

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



***ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS METALES,  
EN LA ETAPA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DEL ÁCIDO FÍTICO,  
EMPLEANDO MUESTRAS SINTÉTICAS QUE SIMULEN CEREALES INFANTILES.***

*Trabajo Especial de Grado presentado  
ante la Ilustre Universidad Central de  
Venezuela, por la Br. Daniela Salas  
Acosta, para optar al título de  
Licenciada en Química.*

Caracas, Octubre, 2010.

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado:

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS METALES, EN LA ETAPA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DEL ÁCIDO FÍTICO, EMPLEANDO MUESTRAS SINTÉTICAS QUE SIMULEN CEREALES INFANTILES”**, presentado por la Br. Daniela Salas Acosta, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por el Reglamento de Trabajo Especial de Grado de la Escuela de Química.

---

***Prof. Luis R. Gómez***  
***(Director)***

---

***Prof. Rosa Amaro***  
***(Director)***

---

***Prof. Jaime Valls***  
***(Jurado)***

---

***Prof. Andrés Escalona***  
***(Jurado)***

Yo, Profesor Luis R. Gómez, Investigador del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, y Profesora Rosa Amaro, Investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela,

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

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS METALES, EN LA ETAPA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DEL ÁCIDO FÍTICO, EMPLEANDO MUESTRAS SINTÉTICAS QUE SIMULEN CEREALES INFANTILES”**

Que presenta la Br. Daniela Salas Acosta, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2009 y 2010, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Octubre de 2010.

---

**Prof. Luis R. Gómez**  
**(Director)**

---

**Prof. Rosa Amaro**  
**(Director)**

## **AGRADECIMIENTOS**

Para ti abuela, por luchar tanto por querer ver este día, sé que estarás orgullosa.

Gracias madre bella, por saber siempre que decir para que todo esté bien y por hacerme sentir siempre, la persona más genial del universo.

A mi tía, por confiar en mí incluso más de lo que yo puedo hacerlo. A mi hermana, por estar pendiente de mí en cada paso, y por ser mi mejor reloj despertador y buzón de correos. A ambas, por darme un hogar al que siempre puedo acudir.

Gracias papá por todo el aprendizaje que me has brindado y por ayudarme con la corrección, aún sin entender nada.

A Uri Vic, por apoyarme siempre y ser todo lo que necesito para que mis días sean maravillosos.

A mi súper ultra querido Prof. Luis G., porque eres el mejor tutor que pude imaginar tener, ya que todo este tiempo me sirvió para tenerte como amigo.

Gracias a la Prof. Rosa Amaro por dejarme ser parte de su investigación, por sus ideas y consejos.

Gracias al COA y sus integrantes por abrirme sus puertas, en especial, al Profesor José Chirinos, por su ayuda incondicional.

A la Universidad Central de Venezuela, por ser mí casa de estudios durante estos años y brindarme un sinfín de enseñanzas y experiencias.

## **RESUMEN**

El ácido fítico (*myo-inositol hexafosfato*) es un compuesto natural encontrado en cantidades considerables en cereales y semillas de leguminosas, cuya principal función es almacenar fósforo como fuente de energía para las plantas. Posee la capacidad de establecer fuertes interacciones con minerales esenciales de nuestra nutrición, comprometiendo los niveles de éstos en el organismo.

Motivados por esta particularidad antinutricional, se han desarrollado numerosos métodos para cuantificar el ácido fítico, siendo los procedimientos cromatográficos los más comúnmente empleados. Sin embargo, cuando las muestras contienen un alto contenido de metales, como es el caso de los cereales infantiles, se reportan valores de ácido fítico por defecto, atribuidos al procedimiento del tratamiento de muestra, en especial, a la etapa de extracción fase sólida.

Con la finalidad de estudiar el efecto de los metales en esta etapa de tratamiento de muestra, se realizó un estudio de la recuperación del ácido fítico para muestras sintéticas con y sin metales (Fe y Ca), las cuales se midieron por espectrometría de absorción molecular UV-Visible.

Para las muestras sin metales el porcentaje de recuperación estuvo en el orden del 75 %, y la pérdida se atribuyó fundamentalmente a la etapa de eliminación del HCl. En cuanto a las muestras preparadas con calcio y hierro, se observó una disminución de los porcentajes de recuperación, obteniéndose valores entre 57 y 69 %, que resultó más evidente al estudiar el efecto combinado de ambos metales (38 %).

Para corregir el efecto de los metales, se propuso emplear ácido tricloroacético en vez de HCl, para simular la matriz de la muestra. Los resultados demostraron una mejora en los porcentajes de recuperación (71 %), concluyendo entonces, que para el estudio de cereales, en especial los de consumo infantil, es recomendable extraer el ácido fítico con ácido tricloroacético, planteando una concentración óptima de 0,3 M de dicho ácido.

## **ÍNDICE GENERAL**

1. INTRODUCCIÓN.	1
1. 1. Ácido fítico.	1
1. 1. 1. Generalidades.	1
1. 1. 2. Beneficios y desventajas del consumo de IP6.	2
1. 1. 3. Química del ácido fítico.	3
1. 1. 4. El IP6 como antinutriente en cereales infantiles.	5
1. 1. 5. Cuantificación del ácido fítico.	7
1. 1. 6. Métodos de extracción y análisis por cromatografía del IP6.	11
1. 1. 7. Ácido fítico en cereales infantiles y pretratamiento de la muestra.	15
2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.	18
3. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VISIBLE.	28
3. 1. Complejo azul de molibdeno.	33
3. 2. Complejo de fosfovanadomolibdato.	34
3. 3. Método fotocolorimétrico para la determinación de ácido fítico, basado en la utilización del Reactivo de Wade.	35
4. OBJETIVOS.	37
4. 1. General.	37
4. 2. Específicos.	38

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	39
5. 1. Materiales empleados.	40
5. 1. 1. Reactivos.	40
5. 1. 2. Equipos.	41
5. 2. Selección del método de medida del ácido fítico.	44
5. 2. 1. Método fotolorimétrico del complejo azul de molibdeno.	44
5. 2. 2. Método fotolorimétrico del complejo amarillo del ácido de vanadomolibfosfórico.	52
5. 2. 3. Método fotolorimétrico basado en la utilización del Reactivo de Wade.	67
5. 3. Extracción en fase sólida.	71
5. 3. 1. Descripción del montaje de extracción fase sólida.	71
5. 3. 2. Descripción del procedimiento de extracción.	72
5. 3. 3. Efecto de la matriz ácida sobre el complejo.	73
5. 3. 4. Eliminación del ácido clorhídrico.	75
5. 3. 5. Estudio de la recuperación en la etapa de evaporación del HCl.	77
5. 4. Evaluación del procedimiento de extracción y medida sin metales.	81
5. 5. Evaluación del efecto de los metales sobre la extracción del IP6.	85
5. 5. 1. Muestras de IP6 con calcio.	86
5. 5. 2. Muestras de IP6 con hierro.	89
5. 5. 3. Efecto combinado. Muestra sintética con hierro y calcio.	92
5. 6. Posible corrección del efecto de los metales: uso de ácido tricloroacético.	93
5. 6. 1. Estudio del efecto del ácido tricloroacético a diferentes concentraciones del mismo.	95

5. 7. Estudio de la posible precipitación del ácido fítico.	97
6. CONCLUSIONES.	101
7. RECOMENDACIONES.	103
8. LITERATURA CITADA.	104

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1. 1. ÁCIDO FÍTICO.

#### 1. 1. 1. GENERALIDADES.

El ácido fítico ( $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ), también conocido como *myo*-inositol hexafosfato (IP6, *myo*-inositol hexaphosphate), es un anillo de inositol sustituido con seis grupos fosfato (Figura 1). Este compuesto se encuentra frecuentemente en la mayoría de las semillas y granos de cereales, ya que es la principal forma natural de almacenamiento de fósforo (P), representando del 60 % al 90 % del fósforo total<sup>1</sup>.

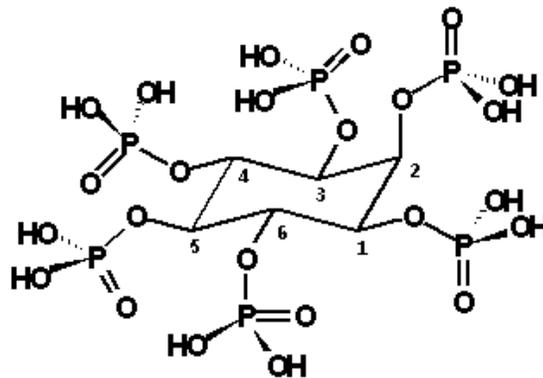


Figura 1. Estructura química del ácido fítico.

Se encuentra en grandes concentraciones en semillas de cereales, productos oleaginosos y en menor cantidad en tubérculos<sup>2</sup>. En granos, existe como sales de ácido fítico en forma de complejos fitato-calcio o fitato-magnesio. En los granos de los principales cereales, aproximadamente del 1 al 2 % del peso de la semilla es ácido fítico o su sal, aunque puede alcanzar valores tan altos como del 6 %<sup>1</sup>.

Por otra parte, el contenido de fitato en este tipo de plantas puede variar según el tipo de cultivo, madurez, variedad y en el caso de los granos, de la fracción del mismo que se muele. Se reporta que los niveles de ácido fítico en las semillas de cereales, son elevados y constituyen el mayor porcentaje del fósforo total (60-82 %); mientras que en varias raíces y tubérculos presentan cantidades moderadas, siendo el fósforo fítico del 21 al 25 % del total. En verduras, las cantidades encontradas son mucho menores<sup>3</sup>.

### *1. 1. 2. BENEFICIOS Y DESVENTAJAS DEL CONSUMO DE IP6.*

En general, la presencia del ácido fítico en los alimentos no implica la existencia de problemas de toxicidad graves. Sin embargo, en vista de que interfiere con la función de los nutrientes esenciales, el ácido fítico puede ser considerado una sustancia natural antinutriente<sup>2</sup>. Éste se enlaza a los minerales en el tracto gastrointestinal, haciéndolos potencialmente inasequibles para el organismo. Como consecuencia de esto, el ácido fítico compromete los niveles de ciertos minerales y también la velocidad de crecimiento en los seres humanos. La importancia del IP6 en la alteración de los niveles minerales, ha orientado las directrices a asegurar una adecuada biodisponibilidad de los mismos<sup>4</sup>.

La condición antinutriente del IP6, es atribuida a su acción quelante con los metales y su unión a proteínas; lo que conlleva a la disminución nutricionalmente importante en la biodisponibilidad de los mismos. Muchos de los complejos ácido fítico-proteína, son insolubles y no son biológicamente aprovechables para los seres humanos bajo condiciones fisiológicas normales<sup>5</sup>.

Los niños, ancianos y las personas vegetarianas; son las más afectadas por el alto contenido de ácido fítico en los alimentos, ya que, a pesar de que el contenido de algunos minerales, tales como: hierro y zinc, es similar a personas que llevan dietas completas, la biodisponibilidad de dichos minerales puede ser comprometida<sup>2</sup>.

Por otra parte, el ácido fítico ha sido reportado como un antioxidante, anticancerígeno e hipoglicémico o hipolipémico. Dicho ácido es considerado un agente antioxidante, porque es un potente inhibidor de la reacción de formación - catalizada por hierro - de radicales hidroxilo al quelatar el hierro libre, bloqueando así su sitio de coordinación. Sin embargo, el mecanismo de esta reacción es incierto. Además, los inositol fosfatos más pequeños, tales como IP4 e IP3, pueden desempeñar roles de mediación de respuestas celulares<sup>5</sup>.

Su ingesta es indispensable para una dieta sana y equilibrada, debido a la acción inhibidora en la cristalización de sales cálcicas, tales como: fosfatos y oxalatos; evitando, por tanto, la formación de depósitos minerales patológicos como son los cálculos renales. Otro efecto beneficioso, es la reducción de la concentración de colesterol, evitando así problemas cardiovasculares<sup>3</sup>.

Considerando los aspectos positivos y negativos de la ingesta de ácido fítico, a través de los alimentos que lo contienen, es necesario señalar la relevancia de una adecuada combinación de alimentos, a fin de tener una correcta ingestión de todos los nutrientes que son esenciales para el organismo, especialmente en aquellos grupos de la población donde el impacto de altas concentraciones de fitato puede ser más serio, como son lactantes, niños, mujeres embarazadas y ancianos<sup>2</sup>.

### *1. 1. 3. QUÍMICA DEL ÁCIDO FÍTICO.*

En su forma desprotonada, tiene gran afinidad por minerales divalentes tales como: calcio, magnesio, zinc, hierro, y cobalto<sup>4</sup>. Usualmente, se encuentra formando complejos con minerales esenciales y/o proteínas. Los mecanismos reales de las interacciones entre el ácido fítico y los minerales, todavía no están definidos; aunque es posible que pueda formar un complejo con un catión a través de un solo grupo fosfato o

entre dos grupos fosfatos; dentro de la misma molécula o entre moléculas diferentes. Los grupos ácidos, presentes en esta molécula, facilitan la formación de numerosas sales; de las cuales aquellas formadas con metales alcalinos son solubles en agua, mientras que las sales de metales divalentes, resultan casi insolubles<sup>3</sup>.

Estudios *in vitro* muestran que los complejos fitato-proteínas son formados por interacciones electrostáticas. El grado de interacción entre el ácido fítico y las proteínas, depende en gran medida del pH, carga neta que posea la proteína, conformación de las moléculas involucradas y de las interacciones con los minerales a un pH específico. Para un valor de pH bajo, se produce una fuerte interacción electrostática entre los grupos amino terminales de las proteínas y los ésteres fosfatos aniónicos del ácido fítico, formándose un complejo binario. A valores de pH intermedios, se forma un complejo ternario con cationes divalentes, como el calcio o el magnesio. Esta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo amino desprotonado de la proteína, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos. Para un valor de pH elevado, la interacción entre las proteínas y el ácido fítico disminuye, de modo que los complejos terciarios se desestabilizan debido al aumento de la fuerza iónica característica del pH elevado<sup>3</sup>. Dichas interacciones con minerales y proteínas, se ilustran en la Figura 2.

El ácido fítico puede ser degradado a *myo*-inositol pentafofosfato (IP5, inositol pentaphosphate), tetrafofosfato (IP4, inositol tetraphosphate), trifosfato (IP3, inositol triphosphate), difosfato (IP2, inositol diphosphate) o monofosfato (IP, inositol monophosphate). Los productos de hidrólisis formados (excepto el *myo*-inositol pentafofosfato), tienen poca capacidad para unirse a los minerales y los complejos formados, son más solubles<sup>3</sup>.

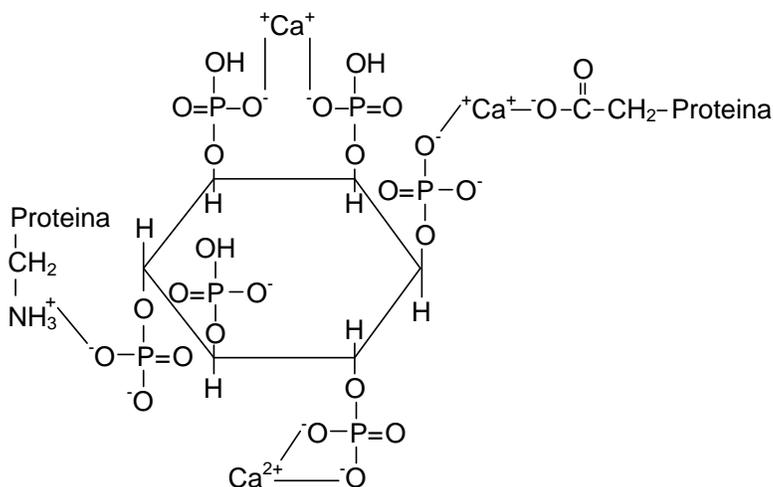


Figura 2. Interacciones del IP6 con minerales y proteínas.

La degradación mencionada se puede producir con o sin hidrólisis enzimática, ocurriendo ésta en el tracto intestinal, por la acción de las fitasas (*myo*-inositol hexafosfato fosfohidroxilasas), las cuales son de origen microbiano o vegetal. Las fitasas hidrolizan – únicamente – los fitatos en disolución; por lo que su actuación requiere humedad en el medio y unas condiciones determinadas de pH y temperatura, que son variables según el tipo de fitasa. Por otro lado, la hidrólisis no enzimática ocurre al calentar o someter a un tratamiento con ácidos fuertes<sup>3</sup>.

#### 1. 1. 4. EL IP6 COMO ANTINUTRIENTE EN CEREALES INFANTILES.

La desnutrición es, principalmente, la consecuencia de un régimen de alimentación inadecuado que da lugar a carencias de calorías, proteínas, vitaminas y minerales. En el caso particular del zinc, se estima que la carencia del mismo afecta, aproximadamente, a la tercera parte de la población mundial; con unos porcentajes que

varían entre el 4 y el 73 % según las regiones<sup>6</sup>. Tres factores etiológicos están asociados con el desarrollo de la deficiencia de zinc: deficiencias dietéticas; estados de enfermedad que inducen a pérdidas excesivas del mineral; y estados fisiológicos que incrementan los requerimientos de dicho metal. De las anteriores, el factor mayor puede atribuirse a la baja ingesta de zinc y/o a la baja biodisponibilidad. Esta última representa un problema en dietas basadas en cereales no refinados y leguminosos con un alto contenido de fitatos, tanto del ácido como de sus sales de potasio, magnesio y calcio. En muchos países, donde la deficiencia de zinc ha sido reportada, también es común la deficiencia de hierro. Esto no resulta sorprendente, ya que el hierro y el zinc tienen una distribución similar en los alimentos y, además, muchos componentes presentes en los mismos, que modifican la biodisponibilidad del zinc, afectan al hierro de igual manera<sup>7</sup>.

Los cereales incorporados como harinas, son usualmente los primeros alimentos sólidos suministrados a los niños, puesto a que están bastante disponibles y son culturalmente aceptados como alimentos básicos. Suelen proporcionarse a edades comprendidas entre los 4 y 6 meses, para suplementar la leche materna y las fórmulas infantiles, durante lo que se considera un período de rápido crecimiento y desarrollo. A esta edad, los depósitos de minerales en el cuerpo del bebé son naturalmente bajos y, además, los depósitos derivados de la madre están casi agotados, por ello las fuentes dietéticas se vuelven muy importantes y una ingesta adecuada, es crucial para satisfacer las necesidades de nutrientes de los lactantes. Los cereales infantiles tienen grandes cargas energéticas basadas en sus contenidos de carbohidratos y proteínas, esto es: valores aproximados del 78 % y 13 %, respectivamente; que también proveen minerales y vitaminas, particularmente tiamina. Los cereales más comúnmente usados para formular harinas de cereales infantiles son: trigo, centeno, cebada, avena, arroz y maíz. Estos pueden emplearse de forma individual, o mezclados para obtener harinas infantiles multicereales.

La baja absorción de los nutrientes provenientes de los cereales infantiles, es considerada como un factor en las causas de las deficiencias minerales en los niños y

lactantes. Sin un suministro adecuado de hierro biodisponible, los niños se convierten rápidamente, en hierro deficientes. La deficiencia de hierro genera complicaciones, tales como: anemia, bajas significativas en el desarrollo mental y psicomotor y reduce el sistema inmunológico. Los cereales también pueden afectar la absorción de calcio y zinc, interfiriendo con el desarrollo de un nivel óptimo de masa ósea y el crecimiento en general<sup>8</sup>.

Entonces, se entiende que el ácido fítico encontrado en cereales no refinados, plantas leguminosas y semillas; constituye un factor dietético que actúa como un potente inhibidor de la absorción de hierro, zinc y calcio. Por lo tanto, para asegurar la absorción de estos minerales a partir de una comida, es *importante considerar las relaciones molares de fitato:mineral* de cada alimento y, por ende, es necesaria la cuantificación del ácido fítico de dichas muestras<sup>9</sup>.

#### 1. 1. 5. CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO FÍTICO.

El efecto, potencialmente perjudicial del ácido fítico, relativo a la alteración de los niveles de nutrientes en los seres humanos, ha conducido al desarrollo de un gran número de técnicas para medir su contenido real en alimentos. Éstas van desde procedimientos clásicos de precipitación y titulación, pasando por métodos fotocolorimétricos y separaciones cromatográficas, hasta espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) e isotacoforesis capilar<sup>2, 5, 10, 11</sup>. Sin embargo, durante mucho tiempo la determinación del ácido fítico ha sido un problema analítico, debido a las diversas interferencias presentadas con las distintas técnicas y métodos utilizados.

Hasta 1980, el IP6 era exclusivamente determinado a través de métodos de precipitación<sup>12</sup>. En un comienzo, el procedimiento más comúnmente empleado se basaba en el principio de que el fitato forma un complejo insoluble en presencia de ión

férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ). En el procedimiento original<sup>13</sup>, los extractos que contenían fitato eran titulados con una disolución de cloruro férrico estandarizado, usando tiocianato de amonio como indicador interno para detectar el exceso de hierro en disolución. De esta forma, el punto final de la titulación era visualizado gracias al color rosado que persiste por 5 minutos (tiocianato férrico). Se presume que el IP6 es el único compuesto de fosfato con esta propiedad, y que el fosfato inorgánico u otros orgánicos distintos al IP6, no precipitan bajo estas condiciones.

La mayor desventaja de éste método, es la dificultad de detectar un punto final persistente en presencia del precipitado fitato-hierro de color blanco, o en presencia de sustancias reductoras provenientes de la matriz que transformen el ión férrico en ferroso. Como consecuencia de lo anterior, se realizaron numerosos cambios al método descrito, estableciendo dos tipos de ensayos, los métodos directos e indirectos.

Los *métodos directos* contemplan el uso del precipitado fitato-hierro; luego de ser recuperado cuantitativamente. Dicho precipitado se calcina o se hidroliza para, posteriormente, determinar el contenido de fósforo total.

En los *métodos indirectos*, se suele añadir una cantidad exactamente conocida de una disolución estandarizada de cloruro de hierro. Luego, el ión férrico que no precipita y queda remanente en disolución, puede medirse por algún método. Para el cálculo posterior de la cantidad de IP6, se considera una relación estequiométrica de hierro-fósforo de 4:6<sup>14</sup>.

Los métodos indirectos parecen ser más convenientes y rápidos que los directos. Sin embargo, cuando los niveles de IP6 son bajos en los alimentos, los métodos indirectos presentan un gran margen de error<sup>14</sup>. Se han reportado casos<sup>15</sup>, en los cuales se sobreestima la cantidad de IP6 como resultado de la presencia, en la matriz, de sustancias que reducen el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ ; tales como ácido ascórbico o clorogénico. La adición de peróxido de hidrógeno al 30 %, ha solucionado este tipo de problemas. También, la presencia de un exceso de hierro en el extracto, bien sea por la adición de

mucho cloruro férrico o porque la semilla o grano posee un gran contenido de hierro, afecta el equilibrio de formación del complejo fitato-hierro<sup>14</sup>.

Por tales inconvenientes, se han probado otra serie de métodos<sup>16</sup> como la extracción del fitato con ácido tricloroacético, y su posterior calentamiento con cloruro de hierro para precipitar el complejo fitato-hierro. Hecho esto, la adición de hidróxido de sodio en ebullición permite la conversión del complejo en hidróxido de hierro insoluble y fitato de sodio soluble. La cantidad de hierro precipitado, es redisuelta y se determina por fotolorimetría o titulación complejimétrica. Así pues, muchos métodos similares fueron empleados de acuerdo a los requerimientos del momento y la instrumentación disponible<sup>14</sup>.

