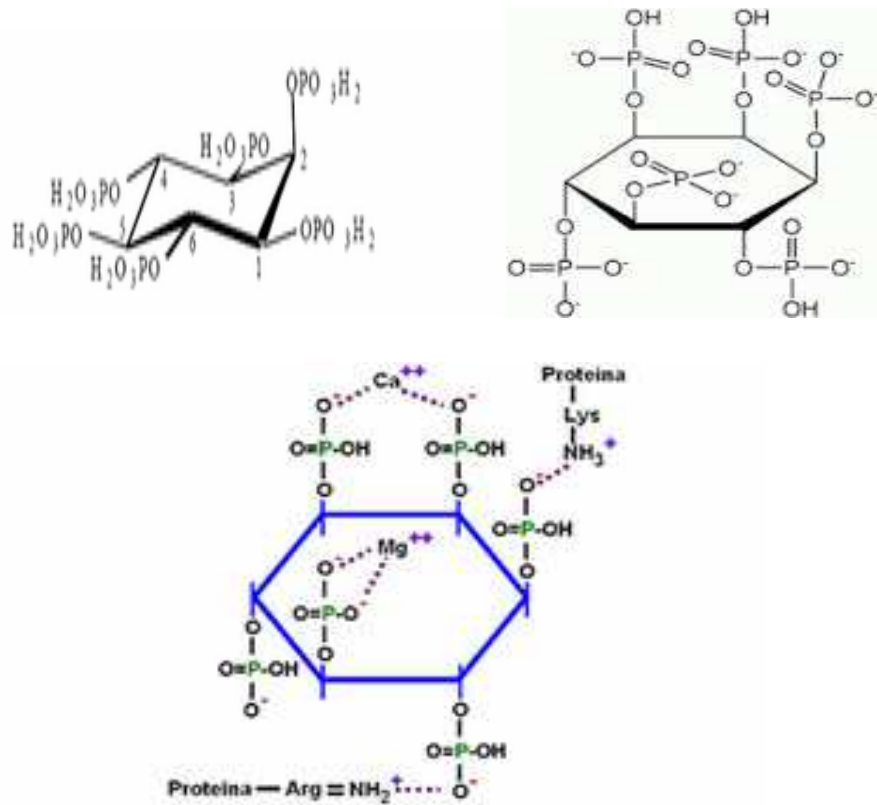
En los alimentos de origen vegetal, existen una serie de sustancias denominadas *factores antinutricionales* que son capaces de disminuir la disponibilidad de los nutrientes indispensables. En la naturaleza, se encuentran grandes cantidades de inositoles polifosforilados como fitina, fitato o ácido fítico (AF). En la mayoría de las plantas, una gran proporción de fósforo (80%) está presente en forma de fitato, especialmente en aquellas semillas en las que se encuentra en proporciones elevadas. Así, en las semillas de cereales, oleaginosas y leguminosas, los niveles de AF son elevados y constituyen el mayor porcentaje (60-82%) del fósforo total, representando una reserva de fósforo y de glúcidos que son utilizados por la planta durante la germinación.

El término fitina se aplica a las sales de calcio –magnesio de dicho ácido, mientras que fitato se aplica a los mono a dodeca aniones. Debido a que reduce la biodisponibilidad de proteínas y nutrientes, el AF es considerado un factor antinutricional [1,2]. Su papel fisiológico en la planta todavía no está suficientemente claro; no obstante, podría actuar como reserva de fósforo, regulando el nivel de fósforo inorgánico antes y durante la germinación de las semillas, como reserva energética y fuente de cationes, como antioxidante, previniendo la peroxidación de los lípidos e incrementando la longevidad de las semillas, o como fuente de mioinositol, que es un importante precursor de los polisacáridos constituyentes de la pared celular. Existen otra serie de procesos que ocurren dentro del organismo de quien lo consume en los que se ve implicado de forma positiva por sus efectos antioxidantes, anti-cancerígenos, preventivo de enfermedades coronarias, de caries dentales, como agente hipocolesterolémico, entre otras funciones [3].