Un cambio realmente importante lo introduce Harland y Oberleas en 1977<sup>17</sup>. Ellos eliminaron el paso de precipitación, simplificando el proceso de determinación. Extrajeron el ácido fítico directamente de la muestra con una disolución de HCl al 1,2 %, seguidamente el extracto se pasó por una resina de intercambio iónico para separar el fósforo inorgánico y preconcentrar el IP6. Hecho esto, la muestra fue eluída con NaCl 0,7 M y a continuación se digestó con ácidos sulfúrico y nítrico concentrados. Luego, el contenido de fósforo fue medido. El uso de relaciones estequiométricas permitió la determinación de la concentración de IP6. Este procedimiento de preconcentración y análisis fotolorimétrico del IP6 como ortofosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) se convirtió, entonces, en un método oficial de la AOAC<sup>18, 1</sup>.

Tanto los métodos de precipitación, como de extracción; presentan un inconveniente como lo es la falta de especificidad. Los alimentos que contienen granos o legumbres procesadas, pueden contener cantidades apreciables de compuestos desfosforilados de ácido fítico, tales como: inositol pentafofato, tetrafofato, trifosfato y, posiblemente, di y monofosfatos. Dichos procedimientos no diferencian al IP6 del resto de los inositoles fosfatos, debido a la dificultad de controlar las condiciones experimentales en los mismos; de forma que sólo determinados inositoles sean obtenidos para su

cuantificación. Por lo tanto, los valores pueden resultar erróneos cuando se determina el contenido de ácido fítico en alimentos procesados, ya que, durante el proceso de los mismos, el IP6 suele degradarse en los demás inositol fosfatos<sup>1</sup>.

En un intento de comprobar lo anteriormente expuesto, relativo a la falta de especificidad, Lehrfeld y Morris (1992)<sup>19</sup> compararon el método empleado de la AOAC, basado en la determinación directa del extracto por fotocolorimetría, con un método que emplea la técnica de HPLC. En ambos procedimientos, el ácido fítico fue extraído de la matriz con una disolución de HCl al 2,4 %, y lavado y preconcentrado a través de una columna de intercambio aniónico. Así, la mayoría de las impurezas fueron eliminadas de la muestra; mientras que el IP6 quedaba retenido en la columna. Luego, el IP6 es eluído con una disolución de NaCl 0,7 M.

En el caso de la AOAC, el extracto es digerido con  $H_2SO_4$  y  $HNO_3$  para obtener ortofosfato. El fósforo inorgánico total fue determinado por fotocolorimetría, empleando una disolución de molibdato; seguida por el reactivo de 1-amino-2-hidroxinaftaleno-4-ácido sulfónico para formar el correspondiente complejo coloreado. La absorbancia se midió a 640 nm. Dicho procedimiento asume dos premisas; primero, que todo el IP6 es retenido en la columna y, segundo, que sólo IP6 es eluído al pasar la disolución de NaCl. Lo anterior es válido, cuando la muestra en cuestión posee sólo IP6; como es el caso de los cereales y granos en su estado natural. Sin embargo, los alimentos de cereales y granos ya procesados, contienen un porcentaje considerable del resto de los inositol fosfatos; los cuales son retenidos igualmente por la columna y también eluyen junto al IP6 con la disolución de NaCl<sup>19</sup>.

A diferencia del método anterior, al emplear la técnica de HPLC, el extracto obtenido se pasó a través de una columna cromatográfica capaz de separar las diferentes especies de inositol fosfato. Como resultado de la comparación de ambos métodos encontraron que, para muestras que contenían predominantemente IP6, los valores del contenido de ácido fítico eran iguales; mientras que, para muestras que contenían cantidades

apreciables de otros inositoles fosfatos (IP5, IP4 e IP3), los valores resultaron diferentes. Concluyeron entonces, que el método de la AOAC sobreestima el contenido de ácido fítico de los alimentos procesados; debido a la falta de especificidad del mismo. De todos los fosfatos posibles, sólo IP6 e IP5 parecen interferir apreciablemente con la biodisponibilidad de elementos traza y minerales. Consecuentemente, la inclusión de otros fosfatos en la determinación de ácido fítico, llevará a sobreestimar los efectos negativos que un alimento particular pueda tener en la biodisponibilidad de elementos traza y minerales<sup>19</sup>.

Debido a que el IP6 y los demás inositoles fosfato, producen efectos diferentes sobre la asimilación de nutrientes, los métodos que permiten la especificidad de los mismos son considerados los más meritorios y en la actualidad constituyen objeto de investigación. Los *métodos modernos emplean la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) para lograr el fraccionamiento de los inositoles fosfatos en sus distintos componentes*, permitiendo la determinación exacta de los mismos<sup>4</sup>.

En vista a lo expuesto en el párrafo anterior, se hará una revisión correspondiente a los métodos cromatográficos empleados para la determinación de IP6 en cereales y alimentos afines, con referencia a sus posibles inconvenientes y conclusiones.

#### 1. 1. 6. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS POR CROMATOGRÁFÍA DEL IP6.

El primer trabajo que expone el uso de la técnica de HPLC, fue la investigación realizada por Tandgendjaja y col. en 1980<sup>20</sup>. Emplearon una columna de fase inversa (C18), con un detector de índice de refracción diferencial. El analito fue extraído con ácido tricloroacético y luego filtrado e inyectado directamente en el sistema cromatográfico, para ser eluído con una fase móvil de acetato de sodio<sup>14</sup>. Desde

entonces, diversos investigadores emplearon la técnica de HPLC; ensayaron con diferentes columnas, composición de la fase móvil, flujos y modificaciones en la preparación de los extractos de muestra; siempre con el ánimo de obtener una mejor separación de los diferentes derivados desfosforilados del IP6 y una mayor sensibilidad de la técnica<sup>21, 22</sup>.

En la mayoría de los métodos inicialmente ensayados, se encontró que el IP6 eluye con el frente del solvente y con una pobre resolución entre los diferentes inositol fosfatos. Para resolver dicha problemática, algunos investigadores proponen un cambio del método cromatográfico y optan por emplear la *cromatografía de par iónico* o la cromatografía de intercambio iónico<sup>14</sup>.

En 1989, Lehrfeld desarrolló un método que engloba tres pasos fundamentales: extracción, preconcentración y/o purificación y análisis cromatográfico. La extracción implica el tratamiento de la muestra con 10 mL de HCl 0,5 M, y luego es llevada a ultrasonido por un lapso de 1 a 1,5 min. La suspensión resultante se centrifugó y el líquido sobrenadante se diluyó con agua para ser pasado por un cartucho de extracción en fase sólida (columna de intercambio aniónico, marca SAX). El ácido fítico retenido en la columna se eluyó con 2 mL de HCl 2 M. Hecho esto, las muestras eluidas se secaron por evaporación. El residuo fue suspendido en 1 mL de agua y 15 µL de hidróxido de tetrabutilamonio, para luego ser centrifugado. Una alícuota del líquido sobrenadante fue inyectada en la unidad HPLC. Para este análisis se empleó una columna analítica de polímero macroporoso (PRP-1) de la casa Hamilton; se utilizó como fase móvil una disolución de ácido fórmico en agua-metanol, adicionando hidróxido de tetrabutilamonio (para propiciar la formación del par iónico). Se empleó un detector de índice de refracción. El método propuesto permite identificar y cuantificar los diferentes inositoles fosfato (IP6, IP5 e IP4) de manera eficiente, reduciendo los tiempos de análisis en las etapas de extracción. De esta forma, se logró analizar hasta 60 muestras diarias. La corrida cromatográfica implica un tiempo de análisis de 14 minutos, con anchos de

bandas relativamente considerables y una degradación de la columna con el tiempo de uso<sup>23</sup>.

Cinco años más tarde (1994), Lehrfeld evaluó el método propuesto por él en 1989, en aras de disminuir el tiempo de análisis y mejorar la resolución cromatográfica<sup>24</sup>. El tratamiento previo de la muestra, fue el mismo propuesto en el trabajo anteriormente descrito. Las medidas se realizaron por HPLC en la modalidad de par iónico, empleando una columna PRP-1; pero se evaluó el uso de varios sistemas de solventes empleados como fase móvil, pH, así como los problemas relacionados con las columnas cromatográficas empleadas. El uso de una columna PRP-1 nueva y una fase móvil de metanol y ácido fórmico en agua a pH 4,3, resuelve satisfactoriamente la mezcla de inositoles (IP3, IP4, IP5 e IP6). Sin embargo, una vez que el desgaste en la columna se hace evidente, resulta conveniente el uso de una fase móvil de acetonitrilo y ácido fórmico, al mismo pH.

Por otro lado, se observó la adsorción del ácido fítico al metal del sistema cromatográfico, específicamente al acero inoxidable del contenedor de las columnas. Para ello, se sugirió el uso de contenedores poliméricos (PEEK, polyether ether ketone). En conclusión, este trabajo cita algunos problemas asociados al método propuesto y las recomendaciones correspondientes para su solución. Además, redujo el tiempo de análisis a 5 minutos; a diferencia del anterior que requería unos 14 minutos<sup>23</sup>. En este sentido, el método de Lehrfeld ha sido ampliamente aceptado. Por otra parte, al medir más eficientemente los diferentes compuestos de ácido fítico, se observaron inconvenientes asociados a trazas de metales (proveniente de los ácidos usados en la extracción y de la matriz de la muestra); para lo cual se recomendó el uso de EDTA. Se concluyó que la presencia de metales causa la formación de complejos fitato-metal, en la etapa de la evaporación del eluente de la columna de intercambio aniónico, lo cual conduce a pérdidas de analito. Se recomendó, entonces, el empleo de ácidos de mayor pureza y tratamiento previo de las muestras con alto contenido de metales.

A pesar de que el método de Lehrfeld es el más ampliamente referido, se han reportado procedimientos que no requieren pasos de pre-purificación y que igualmente permiten, la separación de los diferentes inositol fosfatos por HPLC.

Existen investigaciones, donde la cromatografía de intercambio iónico resulta una técnica más apropiada para la determinación del ácido fítico, en ciertas muestras. En el año 2001, Brooks y Lampi<sup>4</sup> compararon dos métodos para cuantificar el ácido fítico en cereales infantiles comerciales, la cromatografía de par iónico (ion pair HPLC) y la de intercambio iónico (ion exchange HPLC).

Para la cromatografía de par iónico, se hizo pasar la muestra por un cartucho de intercambio aniónico; donde el IP6 retenido se eluyó con HCl 2 M. El líquido resultante fue analizado con una columna PRP-1,5 µm; logrando reproducir el método de Lehrfeld de 1994.

Para la cromatografía de intercambio iónico, se usó ácido tricloroacético 0,61 M y ultrasonido para la extracción del analito. Se empleó una columna de PL-SAX 50 x 2,1 mm y un gradiente de fase móvil de dos buffers. El detector empleado fue un UV-visible a una longitud de onda de 500 nm, utilizando un reactor post columna.

El método de intercambio iónico, dio valores de IP5 que fueron de 5 a 33 veces mayores a los obtenidos por el método de par iónico; mientras que los valores de IP6 fueron de 14 a 190 mayores. Al observar dichos resultados, se investigó la recuperación de analito obtenida por el método de par iónico, demostrando problemas relacionados con la interacción de todos los inositol fosfatos con la matriz de los alimentos. Se hizo una serie de pruebas a cada uno de los pasos del método, determinando que la etapa de extracción es la que resulta problemática. Se sugirió que el gran contenido de metales presentes en los alimentos infantiles; es el responsable de los bajos valores de recuperación. Dicha interferencia, resulta un problema en el paso de extracción con la columna de intercambio aniónico<sup>4</sup>.

Los últimos trabajos ya descritos, indican que es necesario dedicar especial atención al método de extracción de la muestra; en particular a lo relativo a los bajos porcentajes de recuperación del ácido fítico, por posibles interferencias de ciertos metales.

### *1. 1. 7. ÁCIDO FÍTICO EN CEREALES INFANTILES Y PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA.*

Varios autores han reportado bajos porcentajes de recuperación de ácido fítico en algunos cereales; empleando la técnica de HPLC-RI, lo cual va directamente asociado a los procedimientos de pretratamiento de la muestra que hayan sido empleados<sup>4, 5</sup>. En especial, resulta aún más trascendente la obtención de bajos porcentajes de recuperación en cereales infantiles, tal como ha sido reportado en algunas investigaciones<sup>4, 25</sup>; ya que es, precisamente, este tipo de cereales los de mayor interés de estudio por la gran importancia que tienen en la dieta de los infantes, tal como se ha hecho hincapié en los apartados anteriores.

La preparación de la muestra, consiste en una o más operaciones necesarias para modificar la misma, y liberar el analito en una forma conveniente, para el análisis posterior por la técnica cromatográfica elegida. El resultado final de esta operación, es una muestra procesada y tratada, que puede ser inyectada en el sistema cromatográfico. El procedimiento a emplear, contempla la simplificación o eliminación de la matriz de la muestra, de manera que no existan interferencias en el análisis; y asegurar que la cantidad inyectada al cromatógrafo, tenga una concentración adecuada de analito con relación al límite de detección de la técnica.

La homogeneización y disolución de la muestra son, frecuentemente, los primeros pasos de la preparación de ésta. Las muestras sólidas requieren de pulverizado y, en algunos casos, tamizado. Cuando se hacen cálculos basados en el peso original de la

muestra, es recomendable secar las mismas y llevarlas a peso constante, de forma que se elimine el contenido de humedad que, por lo general, no es constante<sup>26</sup>. En el caso del ácido fítico, se ha usado secado en horno, liofilización<sup>25</sup>, pulverización y tamizado de la muestra<sup>23, 5</sup>.

Posterior a los pasos ya mencionados, la extracción es la etapa a seguir en cualquier procedimiento para la determinación cuantitativa de ácido fítico en plantas leguminosas, cereales y en los productos derivados de éstos<sup>14</sup>. Los solventes de extracción de IP6 más comunes, son el ácido clorhídrico y el tricloroacético; los cuales, en las distintas referencias, varían en su concentración y la forma y tiempo en que son empleados. Algunos procedimientos propuestos, emplean extracción bajo agitación por algunas horas. En otros casos, se utiliza ultrasonido reduciendo el tiempo de extracción a cuestión de minutos. Hecho esto, se lleva la muestra en ácido a centrifugar para separar los sólidos y el extracto<sup>4, 5, 8, 9, 23, 24</sup>.

El uso de ácido tricloroacético, tiene ventajas sobre el ácido clorhídrico ya que coagula y desnaturaliza efectivamente las proteínas en el extracto, previniendo la interferencia de las mismas, en etapas posteriores del correspondiente análisis<sup>14</sup>.

De acuerdo con algunos investigadores<sup>17, 18</sup>, el contenido de grasa de la muestra interfiere con la extracción del IP6 de los alimentos. Por ello, el contenido de grasa del material debe mantenerse por debajo del 5 %, o debe reducirse antes del paso de extracción con el ácido seleccionado<sup>14</sup>. Varios investigadores han empleado un paso de extracción previo, con solventes orgánicos como cloroformo y metanol<sup>5</sup> o también etil éter en hexano o solamente hexano<sup>4</sup>.

En vista de que el procedimiento más ampliamente usado, para la determinación de IP6 en alimentos, es el empleado por Lehrfeld (1994); el siguiente paso sería el proceso de preconcentración y purificación de los analitos, mediante el uso de una columna con resina de intercambio aniónico. Se ha reportado el uso de columnas del tipo AG1-X8 con iones cloruro para ser intercambiados<sup>5</sup> o del tipo SAX<sup>4, 8, 9, 23, 24</sup>, entre otras.

También se han utilizado cartuchos del tipo amino<sup>3</sup>. En todos los casos, emplean disoluciones de HCl diluido para remover de la columna todos aquellos compuestos de la matriz que no interesan, dejando el IP6 y sus derivados desfosforilados retenidos en la columna. Luego, los compuestos retenidos se eluyen con una disolución de HCl 2 M. Hecho esto, para evitar la interferencia del HCl en el sistema de detección, se ha recomendado la eliminación del mismo por rotaevaporación o liofilización<sup>4, 8, 9, 23, 24</sup>.

Un estudio que manifiesta problemas asociados a dicha etapa de extracción en fase sólida, fue el realizado por Brooks y Lampi (2001); ya referido anteriormente<sup>4</sup>. Por ello, resulta pertinente ampliar la información de este trabajo, en el cual se comparan dos métodos de HPLC, esto es, par iónico e intercambio iónico, en la determinación de IP6 en cereales infantiles.

Los bajos porcentajes de recuperación obtenidos por el método de par iónico, en comparación con los valores que resultaron del método de intercambio iónico, se asociaron al uso de la resina de intercambio iónico que fue empleada, sólo en este primer método. Los investigadores plantean que la causa de estos resultados, es la presencia de un alto contenido de metales en la matriz de la muestra, produciendo la precipitación del IP6. Cabe señalar que, tras estas inferencias, los autores emplearon varios métodos para eliminar el efecto de la presencia de los metales, tales como: el uso de EDTA, ácido ascórbico, 8-hidroxiquinolina, entre otros; sin obtener resultados satisfactorios<sup>4</sup>.

Como resultado de la necesidad de brindar los nutrientes requeridos por los infantes para su sano crecimiento, la mayoría de los cereales infantiles poseen una gran cantidad de metales, tales como: Fe, Ca y Zn<sup>2</sup>. Debido a esto, y a la gran necesidad de cuantificar el ácido fítico para asegurar que el contenido del mismo no es perjudicial, es pertinente investigar el efecto que tiene la concentración de los metales sobre el paso de extracción en fase sólida, en la determinación del IP6 en los cereales infantiles.

Considerando, que la etapa de extracción en fase sólida es objeto de estudio del presente trabajo, se incluirán a continuación ciertos conceptos relacionados con esta metodología.

## **2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.**

Actualmente, la extracción en fase sólida (solid-phase extraction, SPE) es, probablemente, el método de pretratamiento de muestra más popular, usado para la purificación y/o preconcentración de las muestras. En las últimas décadas, se han desarrollado numerosas mejoras en el campo de la SPE, tales como: nuevos formatos (p. ej. cartuchos y discos sofisticados), nuevos sorbentes o el desarrollo de sistemas automatizados; lo cual, ha conducido al amplio uso de la SPE<sup>27</sup>. Ésta es utilizada para seis propósitos principales en el pretratamiento de muestras: remoción de interferencias, preconcentración, desalinización, intercambio de disolvente, derivatización *in situ* y almacenamiento y transporte de muestra.

La remoción o eliminación de interferencias resulta necesaria en numerosos casos. Existen interferencias que solapan las bandas de los analitos en las separaciones por HPLC, lo cual, puede complicar el desarrollo del método o afectar los resultados del análisis. También, las sustancias hidrofóbicas (aceites o grasas), materiales poliméricos o material particulado, pueden tapan o desactivar la columna HPLC, hecho que puede ser solucionado utilizando algún tipo de SPE.

Para la determinación de trazas, es conveniente concentrar la muestra que se va a analizar. En este caso, grandes volúmenes de muestra son tratados en un cartucho de SPE, de manera que se retenga el analito de interés, para luego eluir el compuesto con un volumen pequeño del solvente seleccionado. En el mejor de los casos, una combinación adecuada de solventes permite la inyección directa en el sistema HPLC,

una vez eluido el analito del dispositivo de extracción. Sin embargo, en los casos en los que se requiere eliminar el solvente, la evaporación del mismo es más rápida al tener un volumen menor. Luego, el analito es redisoluelto en la fase móvil que se vaya a usar en la separación HPLC. Por otro lado, la desalinización de muestras resulta importante para los análisis por cromatografía de intercambio iónico, para lo cual se puede emplear la SPE con fase reversa. El resto de las aplicaciones mencionadas de la SPE, son raramente usadas o menos relevantes<sup>28</sup>.

La extracción en fase sólida constituye un procedimiento que utiliza un material sólido, para retener compuestos específicos de una disolución. La retención toma lugar al pasar la disolución a ser extraída, a través de una cantidad específica de fase sólida porosa finamente dividida (adsorbente), usualmente contenida en una pequeña columna, cartucho o disco<sup>26</sup>. La SPE involucra cuatro pasos: acondicionamiento del adsorbente, introducción de la muestra, lavado (eliminación de interferencias) y recuperación del analito (Figura 3).

El adsorbente es acondicionado al pasar pequeños volúmenes de un solvente A seleccionado, a través del cartucho o columna (Paso 1). Las características del solvente dependerán del adsorbente a utilizar. Este paso tiene la finalidad de remover las impurezas que pueden depositarse en el cartucho, mientras éste es expuesto al ambiente del laboratorio. También, permite la solvatación del material sólido y la activación de los centros del adsorbente. En ocasiones, el exceso de solvente puede ser eliminado, pasando una corriente de aire al cartucho. También es útil, lavar el material sólido con agua antes de introducir una muestra acuosa.

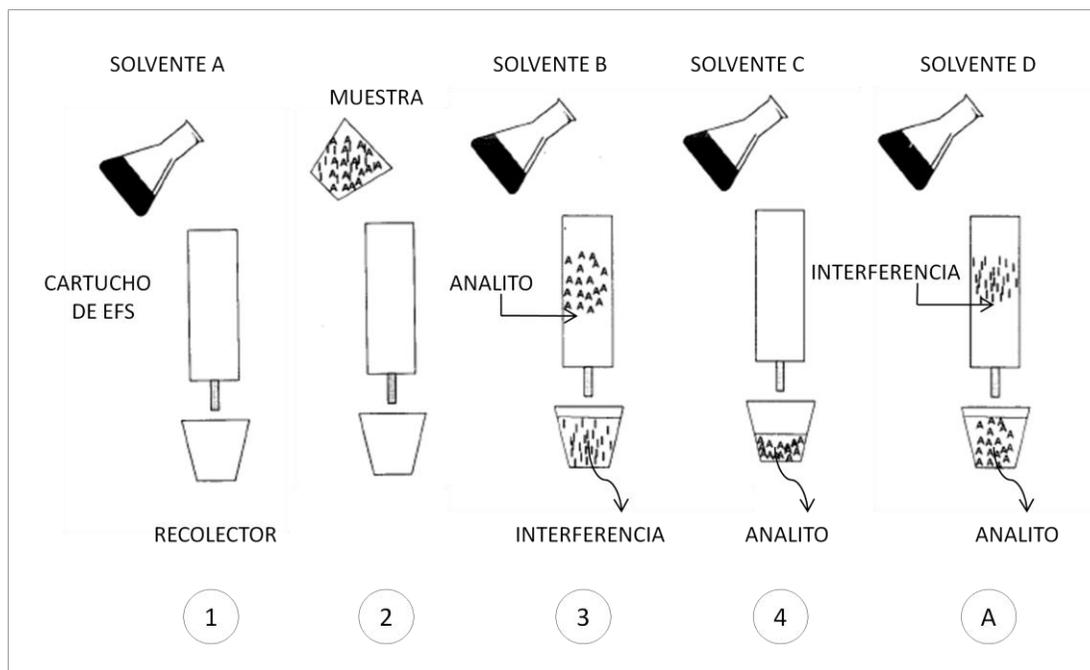


Figura 3. Pasos y modalidades de la SPE.

El segundo paso de la SPE consiste en la introducción de la muestra. Para ello, es disuelta en un disolvente débil y es inyectada al cartucho. Este solvente debe permitir que el analito se retenga fuertemente en la fase sólida. La muestra puede introducirse con una pipeta o jeringa, o incluso puede ser bombeada al cartucho por algún sistema. Es importante elegir la cantidad de muestra a inyectar, tomando en cuenta la capacidad del adsorbente, de manera que no se sobrecargue la fase sólida. La disolución de la muestra debe pasarse sin permitir que el adsorbente se seque. El flujo no tiene que ser preciso, pero se recomienda que no exceda los 4 mL/min, de manera que se proporcione un tiempo adecuado de interacción.

Una vez retenido el analito en la fase sólida, se pueden eliminar las interferencias que quedan igualmente retenidas, lavando el cartucho con un solvente B de fuerza intermedia (Paso 3). De esta manera, las interferencias que son retenidas con menos fuerza que el analito, son removidas de la fase sólida; sin tener pérdidas del analito.