El AF se forma por la esterificación del alcohol inositol cíclico con un máximo de seis grupos de ácido fosfórico, mioinositol cíclico hexafosfato. Según la nomenclatura química es llamado “Mioinositol” 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexacis (dihidrógeno fosfato) [4]. Como muestra la Figura 1, la molécula de AF contiene seis grupos fosfatos. Según esta estructura, el AF, a pH neutro y al pH que normalmente presentan los alimentos, es una molécula cargada

negativamente y por lo tanto muy reactiva, por lo que presenta una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas con carga [5].

**Figura 1. Estructura molecular del AF, estructura ionizada e interacción fitato-aminoácidos, fitato-minerales.**



Fuente: Fernández, S.R. *Uso de enzimas termoestables en la alimentación animal*. 2007.

Los fitatos reducen la digestibilidad de las proteínas, almidón y lípidos, debido a que forman complejos con las proteínas, haciéndolas menos solubles, es decir, más resistentes a la proteólisis [6]. Los polifenoles y el AF pueden afectar la digestibilidad del almidón a través de la interacción con las enzimas amilasas [7]. La acción de ciertas enzimas tales como amilasa, tripsina, fosfatasa ácida y tirosinasa son inhibidas por el AF y también por inositol pentafofato [8]. En cuanto a los complejos que forma con los cationes minerales se encuentran principalmente los di y trivalentes, como: Calcio, Magnesio, Zinc y Hierro

[9,10]. Muchos de estos complejos son insolubles, la solubilidad de las sales formadas con los cationes divalentes sigue el siguiente orden decreciente:  $\text{Cu}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Mn}^{+2} > \text{Fe}^{+2} > \text{Ca}^{+2}$  y, si se considera que la solubilidad es un factor esencial para que los nutrimentos sean absorbidos, la presencia de AF hace que se reduzca la biodisponibilidad de éstos [11] y en consecuencia, va a influir en el valor nutritivo de los alimentos. La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes la interacción es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato; éstos pueden unirse bien a un solo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfato de distintas moléculas de AF [7,12]. La insolubilidad del AF es la principal causa de su comportamiento antinutricional y de sus propiedades fisicoquímicas [2,5]. Sin embargo, es importante considerar que la solubilidad de las sales de AF varía con el pH, ya que el grado de protonación de los grupos fosfatos que no se han unido a los metales está en función de dicho parámetro. Aparentemente, el AF en la semilla se encuentra bajo la forma de sales relativamente solubles de Na o K, más que como fitina insoluble. Las sales de Ca y Mg son solubles a pH bajos e insolubles a pH elevados. Por lo tanto, a pH fisiológico serían insolubles, de ahí el descenso de la biodisponibilidad mineral. En general, las sales hidrogenadas y monovalentes del AF son solubles en agua, mientras que las sales metálicas divalentes y trivalentes son bastante insolubles.

El grado de interacción entre el AF y las proteínas es dependiente de la carga eléctrica neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con minerales a un pH dado. A bajo pH, por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el AF negativamente. En estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre los grupos amino terminal de las proteínas y los ésteres fosfatos aniónicos del AF, formándose en complejo binario. A pH intermedio, por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, dado que la carga de las proteínas, al igual que la del AF, es negativa, su interacción sería imposible; sin embargo, puede realizarse a través de la formación de un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca o el Mg. Esta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo imidazol desprotonado de la histidina, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos. A pH intermedio también pueden existir algunos complejos binarios, ya que a dicho pH los residuos lisil y arginil de las proteínas están aún cargados positivamente. A pH elevado la interacción entre las proteínas y el AF disminuye, los grupos lisil y arginil pierden su carga y por tanto su capacidad de formar complejos binarios. Los complejos ternarios se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta a pH

elevado; un incremento en la concentración del ión Na hace que la reacción de equilibrio del complejo ternario se desplace hacia la derecha liberándose fitato cálcico insoluble y proteína-Na soluble. Así, la formación de complejos entre AF y proteínas no solo afecta la solubilidad y propiedades funcionales de las mismas, sino que también tiene una gran influencia en la biodisponibilidad mineral. Además, el AF puede unirse también al almidón, bien directamente a través de puentes de hidrógeno o indirectamente mediante las proteínas a las que se asocia [13].