El último paso, involucra la elución y recolección de la fracción del analito (Paso 4). Si se está preconcentrando la muestra, se debe utilizar el volumen más pequeño posible para la elución del compuesto. Esto se logra empleando un disolvente fuerte C. Alternativamente, puede emplearse un disolvente un poco menos fuerte que eluya el analito, pero que evite la elución de interferencias fuertemente retenidas. Esta consideración es importante cuando la interferencia que se quiere eliminar, es una especie que eluye con menos facilidad que el analito. Cuando se utilizan disolventes no tan fuertes, se necesitan mayores volúmenes del mismo para la elución; sin embargo, este solvente puede evaporarse por algún método, para luego redissolver el analito en la fase móvil apropiada. Generalmente, los solventes empleados para eluir son muy fuertes y resultan inadecuados para el análisis HPLC; por ende, este paso de eliminación del solvente suele ser común. Otros procedimientos contemplan la retención de las interferencias, dejando pasar los analitos (Sección A en la Figura 3). En estos casos la preconcentración no es posible. Tampoco es posible separar el analito de aquellas interferencias que no sean retenidas por la fase sólida. Por esta razón, esta modalidad de SPE es menos utilizada<sup>28</sup>.

Dependiendo de la naturaleza de la fase sólida, existen varios mecanismos de retención de los solutos. El mecanismo más común de retención es la partición líquido-líquido, aún cuando el nombre de la técnica indica fase sólida. La adsorción líquido-sólido y el intercambio iónico, son también empleados en las separaciones.

#### *Fases sólidas.*

En la extracción en fase sólida se utilizan un gran número de fases estacionarias o adsorbentes. Éstas son fabricadas de forma similar a las empleadas en la cromatografía de líquidos, con partículas de una sustancia porosa. Algunos materiales naturales (como sílice porosa o alúmina), tienen propiedades específicas que permiten el proceso de adsorción. Otros materiales son sintéticos y son fabricados a partir de una base,

sobre la cual, se unen químicamente ciertos fragmentos orgánicos específicos (fase unida químicamente). Los materiales base más comunes son la sílice porosa y los polímeros orgánicos, tales como el poliestirenodivinilbenceno o acrilatos.

Pueden ser clasificados en: no polares, polares y del tipo intercambio iónico. Algunas veces, los materiales que tienen un polímero orgánico sintético como material base, son clasificados separadamente. Un número significativo de adsorbentes tienen un esqueleto de sílice porosa, el cual es derivatizado con reactivos específicos, para obtener una fase unida químicamente con las propiedades deseadas. La sílice utilizada para este propósito, es típicamente un material amorfo, con un área de superficie comprendida entre 50 y 500 m<sup>2</sup>/g, y un diámetro de poro de 50 a 500 Å. La superficie de la sílice contiene un número de grupos silanoles que pueden ser: silanoles individuales, silanoles geminales o silanoles asociados mediante puentes de hidrógeno, entre ellos mismos, o con moléculas de agua. Lo anteriormente expuesto se indica en la Figura 4.

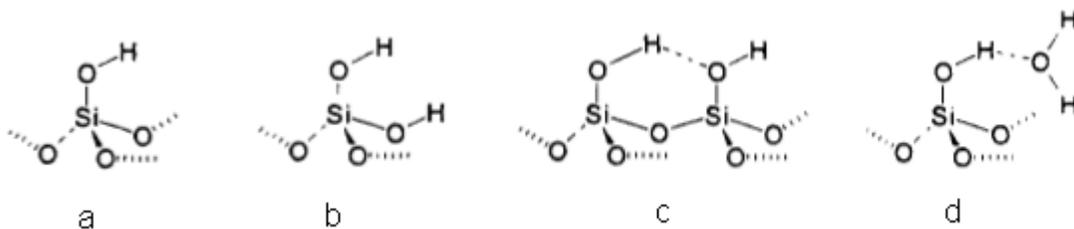


Figura 4. (a) Silanol individual, (b) Silanoles geminales, (c) y (d) Silanoles asociados.

Existe la sílice denominada Tipo B, cuya estructura es más uniforme, ya que sólo contiene silanoles individuales asociados por puentes de hidrógeno. La sílice no modificada puede emplearse como adsorbente de SPE. Sin embargo, tal como sucede en cromatografía al usar esta fase estacionaria, los enlaces entre el esqueleto y el agua de la superficie de la sílice, no son muy fuertes, de modo que dicha agua puede ser removida por diferentes eluentes. Esto conduce a modificaciones en la naturaleza de la superficie de sílice, y por lo tanto, en la polaridad del material<sup>26</sup>.

Por otro lado, los silanoles de la superficie de sílice pueden ser modificados químicamente, generando materiales de polaridades diferentes. Existen numerosas reacciones empleadas para crear fases sólidas con esqueletos de sílice. Una de estas reacciones utiliza un organosilano reactivo, tal como se indica en la Figura 5.

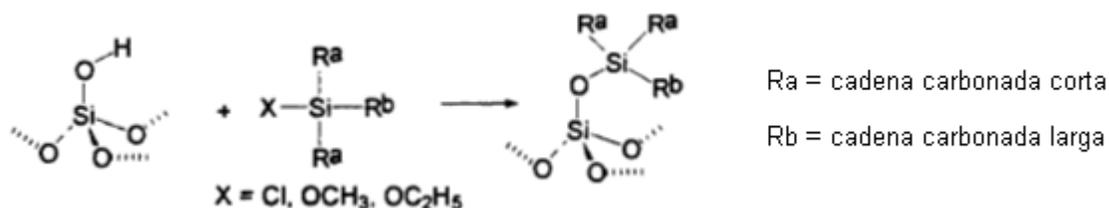


Figura 5. Reacción de un grupo silanol con un organosilano.

De este modo, variando los grupos del organosilano se pueden obtener un gran número de adsorbentes. Muchas reacciones son utilizadas para reemplazar los grupos OH activos de la superficie de sílice. Algunas estructuras de los materiales obtenidos usando sílice como base, se indican en la Figura 6.

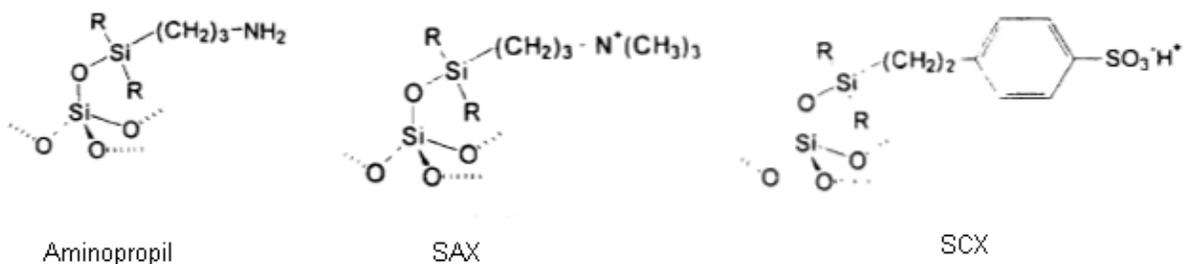


Figura 6. Algunos materiales obtenidos usando base de sílice.

Dependiendo del proceso de derivatización, los grupos R pueden ser  $\text{CH}_3$ ,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ , o para materiales obtenidos usando silanos con tres grupos reactivos (p. ej. triclorosilanos), R puede ser el oxígeno unido a otro átomo de Si de la base de sílice<sup>26</sup>.

Por otro lado, la alúmina, florisil ( $\text{MgSiO}_3$ ), celulosa y el carbón grafitado, también son materiales usados como adsorbentes. La alúmina ha sido utilizada por mucho tiempo

como fase estacionaria, de la cual pueden obtenerse diferentes estados de hidratación y caracteres básicos o ácidos, dependiendo del tratamiento del material. También se han usado óxidos de magnesio y zirconio como sorbentes para ciertas separaciones<sup>26</sup>.

Otro tipo de material frecuentemente utilizado como material base, es el poliestirenodivinilbenceno (SDVB o PS-DVB). Las unidades de divinilbenceno que tienen dos grupos reactivos, determinan el grado de entrecruzamiento en el copolímero, el cual influye en las propiedades del material. Cantidades alrededor de 8 y 12 % de DVB en estireno, son comunes en productos comerciales. Otras sustancias de entrecruzamiento pueden emplearse aparte del DVB, como el etilendimetacrilato. También, se pueden llevar a cabo derivatizaciones que generen otros materiales. Así pues, la sulfonación del SDVB produce un intercambiador catiónico fuerte. La clorometilación del SDVB, seguida de la reacción con una amina terciaria, genera un intercambiador aniónico (Figura 7).



Figura 7. Estructura del SDVB y algunos de sus derivados.

Los materiales utilizados como fases sólidas deben estar libres de impurezas, que provengan del proceso de derivatización; han de tener ciertas especificaciones (tamaño de partícula, porosidad, área de superficie, etc.), y deben tener una homogeneidad adecuada. La selección de un adsorbente entre diferentes fabricantes, debe basarse en este tipo de criterios<sup>26</sup>.

El presente trabajo se enfoca en el uso de fases con grupos aminos (aminopropil), ampliamente usadas para el tratamiento de muestras de ácido fítico. Este adsorbente polar puede interactuar a través de enlaces de hidrógeno, y por sus propiedades de intercambiador aniónico. En vista de que el pKa del adsorbente  $\text{NH}_2$  es alrededor de 9,8; a cualquier pH por debajo de este valor, la mayoría de los grupos funcionales están cargados positivamente. El  $\text{NH}_2$  es un intercambiador aniónico más débil que sorbentes como la SAX (Véase Figura 6), donde la amina cuaternaria de la fase sólida está siempre cargada. Esto lo hace un adsorbente más eficiente para la retención de aniones fuertes tales como los ácidos sulfónicos, los cuales pueden ser retenidos irreversiblemente en una fase SAX. Debido a que el grupo propil está conectado a la funcionalidad del  $\text{NH}_2$ , esta fase también puede ser usada para aislar compuestos no polares de muestras polares. Así como la sílice, los adsorbentes  $\text{NH}_2$  son útiles para la separación de isómeros estructurales. La sílice aminopropil puede utilizarse para matrices acuosas, especialmente cuando el volumen de la muestra es pequeño. También, este adsorbente se emplea comúnmente para la purificación de muestras biológicas<sup>26</sup>.

#### *Dispositivos utilizados en la SPE.*

Los materiales usados como adsorbentes en SPE son contenidos en columnas, cartuchos o discos. La configuración más popular para un dispositivo de SPE es el cartucho, el cual tiene un formato tipo jeringa, tal como se ilustra en la Figura 8.

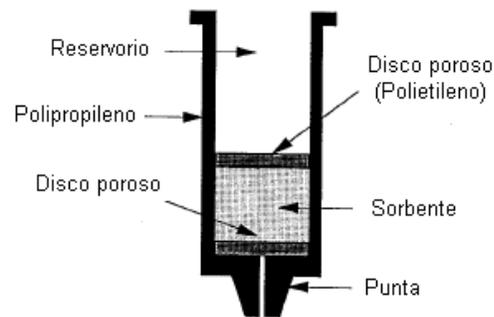


Figura 8. Cartucho típico tipo jeringa.

El material usado para el reservorio es generalmente polipropileno, aunque también se usan otros materiales, inclusive vidrio.

Por otro lado, los discos son dispositivos que se parecen a los filtros de membranas en cuanto a su apariencia; son planos de 1 mm de espesor y tienen diámetros alrededor de 4 cm. Éstos combinan las ventajas de las membranas con la extracción. En comparación con los cartuchos, estos dispositivos permiten mayores velocidades de flujo<sup>28</sup>. El diseño de columnas, cartuchos y discos, puede variar de modo que se ajusten a los requerimientos, con respecto al volumen de muestra, sistemas de introducción de disolvente (jeringas) o automatización.

La retención y elución en la SPE, puede ser vista como un proceso de distribución entre una fase móvil y una fase estacionaria, similar a la separación por HPLC, pero llevada a cabo en una columna más corta; con un número pequeño de platos teóricos, pero que involucra compuestos con grandes diferencias en sus coeficientes de distribución (K). Los adsorbentes utilizados en SPE tienen diámetros de partículas comprendidos entre 60 y 100  $\mu\text{m}$ , mientras que, para las columnas de HPLC se emplean diámetros de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Esto representa una gran diferencia en la presión utilizada para pasar los fluidos a través del dispositivo en cuestión. El número de platos teóricos de una columna analítica de HPLC es aproximadamente 10.000, mientras que, para una columna de

SPE, son alrededor de 70. En HPLC es posible separar compuestos con un  $\alpha$  tan bajo como 1,05. Esto no es factible para la SPE. Por estas razones, la SPE es vista como una técnica diferente, donde la separación no se basa en una elución gradual de los analitos a lo largo de la columna; sino que, se basa en la retención completa del compuesto de interés, para luego eluir el mismo rápidamente, empleando un cambio de solvente<sup>26</sup>.

#### *SPE vs. Extracción líquido-líquido.*

La SPE tiene varias ventajas sobre el uso de extracción líquido-líquido. La SPE conduce a una recuperación más completa del analito, permite una separación más eficiente de las interferencias del analito, reduce el consumo de solventes orgánicos y permite que la recolección total de la fracción del analito sea más fácil. Además, involucra procedimientos manuales más convenientes, remueve el material particulado y, por último, su automatización resulta más sencilla. En vista de que la SPE es un proceso de separación más eficiente, resulta más fácil obtener grandes porcentajes de recuperación. Los procedimientos líquido-líquido, que requieren numerosas extracciones sucesivas para recuperar un 99 % del analito, a menudo pueden reemplazarse por métodos de SPE de un solo paso. Sin embargo, los dispositivos de fase sólida utilizados en estos métodos, pueden variar de un lote a otro, por lo cual, la reproducibilidad en los métodos de SPE puede resultar un problema en algunos casos. Además, puede existir adsorción irreversible para el caso de algunos analitos sobre los cartuchos de extracción<sup>28</sup>.

En la presente investigación, las muestras tratadas por extracción en fase sólida serán analizadas por espectrometría de absorción molecular UV-visible. Se desea emplear esta técnica, por su mayor sensibilidad al compararse con el sistema de detección por índice de refracción, usado por Lehrfeld<sup>23</sup>. Para estudiar la eficiencia del proceso de extracción se determinarán porcentajes de recuperación del procedimiento.

### 3. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VISIBLE.

Constituye una técnica analítica, basada en la absorción de la radiación electromagnética por parte de un analito. En este caso, se trabaja con la región del espectro electromagnético correspondiente a las longitudes de onda del UV-visible. Cuando la radiación atraviesa una capa de un sólido, líquido o gas; que contiene al analito, ciertas frecuencias se eliminan selectivamente por absorción, transfiriendo la energía electromagnética a los átomos o moléculas involucradas. La absorción provoca que estas partículas pasen de su estado normal a temperatura ambiente, o estado fundamental, a uno o más estados excitados de energía superior. El estudio de las frecuencias absorbidas permite caracterizar el analito de interés, ya que, los espectros obtenidos a partir de dichas frecuencias, son particulares para cada especie<sup>29</sup>.

La espectrometría de absorción implica la medida de la fracción de radiación, de una longitud de onda dada, que pasa a través de una muestra. Para este fin, se utilizan equipos con una geometría similar a la esquematizada en la Figura 9.

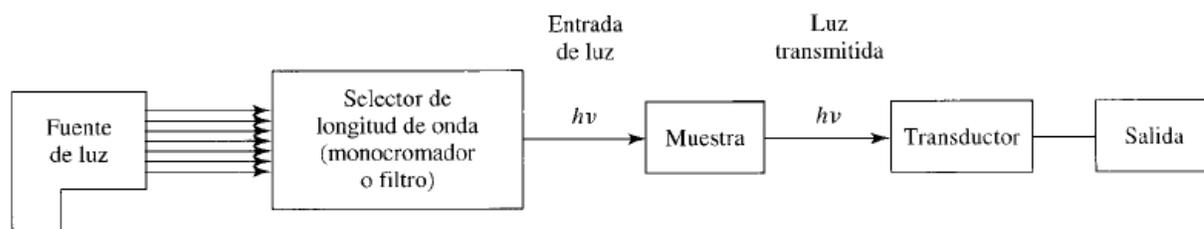


Figura 9. Diseño de un equipo experimental para medir absorbancia o transmitancia, a una única longitud de onda.

La muestra no emite radiación por sí misma, por lo que se debe incluir una fuente de radiación. La mayoría de las fuentes producen radiación con longitudes de onda no deseadas además de la requerida. Así pues, el paso de la radiación a través de un monocromador o filtro, selecciona la longitud de onda deseada. La figura muestra el

selector de longitud de onda entre la fuente y la muestra. Sin embargo, en otros diseños, se colocan monocromadores en el lado opuesto de la muestra, es decir, entre la muestra y el transductor.

Para los análisis, se hacen dos medidas de la cantidad de radiación absorbida. En la primera, se mide la cantidad de radiación (a la longitud de onda elegida) que llega al transductor, cuando se coloca un blanco. Este parámetro se denomina intensidad  $P_0$  del blanco, y corresponde a una concentración igual a cero de analito. La medida final se obtiene comparando la señal de las muestras o los patrones de calibración, con la del blanco. Se denomina  $P$  a la intensidad que se mide con las muestras o con el estándar. La comparación que se hace implica la relación  $P/P_0$ , midiendo ambas intensidades a las mismas condiciones instrumentales. La relación  $P/P_0$  se denomina *transmitancia* (Véase ecuación 1). Este parámetro puede expresarse en porcentaje.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (\text{ec. 1})$$

El logaritmo negativo de  $T$  se conoce como la *absorbancia* (Ecuación 2).

$$A = -\log \frac{P}{P_0} = -\log T \quad (\text{ec. 2})$$

La absorbancia de una muestra es proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe la radiación incidente, tal como se indica en la ecuación 3. Dicha relación corresponde a la *ley de Lambert-Beer*. El término  $\epsilon$  se denomina coeficiente de absorptividad molar, y es una constante propia de la sustancia que se analiza, la cual depende de la longitud de onda con la cual se trabaje. Las unidades de esta constante son  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . La longitud de paso óptico, a través del cual la radiación viaja por la muestra, está denotada por  $b$ , y se expresa en centímetros. La concentración  $C$  de la muestra se expresa, en este caso, en molaridad<sup>30</sup>.

$$A = \epsilon b C \quad (\text{ec. 3})$$

Se han encontrado desviaciones de la proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración. En algunas ocasiones, estas desviaciones están relacionadas con el fundamento de la ley, de modo que representan limitaciones propias de la misma. Otras veces, surgen como consecuencia de la forma en la cual se realizan las medidas de absorbancia, o como resultado de cambios químicos asociados con cambios de concentración. Las dos últimas, son conocidas como desviaciones instrumentales y desviaciones químicas, respectivamente.

La ley de Beer describe el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas; en este sentido, es una ley límite. A concentraciones altas, la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción, disminuye hasta el punto en que cada molécula modifica la distribución de carga de las moléculas vecinas. Esto altera la capacidad de las moléculas de absorber radiación. Este efecto puede ser considerable para medios que contienen bajas concentraciones de analito, pero que tienen altas concentraciones de electrolitos. Por otro lado, las desviaciones químicas surgen cuando el analito se disocia, se asocia o reacciona de alguna manera con el medio, afectando la concentración de la especie de interés. Las desviaciones instrumentales aparecen cuando existe la presencia de radiación policromática o parásita, durante la medición.

### *Instrumentación.*

Los instrumentos utilizados para esta técnica se denominan espectrofotómetros y, tal como se mencionó anteriormente, constan – básicamente – de la fuente de radiación, selector de longitud de onda, un recipiente para contener la muestra y el sistema de detección. Las fuentes proporcionan la radiación que va a ser absorbida por la especie y, para este caso, son continuas, de manera que emiten radiación con una potencia constante, en un amplio rango de longitudes de onda. Se pueden enumerar algunas fuentes de uso común, como lo son: las lámparas de deuterio e hidrógeno, de filamento

de wolframio y las lámparas de arco de xenón. En el caso de los recipientes para la muestra, se usan cubetas o celdas pequeñas (generalmente de 1 cm de ancho) fabricadas de un material que deje pasar la radiación sin absorber la misma, tal como: el cuarzo, sílice fundida o el plástico.

Por otro lado, los selectores de longitud de onda más empleados son los monocromadores, bien sea de prisma o de red, los cuales permiten aislar una longitud de onda de trabajo. La Figura 10 muestra los elementos ópticos que hay en todos los monocromadores, que son: una rendija de entrada, que proporciona una imagen óptica rectangular; espejos o lentes colimadoras, un prisma o una red, que dispersan la radiación en sus longitudes de onda individuales; algún elemento focalizador y una rendija de salida, que permite aislar la banda espectral deseada.

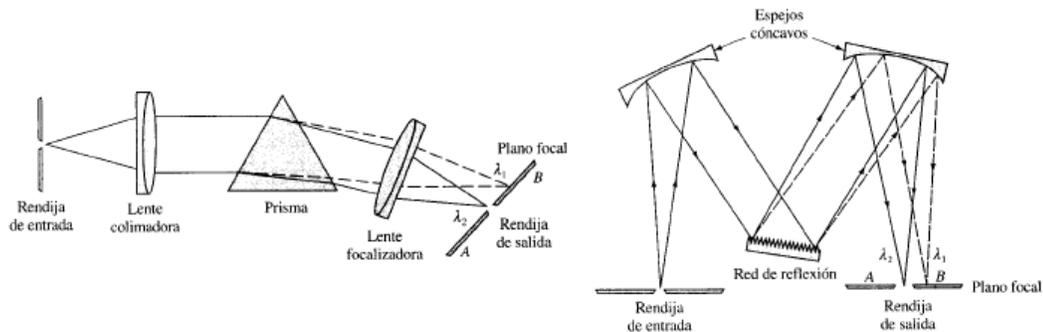


Figura 10. Monocromadores de prisma y de red.

Actualmente, casi todos los monocromadores comerciales llevan redes de reflexión, porque son más baratas de fabricar y proporcionan mejor separación de las longitudes de onda, para un mismo tamaño del elemento dispersante.

Por último, los detectores utilizados transforman la radiación en una señal eléctrica que pueda ser digitalizada. Éstos se basan en el efecto fotoeléctrico y, por ello, son fabricados de materiales fotosensibles, que emiten electrones al ser irradiados con un

haz. Entre ellos, podemos encontrar: celdas voltaicas, fototubos de vacío, fotomultiplicadores y diodos de silicio.

### *Aplicaciones.*

Las medidas de absorción de radiación UV-visible, tienen una gran aplicación en la identificación y determinación de una enorme cantidad de especies orgánicas e inorgánicas. Las aplicaciones cualitativas de esta técnica son limitadas, ya que, una identificación inequívoca es a menudo imposible. Esto se debe a que los espectros de banda obtenidos, si bien poseen cierta especificidad, tienen anchos de banda considerables que comprometen dicha característica. Sin embargo, la espectrometría de absorción molecular resulta muy útil en los análisis cuantitativos. Numerosas especies, tanto absorbentes como no absorbentes de radiación, pueden determinarse usando métodos espectrofotométricos. Las especies absorbentes en la región del espectro visible, son moléculas cromóforas o especies inorgánicas particulares. Aquellas especies no absorbentes por sí solas, se hacen reaccionar para formar especies que sí absorban radiación en la región visible. Las reacciones de formación de complejos coloreados, son las más comunes para este tipo de técnica.

El procedimiento a seguir para desarrollar este método, comienza con la formación del complejo coloreado a partir del analito y otros reactivos específicos. La información relacionada con las instrucciones necesarias para llevar a cabo la reacción, se obtiene a partir de la literatura. Inicialmente, la reacción de formación del complejo se lleva a cabo usando un estándar del analito que se va a determinar. De esta forma, se verifica que la reacción transcurre adecuadamente, y que los reactivos usados para la misma están en óptimas condiciones.