El fosfato proveniente de cualquier fuente, inorgánica u orgánica, no siempre es completamente disponible o utilizado. Algo se pierde siempre en las funciones digestivas y metabólicas normales. En general, para las diferentes especies, las fuentes de fósforo de origen animal, son de alta biodisponibilidad cuando se comparan con las de origen mineral, de mayor valor biológico, como los mono, di y trifosfatos inorgánicos [14]. En las fuentes de origen vegetal, granos de cereales y leguminosas y torta de oleaginosas, el fósforo presente en forma de fitatos, es muy poco utilizado por los no rumiantes, mientras que, en los rumiantes, la microflora del rumen es capaz de hidrolizar estos fitatos liberando fósforo disponible para su absorción. El fósforo contenido en los fitatos es muy poco disponible para los no rumiantes ya que el organismo animal carece de la enzima específica, al menos en cantidad suficiente, para romper y separar el fosforo de la molécula de inositol.

En situaciones normales, la mayor parte del fósforo fítico aparece en las heces incrementando el problema de contaminación ambiental. Diferentes estudios indican que la problemática de contaminación ambiental por minerales podría reducirse hasta en un 50% si se utilizaran alimentos ricos en fitasas naturales o cuando se adicionan fitasas exógenas ya que mejoran la hidrólisis del AF [15,16].

Las fitasas son enzimas que mejoran la digestión del fósforo en los balanceados utilizados en la alimentación de animales monogástricos. Por tanto, su interés radica, principalmente, en que van a permitir una mejor utilización del fósforo de la dieta. El fósforo es el segundo mineral en importancia, desde el punto de vista cuantitativo; en el organismo del cerdo, por ejemplo, localiza sus depósitos, en un 80%, en los huesos y dientes, el resto se distribuye por todo el organismo animal, en tejidos y fluidos blandos.

Al margen de su importancia cuantitativa, el fósforo va a cumplir una serie de funciones dentro del organismo animal de vital importancia, por lo que puede ser considerado como el mineral más importante. Entre estas funciones podemos destacar las siguientes:

- Interviene en la formación y mineralización de la matriz orgánica de los huesos.



- Interviene en el crecimiento y diferenciación celular, al formar parte de los ácidos nucleicos ADN y ARN.
- Mantiene la integridad de las membranas celulares, al formar parte de los fosfolípidos.
- Como fosfato contribuye a mantener el equilibrio osmótico.
- Interviene en el metabolismo de los glúcidos, ácidos grasos, síntesis de aminoácidos y proteínas, a través del AMP, ADP y ATP.

Por todas estas funciones, sus necesidades deben ser perfectamente cubiertas por los nutricionistas, para que de esta manera el rendimiento productivo no se vea afectado.

Ahora bien, el principal problema con el que nos encontramos es que el aporte de fósforo vegetal, a través de las materias primas vegetales de los balanceados, es insuficiente para cubrir estas necesidades, debido a que las dos terceras partes del fósforo vegetal (60-85%) está ligado al AF, en forma de fitatos, cuya biodisponibilidad para los animales monogástricos es casi nula, ya que una pequeñísima cantidad de fósforo ligado al AF llega a estar biológicamente disponible. Por lo tanto, para cubrir dichas necesidades, se hace imprescindible la suplementación con una fuente extra de fósforo mineral, principalmente, en forma de fosfato bicálcico y monocálcico. Sin embargo, ello plantea un problema, al margen del costo económico de la suplementación, como es la excesiva eliminación de fósforo en las deyecciones de los cerdos, provocando un verdadero problema medio ambiental [17].

### **1.1 Análisis de ácido fítico**

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 análisis de AF puede considerarse “primitivo” ya que no existe un reactivo específico o espectro característico de absorción que permita cuantificarlo [1,18-20]. Por esta razón se recurre a la medición de inositol fosfato, o bien, al establecimiento de una relación estequiométrica entre el fitato y algunos cationes que son relativamente fáciles de medir como herramienta de cuantificación indirecta [21].

El análisis de fitato puede ser considerado desde técnicas de gran simplicidad hasta métodos muy específicos. Se han publicado varios métodos para la determinación cuantitativa de fitatos, los cuales han sido divididos en directos en los cuales el fitato férrico es removido y determinado como fósforo o inositol y métodos indirectos en los cuales se agrega un exceso de cloruro férrico para precipitar el fitato y el hierro como fitato férrico [1]. Así, la concentración de fitato es determinada a partir de estos resultados usando una proporción teórica de Fe: P-fítico de 4:6 o a través de la determinación de hierro residual en solución luego de la precipitación de fitato férrico de una concentración conocida de sal férrica en solución ácida. Para calcular la cantidad de AF 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. Se han registrado variaciones en los métodos tanto directos como indirectos de extracción, precipitación y purificación [22].

Como muestra en el cuadro 1 la mayoría de las técnicas tienen que ver con la extracción mediante ácidos (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o ácido tricloroacético TCA) a diferentes concentraciones y tiempos de extracción, una precipitación posterior del complejo fitato-hierro (III) seguida de la adición de cloruro férrico [23] o por técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución [24-26] en las que se utilizan resinas de intercambio iónico. El fitato se estima al calcular fósforo, hierro o inositol en el complejo aislado.

**Cuadro 1. Técnicas para la determinación de AF.**

TÉCNICAS VOLUMÉTRICAS		
PROCEDIMIENTO	MATRIZ	REFERENCIA
Extracción del ácido fítico con Acido clorhídrico diluido Valoración con disolución de cloruro férrico en ácido clorhídrico diluido Indicador: tiocianato potásico	Cereales y harinas	Heubner y Staedler (1914)
Valoración del ácido fítico con Fe (III) Indicador: salicilato sódico	Harinas y productos dietéticos	Casares y Moreno (1951)
Valoración con Fe (III) Indicador: ácido sulfosalicílico Valoración con Torio Indicador: naranja de xilenol	Solución acuosa de ácido fítico	Reeves (1979)
Precipitación de fitato con Fe (III) Valoración por retroceso del Fe (III) con EDTA Indicador: ácido sulfosalicílico	Harinas	Ruiz de Lope <i>et al.</i> 1983
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS		
PROCEDIMIENTO	MATRIZ	REFERENCIA
Extracción de inositol fosfatos con HCl Separación de los InsP por cromatografía de intercambio iónico Cromatografía líquida de alta resolución Columna C-18 en fase reversa Detector refractométrico	Salvado crudo Productos procesados Contenido intestinal	Sandberg y Adherinne (1986)
Cromatografía líquida de alta resolución Columna en fase reversa Detector refractométrico	Alimentos procesados	Phylipy <i>et al.</i> (1988)
Cromatografía líquida de alta resolución Columna en fase reversa	Harina de trigo	Plaami y Kumpulainen (1991)

TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS		
PROCEDIMIENTO	MATRIZ	REFERENCIA
Valoración del exceso de Fe (III) con tiocianato potásico		Young (1936)
Valoración del exceso de Fe (III) con tiocianato potásico		Samotus et al. (1962)
Extracción fítico con tricloroacético. Precipitación con Fe (III) Determinación colorimétrica	Trigo	Wheeler y Ferrel (1971)
Extracción fítico con tricloroacético Precipitación con Fe (III) Determinación colorimétrica	Legumbres	Siddhuraju <i>et al.</i> (1995)
TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS		
Resonancia magnética nuclear por transformada de Fourier Determinación de P-31	Pastas Cereales Pan	O'Neill (1980)
Técnica espectrofotométrica de emisión con antorcha de plasma de argón (ICP-AES) Extracción en medio ácido Determinación del fósforo	Cereales	Plaami y Kumpulainen (1991)

Fuente: Felbes Acosta, C. I. *Estudio del contenido de fitatos en derivados de cereales de consumo en canarias*.1998.

Como se pudo observar en el cuadro, existen muchos métodos para medir el AF; sin embargo, hay discrepancias entre los resultados obtenidos [20].

De las técnicas colorimétricas citadas se seleccionó la de Wheeler y Ferrel en donde se realiza la extracción con TCA, teniendo en cuenta que esta técnica es más accesible que las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución o espectrofotométricas, pues no requiere equipos costosos.