Las medidas de absorbancia se hacen, normalmente, a una longitud de onda correspondiente a un pico de absorción, para obtener la máxima sensibilidad. Por ello,

una vez formado el complejo, se realiza un barrido de la absorbancia en función de la longitud de onda, para determinar aquella con la cual se va a trabajar.

Después de decidir las condiciones para el análisis, es necesario preparar una curva de calibración que relacione la absorbancia con la concentración. Para esto, se mide la señal de una serie de patrones preparados a partir de un estándar del analito. Luego, la concentración de la muestra es determinada a partir de dicha curva. Lo ideal, es que los patrones de calibración tengan una composición parecida a la de las muestras a analizar, no sólo en cuanto a la concentración del analito, sino también con respecto a la concentración de las otras especies presentes en la matriz de la muestra<sup>29</sup>.

Inicialmente, el presente estudio involucró la transformación del IP6 en fosfato, el cual puede cuantificarse por fotolorimetría. Existen dos métodos comunes para la determinación de fosfato: el método del complejo azul de molibdeno y el complejo de fosfovanadomolibdato.

### **3. 1. COMPLEJO AZUL DE MOLIBDENO.**

El método de determinación de fosfato, empleando el complejo denominado azul de molibdeno, consiste en añadir molibdato de amonio a una disolución ácida de fosfato. El fosfomolibdato de amonio formado, es posteriormente reducido a un estado de oxidación menor, obteniéndose un complejo coloreado azul, el cual se señala que tiene la composición  $(\text{MoO}_2 \cdot 4\text{MoO}_3)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ <sup>31</sup>.

La intensidad del color de una disolución de azul de molibdeno depende de: el pH, la relación ácido/molibdato, la cantidad de molibdato y la presencia de otros iones. El tiempo que tarda en desarrollarse el color del complejo, depende de la temperatura y del pH de la disolución. Este último parámetro puede ajustarse adicionando algún ácido

o base, o utilizando buffers. El color del complejo puede verse como un azul intenso o un azul verdoso, de manera que la longitud de onda de trabajo depende del color que se obtenga experimentalmente. Dicho color depende de la forma en la cual el complejo es preparado, esto es, de los reactivos que se usen para la formación del mismo.

Hasta ahora, muchos agentes reductores han sido utilizados para la formación del complejo. Se han empleado azúcares tales como: glucosa, maltosa, lactosa o galactosa; para reducir disoluciones de molibdato de amonio en  $H_2SO_4$ , en presencia de fosfato. También se ha utilizado tiosulfato de sodio, zinc, oxalato de amonio, sulfato de hidracina, ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, ácido ascórbico, 8-hidroxiquinolina, hidroquinona, entre muchos otros. Prácticamente cada reductor debe considerarse como un problema separado, ya que, cada uno requiere condiciones de trabajo diferentes. El agente reductor más utilizado es el cloruro estannoso. En este caso, la disolución ácida de fosfato/molibdato puede prepararse con HCl o  $H_2SO_4$ . El cloruro estannoso, aún en HCl concentrado, tiende a perder su poder reductor. Como consecuencia de lo anterior, pueden obtenerse disoluciones verdosas del complejo. Entonces, el reactivo puede mantenerse bajo algún gas inerte para prevenir la oxidación, pero es siempre preferible preparar el reactivo fresco<sup>32</sup>.

### **3. 2. COMPLEJO DE FOSFOVANADOMOLIBDATO.**

Cuando un exceso de una disolución de molibdato, es añadido a una disolución ácida de algún vanadato en presencia de ortofosfato, se obtiene una coloración amarilla, como resultado de la formación de lo que se cree es ácido vanadomolibfosfórico. La fórmula  $(NH_4)_3PO_4 \cdot NH_4VO_3 \cdot 16MoO_3$ , ha sido sugerida tentativamente para este complejo, aunque la composición exacta es incierta. El color del complejo vanadomolibfosfórico es más estable que el del complejo azul de molibdeno. Además,

la determinación por medio de este método es generalmente aplicado a un rango más amplio de concentraciones.

El tiempo que tarda en desarrollarse el color varía de 5 minutos a 30 minutos. En algunos casos, se puede calentar la disolución para acelerar la aparición total del color, pero esto puede hacerse sólo si silicatos y arsenatos están ausentes. La selección de la longitud de onda a la cual se hace la determinación de fósforo, resulta importante. La lecturas pueden hacerse a 430, 450 y 470 nm<sup>32</sup>. Otras referencias proponen trabajar a 400 nm<sup>33</sup>. El nitrato de cobre presenta una ligera absorción a 420 nm, por lo cual debe considerarse al trabajar a esta longitud de onda. El hierro interfiere levemente, lo cual puede corregirse realizando un blanco con todos los reactivos excepto el molibdato. La plata puede crear turbidez, y los iones cérico y estánnico precipitan. Otros iones reducen el complejo y lo transforman en azul de molibdeno<sup>32</sup>.

Los complejos descritos resultan muy útiles, puesto que no existe ninguna reacción directa sobre el ácido fítico, que genere una especie coloreada que pueda ser empleada para su análisis fotocolorimétrico. Sin embargo, se conoce un método fotocolorimétrico indirecto que permite cuantificar el ácido fítico, sin necesidad de llevar a cabo la digestión del mismo.

### **3. 3. MÉTODO FOTOCOLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO, BASADO EN LA UTILIZACIÓN DEL REACTIVO DE WADE.**

En 1980, M. Latta y M. Eskin<sup>34</sup> presentaron un procedimiento sencillo para cuantificar ácido fítico, basado en la reacción que ocurre entre el cloruro férrico y el ácido sulfosalicílico. Dichos reactivos fueron usados por Wade y Morgan<sup>35</sup>, para detectar ésteres fosfatos separados por cromatografía en papel.

Latta y Eskin prepararon una serie de patrones, que contuvieron entre 5 y 40 mg/L de ácido fítico en agua destilada. Se añadieron en tubos de centrifuga alícuotas de 3 mL de los patrones, seguidas de 3 mL de agua destilada. A cada tubo de centrifuga, se agregó 1 mL del Reactivo de Wade modificado (0,03 % de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0,3 % de ácido sulfosalicílico en agua destilada), y se mezcló en un vortex por 5 s. La mezcla se centrifugó por 10 min, y el sobrenadante se midió en un espectrofotómetro a 500 nm. Utilizando el método de medida anterior, cuantificaron el ácido fítico de una serie de cereales, legumbres y semillas, las cuales fueron tratadas previamente. Los resultados obtenidos en este método, fueron comparados con aquellos obtenidos al aplicar el método de digestión ácida del IP6, propuesto por Harland y Oberleas<sup>17</sup>.

La reacción entre el  $\text{FeCl}_3$  y el ácido sulfosalicílico produce una disolución de color rosado. En presencia de ácido fítico, el hierro se enlaza al éster fosfato haciéndose incapaz de reaccionar con el ácido sulfosalicílico, de modo que se produce un decaimiento de la intensidad del color. Dicha disminución del color es proporcional a la concentración de ácido fítico. La curva de calibración se construyó graficando el decaimiento en la absorbancia, obteniéndose un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) igual a 1. Al comparar los resultados obtenidos por el método propuesto y el de digestión, se encontró que no existen diferencias significativas entre ambos procedimientos. Se demostró entonces, que el método del Reactivo de Wade tiene varias ventajas sobre el método de digestión, con respecto a la simplicidad y rapidez del procedimiento. Concluyeron que el método de digestión consume mucho tiempo, y es bastante impráctico para monitorear los niveles de IP6 de muchas muestras. De este modo, este trabajo estableció el método del Reactivo de Wade, como un procedimiento rápido y efectivo para la determinación de ácido fítico.

#### **4. OBJETIVOS.**

Los conceptos detallados en los apartados anteriores, relacionados con las observaciones y conclusiones expuestas en los trabajos referenciados; conllevan a estudiar el efecto de la concentración de los metales, presentes en los cereales infantiles fortificados, sobre el paso de extracción en fase sólida. Se trabajará con muestras sintéticas de IP6 que serán tratadas con SPE, y se analizarán luego por fotolorimetría. La utilización de muestras sintéticas permitirá observar el efecto de los metales de forma aislada, evitando otros efectos posibles asociados a la matriz de las muestras reales. De esta manera, los resultados obtenidos se atribuirán únicamente a la presencia de dichos metales.

##### **4. 1. GENERAL.**

Estudiar el efecto de la concentración de metales, existentes en la matriz de los cereales infantiles; como posible causa de los bajos porcentajes de recuperación de ácido fólico, durante el paso de extracción en fase sólida.

## 4. 2. ESPECÍFICOS.

- ✓ Estudiar y determinar los porcentajes de recuperación para la etapa de preconcentración y purificación, que se realiza en la extracción en fase sólida (columna de intercambio aniónico); empleando muestras sintéticas de ácido fítico a diferentes concentraciones.
  
- ✓ Estudiar y determinar los porcentajes de recuperación en la etapa de preconcentración y purificación, que se realiza en la extracción en fase sólida, empleando muestras sintéticas de ácido fítico en presencia de cantidades fijas de los metales comunes en cereales infantiles.
  
- ✓ Comparar los resultados obtenidos para ambos tipos de muestras, esto es, para aquellas que contienen sólo ácido fítico y para las que contienen metales en adición al ácido.
  
- ✓ Considerar posibles soluciones al problema de la baja recuperación del analito durante la extracción y aplicar las mismas al análisis de las muestras de cereales infantiles por el método HPLC-RI.

## **5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

Esta sección contiene información relativa a los reactivos, equipos y metodologías empleadas. Cabe destacar que durante la realización del presente trabajo, se ejecutaron una gran cantidad de experiencias, sin embargo, con la finalidad de no perder de vista el objetivo principal, solo se reseñaron aquellas que suministraron información que se consideró significativa.

En cuanto a las metodologías empleadas, en una primera etapa se describen las experiencias llevadas a cabo, para seleccionar el método espectrofotométrico más práctico en la cuantificación del ácido fítico (IP6). Originalmente, se propuso una digestión ácida para la transformación del IP6 en ortofosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ), y posteriormente medirlo por la formación de un complejo coloreado. Asimismo, se planteó el uso de otro método en el cual la etapa de digestión no fuese necesaria, como es el basado en el Reactivo de Wade. De todos ellos, se analizaron sus ventajas y desventajas.

Una vez seleccionado el método más adecuado para cuantificar el IP6, se procedió a ensamblar el montaje de extracción en fase sólida. Seguidamente, se evaluó el sistema combinado de extracción y medida UV-Visible, tratando de eliminar o al menos minimizar, los efectos de matriz producidos en la etapa de medida, motivado a ciertos reactivos involucrados en el proceso de extracción.

Finalmente, ya establecido el procedimiento global, se procedió a observar las interferencias del calcio y el hierro en la etapa de extracción. Para ello, se prepararon muestras sintéticas, compuestas por ácido fítico con y sin metales, en composiciones similares a las contenidas en cereales comerciales. Se determinaron los porcentajes de recuperación para su posterior comparación, y también, inferir sobre las posibles dificultades de los análisis de IP6, en cereales con altos contenidos de dichos minerales.

## 5. 1. MATERIALES EMPLEADOS.

### 5. 1. 1. REACTIVOS.

Los reactivos utilizados en el presente trabajo, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos empleados y sus características.

<i>Nombre</i>	<i>Fórmula química</i>	<i>Marca</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Peso molecular (g/mol)</i>
Dihidrógenofosfato de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Riedel-de Haën	99	136,09
Molibdato de amonio tetrahidratado	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haën	99	1235,86
Cloruro estannoso dihidratado	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haën	98	225,63
Metavanadato de amonio	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	Hopkin&Williams	100	116,99
Cloruro férrico hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck	99	270,30
Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	99	254,22
Sal dipotásica de ácido fítico	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{K}_2\text{O}_{24}\text{P}_6$	Sigma-Aldrich	95	736,20
Amonio e hierro (II) sulfato-6-hidrato (sal de Mohr)	$(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haën	99	392,14
Carbonato de calcio	$\text{CaCO}_3$	Riedel-de Haën	98,5-100,5	100,09
Ácido clorhídrico	$\text{HCl}$	Riedel-de Haën	37	36,46
Ácido sulfúrico	$\text{H}_2\text{SO}_4$	Riedel-de Haën	95-97	98,08
Ácido nítrico	$\text{HNO}_3$	Merck	65	63,01
Hidróxido de amonio	$\text{NH}_4\text{OH}$	Riedel-de Haën	25	35,04

### 5. 1. 2. EQUIPOS.

#### ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE.

Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible de longitud de onda variable, de la casa comercial Thermo Electron Corporation, modelo Genesys 10uv (Figura 11).

Las características del espectrofotómetro se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Características del espectrofotómetro Genesys 10uv.

<i>Fuente</i>	Lámpara de xenón
<i>Diseño óptico</i>	Haz dividido
<i>Detección</i>	Detectores duales de estado sólido
<i>Ancho de banda espectral</i>	5 mm

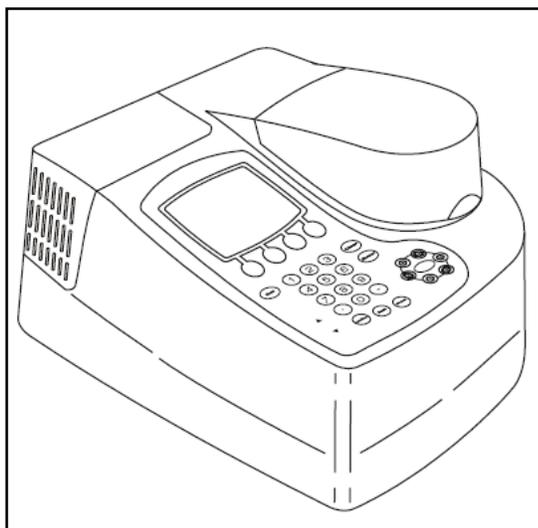


Figura 11. Espectrofotómetro Genesys 10uv.

## ROTAEVAPORADOR.

Para la eliminación de los disolventes, se empleó un rotaevaporador marca Buchi, modelo R-1100 (Figura 12). Acoplado a éste, se adaptó un criostato para refrigerar el condensador y una bomba de vacío, para ayudar a la evaporación de los disolventes.



Figura 12. Rotaevaporador.

## ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMAS.

Se utilizó un espectrofotómetro de haz sencillo fabricado por la GBC, Scientific Equipment PTY LTD, modelo Avanta, que posee un fotomultiplicador como detector. Dicho instrumento se ilustra en la Figura 13.



Figura 13. Espectrofotómetro de absorción atómica de llamas.

#### CARTUCHO DE EXTRACCIÓN Y FILTRO.

Se utilizaron cartuchos de intercambio aniónico, del tipo amino, modelo clásico tipo Sep-Pak®, de Waters (Figura 14). El cartucho está fabricado a base de sílice, con una fase polar de carácter básico (aminopropil) unida químicamente. Puede emplearse como adsorbente polar, con diferente selectividad para los analitos básicos y ácidos; o como un intercambiador aniónico débil, en medio acuoso. Posee un tamaño de partícula de 55 a 105  $\mu\text{m}$  y opera en un rango de pH entre 2 y 8.



Figura 14. Cartucho clásico Sep-Pak® NH<sub>2</sub>.

Se emplearon filtros de jeringa con membranas de nylon (diámetro de 25 mm y tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ), de Millipore.

## 5. 2. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE MEDIDA DEL ÁCIDO FÍTICO.

### 5. 2. 1. MÉTODO FOTOCOLORIMÉTRICO DEL COMPLEJO AZUL DE MOLIBDENO.

El primer método propuesto para la determinación del IP6, fue su transformación previa por digestión ácida a  $\text{PO}_4^{-3}$  y su posterior medida espectrofotométrica, con la formación del complejo azul de molibdeno.

#### ***Formación del complejo azul de molibdeno.***

La primera etapa para el estudio de la formación del complejo, se realizó con un estándar de ortofosfato en vez de IP6. Establecidas las condiciones óptimas de medida, se procedió a realizar los mismos ensayos con un estándar de IP6, que previamente había sido sometido al tratamiento ácido para su transformación a ortofosfato. Para ello, se prepararon las siguientes disoluciones:

#### *✓ Disolución estándar de fósforo.*

Para preparar esta disolución, se pesó  $(0,0910 \pm 0,0002)$  g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 99 % de pureza, y se enrasó con agua destilada en un balón aforado de  $(200,0 \pm 0,1)$  mL. La concentración final fue de  $(102,5 \pm 0,1)$  mg/L expresada como P.

#### *✓ Disolución de molibdato de amonio.*

Se pesó 4 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y se disolvió en 40 mL de agua destilada en caliente. Se dejó enfriar la disolución, y se le añadió 30 mL de HCl concentrado. Finalmente, se llevó a 100 mL con agua destilada.

✓ *Disolución de cloruro estannoso.*

Se preparó una disolución concentrada de  $\text{SnCl}_2$ , tras disolver 5 g de la sal en 12,5 mL de HCl concentrado. El sólido no se disuelve completamente en el ácido, obteniéndose una suspensión que se almacenó en un frasco ámbar tapado. Dicha disolución debe prepararse frecuentemente. Posteriormente, se tomó 1 mL de la suspensión anterior y se llevó a 100 mL con agua destilada. Esta última es muy inestable, por lo cual, se debe preparar fresca al momento de ser utilizada.

✓ *Disolución del complejo azul de molibdeno.*

Una vez preparadas las disoluciones anteriores, se tomó una alícuota de  $(1,00 \pm 0,01)$  mL del estándar de P, y se diluyó con agua destilada hasta la mitad, en un balón aforado de  $(100,00 \pm 0,08)$  mL. Luego, se añadió 10 mL de la disolución de molibdato de amonio, seguidos por 1 mL de la disolución de  $\text{SnCl}_2$  y se enrasó con agua destilada. El patrón obtenido fue una disolución de un color azul intenso, con una concentración de  $(1,02 \pm 0,01)$  mg/L como P.

***Selección de la longitud de onda de trabajo.***

Con el patrón de  $(1,02 \pm 0,01)$  mg/L se buscó la longitud de onda de trabajo, para lo cual, se realizó un barrido desde los 500 a los 900 nm, midiendo las respectivas absorbancias. El espectro de absorción obtenido se muestra en la Figura 15.

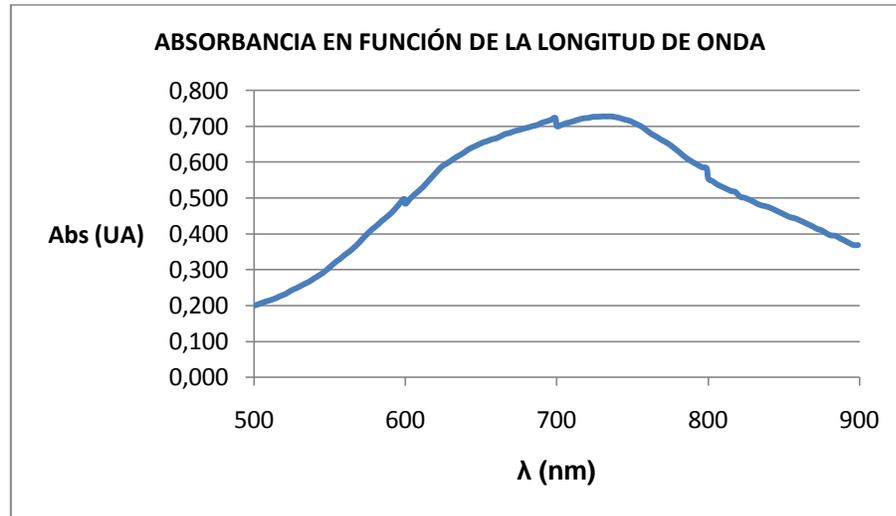


Figura 15. Gráfico de la absorbancia en función de la longitud de onda, del complejo azul de molibdeno.

Cabe destacar que, el espectrofotómetro empleado sólo puede realizar barridos a intervalos de 100 nm; de tal manera que se midió la absorbancia para los siguientes rangos de longitudes de onda: (500-599) nm, (600-699) nm, (700-799) nm y (800-899) nm. En este equipo, cada cambio en el rango de  $\lambda$ , precisó nuevamente del establecimiento de la línea base, por lo cual, el espectro en la Figura 15 presenta ligeros ruidos a 600, 700 y 800 nm.

El espectro de absorción presentó un máximo de absorbancia en el rango comprendido entre los 724 y los 733 nm. La longitud de onda de trabajo seleccionada fue la central, correspondiente a 727 nm (hay que denotar que el equipo posee un ancho de banda relativamente amplio de 5 nm).

### ***Cinética en la estabilidad del complejo azul de molibdeno.***

Se ha reportado en la literatura<sup>32</sup>, que el complejo azul de molibdeno tiende a degradarse, lo que implica cierta estabilidad temporal; razón por la cual, se decidió estudiar la absorbancia en función del tiempo de un patrón recién preparado del complejo. La gráfica obtenida se muestra en la Figura 16.

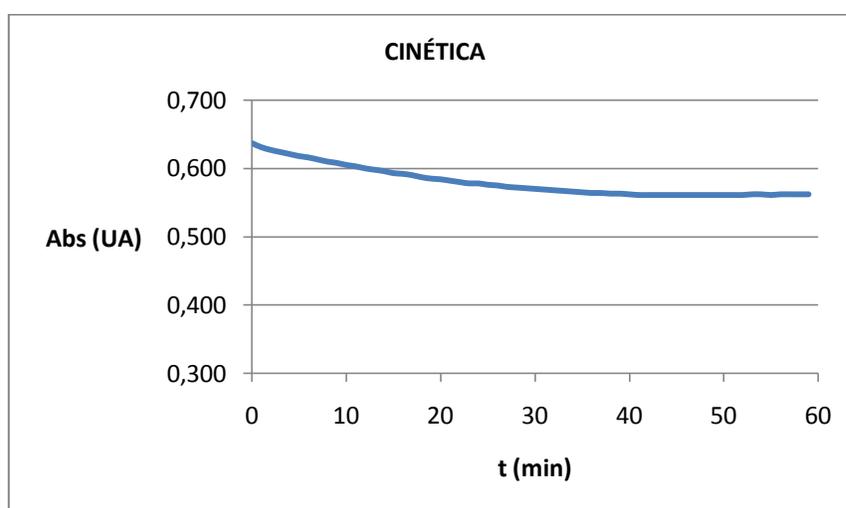


Figura 16. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo, del complejo azul de molibdeno.

La caída de la absorbancia al transcurrir el tiempo, indica una ligera degradación del complejo hasta 40 minutos, tal como se observa en la Figura 16. Dicha caída resulta mayor en los primeros 14 minutos, y luego se hace menor hasta los 40 minutos. El tiempo elegido para medir fue a los 14 minutos, lapso relativamente breve para evitar tiempos de análisis muy prolongados.

### **Curva de calibración.**

Siguiendo el procedimiento ya descrito, se prepararon 6 patrones del complejo y su correspondiente blanco. Las concentraciones de los mismos y sus respectivas señales de absorbancia, medidas a los 14 minutos, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones y señales de Abs de los patrones.

<i>Patrón</i>	<i>C (mg/L P)</i>	<i>Abs (UA)</i>
Blanco	0,000	0,021
1	0,126	0,073
2	0,252	0,114
3	0,379	0,179
4	0,504	0,277
5	1,004	0,524
6	1,506	0,715

La curva de calibración, obtenida al graficar la absorbancia de los patrones en función de la concentración de los mismos, se observa en la Figura 17.