## Capítulo 2

### **2. Objetivo**

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. 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. No obstante, su alto potencial quelante impide la absorción a nivel intestinal de una serie de iones divalentes, 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 modificar, a partir de la bibliografía existente, un sistema de detección y cuantificación de AF en muestras vegetales. Debido a que existen métodos colorimétricos que arrojan diferencias en los resultados de la medición del AF, se propone, un estudio comparativo de tres pruebas colorimétricas a partir del análisis de materias primas de origen vegetal con el fin de establecer la mejor eficacia y eficiencia de cada uno para detectar y cuantificar indirectamente la presencia de AF.

## Capítulo 3

### **3. Materiales y métodos**

El trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales situado en el campo de enseñanza de la Universidad Nacional de La Pampa, donde se realizaron los análisis centesimales de composición de ácido fólico correspondientes a 8 ingredientes/insumos de uso en la composición de dietas de monogástricos en la región semiárida pampeana.

Los materiales analizados fueron molidos y tamizados en un tamiz de 40 mallas para luego realizar las determinaciones de la sal orgánica por tres métodos analíticos diferentes. Para cada muestra en estudio se realizaron tres repeticiones ( $n=3$ ). Los datos se analizaron por ANOVA y los valores medios y sus respectivos desvíos estándares por el Test de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

#### **3.1 Muestras**

Se estudiaron un total de 8 materias primas de uso común en la formulación de alimentos para animales las cuales fueron: Soja, Maíz, Avena, Trigo, Triticale, Sorgo, Girasol y Centeno. Siguiendo técnicas estandarizadas de muestreo, se realizaron tres repeticiones de cada muestra vegetal, las cuales fueron recolectadas en fábricas de alimentos y plantas procesadoras de materias primas.

##### ***3.1.1 Acondicionamiento de las muestras***

Las muestras fueron molidas, en un molinillo de acero inoxidable y fueron tamizadas para el análisis de AF, se guardaron en frascos con tapa hermética.

### **3.2 Determinación de AF**

Todos los análisis se realizaron por triplicado. El AF se determinó mediante técnicas colorimétricas. El estudio se basó en comparar el método de Wheeler y Ferrel original, con dos modificaciones realizadas sobre el mismo. El contenido de fitato se determinó suponiendo un valor constante de hierro-P fítico de 4:6.

#### ***3.2.1 Materiales***

Los reactivos utilizados, se prepararon acorde al método citado por Wheeler y Ferrel:

- Ácido tricloroacético (TCA) al 3%
- Solución de  $\text{FeCl}_3$
- NaOH 1.5N
- $\text{HNO}_3$  3.2N
- Tiocianato de potasio (KSCN) 1,5 M
- Solución estándar de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$
- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 10% en TCA 3%
- HCl al 1.2%

#### ***3.2.2 Método Wheeler y Ferrel (1971) (1)***

Se pesaron 3 gr de cada una de las muestras y se realizó una extracción con 30 mL de TCA 3% y agitación mecánica a temperatura ambiente (25°C) durante 25 minutos. Luego se centrifugó el extracto durante 20 minutos y se transfirió una alícuota de 5 mL a un tubo de centrifuga cónico en donde se le agregó 2 mL de solución de  $\text{FeCl}_3$ . El tubo se colocó en

baño de agua a ebullición por 45 minutos para luego llevarlos nuevamente a centrifugar otros 15 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, el precipitado se lavó 2 veces con 5 mL de TCA 3%, se calentó a ebullición 15 minutos y se centrifugó 15 minutos más. Se repitió el lavado pero esta vez con agua bi-destilada, luego de calentar a ebullición y centrifugar, se descartó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó 1,5 mL de NaOH 1.5N con 5 mL de agua bi-destilada y se calentó 30 minutos a ebullición. Se filtró cuantitativamente en caliente a través de un papel de filtro Whatman N°2 con 35 mL de agua bi-destilada desechando lo filtrado. El precipitado se disolvió con 10 mL de HNO<sub>3</sub> 3.2N y agua destilada, se transfirió a un matríz de 100 mL. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución y se transfirió a otro matríz de 100 mL que contenía 20mL de KSCN 1.5M. Se aforó y mezcló el contenido para leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 480 nm.

### ***3.2.3 Método Wheeler y Ferrel modificado con HCl (2)***

La valoración del AF se determinó mediante el método de Wheeler y Ferrel modificado. Para ello, se cambió la solución extractiva, se reemplazó el TCA 3% por una solución de HCl 1.2%.

### ***3.2.4 Método Wheeler y Ferrel modificado con solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3)***

Para realizar el análisis de AF mediante el método de Wheeler y Ferrel modificado, se varió la solución extractiva, en esta ocasión se utilizó una solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% en TCA 3% en vez del TCA 3%.

- En ambas modificaciones, el procedimiento para la lectura de la absorbancia fue seguido según las especificaciones del método original utilizando las mismas cantidades tanto de muestras como de reactivos.

### ***3.2.5 Recta de calibrado***

Se pesaron con precisión 3002,4 mg de Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y se disolvieron en 100 mL de agua bidestilada en un matríz aforado. Se diluyeron 2,5 mL hasta completar los 250 mL en un



matraz aforado. Se realizaron patrones tomando alícuotas de 2-5-10- 20- 25- 50 mL y se transfirieron respectivamente a matraces de 100 mL que contenían 20mL de KSCN 1.5M y se aforaron con agua bidestilada.

Las lecturas fotométricas se efectuaron en un espectrofotómetro Metrolab 480 nm utilizando cubetas de 10 mm de paso de luz. Finalmente se representaron gráficamente las absorbancias obtenidas.

### ***3.2.6 Cálculo para determinar el fósforo fítico***

Con los resultados de absorbancia de la curva estándar, y los que arrojan las muestras, se calcula aproximadamente los µg de hierro que hay en la muestra y para determinar el fósforo fítico se utiliza la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Fósforo fítico (mg)}}{100\text{g de muestra}} = \frac{\mu\text{g Fe} \times 15}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

## Capítulo 4

### 4. Resultados y discusión

En el cuadro 2 se detallan los resultados obtenidos por los diferentes métodos para determinar el AF en las muestras consideradas en este estudio.

**Cuadro 2. Composición de AF de las muestras analizadas (mg P-fítico/ 100 gr de muestra)  $\pm$  DS**

Muestras	MÉTODO ORIGINAL (1)	MODIFICACIÓN CON HCl (2)	MODIFICACION CON Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3)
SOJA	0,240625 ( $\pm 0,01$ ) <i>b</i>	0,1 ( $\pm 0,02$ ) <i>a</i>	0,278125 ( $\pm 0,03$ ) <i>c</i>
AVENA	0,01875 ( $\pm 0,03$ ) <i>a</i>	0,134375 ( $\pm 0,03$ ) <i>b</i>	0,13125 ( $\pm 0,006$ ) <i>b</i>
MAIZ	0,13125 ( $\pm 0,07$ ) <i>a</i>	0,1478125 ( $\pm 0,01$ ) <i>b</i>	0,158125 ( $\pm 0,03$ ) <i>bc</i>
SORGO	0,303125 ( $\pm 0,09$ ) <i>c</i>	0,24375 ( $\pm 0,02$ ) <i>b</i>	0,0290625 ( $\pm 0,003$ ) <i>a</i>
CENTENO	0,03125 ( $\pm 0,04$ ) <i>a</i>	0,153125 ( $\pm 0,03$ ) <i>b</i>	0,27375 ( $\pm 0,03$ ) <i>c</i>
TRIGO	0,315625 ( $\pm 0,01$ ) <i>b</i>	0,203125 ( $\pm 0,04$ ) <i>a</i>	0,401875 ( $\pm 0,04$ ) <i>c</i>
TRITICALE	0,08125 ( $\pm 0,02$ ) <i>a</i>	0,139375 ( $\pm 0,03$ ) <i>b</i>	0,2415625 ( $\pm 0,04$ ) <i>c</i>
GIRASOL	0,353125 ( $\pm 0,02$ ) <i>c</i>	0,2790625 ( $\pm 0,04$ ) <i>b</i>	0,0228125 ( $\pm 0,001$ ) <i>a</i>

Medias con distinta letra en la fila difieren estadísticamente ( $P < 0,05$ ) HSD.