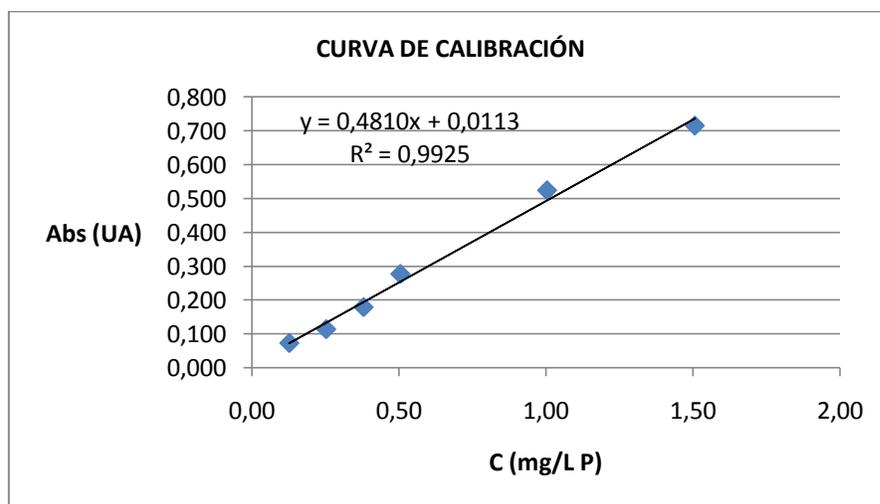


Figura 17. Curva de calibración del complejo azul de molibdeno ( $y = 0,4810x + 0,0113$ ;  $R^2 = 0,9925$ ).

Cabe destacar, que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) obtenido no está dentro de lo esperado normalmente para este tipo de técnica, por lo tanto, los patrones fueron preparados varias veces y se rehicieron las curvas de calibración; presentándose la misma irregularidad. Esto puede atribuirse, a las posibles fluctuaciones de las absorbancias debido a la degradación del complejo, a pesar de medir a los 14 minutos establecidos. Sin embargo, a pesar de esta dificultad, se decidió continuar con la digestión del ácido fítico.

***Evaluación de la digestión del ácido fítico, empleando el complejo azul de molibdeno para la posterior cuantificación del fosfato liberado.***

Para este estudio, se preparó una disolución estándar de ácido fítico, correspondiente a  $(200,3 \pm 0,2)$  mg/L como IP6. Para llevar a cabo la digestión, se mezcló en un beaker: una alícuota de  $(1,00 \pm 0,01)$  mL de la disolución estándar de IP6; 0,5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, 3 mL de  $HNO_3$  concentrado y 15 mL de agua destilada. La mezcla se calentó a ebullición durante 30 minutos y para evitar la evaporación completa del líquido, se añadió agua destilada constantemente. Luego, el producto de la digestión se trasvasó cuantitativamente a un balón aforado de  $(50,00 \pm 0,05)$  mL; se diluyó hasta la mitad de dicho volumen, y se añadieron los reactivos necesarios para la formación del complejo. Al enrasar, y asumiendo la conversión completa de todo el IP6 en ortofosfato, se esperaba obtener una disolución de  $(1,13 \pm 0,01)$  mg/L de P. El procedimiento anterior se ilustra en la Figura 18.

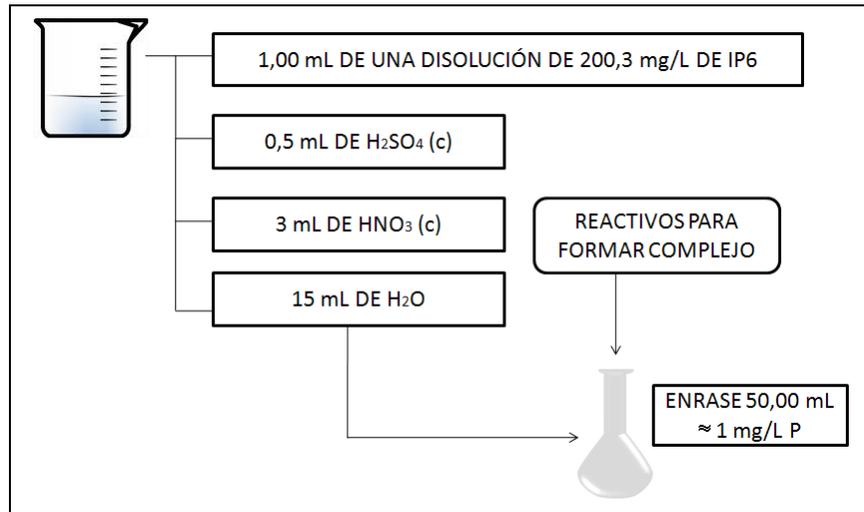


Figura 18. Procedimiento para la digestión del IP6.

Al agregar el molibdato de amonio seguido por el SnCl<sub>2</sub>, no se formó el esperado color azul, característico del complejo. La posible interferencia fue atribuida al ácido excedente de la digestión del IP6.

En vista a lo anteriormente planteado, se decidió evaluar el efecto de la acidez de la matriz sobre la formación del complejo. Para ello, se prepararon dos patrones de un estándar de ortofosfato, con y sin la mezcla de ácidos, tal como se indica en la Figura 19. La concentración final de los patrones fue igual a (1,02±0,01) mg/L expresados como P.

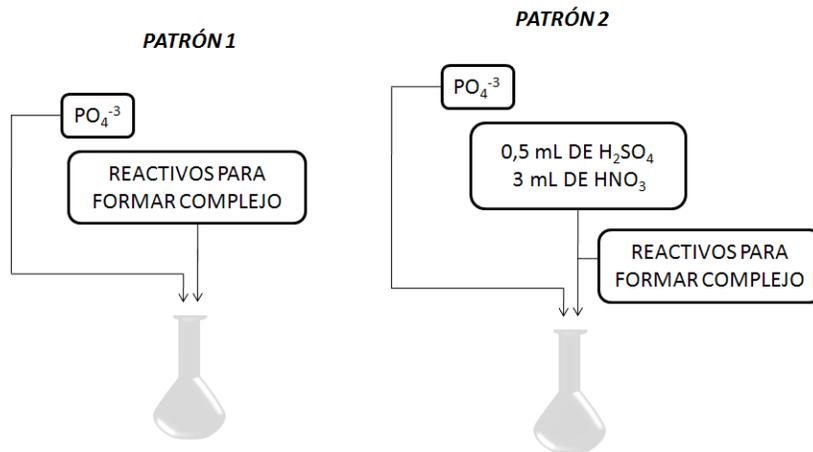


Figura 19. Ensayos para el estudio de la acidez sobre el complejo.

Nótese que el patrón 1 fue preparado en una matriz netamente acuosa, mientras que, el patrón 2 contiene los ácidos empleados en la digestión. Para el patrón 1 se obtuvo una absorbancia de 0,574 UA; mientras que, para el patrón 2 no se observó la formación del complejo. Se puede decir entonces, que los ácidos utilizados para la digestión, impiden la formación del complejo.

La conclusión anterior nos conllevó a neutralizar los ácidos de la digestión del patrón de IP6, previo a su análisis espectrofotométrico. Sin embargo, se presentó un problema adicional que se evidenció con la formación de un precipitado azul verdoso en las disoluciones. Tras analizar lo sucedido, se determinó que el reactivo de molibdato se había dañado. Se concluyó entonces, que la disolución de molibdato de amonio debe ser preparada cada vez que se vaya a utilizar; tal como se hizo con la disolución de  $\text{SnCl}_2$ .

La utilización del complejo azul de molibdeno requiere, tal como se expuso anteriormente, que los diversos reactivos que forman el complejo, se preparen en el momento de ser empleados. También, es necesario medir tanto patrones, muestras y el

blanco, exactamente a los 14 minutos de ser formado el complejo. Por otra parte, es evidente la gran dependencia del complejo del medio que lo circunda (efecto matriz).

Tales requerimientos hacen que este método de medida sea bastante delicado y tedioso; características que resultan indeseadas en el presente trabajo, donde se requiere que el método de medida sea lo más rápido, sencillo y robusto. Por esta razón, se decidió evaluar otro complejo coloreado.

### *5. 2. 2. MÉTODO FOTOCOLORIMÉTRICO DEL COMPLEJO AMARILLO DEL ÁCIDO DE VANADOMOLIBFOSFÓRICO.*

Otro método propuesto para la determinación del IP6, fue su transformación previa por digestión ácida a  $\text{PO}_4^{-3}$  y posterior medida espectrofotométrica, con la formación del complejo amarillo de vanadomolibfosfórico.

#### ***Formación del complejo amarillo del ácido de vanadomolibfosfórico.***

Al igual que en el caso anterior, la primera etapa para el estudio de la formación del complejo, se realizó con un estándar de ortofosfato y, una vez establecidas las condiciones, se procedió a realizar los mismos ensayos con un estándar de IP6, que previamente había sido sometido al tratamiento ácido. Para ello, se prepararon las siguientes disoluciones:

- ✓ *Disolución estándar de fósforo.*

Para preparar esta disolución, se pesó  $(0,0910 \pm 0,0002)$  g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 99 % de pureza, y se enrasó con agua destilada en un balón aforado de  $(200,0 \pm 0,1)$  mL. La concentración final fue de  $(102,5 \pm 0,1)$  mg/L como P.

✓ *Reactivo de molibdovanadato.*

Se disolvieron 10 g de molibdato de amonio tetrahidratado en 100 mL de agua caliente, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Por otro lado, se disolvieron 0,5 g de metavanadato de amonio en 63 mL de agua caliente. La disolución anterior se dejó enfriar y se le añadieron 88 mL de HCl concentrado. Una vez preparadas ambas disoluciones, se mezclaron gradualmente y removiendo, para finalmente llevarlas a un volumen final de 500 mL con agua destilada.

✓ *Disolución del complejo amarillo del ácido de vanadomolibfosfórico.*

Se tomó una alícuota de  $(1,50 \pm 0,01)$  mL de la disolución estándar de P. Se diluyó hasta la mitad del volumen de un balón aforado de  $(25,00 \pm 0,03)$  mL, y se añadieron 6 mL del reactivo de molibdovanadato. Posteriormente, se enrasó con agua destilada hasta la marca del aforo. La disolución del complejo resultó de un color amarillo brillante con una concentración de  $(6,15 \pm 0,01)$  mg/L como P.

***Selección de la longitud de onda de trabajo.***

Empleando el patrón de  $(6,15 \pm 0,01)$  mg/L de P, se midió la absorbancia en función de la longitud de onda, cuyo espectro de absorción se muestra en la Figura 20.

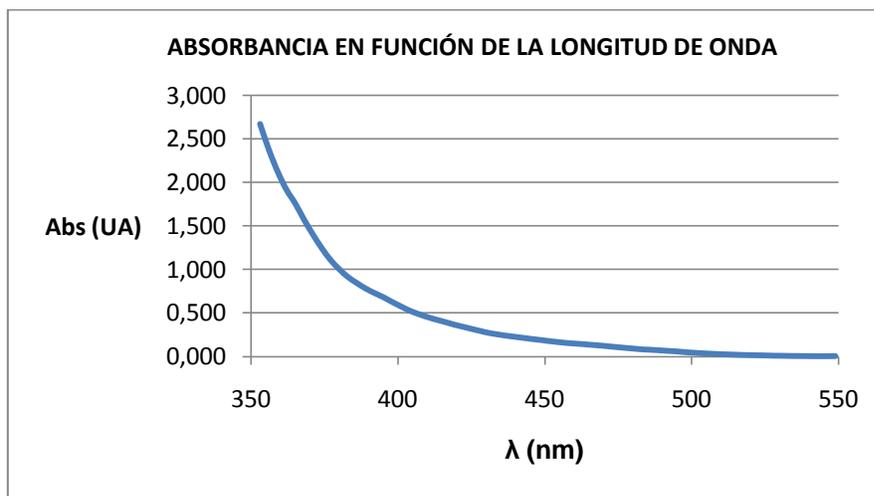


Figura 20. Gráfico de la absorbancia en función de la longitud de onda, del complejo amarillo de vanadomolibfosfórico.

En la Figura 20, se observa como la absorbancia decae al aumentar la longitud de onda; tanto es así, que a partir de los 500 nm la señal es prácticamente nula. Por otro lado, en el rango comprendido entre 350 y 380 nm, la caída de la señal es muy abrupta.

El inicio del barrido del espectro corresponde a la zona del umbral del UV-Visible (350 nm), donde la absorbancia resulta alta; lo cual puede atribuirse a que en esta región otros componentes de la matriz pueden presentar absorción. Por esta razón, se decidió trabajar a  $\lambda = 400$  nm, longitud de onda recomendada en la literatura.

### ***Cinética de la estabilidad del complejo amarillo.***

Para estudiar la estabilidad del complejo amarillo, se midió la absorbancia del patrón en función del tiempo. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 21.

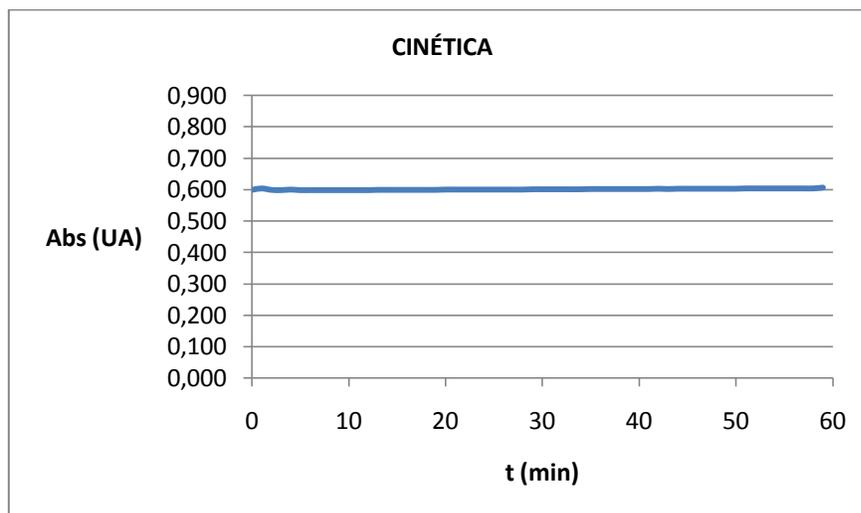


Figura 21. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo, del complejo amarillo vanadomolibfosfórico.

Obsérvese que la absorbancia se mantuvo constante, en el tiempo durante el cual se realizó el estudio. Se puede decir entonces, que la disolución se mantiene estable al menos durante 60 minutos. De lo anteriormente expuesto, la medida de las disoluciones de este complejo, pudieron realizarse en cualquier momento de los 60 minutos establecidos.

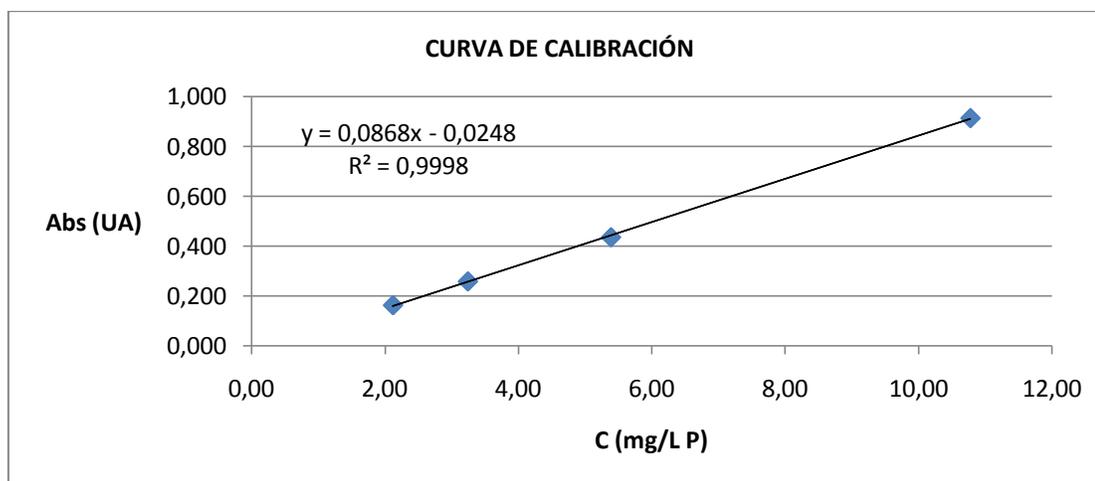
### ***Curva de calibración.***

Siguiendo el procedimiento ya descrito, se prepararon 4 patrones del complejo y su correspondiente blanco. Las concentraciones de los mismos y sus respectivas señales de absorbancia, se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Concentraciones y señales de Abs de los patrones.

<i>Patrón</i>	<i>C (mg/L P)</i>	<i>Abs (UA)</i>
Blanco	0,000	0,107
		0,108
1	2,118	0,163
		0,163
2	3,241	0,258
		0,259
3	5,386	0,435
		0,436
4	10,774	0,913
		0,914

La curva de calibración, obtenida al graficar la absorbancia de los patrones en función de la concentración de los mismos, se observa en la Figura 22.



**Figura 22.** Curva de calibración del complejo amarillo ( $y = 0,0868x - 0,0248$ ;  $R^2 = 0,9998$ ).

Para este caso, el valor del  $R^2$  resultó más alto que el obtenido para el complejo azul, representando una mejor linealidad. Sin embargo, la sensibilidad medida a través de la pendiente resultó aproximadamente cinco veces menor.

Una vez construida la curva de calibración del complejo, se procedió a estudiar la digestión del ácido fítico.

***Evaluación de la digestión del ácido fítico, empleando el complejo amarillo del ácido de vanadomolibfosfórico, para la cuantificación del fosfato liberado.***

Para este estudio se preparó una disolución estándar de ácido fítico, correspondiente a  $(200,3 \pm 0,2)$  mg/L como IP6. Tal como en el caso anterior, la digestión del ácido fítico se llevó a cabo, mezclando una alícuota de  $(3,00 \pm 0,01)$  mL del estándar, 0,5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado y 3 mL de  $HNO_3$  concentrado. Posteriormente, se agregó el reactivo de molibdovanadato y se enrasó a un volumen de  $(50,00 \pm 0,05)$  mL; obteniéndose una disolución del complejo con una concentración de  $(3,39 \pm 0,01)$  mg/L como P.

Transcurridos los 30 minutos de la digestión, se mezclaron con el reactivo acomplejante y se observó que el color de las disoluciones, era muy por debajo de lo esperado para esta concentración; indicando que el complejo no se formaba satisfactoriamente. Considerando que el tiempo requerido para la digestión era mayor al propuesto, se procedió a realizar una serie de ensayos para determinar el tiempo óptimo de digestión.

Para ello, se realizó una evaluación preliminar (sin réplicas) con cuatro alícuotas iguales del estándar de ácido fítico:

- ✓ En el primer ensayo, el patrón se sometió solo al procedimiento descrito anteriormente, es decir, calentamiento en una plancha por 30 minutos a la temperatura de ebullición.

- ✓ En el segundo ensayo, a parte del procedimiento anterior, se dejó reposar por 24 horas.
- ✓ En el tercer ensayo, a parte de ambos procedimientos anteriores, se probó calentar por 2 horas más.
- ✓ En el cuarto ensayo, un patrón original se calentó directamente por 1 ½ h a la temperatura de ebullición.

Los 4 ensayos se esquematizan en la Figura 23. El producto de cada uno de los ensayos fue tratado con el reactivo de molibdovanadato, para formar el complejo, y se midieron las respectivas absorbancias a la longitud de onda de trabajo. En la Tabla 5, se presentan las alícuotas tomadas y sus respectivos equivalentes en peso, expresados como P y en la Tabla 6 se presenta el peso esperado, medido y la exactitud, expresada como el error relativo porcentual.

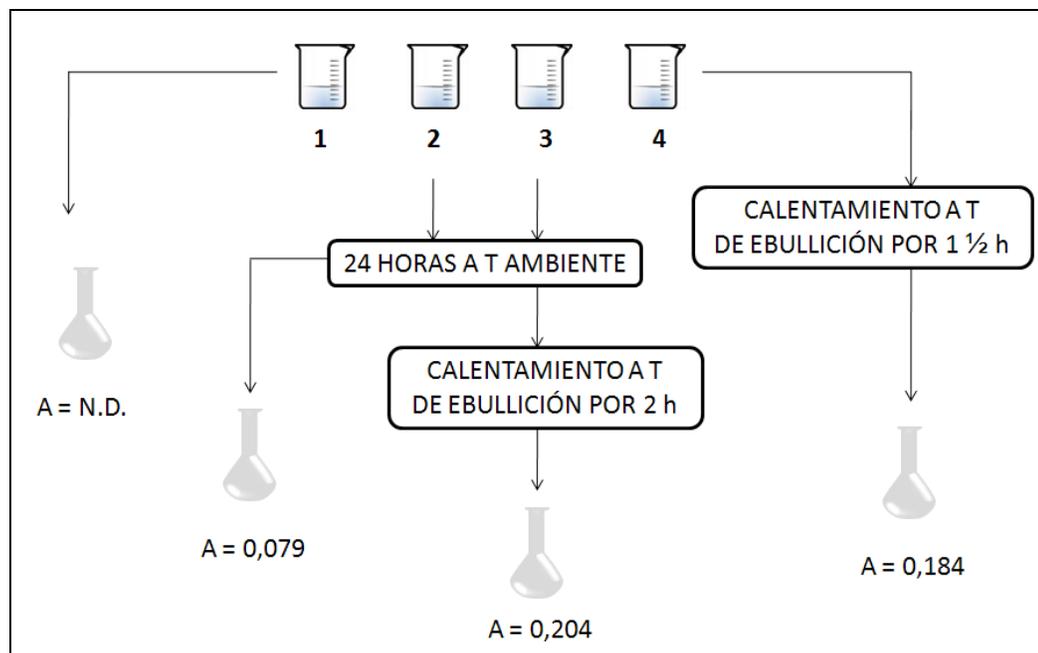


Figura 23. Esquema de la digestión de los 4 ensayos.

Tabla 5. Alícuotas tomadas de la disolución de IP6 y sus equivalentes en peso.

<i>Ensayo</i>	<i>Vol (<math>\pm 0,0002</math>) mL</i>	<i>Peso (mg P)</i>
1	3,0121	0,1701
2	2,9996	0,1694
3	3,0228	0,1708
4	3,0296	0,1711

Tabla 6. Absorbancia promedio, peso esperado y medido de cada ensayo.

<i>Ensayo</i>	<i>Abs Promedio (UA)</i>	<i>Peso esperado (mg P)</i>	<i>Peso medido (mg P)</i>	<i>%*</i>
1	NO DETECTABLE	0,1701	-	-
2	0,079	0,1694	0,0595	-65
3	0,204	0,1708	0,1315	-23
4	0,184	0,1711	0,1200	-30

\*Error relativo porcentual entre el peso esperado y el peso medido.

El producto del primer ensayo dio un valor muy cercano a la absorbancia del blanco, de manera que la concentración de P no pudo ser determinada de la curva de calibración. El segundo ensayo dio una cantidad de P, que comparándolo con el peso original, se observó que el resultado estaba por debajo de lo esperado. Para el tercer ensayo, la cantidad medida de P resultó más cercano al valor esperado. El ensayo final dio un peso muy parecido al tercer ensayo.

Se concluye entonces, que lo ideal consiste en calentar la mezcla de reacción por un tiempo mayor a 2 horas. Se propuso emplear un tiempo de 3 horas para asegurar la digestión completa del analito.

*Evaluación de la digestión de IP6 empleando 3 horas de calentamiento.*

Con la idea de evaluar la reproducibilidad del procedimiento de digestión ácida descrito anteriormente (empleando 3 h de calentamiento), se analizaron tres réplicas de una disolución estándar de IP6 (Tabla 7).

Tabla 7. Alícuotas de la disolución de IP6 y sus equivalentes en peso.

<i>Réplicas</i>	<i>Vol (<math>\pm 0,0002</math>) mL</i>	<i>Peso (mg P)</i>
1	3,0106	0,1701
2	2,9981	0,1694
3	2,9893	0,1689

El producto de la digestión de cada réplica, fue tratado con el reactivo acomplejante y enrasado a (50,00 $\pm$ 0,05) mL. Los pesos esperados y medidos, se indican en la Tabla 8. Cabe destacar, que las curvas de calibración se realizaron a diario, encontrándose muy poca variación de los diferentes parámetros estadísticos, lo que indica robustez en el sistema de calibración.