Los métodos probados presentaron resultados diferentes entre ellos para cada insumo. Tanto en maíz, en triticale, como en centeno, la menor concentración de AF la presentó el

método 1 y la mayor concentración el método 3. En comparación con los resultados reportados por las tablas FEDNA (2010) [anexo 1], los valores obtenidos estarían indicando que para estas muestras, el método 3 resulta más efectivo a la hora de cuantificar las cantidades de AF pero tanto para centeno como para triticale, la cantidad de AF obtenida estaría sobrevalorada.

Un caso particular fue el que se dio en avena, para este insumo, las modificaciones al método (métodos 2 y 3) no mostraron diferencias significativas en cuanto a la determinación de AF pero arrojaron un resultado mayor y más próximo a los reportados por las tablas FEDNA que el método 1.

Sorgo y girasol mostraron resultados similares, para ambos casos, el método 1 fue el que permitió una mayor cuantificación de AF pero para el caso particular de sorgo, todos los métodos en estudio arrojaron concentraciones sobrevaloradas a las reportadas por las tablas FEDNA.

En soja y trigo se mostró con menor concentración en AF el método 2 y con mayor concentración el 3, en comparación con lo reportado por FEDNA, los valores obtenidos para ambas muestras estarían sobrevalorados.

Para todos los casos en estudio, que un método reporte baja concentración de AF, estaría indicando más fósforo disponible para el metabolismo animal. Que un método reporte una concentración alta de AF, estaría indicando mayor cantidad de fósforo bloqueado, que al no ser metabolizado, generaría un residuo/efluente altamente contaminante tanto para el ambiente como para el suelo, habría en consecuencia, menos fósforo disponible en las dietas para asimilar en el proceso de síntesis de tejido animal, aspecto que implicaría agregar una fuente extra de fósforo mineral como puede ser el fosfato mono y bicálcico, u otra fuente de fósforo soluble. Otra alternativa que mejora la disponibilidad del fósforo bloqueado en el metabolismo animal, sería la adición de enzimas (fitasas) ausentes en monogástricos que ofrecerían disponibilidad de fósforo a la dieta sin adicionar una fuente externa. Esta última alternativa debería evaluarse si conviene económicamente por que al tratarse de enzimas, se requieren procesos tecnológicos de preparación de dietas que no inhiban su capacidad enzimática, especialmente se demandan procesos que tengan controlado tanto la presión como la temperatura, o en tal caso que en la preparación de la dieta, se utilicen enzimas termoestables.

## Capítulo 5

### 5. Conclusiones

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 que tienen estos métodos es que no sólo el fitato (inositol hexafosfato) sino que otros componentes que contienen fósforo son precipitados. 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 distintas investigaciones 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. Además, la solubilidad del fitato férrico se incrementa con un exceso de cloruro férrico y pequeñas cantidades de fosfato inorgánico tienden a precipitar.

Si los resultados y la discusión implican pocas diferencias entre métodos, una solución es optar por el más económico y rápido para medir AF y proponer un estudio que contemple una alternativa económica accesible para aumentar el tamaño de muestras y analizar varios sustratos por ingrediente a modo de disminuir el coeficiente de variabilidad de los datos respecto a la media obtenida, y dar más robustez al test estadístico a priori de diferencias de medias (HSD), para afirmar con mayor certeza las semejanzas y las diferencias entre los métodos analíticos de cuantificación de AF.

## Capítulo 6

### 6. Referencias bibliográficas citadas y consultadas

1. Maga, J.A. *J. Agric food Chem.* 1982, 30,1-9.
2. Cheryan, M. *Phytic acid interactions in food systems CRC: Critical Reviews in Food Sci. And Nutrition*, 1980, 297-335.
3. Felbes Acosta, C. I. *Estudio del contenido de fitatos en derivados de cereales de consumo en canarias.* 1998.
4. Oberleas D.. *The determination of phytate and inositol phosphate. Methods pf biochemical Analysis.* 1971,20: 87-101.
5. Wang J. *Improvement of citric-acid production by Aspergillus niger with addition of phytate to beef molasses. Bioresource Technol.* 1998, 65:243-245.
6. Dvorakova J. *Phytase: Sources, preparation and exploitation. Folia Microbiol.* 1998, 43:1186-1189.
7. Thompson, L. U. *Phytic acid: a factor influencing starch digestibility and blood glucose responce. En: Phytic Acid: Chemistry and Applications (E. Graf, Ed.). Pilatus Press, Minneapolis 1986, pp. 173-194.*
8. Harland B., Morris E.. *Phytate: a good or bad food component? 1995,Nutr. Res.* 15:733-754.
9. Concon, J. *Food toxicology. Part A: principles and concepts.* Marcel Dekker, Inc. USA 1998, 411-416.
10. Carnovale, E.; Lugaro, E.; Lombardi- Boccia, G.*Cereal Chem.* 1988, 65, 11-117.
11. Erdman, J. W. *j. Am. Oil Chem. Sci.* 1979, 56, 736-741.