Tabla 8. Absorbancia promedio, peso esperado y medido de cada réplica.

<i>Réplicas</i>	<i>Abs Promedio (UA)</i>	<i>Peso esperado (mg P)</i>	<i>Peso medido (mg P)</i>	<i>%</i>
1	0,214	0,1701	0,1376	-19
2	0,166	0,1694	0,1099	-35
3	NO DETECTABLE	0,1689	-	-

La exactitud de los valores obtenidos, expresada como el error relativo porcentual, fue baja, y además, bastante irreproducible.

Recordando, que en el caso del complejo anterior (azul de molibdeno) se comprobó una interferencia debida a la matriz ácida; se decidió evaluar el efecto de la mezcla de ácidos sobre la absorbancia de este complejo.

*Efecto de la matriz ácida sobre la absorbancia del complejo.*

Para evidenciar el efecto ácido sobre la formación del complejo, se decidió medir dos patrones de ortofosfato con una concentración de  $(5,13 \pm 0,01)$  mg/L expresada como P, con y sin ácidos de digestión. Véase la Figura 24.

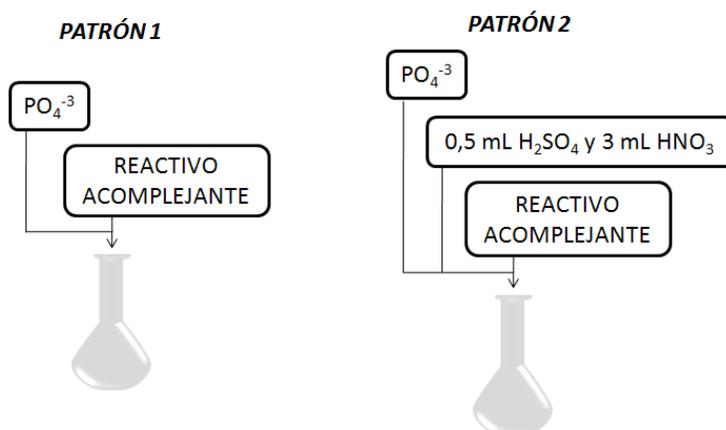


Figura 24. Patrones preparados para el estudio del efecto de la matriz ácida.

La absorbancia del patrón 1 fue de 0,540 UA; mientras que, la correspondiente al patrón 2 fue 0,436 UA. Nótese que a pesar de que ambos patrones tienen la misma concentración, éstos dieron señales diferentes. Se observa entonces, que la presencia de una matriz ácida conduce a la variación de la absorbancia del complejo.

El efecto ácido sobre la formación del complejo puede ser atacado por dos vías: neutralizar los ácidos, previo a la medida de la absorbancia, o simular la matriz ácida de la digestión en los patrones de calibración. A continuación describimos ambos procedimientos.

*Simulación de la matriz ácida en los patrones.*

Para esta prueba, se propuso digerir una cantidad de IP6 y realizar una comparación directa con un patrón de ortofosfato, que contuvo la misma matriz ácida de la digestión. Dicho patrón tuvo una concentración de  $(5,088 \pm 0,007)$  mg/L de P, cantidad que se esperó recuperar en las disoluciones digeridas.

Se sometieron tres alícuotas (Tabla 9), al procedimiento de digestión ácida.

Tabla 9. Alícuotas tomadas de la disolución de IP6 y sus equivalentes en peso.

<i>Réplicas</i>	<i>Vol (<math>\pm 0,0002</math>) mL</i>	<i>Peso (mg P)</i>
1	5,0357	0,2930
2	5,0609	0,2944
3	5,0574	0,2942

Una vez llevada a cabo la digestión, se trataron con el reactivo de molibdovanadato, para luego medir la absorbancia de cada una de ellas. Por otro lado, se preparó un blanco del complejo que tuviese la misma matriz ácida.

Las señales de absorbancia obtenidas para cada réplica, y los valores esperados y medidos, se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Absorbancia promedio de cada réplica y los pesos esperados y medidos.

<i>Réplicas</i>	<i>Abs promedio (UA)</i>	<i>Peso esperado (mg P)</i>	<i>Peso medido (mg P)</i>	<i>%</i>
1	0,475	0,2930	0,3067	5
2	0,088	0,2944	0,0565	-81
3	0,245	0,2942	0,1582	-46

Los valores obtenidos para esta prueba, resultaron igualmente irreproducibles. Esto puede atribuirse a que las mezclas resultantes de la digestión, contienen siempre cantidades variables de los ácidos; lo cual genera diferencias en las medidas de absorbancia. En conclusión, resulta conveniente eliminar los ácidos de la matriz, para lo cual se resolvió neutralizar los mismos.

#### *Neutralización de la matriz ácida.*

Para este caso, se sometieron tres alícuotas (Tabla 11) al procedimiento de digestión, y se añadió a cada una la cantidad de  $\text{NH}_4\text{OH}$  necesaria para ajustar el pH de la disolución a un valor de 4,5. Una vez neutralizadas, se trataron las disoluciones con el reactivo de molibdovanadato, para formar el complejo.

Tabla 11. Alícuotas tomadas de IP6 y sus equivalentes en peso.

<i>Réplicas</i>	<i>Vol (<math>\pm 0,0002</math>) mL</i>	<i>Peso (mg P)</i>
1	5,0875	0,2960
2	5,0290	0,2926
3	5,0636	0,2946

Se realizó una comparación directa con un patrón de ortofosfato de  $(5,144 \pm 0,005)$  mg/L como P, que contuvo los ácidos utilizados para la digestión y se ajustó a un pH de 4,5.

El blanco se preparó añadiendo el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y el  $\text{HNO}_3$ , seguido por el  $\text{NH}_4\text{OH}$  y el reactivo acomplejante.

La absorbancia de cada réplica y los valores esperados así como los medidos, se indican en la Tabla 12.

Tabla 12. Absorbancia promedio de cada réplica y cantidad esperada y medida de P.

<i>Réplica</i>	<i>Abs Promedio (UA)</i>	<i>Peso teórico (mg P)</i>	<i>Peso medido (mg P)</i>	<i>%</i>
1	0,184	0,2960	0,0738	-75
2	0,208	0,2926	0,0863	-71
3	0,219	0,2946	0,0918	-69
DSR (%)				3

Considerando que los procesos de digestión, no suelen ser del todo idénticos para cada réplica sometida al procedimiento; los valores obtenidos resultaron más reproducibles que en los casos anteriores (3 %). Se concluye entonces, que para garantizar la reproducibilidad del procedimiento, es necesario ajustar las réplicas y patrones al mismo pH.

Por otra parte, se observó que el error relativo porcentual resulta bastante alto para todas las réplicas (los valores medidos resultaron muy diferentes a los valores esperados). Para una mejor comprensión, se calculó el porcentaje de recuperación obteniéndose un valor promedio de  $(29 \pm 3)$  %. Esto nos llevó a concluir que la digestión aún no era suficientemente completa.

Para resolver esta problemática, se decidió llevar a cabo el proceso de digestión utilizando un tiempo de calentamiento mayor. Para ello, se requirió del uso de un sistema cerrado donde no hubiese pérdida de solvente, debida a los prolongados

tiempos de digestión. Entonces, se planteó el uso de un sistema de calentamiento con reflujo.

*Digestión del ácido fítico empleando 15 horas de calentamiento.*

Se colocó una alícuota de  $(4,9533 \pm 0,0002)$  mL de una disolución de  $(206,3 \pm 0,2)$  mg/L de IP6 en un balón de reacción. Seguidamente, se colocaron los ácidos empleados para la digestión y 10 mL de agua destilada. Luego, se colocó el balón en un sistema de calentamiento con reflujo (Figura 25), y se calentó la mezcla durante 15 horas a la temperatura de ebullición.



Figura 25. Sistema con reflujo.

El producto de la digestión se ajustó a un pH de 4,5, y se trató con el reactivo acomplejante. Por otro lado, se preparó el blanco y el patrón de ortofosfato para la comparación directa (de 5,1265 mg/L expresado como P), ajustando el pH de ambas disoluciones a 4,5. Asumiendo la digestión total de la alícuota tomada de IP6, se

esperaba obtener 0,2882 mg de P. Las señales de absorbancia obtenidas para cada disolución se indican en la Tabla 13.

Tabla 13. Absorbancia promedio del blanco, patrón y del producto de la digestión.

<i>Disolución</i>	<i>Abs Promedio (UA)</i>
Blanco	0,0400
Patrón	0,4770
Digestión	0,4675

La cantidad de P medida para la disolución resultante de la digestión, se indica en la Tabla 14.

Tabla 14. Cantidad esperada y medida de P de la disolución.

<i>Peso esperado (mg P)</i>	<i>Peso medido (mg P)</i>	<i>%</i>
0,2882	0,2512	-13

Para este caso, la cantidad de P medida fue mucho mayor que en el caso anterior, lo cual, indica que el proceso de digestión fue más efectivo. El porcentaje de recuperación fue igual a 87 %, observando que para lograr la digestión completa del ácido fítico, se requieren más de 15 horas de calentamiento.

El procedimiento de digestión utilizado involucra un tiempo de calentamiento de 15 horas, que resulta excesivo. Debido a esta razón, se decidió investigar otro método de medida que fuese más rápido, sencillo y adecuado a los requerimientos del presente trabajo. Fue entonces, que se planteó evaluar el método fotolorimétrico propuesto por Latta y Eskin en 1980.

### 5. 2. 3. MÉTODO FOTOCOLORIMÉTRICO BASADO EN LA UTILIZACIÓN DEL REACTIVO DE WADE.

#### ***Formación del complejo vinotinto, Reactivo de Wade.***

El Reactivo de Wade es una disolución de una mezcla de ácido sulfosalicílico con cloruro de hierro a una concentración final de 0,3 y 0,03 %, respectivamente. La disolución se torna de un color vinotinto intenso. Es pertinente recordar, que este reactivo pierde coloración en presencia del ácido fítico, lo que implica que el aumento de la concentración del mismo, conlleva a una disminución en la absorbancia; razón por la cual, este análisis es considerado una medida indirecta.

La concentración de la disolución anterior como señal de partida, da valores de absorbancia muy altos, que producen la saturación del detector, por lo cual, este reactivo suele diluirse (normalmente 7 veces). La disolución diluida del Reactivo de Wade, corresponde al blanco utilizado por el presente trabajo. Dicho blanco fue siempre preparado al momento de realizar cualquier medida.

#### ***Selección de la longitud de onda de trabajo.***

Para determinar la  $\lambda$  de trabajo, se realizó un barrido de la longitud de onda en función de la absorbancia, empleando la disolución del blanco. El espectro de absorción obtenido, se muestra a continuación en la Figura 26.

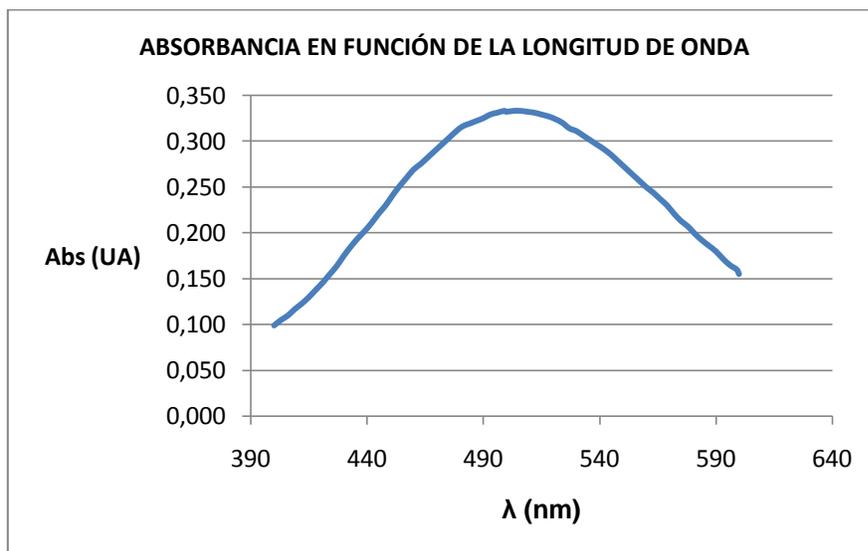


Figura 26. Gráfico de la absorbancia en función de la longitud de onda, del Reactivo de Wade.

El espectro obtenido presentó un máximo de absorbancia en el rango comprendido entre los 499 y los 506 nm. En vista de lo anterior, la longitud de onda de trabajo seleccionada fue 500 nm (recomendada en la literatura).

### ***Curva de calibración.***

Los patrones se prepararon en viales, tomando alícuotas de una disolución de  $(50,91 \pm 0,05)$  mg/L de IP6. Luego, se agregó agua destilada hasta completar un volumen de 6 mL. Finalmente, se añadió 1 mL del Reactivo de Wade y se agitó la disolución. Los valores de las alícuotas y de cada engrase, así como las respectivas concentraciones, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Alícuotas de los reactivos utilizados para la preparación de los patrones.

<i>Patrón</i>	<i>Vol alícuota de IP6 (±0,0002) mL</i>	<i>Vol alícuota del RW (±0,0002) mL</i>	<i>Enrase (±0,0002) mL</i>	<i>C (mg/L IP6)</i>
Blanco	0,0000	1,0076	6,9373	0,0000
1	0,2740	1,0114	7,1163	1,9604
2	0,7045	1,0081	7,0073	5,1188
3	1,4069	1,0088	6,9136	10,3609
4	2,0425	0,9994	6,9301	15,0059

El blanco y los patrones se midieron a 500 nm. Las señales obtenidas se indican en la Tabla 16.

Tabla 16. Señales de Abs obtenidas para los patrones y el blanco correspondiente.

<i>Patrón</i>	<i>Abs Neta (UA)</i>	<i>Abs Analito (UA)</i>
Blanco	0,330	0,000
1	0,300	0,030
	0,301	0,029
2	0,272	0,058
	0,271	0,059
3	0,219	0,111
	0,219	0,111
4	0,170	0,160
	0,169	0,161

Cabe destacar que la *Abs Neta*, es la señal resultante de la disminución de la absorbancia del blanco por la adición del estándar de IP6 (tomada directamente del equipo), mientras que la *Abs Analito* es la señal resultante de la diferencia entre la absorbancia del blanco y la neta. La curva de calibración graficada se indica en la Figura 27.

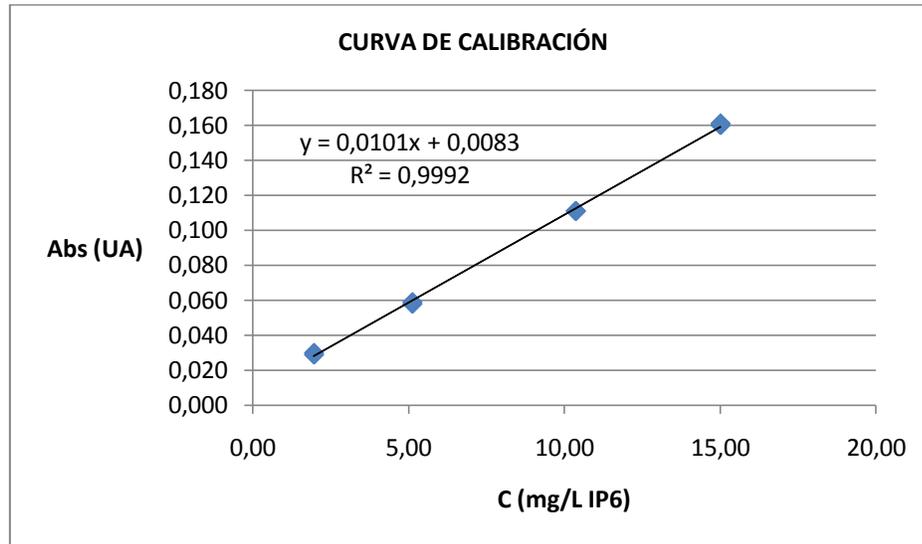


Figura 27. Curva de calibración con el Reactivo de Wade ( $y = 0,0101x + 0,0083$ ;  $R^2 = 0,9992$ ).

Se obtuvo un valor de  $R^2$  satisfactorio, comprobando la linealidad de la curva de calibración; la cual fue empleada para todos los análisis posteriores.

Es importante señalar, que se realizaron diversas pruebas a fin de optimar las condiciones de medida. Una de ellas, fue acrecentar la señal del blanco, es decir, aumentar la concentración de partida del Reactivo de Wade; con la idea de establecer un rango mayor de concentraciones para el IP6. El resultado fue una pérdida de la linealidad, debido posiblemente a la saturación del detector.

Otra observación importante, fue la necesidad de añadir el Reactivo de Wade de la forma más precisa posible, y en el mismo lapso para cada uno de los patrones. De lo contrario, se presentaban problemas de linealidad.

En definitiva, este método resultó un procedimiento sencillo y rápido; por consiguiente, se decidió emplearlo en la medida del ácido fítico. Seguidamente, se procedió a trabajar en la etapa más importante del presente trabajo, es decir, con el estudio de la extracción del IP6 mediante la técnica de SPE.

### 5. 3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

#### 5. 3. 1. DESCRIPCIÓN DEL MONTAJE DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Se dispuso de un montaje de extracción formado por un módulo dispensador, constituido por un cilindro polimérico con su respectivo embolo (tipo inyectora de 60 mL); el cartucho de extracción propiamente dicho (360 mg de adsorbente, intercambio aniónico), un filtro de disco acoplado al sistema de inyección (NY, 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, diámetro 25 mm) y un vial de recolección, tal como se indica en la Figura 28.

El estudio de la optimización de la extracción está orientado para su futura aplicación en la determinación del ácido fólico en cereales, en especial para los de uso infantil, con mayor contenido de minerales. Sin embargo, en este trabajo empleamos como muestras, patrones de concentración conocida, con el objetivo de tener un mejor control sobre las diferentes variables matriciales. Dichos patrones serán referidos como muestras simuladas o sintéticas.

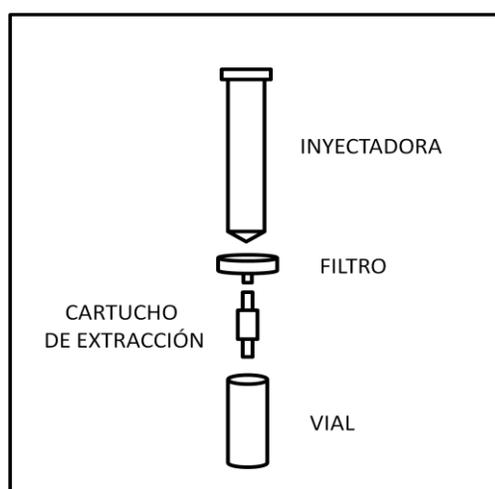


Figura 28. Montaje instalado para la extracción.

### 5. 3. 2. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.

#### ***Activación del cartucho de extracción.***

El cartucho de intercambio aniónico, fue activado al hacerle pasar alícuotas sucesivas de 10 mL de las siguientes disoluciones: agua destilada; 0,5 M de HCl; 2 M de HCl; 0,5 M de HCl y agua destilada.

#### ***Introducción de la muestra en el cartucho de extracción.***

Se añadió, aproximadamente, 5 mL de agua destilada a la inyectora; después una alícuota exacta de un patrón de concentración conocida (muestra sintética), y finalmente se completó el volumen de la inyectora a 20 mL aproximadamente. Esto se hizo con el objetivo de no pasar a través del lecho extractor, un frente muy concentrado del analito de interés. El flujo estuvo entre 0,9 y 1,0 mL/min.

#### ***Lavado del cartucho de extracción.***

El cartucho fue lavado con 5 mL de agua destilada, seguidos de 10 mL de una disolución de 0,05 M de HCl. Estas alícuotas fueron añadidas en la misma inyectora, de manera que se arrastrara todo el analito que pudo haber quedado en la misma.

#### ***Elución del ácido fítico del cartucho de extracción.***

El ácido fítico retenido en el cartucho, fue eluído con 8 mL de la disolución de 2 M de HCl. La disolución se pasó lentamente, tratando de lograr el mismo flujo empleado anteriormente.

Una vez extraído el IP6, la etapa final consistió en tomar una alícuota de dicha disolución y someterla al tratamiento con el reactivo de Wade, para luego medirla en el espectrofotómetro UV-Visible. Como podemos observar, el IP6 queda en una matriz ácida luego de la extracción, que si bien es cierto, no es tan fuerte como en los casos

anteriores, puede tener algún efecto sobre el análisis espectrofotométrico. Es por ello que desde un principio, se decidió evaluar el efecto de la presencia de HCl en el complejo utilizado.

### 5. 3. 3. EFECTO DE LA MATRIZ ÁCIDA SOBRE EL COMPLEJO.

Se prepararon dos patrones con la misma concentración de IP6, esto es,  $(10,00 \pm 0,01)$  mg/L. Luego, a uno de ellos se le añadió una alícuota de una disolución de HCl, de manera que la concentración final fuese 0,1 M. Dicha concentración, fue calculada como el valor máximo de HCl que podrían contener las muestras sintéticas, una vez extraídas y tratadas para ser medidas con el Reactivo de Wade.

El patrón sin HCl se llamó 1 y el patrón con ácido fue denominado como 2. La absorbancia de cada patrón y la del blanco, se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Absorbancia del blanco y de los patrones 1 y 2.

<i>Patrón</i>	<i>Abs (UA)</i>
Blanco	0,3340
1	0,2340
2	0,1340

La absorbancia del patrón con HCl, resultó prácticamente la mitad de la señal del que no contenía ácido. Se puede decir entonces, que la presencia de HCl a la concentración mencionada, conduce a una disminución de la absorbancia de la disolución.

Posteriormente, se realizaron algunas pruebas para determinar el procedimiento más adecuado para minimizar o eliminar este efecto; las cuales fueron resumidas a continuación.

Cabe señalar que, las disoluciones eluidas del cartucho de extracción fueron siempre diluidas para su análisis posterior. Las alícuotas tomadas para hacer las diluciones, variaron dependiendo de la concentración inicial de la muestra sintética; por lo cual, las disoluciones finales contendrían concentraciones de HCl que variaban entre 0,02 y 0,10 M. Por esta razón, la primera experiencia fue un estudio del comportamiento de la absorbancia en función de la concentración de HCl; con la finalidad de determinar si existía un rango de concentración del mismo, en el cual, la interferencia fuese constante. De esta manera, al preparar dentro de ese rango tanto patrones como muestras, se podía corregir la interferencia. Se prepararon 5 patrones con la misma cantidad exacta de IP6 (10 mg/L) y con concentraciones de HCl que variaron de 0,02 a 0,10 M. Las señales obtenidas se graficaron en función de la concentración de HCl. Véase la Figura 29.

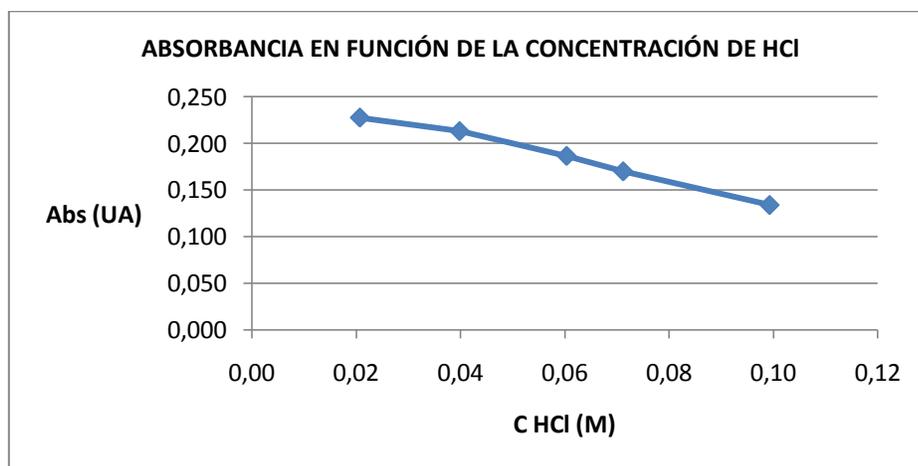


Figura 29. Efecto de la concentración de HCl sobre la absorbancia.

Se observó que la absorbancia disminuye en la medida que aumenta la concentración de HCl, de manera que no existe un rango de concentraciones de ácido, en el cual la absorbancia se mantenga estable. Por ello, pequeñas variaciones en la concentración de HCl de las disoluciones, conducirían a errores en la medida.

Consecuentemente, se realizó una segunda prueba que consistió en un análisis donde tanto patrones como muestras fueron preparados en una misma matriz ácida. La curva de calibración obtenida dio una correlación muy lineal con un  $r$  de 0,9995; lo que indica que la interferencia del ácido afecta por igual al rango de concentraciones estudiado, y pudiera ser usado para corregir dicho efecto. Sin embargo, la muestra tratada en el cartucho de extracción y analizada posteriormente, dio porcentajes de recuperación que variaron considerablemente entre las réplicas realizadas. Esto se atribuye a que no es posible controlar una cantidad constante de ácido, en el procedimiento de extracción. Por lo expuesto anteriormente, se resolvió eliminar el HCl de la matriz de las disoluciones.

#### *5. 3. 4. ELIMINACIÓN DEL ÁCIDO CLORHÍDRICO.*

A continuación, se describe el procedimiento general utilizado para la eliminación del ácido clorhídrico, de las disoluciones eluidas del cartucho de SPE. La disolución ácida resultante de la elución del IP6, se recolectó en un balón y se colocó en el rotaevaporador (conectado a una bomba de vacío) durante 15 minutos, calentando a 40 °C. Transcurrido este tiempo, el balón quedaba completamente seco. Luego, se agregaron (10,00±0,02) mL de agua destilada para restituir la disolución, la cual, se agitó varias veces empleando un vortex.

Hecho esto, se procedió a preparar las disoluciones coloreadas para ser medidas en el espectrofotómetro. Para ello, se añadió en un vial una alícuota de la disolución restituida, agua destilada hasta completar un volumen de 6 mL, y finalmente 1 mL del Reactivo de Wade.

Para verificar la efectividad del procedimiento descrito, se trató por triplicado una muestra de (149,8±0,3) mg/L de IP6 en 0,2 M de HCl. El blanco preparado en agua

destilada y las disoluciones coloreadas, fueron medidos a una longitud de onda de 500 nm. Las alícuotas utilizadas para la preparación de las disoluciones, y las señales medidas, se exponen en las Tablas 18 y 19, respectivamente.

Tabla 18. Alícuotas empleadas en la preparación de las disoluciones coloreadas de la muestra.

<i>Réplicas</i>	<i>Alícuota muestra (±0,0002) mL</i>	<i>Alícuota RW (±0,0002) mL</i>	<i>Enrase (±0,0002) mL</i>
1	0,5984	1,0082	7,0326
2	0,5945	1,0044	7,0339
3	0,6001	1,0068	7,0096

Tabla 19. Señales obtenidas para las disoluciones de la muestra.

<i>Patrón</i>	<i>Abs Neta (UA)</i>	<i>Abs Analito (UA)</i>	<i>A Promedio (UA)</i>
Blanco	0,331	-	-
1	0,273	0,058	0,0580
	0,273	0,058	
2	0,271	0,060	0,0605
	0,270	0,061	
3	0,272	0,059	0,0590
	0,272	0,059	

Con los valores de absorbancia y la curva de calibración, y tomando en cuenta todos los factores de dilución efectuados, se calculó la cantidad de IP6 recuperada. La cantidad inicial y obtenida de IP6, con sus respectivos porcentajes de recuperación, se indican en la Tabla 20.

Tabla 20. Peso inicial y obtenido, y porcentaje de recuperación.

<i>Réplica</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>% R</i>
1	0,7491	0,5783	77
2	0,7491	0,6115	82
3	0,7491	0,5863	78

En este caso, se obtuvo un porcentaje de recuperación del orden del 79 %, con una desviación estándar relativa (DSR) de 2,5 %. Del análisis de ambos valores, consideramos que la reproducibilidad resultó bastante aceptable, pero por otra parte, se observó una pérdida considerable del analito (alrededor del 20 %). En este punto, se planteó precisar la fuente de dicha pérdida, la cual puede ser atribuida a dos factores: arrastre del ácido fítico en el procedimiento de evaporación a baja presión (en la etapa de la eliminación del ácido extractor) o en el procedimiento de extracción propiamente dicho.

### 5. 3. 5. ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN EN LA ETAPA DE EVAPORACIÓN DEL HCL.

Para estudiar si la pérdida ocurre durante la etapa de evaporación, se preparó una muestra sintética de  $(153,9 \pm 0,1)$  mg/L de IP6, en una matriz de 2 M de HCl (simulando que la muestra ya ha sido eluida del cartucho de extracción). Se tomó una alícuota de  $(5,00 \pm 0,01)$  mL de la muestra, y se colocó en el rotaevaporador. Posteriormente, se sometió la misma al resto del procedimiento. El peso inicial y obtenido, con su respectivo error porcentual, se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Peso inicial y peso obtenido de la muestra.

<i>Réplicas</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>%*</i>
1	0,7694	0,6455	-16
2	0,7694	0,6507	-15
3	0,7694	0,6450	-16

\*Error relativo porcentual.

Se observa que el procedimiento presenta pérdidas, por lo cual, se puede concluir que la misma esta asociada al método de evaporación y no a la extracción en el cartucho.

En una serie de experiencias posteriores, se modificaron algunas variables de la evaporación, con la finalidad de minimizar la pérdida observada. Un primer cambio fue reducir el tiempo de evaporación; resultando que el HCl no era removido en su totalidad. Por otro lado, se disminuyó la cantidad de vacío del sistema; sin encontrar resultados satisfactorios.

Para determinar si el HCl contribuye con la pérdida del analito (por arrastre con vapor), se evaporó una muestra que no tuviera dicho ácido. Para ello, se evaporó una alícuota de la disolución de (206,3±0,2) mg/L de IP6 en agua destilada. Los resultados de este ensayo se indican en la Tabla 22.

Tabla 22. Peso inicial y peso obtenido, de una alícuota de la disolución de IP6 en agua destilada.

<i>Réplicas</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>%</i>
1	1,0316	1,0789	4
2	1,0316	1,0672	3
3	1,0316	1,0696	4

La recuperación es completa para este caso. En vista de ello, se puede decir que la presencia del HCl en la matriz de la disolución, de alguna manera contribuye a que el ácido fítico sea arrastrado por el vacío generado en el sistema de evaporación.

Considerando, que el uso de la disolución de 2 M de HCl es estrictamente necesario, se decidió trabajar con el procedimiento propuesto; sabiendo que existe una pérdida de alrededor del 15 %, en la etapa de la eliminación del HCl. Trabajar en estas condiciones resulta perfectamente viable, ya que, el objetivo del presente trabajo, consiste en comparar la recuperación en dos tipos de muestras sintéticas. Así, las pérdidas asociadas a la metodología propuesta, serán iguales para ambos tipos de muestras sintéticas; de modo que la comparación será completamente válida.

Finalmente, la metodología propuesta para el análisis de muestras de IP6 con y sin metales, consta de tres procesos fundamentales: la extracción en fase sólida en el cartucho de intercambio aniónico, la eliminación del ácido clorhídrico y el tratamiento con el Reactivo de Wade para la medida espectrofotométrica. El procedimiento detallado se muestra en la Figura 30.

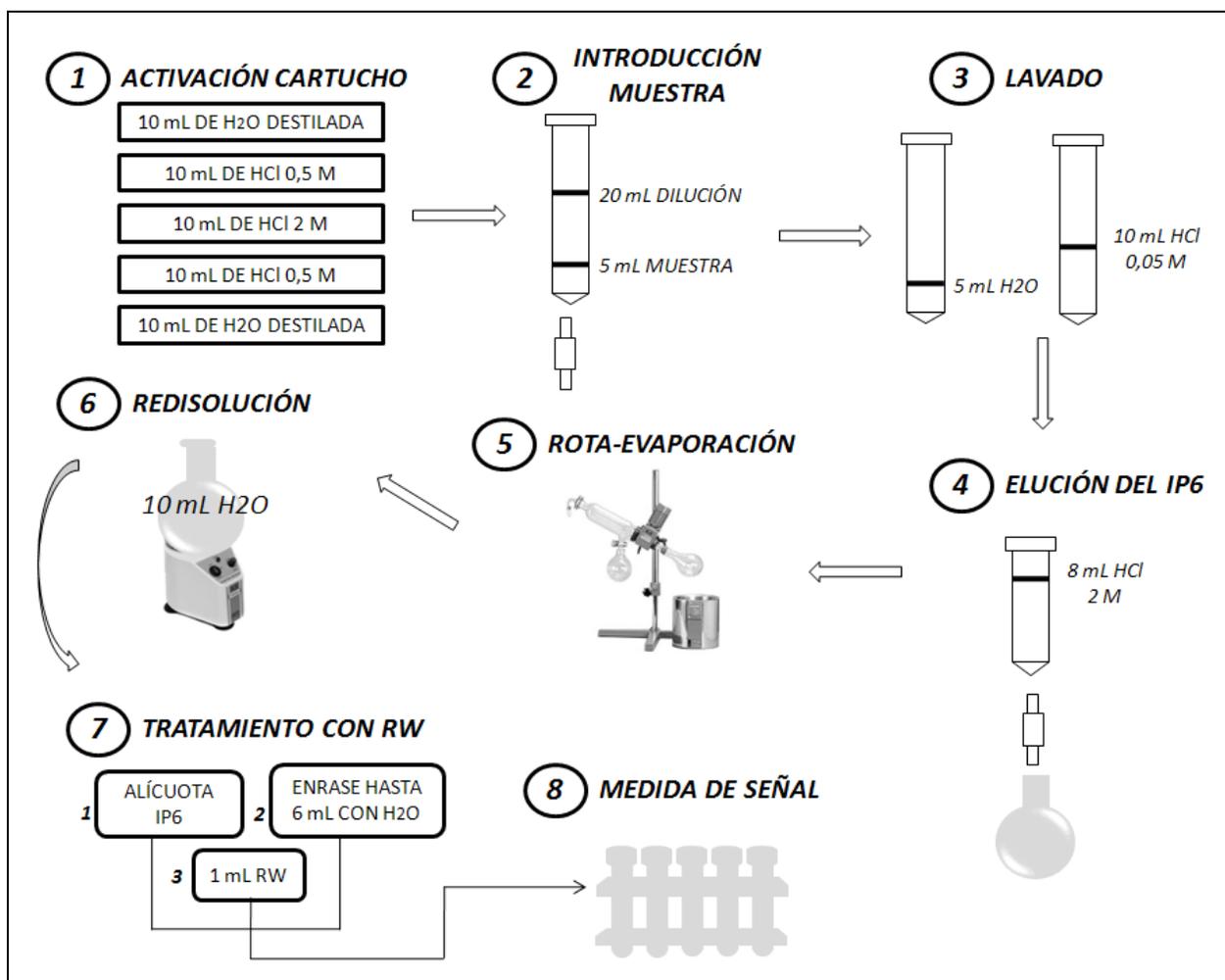


Figura 30. Procedimiento definitivo empleado para el análisis de las muestras sintéticas.

#### **5. 4. EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y MEDIDA SIN METALES.**

Para evaluar la eficiencia en la recuperación del procedimiento de extracción propuesto, se escogió un rango de concentraciones de IP6 de 60 a 250 mg/L; el cual, se seleccionó con valores ligeramente por encima y por debajo, del rango acorde al encontrado en muestras de cereales comerciales.

Para ello, se prepararon 5 muestras sintéticas de ácido fítico, correspondientes a 58,70; 90,99; 149,83; 199,72 y 252,77 mg/L como IP6. Todas ellas se elaboraron en una matriz de 0,2 M de HCl y se denominaron A, B, C, D y E, respectivamente.

Se procedió a tomar una alícuota de  $(5,00 \pm 0,01)$  mL de cada una de las muestras mencionadas anteriormente, y se sometieron al procedimiento de extracción planteado anteriormente. Luego de la evaporación del HCl, la muestra fue reconstituida en  $(10,00 \pm 0,02)$  mL de agua destilada, y una alícuota de ella fue combinada con el Reactivo de Wade. Posteriormente, se midió la absorbancia y se determinó su concentración. Cabe destacar, que cada muestra fue analizada por triplicado.

En la Tabla 23 se detallan las alícuotas tomadas después del proceso de extracción y evaporación de cada una de las muestras, con sus respectivas réplicas. Además, se puntualizan las alícuotas del Reactivo de Wade, así como los volúmenes de enrase.

Tabla 23. Alícuotas empleadas de la muestra restituida, del Reactivo de Wade, y del volumen final de la disolución.

<i>Muestra</i>	<i>Alícuota muestra sintética (Vol±0,0002) mL</i>	<i>Alícuota RW (Vol±0,0002) mL</i>	<i>Enrase (Vol±0,0002) mL</i>
A.1	1,5013	1,0167	7,0685
A.2	1,5235	1,0134	6,9504
A.3	1,4953	0,9999	7,0322
B.1	0,9986	1,0014	6,9677
B.2	0,9974	1,0009	7,0701
B.3	1,0012	1,0038	6,9998
C.1	0,5984	1,0082	7,0326
C.2	0,5945	1,0044	7,0339
C.3	0,6001	1,0068	7,0096
D.1	0,4401	1,0153	6,9675
D.2	0,4434	1,0131	6,9994
D.3	0,4443	1,0020	7,0097
E.1	0,3986	1,0147	6,9772
E.2	0,3878	1,0158	6,8941
E.3	0,3977	1,0048	7,0310

Las disoluciones obtenidas se midieron en el espectrofotómetro y las absorbancias de cada muestra y del blanco (preparado en el momento), se indican en la Tabla 24.

Tabla 24. Absorbancia del blanco y de cada réplica analizada.

<i>Muestra</i>	<i>Abs Neta (UA)</i>	<i>Abs Analito (UA)</i>	<i>A Promedio (UA)</i>
Blanco	0,331		
A.1	0,275	0,056	0,0555
	0,276	0,055	

A.2	0,277	0,054	0,0535
	0,278	0,053	
A.3	0,271	0,060	0,0595
	0,272	0,059	
Blanco	0,330		
B.1	0,271	0,059	0,0595
	0,270	0,060	
B.2	0,268	0,062	0,0620
	0,268	0,062	
B.3	0,271	0,059	0,0585
	0,272	0,058	
Blanco	0,331		
C.1	0,273	0,058	0,0580
	0,273	0,058	
C.2	0,271	0,060	0,0605
	0,270	0,061	
C.3	0,272	0,059	0,0590
	0,272	0,059	
Blanco	0,331		
D.1	0,278	0,053	0,0530
	0,278	0,053	
D.2	0,274	0,057	0,0565
	0,275	0,056	
D.3	0,271	0,060	0,0595
	0,272	0,059	
Blanco	0,330		
E.1	0,272	0,058	0,0585
	0,271	0,059	
E.2	0,276	0,054	0,0540
	0,276	0,054	
E.3	0,267	0,063	0,0635
	0,266	0,064	

Con el valor de la absorbancia promedio y la curva de calibración, se calculó la cantidad obtenida de IP6; y con este último valor se determinó el peso. A partir del valor del peso inicial se calculó el porcentaje de recuperación para cada muestra (%R). Véase la Tabla 25.

Tabla 25. Peso inicial, obtenido, y porcentaje de recuperación.

<i>Muestra</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>% R</i>
A.1	0,2935	0,2200	75
A.2	0,2935	0,2042	70
A.3	0,2935	0,2384	81
B.1	0,4550	0,3537	78
B.2	0,4550	0,3769	83
B.3	0,4550	0,3475	76
C.1	0,7491	0,5783	77
C.2	0,7491	0,6115	82
C.3	0,7491	0,5863	78
D.1	0,9986	0,7007	70
D.2	0,9986	0,7533	75
D.3	0,9986	0,7998	80
E.1	1,2639	0,8700	69
E.2	1,2639	0,8044	64
E.3	1,2639	0,9662	76

Un resumen de los porcentajes de recuperación promedio, con su desviación estándar, se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Resumen de los porcentajes de recuperación con sus desviaciones estándar (s).

<i>C IP6 (mg/L)</i>	<i>% Recuperación (<math>\pm s</math>)</i>
60	75 $\pm$ 6
90	79 $\pm$ 3
150	79 $\pm$ 2
200	75 $\pm$ 5
250	70 $\pm$ 6

Los porcentajes de recuperación obtenidos variaron entre 70 y 79 %. Se observa un sesgo negativo (por defecto) y aproximadamente constante. Es de esperar que esto se deba a la pérdida en la etapa de evaporación del ácido y a la extracción propiamente dicha.

## **5. 5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS METALES SOBRE LA EXTRACCIÓN DEL IP6.**

Para las siguientes experiencias, se decidió trabajar en un rango más estrecho de concentraciones de IP6 (intermedio, de 90 a 200 mg/L), ya que éstas son las más comúnmente encontradas en cereales infantiles.

Generalmente, los cereales infantiles son enriquecidos con hierro y calcio. Debido a esto, se prepararon muestras que contuvieran cantidades añadidas de los mismos, en el orden de concentración en que se encuentran en dichos cereales.

### 5. 5. 1. MUESTRAS DE IP6 CON CALCIO.

Las muestras fueron preparadas a las siguientes concentraciones exactas: 91,79; 154,10; y 200,47 mg/L de IP6; en una matriz de Ca (160 mg/L) y 0,2 M de HCl. Las muestras se denominaron F, G y H, respectivamente.

Las muestras fueron sometidas al procedimiento anterior y medidas en el espectrofotómetro. En la Tabla 27 se detallan las alícuotas de las disoluciones utilizadas y en la 28 las absorbancias de cada muestra. Los porcentajes de recuperación obtenidos para cada una de las muestras, se presentan en la Tabla 29.

Tabla 27. Alícuotas empleadas de la muestra restituida, del Reactivo de Wade, y del volumen final de la disolución.

<i>Muestra</i>	<i>Alícuota muestra sintética (Vol±0,0002) mL</i>	<i>Alícuota RW (Vol±0,0002) mL</i>	<i>Enrase (Vol±0,0002) mL</i>
F.1	1,0047	1,0148	6,9470
F.2	1,0076	1,0145	6,9789
F.3	1,0125	1,0185	7,0074
G.1	0,5994	1,0119	6,9995
G.2	0,5925	1,0132	6,9215
G.3	0,6051	1,0136	6,9593
H.1	1,0143	1,0153	6,9599
H.2	1,0123	1,0160	7,0444
H.3	1,0110	1,0191	6,9606

Tabla 28. Absorbancia del blanco y de cada réplica analizada.

<i>Muestra</i>	<i>Abs Neta (UA)</i>	<i>Abs Analito (UA)</i>	<i>A Promedio (UA)</i>
Blanco	0,328		
F.1	0,276	0,052	0,0520
	0,276	0,052	
F.2	0,273	0,055	0,0545
	0,274	0,054	
F.3	0,272	0,056	0,0560
	0,272	0,056	
Blanco	0,332		
G.1	0,269	0,063	0,0630
	0,269	0,063	
G.2	0,273	0,059	0,0585
	0,274	0,058	
G.3	0,269	0,063	0,0630
	0,269	0,063	
Blanco	0,327		
H.1	0,203	0,124	0,1240
	0,203	0,124	
H.2	0,201	0,126	0,1260
	0,201	0,126	
H.3	0,201	0,126	0,1260
	0,201	0,126	

Tabla 29. Peso inicial, obtenido, y porcentaje de recuperación para cada muestra.

<i>Muestra</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>% R</i>
F.1	0,4590	0,2992	65
F.2	0,4590	0,3168	69
F.3	0,4590	0,3269	71

G.1	0,7705	0,6324	82
G.2	0,7705	0,5806	75
G.3	0,7705	0,6229	81
H.1	1,0024	0,7860	78
H.2	1,0024	0,8109	81
H.3	1,0024	0,8023	80

En la Tabla 30, se presenta un resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos para todas las muestras sintéticas con calcio. En la misma tabla, se incluyen los valores obtenidos en el apartado anterior para las muestras sin calcio.

Tabla 30. Resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras sintéticas que contienen sólo IP6, y para aquellas que contienen calcio.

<i>C IP6 (mg/L)</i>	<i>Muestra (sin Ca)</i>	<i>% Recuperación (<math>\pm s</math>)</i>	<i>Muestra (con Ca)</i>	<i>% Recuperación (<math>\pm s</math>)</i>
90	B	79 $\pm$ 3	F	69 $\pm$ 3
150	C	79 $\pm$ 2	G	79 $\pm$ 4
200	D	75 $\pm$ 5	H	80 $\pm$ 1

Indudablemente, las muestras sintéticas C y G presentan el mismo porcentaje de recuperación. Esto se comprobó al analizar las dos muestras al mismo tiempo (repetiendo el análisis de C, obteniéndose el mismo valor de la primera vez). Igualmente, las muestras sintéticas D y H presentan valores muy parecidos. Aparentemente, sólo la muestra sintética F parece sufrir un efecto debido a la presencia del calcio.

En este orden de ideas, se señala que el calcio afecta el porcentaje de recuperación, sólo si se utiliza una concentración de IP6 igual a 90 mg/L.

### 5. 5. 2. MUESTRAS DE IP6 CON HIERRO.

Las muestras fueron preparadas a las siguientes concentraciones exactas: 92,11; 154,77; y 199,44 mg/L de IP6; en una matriz de Fe (10 mg/L) y 0,2 M de HCl. Las muestras se denominaron I, J y K, respectivamente.

En la Tabla 31 se detallan las alícuotas de las disoluciones utilizadas y en la 32 las absorbancias de cada muestra. Los porcentajes de recuperación obtenidos para cada una de las muestras, se presentan en la Tabla 33.

Tabla 31. Alícuotas empleadas de la muestra restituida, del Reactivo de Wade, y del volumen final de la disolución.

<i>Muestra</i>	<i>Alícuota muestra sintética (Vol±0,0002) mL</i>	<i>Alícuota RW (Vol±0,0002) mL</i>	<i>Enrase (Vol±0,0002) mL</i>
I.1	0,9979	1,0038	7,0883
I.2	1,0004	1,0009	6,9338
I.3	1,0005	1,0043	7,0228
J.1	0,6047	1,0086	6,9227
J.2	0,6058	1,0065	6,9764
J.3	0,6053	1,0066	6,9897
K.1	0,4562	1,0175	6,9472
K.2	0,4547	1,0103	6,9989
K.3	0,4580	0,9933	6,9130

Tabla 32. Absorbancia del blanco y de cada réplica analizada.

<i>Muestra</i>	<i>Abs Neta (UA)</i>	<i>Abs Analito (UA)</i>	<i>A Promedio (UA)</i>
Blanco	0,328		
I.1	0,273	0,055	0,0555
	0,272	0,056	
I.2	0,277	0,051	0,0515
	0,276	0,052	
I.3	0,274	0,054	0,0545
	0,273	0,055	
Blanco	0,328		
J.1	0,276	0,052	0,0515
	0,277	0,051	
J.2	0,273	0,055	0,0550
	0,273	0,055	
J.3	0,273	0,055	0,0555
	0,272	0,056	
Blanco	0,333		
K.1	0,292	0,042	0,0415
	0,292	0,042	
K.2	0,286	0,048	0,0470
	0,287	0,047	
K.3	0,284	0,050	0,0490
	0,285	0,049	

Tabla 33. Peso inicial, obtenido, y porcentaje de recuperación de cada muestra.

<i>Muestra</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>% R</i>
I.1	0,4606	0,3320	72
I.2	0,4606	0,2965	64
I.3	0,4606	0,3211	70

J.1	0,7739	0,4897	63
J.2	0,7739	0,5325	69
J.3	0,7739	0,5396	70
K.1	0,9972	0,5006	50
K.2	0,9972	0,5898	59
K.3	0,9972	0,6082	61

A continuación, se muestra un resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos para todas las muestras sintéticas con hierro.