12. Lott J. N. A., Greenwood J. S., Batten G. D. *Mechanisms and mineral nutrient storage during seed development*. En: Seed Development and Germination. J. Kigel G. Galili (Eds) Marcel Dekker. New York. 1995, p. 215.
  13. Godoy S. y Chicco C. F. *Utilización Del Fósforo Fítico En La Nutrición De Los Rumiantes*. Revista Digital CENIAP HOY N° 9. Venezuela.2005.
  14. Housemann R. A. *Phosphorus, some aspect of phosphorus supply to farm livestock*. The Feed Compound. 1984, 4:15-32.
  15. Hoppe, P.P. *Review of the biological effects and the ecological importance of phytase in pigs*. 1992
  16. Harter-Denis, J. *Biotechnology in the feed industry*. 1999
  17. Cromwell, G.L. *Phytase, what is new and what needs to be done?*. J. Anim. Sci., 2002,80 (Suppl. 1): 54. Ref. 211.
  18. Xu, P.; Price, J.; Aggett, P.J. *Prog. Food and Nutr. Sci.*1992, 16,245-262.
  19. Thompson, D.B.; Erdman, J.W. *J. Food Sci.* 1982, 47, 513-517.
  20. Makower, R.U. *Cereal Chem.* 1970, 47,288-295.
  21. Oatway, L. *Phytic Acid: A Literature Review*, marzo de 2000, en: <http://www.agric.gov.ab.ca/ministry/pid/fcdc/oatway.html>
  22. Wheeler, E.L.; Ferrel, R.E. *a method for phytic Acid Determination in Wheat and Wheat Fractions*. 1971.
  23. Ruiz de Lope, C.; García-Villanueva, R.J. *Anales de Bromatología*, 1982, 34,9-12.
  24. Lee, K.; Abendroth, J.A. *J. Food Sci.*1983, 48,1344-1345, 1351.
  25. Harland, B.F.; Oberleas, D. J. *Assoc.Offic.Anal.Chem.*1986, 69, 667-670.
  26. Rounds, M.A.; Nielsen, S.S. *Journal of Chromatography*. 1993, 653, 148-152.
- De Boland, A., Garner, G., O'dell, B. *Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products*. *J. Agric. Food Chem.* 1975, 23, 1186- 1189.

Sandberg, A.S., Ahderinne, R. *HPLC method for determination of inositol tritetrakis y hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability*. J. Food Sci. 1986,54, 159-161.

Graf, E., Dintzis, F. *High performance liquid chromatographic method for the determination of phytate*. An. Biochem. 1982, 119, 413-417.

# Capítulo 7

## 7. Anexo

### Anexo 1. Valores de fósforo y ácido fítico en algunas materias primas vegetales.

Materia Prima (Cereales)	P total (%)	P fítico (%)	P disponible (%)
Avena	0,33	0,18	0,09
Centeno	0,30	0,21	0,14
Triticale	0,34	0,23	0,17
Maíz	0,25	0,18	0,05
Trigo	0,30	0,20	0,15
Sorgo	0,30	0,20	0,06
Cebada	0,36	0,24	0,15
Girasol	0,50	0,44	0,08
Materia Prima (Oleaginosas)	P total (%)	P fítico (%)	P disponible (%)
Soja	0,53	0,23	0,16
Pellet Girasol	0,20	0,18	0,04
Pellet Alfalfa	0,27	0,01	0,26
Pellet Soja	0,15	0,11	0,05

Fuente: FEDNA 2010.