Tabla 34. Resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras sintéticas que contienen sólo IP6, y para aquellas que contienen hierro en adición al IP6.

<i>C IP6 (mg/L)</i>	<i>Muestra (sin Fe)</i>	<i>% Recuperación (<math>\pm s</math>)</i>	<i>Muestra (con Fe)</i>	<i>% Recuperación (<math>\pm s</math>)</i>
90	B	79 $\pm$ 3	I	69 $\pm$ 4
150	C	79 $\pm$ 2	J	67 $\pm$ 4
200	D	75 $\pm$ 5	K	57 $\pm$ 6

Para este caso, las muestras que fueron preparadas con hierro, presentaron porcentajes de recuperación menores, que los obtenidos para las muestras que no contenían metales. Ciertamente, la presencia del hierro en las disoluciones conduce a una mayor pérdida, la cual origina la disminución de los porcentajes de recuperación.

### 5. 5. 3. EFECTO COMBINADO. MUESTRA SINTÉTICA CON HIERRO Y CALCIO.

Se propuso estudiar el efecto de la presencia del calcio y el hierro, combinados en la misma muestra sintética. Para ello, se preparó una muestra sintética de 91,47 mg/L de IP6, con las concentraciones de hierro y calcio empleadas hasta ahora, esto es, 10 y 160 mg/L, respectivamente. Se decidió trabajar a la concentración de IP6 mencionada, ya que, en el estudio del calcio, se observó un efecto sólo a esta concentración. La matriz de la muestra sintética fue 0,2 M de HCl. En la Tabla 35 se detallan las alícuotas de las disoluciones utilizadas y en la 36 las absorbancias de la muestra. El porcentaje de recuperación obtenido para esta muestra, se indica en la Tabla 37.

Tabla 35. Alícuotas empleadas de la muestra restituida, del Reactivo de Wade, y del volumen final de la disolución.

<i>Muestra</i>	<i>Alícuota muestra sintética (Vol±0,0002) mL</i>	<i>Alícuota RW (Vol±0,0002) mL</i>	<i>Enrase (Vol±0,0002) mL</i>
L.1	1,0170	1,0158	6,9816
L.2	1,0144	1,0152	6,9261
L.3	1,0176	1,0136	7,0010

Tabla 36. Absorbancia del blanco y de cada réplica analizada.

<i>Muestra</i>	<i>Abs Neta (UA)</i>	<i>Abs Analito (UA)</i>	<i>A Promedio (UA)</i>
Blanco	0,330		
I.1	0,296	0,034	0,0340
	0,296	0,034	
I.2	0,297	0,033	0,0330
	0,297	0,033	
I.3	0,296	0,034	0,0340
	0,296	0,034	

Tabla 37. Peso inicial y obtenido, y porcentaje de recuperación, calculados para la muestra sintética L.

<i>Réplica</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>% R</i>
L.1	0,4573	0,1747	38
L.2	0,4573	0,1670	37
L.3	0,4573	0,1751	38

$$\% R = (38 \pm 1)$$

Para este caso, se puede apreciar una disminución considerable del porcentaje de recuperación, al compararlo con la muestra que no contuvo metales. Asimismo, la recuperación para esta muestra sintética, resulta menor que para las muestras que poseen sólo calcio o hierro. Resulta evidente, el efecto combinado que tiene la presencia de los metales sobre el porcentaje de recuperación del método utilizado.

## **5. 6. POSIBLE CORRECCIÓN DEL EFECTO DE LOS METALES: USO DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO.**

A continuación, se planteó evaluar el uso del ácido tricloroacético (TCA), como posible solución a la interferencia de los metales, en el proceso de extracción en fase sólida.

Se ha propuesto el uso del TCA<sup>4,14</sup>, aparte del HCl comúnmente utilizado, para la extracción del IP6 de la matriz de la muestra; el cual posee ventajas sobre otros ácidos debido a que reduce las interferencias ocasionadas por las proteínas. Cabe señalar, que la utilización de uno u otro ácido extractor se han hecho indistintamente; aunque el TCA suele ser mayormente empleado en el método de cromatografía de intercambio iónico.

Resulta curioso que en ciertos trabajos donde se han reportados altos porcentajes de recuperación del IP6<sup>4,5</sup>, se ha empleado ácido tricloroacético, aunque dichos resultados no hayan sido atribuidos al uso de este reactivo en específico. Entonces, se pensó que el uso de este ácido pudo influir en la obtención de una recuperación mayor del analito.

Para estudiar el efecto del ácido tricloroacético, se prepararon dos muestras con la misma concentración de ácido fítico y de metales, pero variando la matriz ácida de las disoluciones. Una de las muestras fue preparada en 0,2 M de HCl, mientras que, la otra se elaboró en 0,6 M de TCA. Dicha concentración de TCA fue la misma concentración empleada en el trabajo de Brooks y Lampi (2001). Ambas muestras tuvieron 160 mg/L de Ca y 10 mg/L de Fe, de manera que, se tuviera el efecto combinado de ambos metales. Las dos muestras fueron tratadas y medidas al mismo tiempo. Cabe destacar que, la muestra preparada en HCl, fue la muestra L analizada en el apartado anterior. La muestra preparada en TCA, se denominó muestra N. Los porcentajes de recuperación obtenidos, se presentan en la Tabla 38.

Tabla 38. Peso inicial, obtenido, y porcentaje de recuperación de cada muestra.

<i>Muestra</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>% R</i>
L.1	0,4573	0,1747	38
L.2	0,4573	0,1670	37
L.3	0,4573	0,1751	38
N.1	0,4656	0,2916	63
N.2	0,4656	0,2862	61
N.3	0,4656	0,2984	64

Al comparar la muestra L (preparada en HCl), con la muestra N (preparada en TCA), se puede apreciar la diferencia en los porcentajes de recuperación. Véase la Tabla 39.

Tabla 39. Resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras sintéticas L y N, preparadas en diferentes matrices.

<i>Muestra</i>	<i>C IP6 (mg/L)</i>	<i>C Ca (mg/L)</i>	<i>C Fe (mg/L)</i>	<i>Matriz</i>	<i>% Recuperación (± s)</i>
L	90	160	10	0,2 M HCl	38 ± 1
N	90	160	10	0,6 M TCA	63 ± 1

El porcentaje de recuperación de la muestra preparada en TCA, resultó mayor que el obtenido para la muestra preparada en HCl. Claramente, el ácido tricloroacético contribuye a disminuir el efecto de los metales, aumentando así el porcentaje de recuperación. Aparentemente, el uso del TCA no corrige completamente el efecto de los metales. No obstante, dicha afirmación no puede asegurarse si sólo se ha empleado una sola concentración del ácido tricloroacético.

#### 5. 6. 1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO TRICLOROACÉTICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL MISMO.

Se analizaron tres muestras sintéticas que tuvieron, cada una: 90 mg/L de IP6, 160 mg/L de Ca y 10 mg/L de Fe; variando en cada caso, la concentración de ácido tricloroacético en las cuales fueron preparadas. Las concentraciones de TCA empleadas fueron: 0,3 M, 0,6 M y 0,9 M; obteniéndose tres muestras llamadas M, N y O, respectivamente. Observe que la muestra N fue la misma analizada en el punto anterior. Dicha muestra fue preparada nuevamente y analizada al mismo tiempo que las otras dos muestras. Los porcentajes de recuperación obtenidos para cada una de las muestras, se presentan en la Tabla 40.

Tabla 40. Peso inicial, obtenido, y porcentaje de recuperación de cada muestra.

<i>Muestra</i>	<i>Peso inicial (mg IP6)</i>	<i>Peso obtenido (mg IP6)</i>	<i>% R</i>
M.1	0,4688	0,3472	74
M.2	0,4688	0,3122	67
M.3	0,4688	0,3344	71
N.1	0,4701	0,3163	67
N.2	0,4701	0,2837	60
N.3	0,4701	0,3145	67
O.1	0,4724	0,1891	40
O.2	0,4724	0,1634	35
O.3	0,4724	0,2285	48

A continuación, se muestra un resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos para todas las muestras sintéticas con TCA.

Tabla 41. Resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras sintéticas M, N y O, preparadas en diferentes concentraciones de TCA.

<i>Muestra</i>	<i>C IP6 (mg/L)</i>	<i>C Ca (mg/L)</i>	<i>C Fe (mg/L)</i>	<i>Matriz</i>	<i>% Recuperación (± s)</i>
M	90	160	10	0,3 M TCA	71 ± 4
N	90	160	10	0,6 M TCA	65 ± 4
O	90	160	10	0,9 M TCA	41 ± 7

El porcentaje de recuperación que resultó más alto, fue el obtenido para la muestra preparada con la menor concentración de TCA. Dicho valor resulta muy cercano al porcentaje de recuperación obtenido para la muestra sin metales. Se puede decir entonces, que utilizando una concentración de 0,3 M de ácido tricloroacético, se logra minimizar el efecto de los metales.

## 5. 7. ESTUDIO DE LA POSIBLE PRECIPITACIÓN DEL ÁCIDO FÍTICO.

En un estudio adicional del presente trabajo, se quiso indagar un poco acerca de la interacción que se da entre el ácido fítico y los metales, la cual conduce a la disminución de los porcentajes de recuperación. Varias referencias<sup>3,4</sup> proponen que los metales provocan la precipitación del IP6, haciéndolo inasequible para interactuar con el adsorbente del cartucho SPE.

Sin embargo, este precipitado no es visible durante el procedimiento, ya que, si el sólido se forma durante la extracción con HCl, éste se confunde con el mismo cereal y luego es filtrado de la disolución. Por otro lado, es probable que dicho precipitado sea muy fino, y por lo tanto, no pueda distinguirse a simple vista.

Para evaluar lo anterior, se pasó una muestra sintética a través de un filtro de nylon y se cuantificó antes y después de ser filtrada. Esto se realizó bajo la premisa de que el precipitado quedaría depositado en el filtro. Cabe destacar, que el método de medida se ve afectado por la presencia del hierro, por lo cual, el IP6 no pudo cuantificarse en este caso, ya que las muestras no fueron tratadas en el cartucho de extracción, que permitía la eliminación de la matriz. Por esta razón, se prepararon muestras con hierro, de manera que se midió la concentración de este metal antes y después de pasar por el filtro, empleando la técnica de espectroscopia de absorción atómica en llamas (EAA).

Se preparó una muestra de 150 mg/L de IP6 y 10 mg/L de Fe en 0,2 M de HCl. Luego, se tomó una alícuota de 5 mL de dicha muestra y se diluyó a la mitad (se denominó P). Por otro lado, se tomó otra alícuota de 5 mL de la muestra, y se agregó en una inyectora de 60 mL, dispuesta verticalmente sobre el filtro de 0,45 µm. Lentamente, se filtró todo el líquido y se recolectó en un envase limpio y seco. Luego, se lavó la inyectora con 5 mL de agua destilada, y se recolectó dicho lavado en el mismo envase. El procedimiento anterior se realizó por triplicado (réplicas 1, 2 y 3).

Se prepararon 4 patrones con concentraciones de 2 a 8 mg/L de Fe. Posteriormente, tanto los patrones como las muestras filtradas, se midieron en el espectrofotómetro de absorción atómica. La curva de calibración obtenida para el Fe dio la ecuación:  $y = 0,008x - 0,004$  ( $R^2 = 0,996$ ). Los valores de concentración de las muestras, se indican en la Tabla 42.

Tabla 42. Concentración de hierro de la muestra diluida P, y de las tres réplicas filtradas.

<i>Muestra</i>	<i>C Fe (mg/L)</i>
P	5,6
1	6,6
2	6,3
3	6,0

La muestra sintética antes de pasar por el filtro dio 5,6 mg/L de Fe. Por otro lado, la muestra ya filtrada dio una concentración igual a  $(6,3 \pm 0,3)$  mg/L de Fe. La concentración de Fe de la muestra sintética, antes y después de ser filtrada, resultó similar. En este punto existen dos conclusiones que resultan válidas: no se forma precipitado entre el IP6 y el Fe, o éste es de un tamaño de partícula tan pequeño que atraviesa el filtro utilizado.

En otra experiencia, una muestra de 90 mg/L de IP6 y 10 mg/L de Fe (llamada I según la nomenclatura de los apartados anteriores) se guardó bajo refrigeración durante 5 días desde su preparación. Transcurrido este lapso, se observó que la disolución estaba turbia. Claramente, se había formado una especie de coloide que sólo fue visible tras su coagulación, después de varios días.

Se sometió la muestra al análisis de hierro por EAA ya descrito anteriormente, pero se empleó un filtro con un tamaño de poro más pequeño (0,20  $\mu\text{m}$ ). Los patrones de Fe y

las réplicas filtradas de la muestra fueron medidos en el espectrofotómetro de absorción atómica. La curva de calibración y los resultados obtenidos, se presentan a continuación.

Curva de calibración del Fe:  $y = 0,043x + 0,005$  ( $R^2 = 1$ ).

Tabla 43. Concentración de hierro de la muestra I diluida, y de las tres réplicas filtradas.

<i>Muestra</i>	<i>C Fe (mg/L)</i>
I diluida	4,3
1	< 2
2	< 2
3	< 2

Las réplicas filtradas, dieron concentraciones menores a la concentración del primer patrón. Claramente, el contenido de hierro de las muestras filtradas fue menor al valor obtenido para la muestra sin filtrar. El hierro de la disolución queda depositado en el filtro utilizado.

Por otro lado, la muestra fue analizada por el procedimiento de extracción de los apartados anteriores junto a una muestra sin Fe. Los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras (denominadas B e I), se presentan en la Tabla 44.

Tabla 44. Porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras B e I.

<i>C IP6 (mg/L)</i>	<i>Muestra (sin Fe)</i>	<i>% Recuperación (% ± s)</i>	<i>Muestra (con Fe)</i>	<i>% Recuperación (% ± s)</i>
90	B	81,4 ± 0,2	I	24 ± 4

Para la muestra B se obtuvo el mismo valor anterior, sin embargo, la recuperación de la muestra I disminuyó considerablemente. En el caso de la muestra I, no hubo repetitividad, pero el efecto del hierro se hizo más evidente. El efecto del metal se hace mayor si la muestra se deja interactuando por varios días. Dicha observación no había sido evidente puesto que, todas las muestras sintéticas analizadas hasta el momento fueron analizadas de un día a otro.

A partir de los resultados anteriores, se puede decir que la turbidez observada en la muestra I, corresponde a un coloide formado entre el ácido fítico y el hierro añadido a la disolución. Dicha interacción se hace más fuerte con el transcurso de los días, por lo cual, el factor tiempo resulta un parámetro importante en el procedimiento. En la determinación de muestras reales, donde se quieran altos porcentajes de recuperación, se sugiere que las muestras sean tratadas en el cartucho de extracción en fase sólida, lo más rápidamente posible una vez extraídas de los cereales infantiles. De esta manera, el ácido fítico y los metales extraídos en la disolución de HCl empleada, tendrán el tiempo mínimo de interacción.

## **6. CONCLUSIONES.**

A pesar de que existen varios métodos espectrofotométricos ampliamente usados para la determinación de IP6, se encontró una fuerte interferencia matricial en los sistemas de medida, en especial cuando disponemos de un excedente de ácido. Además, la transformación del IP6 en ortofosfato requirió tiempos de calentamiento muy prolongados. El método más rápido, sencillo y adecuado para cuantificar el IP6, que además no requiere transformarlo en ortofosfato, fue el basado en el Reactivo de Wade.

En el procedimiento de tratamiento de muestras de ácido fítico, las preparadas sin metales, dieron porcentajes de recuperación del analito que comprendieron entre 70 y 79 %. En este caso, la pérdida fue atribuida al método utilizado para la eliminación de ácido clorhídrico, más que a la extracción propiamente dicha. Hay que hacer notar, que si no fuese necesaria la etapa de eliminación de ácido, la recuperación estuviera en el orden del 95 %.

Se observó que los porcentajes de recuperación de ácido fítico, tienden a disminuir cuando existe calcio o hierro en la matriz de la muestra, a las concentraciones estudiadas en el presente trabajo.

La presencia del calcio en la matriz tiene un efecto negativo sobre la recuperación, para una sola de las concentraciones de ácido fítico estudiadas en el presente trabajo. Los porcentajes de recuperación de las muestras preparadas con ácido fítico y hierro, fueron menores a los obtenidos para las muestras sin metales. Dichos porcentajes variaron entre un 57 y 69 %.

Observamos que la presencia del hierro en la matriz tiene un efecto más negativo sobre la recuperación que la manifestada por el calcio. Por otra parte, el efecto combinado de ambos metales tiende a disminuir considerablemente el porcentaje de recuperación del ácido fítico (38 %).

El uso de ácido tricloroacético para simular la matriz ácida de la muestra, en lugar de la utilización de ácido clorhídrico, atenúa los efectos producidos por la presencia de metales. De esta manera, se obtienen mayores porcentajes de recuperación de ácido fítico, alcanzando hasta un 71 %.

La concentración de ácido tricloroacético que generó un mayor porcentaje de recuperación del analito, entre aquellas estudiadas en el presente trabajo, fue 0,3 M.

Si bien es cierto que se reporta la formación de complejos insolubles de IP6 y metales, nuestras observaciones denotaron que dicho precipitado no es inmediato, sino a las horas de su interacción o en el caso de formarse, deben ser coloides de muy bajo diámetro de partículas. Se puede concluir que hay una interacción importante IP6-metales, que conduce a una disminución de la concentración de IP6 libre en la extracción.

## **7. RECOMENDACIONES.**

Considerando las conclusiones presentadas en este trabajo, se sugiere realizar un estudio del efecto de los metales sobre los porcentajes de recuperación de ácido fólico, obtenidos en la etapa de extracción en fase sólida, utilizando muestras reales de cereales infantiles y empleando la técnica HPLC-RI.

Se recomienda evaluar los métodos de eliminación de ácido clorhídrico generalmente usados, en aras de disminuir las pérdidas que puedan producirse en esta etapa del procedimiento y de emplear un método robusto y satisfactorio.

Se propone el estudio del efecto de otros metales, igualmente presentes en la matriz de los cereales infantiles, que puedan comprometer la recuperación del ácido fólico.

Se recomienda la utilización de ácido tricloroacético para la extracción del ácido fólico de la matriz, para disminuir el efecto de los metales presentes en la muestra.

También, se sugiere analizar inmediatamente las muestras ya extraídas con el ácido seleccionado, de manera que las interacciones ácido fólico – metal no tengan tiempo de evolucionar.

## 8. LITERATURA CITADA.

1. Wu, P., Tian, J.-C., Walker, C. E., & Wang, F.-C. (2009). Determination of phytic acid in cereals - a brief review. *International Journal of Food Science and Technology* , 1671-1676.
2. Febles, C. I., Arias, A., Hardisson, A., Rodríguez-Álvarez, C., & Sierra, A. (2001). Phytic acid level in infant flours. *Food Chemistry* , 437-441.
3. Caripá, D. (Octubre de 2008). Determinación de minerales y ácido fítico por HPLC-RI en cereales infantiles. *T.E.G Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela* .
4. Brooks, S. P., & Lampi, B. J. (2001). Problems Associated with Measuring Phytate in Infant Cereals. *J. Agric. Food Chem* , 564-569.
5. Park, H.-R., Ahn, H.-J., Kim, S.-H., Lee, C.-H., Byun, M.-W., & Lee, G.-W. (2006). Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods. *Food Control* , 727-732.
6. Organización Mundial de la Salud. (2002). *Informe sobre la salud en el mundo 2002*.
7. Abebe, Y. e. (2007). Phytate, zinc, iron and calcium content of selected raw and prepared foods consumed in rural Sidama, Southern Ethiopia, and implications for bioavailability. *Journal or Food Composition and Analysis* , 161-168.
8. Frontela, C., García-Alonso, F. J., Ros, G., & Martínez, C. (2008). Phytic acid and inositol phosphates in raw flours and infant cereals: The effect of processing. *Journal of Food Composition and Analysis* , 343-350.

9. Chan, S. e. (2007). The concentrations of iron, calcium, zinc and phytate in cereals and legumes habitually consumed by infants living in East Lombok, Indonesia. *Journal of Food Composition and Analysis* , 609-617.
10. O'Neill, I. K., Sargent, M., & Trimble, M. L. (1980). Determination of IP6 in foods by phosphorous-31 Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* , 1288-1291.
11. Blatny, P., Kvasnicka, F., & Kenndler, E. (1995). Determination of phytic acid in cereal grains, legumes, and feeds by capillary isotachopheresis. *J. Agric. Food Chem.* , 129-133.
12. Martinez, B., Ibanez, M. V., & Rincón, F. (2002). Ácido Fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas . *ALAN* , 219-231.
13. Heubner, W., & Stadtler, H. (1914). Biochemische Zeitschrift, Zur Chemischen Physiologie and Pathologie. 422-437.
14. Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1989). *Phytates in cereals and legumes*. Estados Unidos: CRC Press, Inc.
15. Samotus, B., & Schwimmer, S. (1962). Effect of Maturity & Storage on Distribution of Phosphorus among Starch & Other Components of Potato Tuber. *American Society of Plant Biologists* , 519-522.
16. Wheeler, E. L., & Ferrell, R. E. (1971). A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chemistry* , 312-314.
17. Harland, B. F., & Oberleas, D. (1977). A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. *Cereal Chemistry* , 827-832.

18. Harland, B. F., & Oberleas, D. (1986). Anion exchange method for determination of phytates in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* , 667-670.
19. Lehrfeld, J., & Morris, E. R. (1992). Overestimation of Phytic Acid in Foods by the AOAC Anion Exchange Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 2208-2210.
20. Tangendjaja, B., Buckle, K. A., & Wootton, M. (1980). Analysis of phytic acid by high-performance chromatography. *Journal of Chromatography* , 274-277.
21. Camire, A. L., & Clydesdale, F. M. (1982). Analysis of phytic acid in foods by HPLC. *J. Food Sci.* , 47, 575.
22. Kunckles, E. B., Kuzmicky, D. D., & Betschart, A. A. (1982). HPLC analysis of phytic acid in selected foods and biological samples. *J. Food Sci.* , 47, 257.
23. Lehrfeld, J. (1989). High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Phytic Acid on a pH-Stable, Macroporous Polymer Column. *Cereal Chemistry* , 510-515.
24. Lehrfeld, J. (1994). HPLC Separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *J. Agric. Food Chem.* , 2726-2731.
25. Amaro, R., Caripá, D., Escalona, A., & Murillo, M. (2009). Evaluation of phytic acid recovery and Ca, Fe and Zn content in infant cereals: problems associated with HPLC-RI method. *Abstracts of 34th International Symposium of High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques* , 369.
26. Moldoveanu, S. C., & David, V. (2002). *Sample preparation in chromatography*. Journal of Chromatography Library, Elsevier Science B. V.
27. Mondello, L., Lewis, A., & Bartle, K. (2002). *Multidimensional Chromatography*. England: John Wiley and Sons Ltd.

28. Snyder, L., Kirkland, J., & Glaich, J. *Practical HPLC Method Development*. Segunda Edición.
29. Skoog, D., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Mc Graw Hill 5ta Edición.
30. Rubinson, K., & Rubinson, J. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Pearson Educación S. A. .
31. Chamberlin, G., & Thomas, L. (1980). *Colorimetric Chemical Analytical Methods*. England: Tintameter Ltd. Novena edición.
32. Snell, F., & Snell, C. (1949). *Colorimetric methods of analysis*. D. Van Nostrand Company, Inc.; Third Edition, Vol II.
33. Association of Analytical Communities (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Arlington, Virginia: 16th Edition.
34. Latta, M., & Eskin, M. (1980). *A Simple and Rapid Colorimetric Method for Phytate Determination*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1313-1315.
35. Wade, H., & Morgan, D. (1955). *Biochemistry Journal*, 264.