

25  
2eq.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

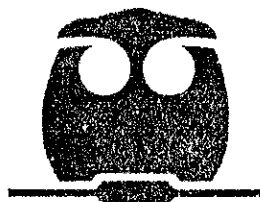
## Desarrollo de Métodos para Determinar Fitatos y Oxalatos y su Aplicación en Semillas Silvestres de Interés.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS.

PRESENTA

BRIAN ANATOLY, HERRERA VOLKOV



México D.F.



MEMBROS PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

1998

CON  
ORIGEN

266594



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente Prof.	VALLE VEGA PEDRO.
Vocal Prof.	LUCAS FLORENTINO BERNARDO
Secretario Prof.	HERNÁNDEZ INFANTE MIGUÉL
1er. Suplente Prof.	LEAL LARA HERMILO
2do. Suplente Prof.	GÁLVEZ MARISCAL AMANDA

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 111 Bioquímica y Farmacia,  
Edificio E, Posgrado, Facultad de Química, UNAM C.P. 04500.

Asesor: M. en C. Bernardo Lucas Florentino.



Sustentante: Brian Anatoly Herrera Volkov.

Brian Herrera

# FALTAN PAGINAS

De la: /

A la: 2

---

Dedicatorias.

A mi padres:

René Rubén Herrera Hdez.  
Zina Volkov Zemakova

A mi esposa:

Renée Zavaleta de Herrera

A mi hija:

Natasha Herrera Zavaleta

A mis hermanos:

Vanessa Herrera

José Luis Herrera

A mis compañeros:

Edgar Chávez Montes

Ivette Mascher Brizuela

A mi asesor de tesis:

M. en C. Bernardo Lucas Florentino

A mis amigos.

A todos ellos por su apoyo y estímulo, con mucho cariño.

Brian A. Herrera Volkov

# CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>2. GENERALIDADES</b> .....	<b>7</b>
2.1 PRINCIPALES TÓXICOS Y FACTORES ANTINUTRICIONALES EN LEGUMINOSAS COMESTIBLES	11
2.2 LEGUMINOSAS (DEFINICIÓN, VARIEDADES, NOMBRES, CARACTERÍSTICAS GENERALES) ....	15
2.3 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS EN LA ALIMENTACIÓN MUNDIAL .....	16
2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PRINCIPALES LEGUMINOSAS COMESTIBLES .....	17
2.5 GENERALIDADES SOBRE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	19
2.6 MÉTODOS PARA DETERMINAR FITATOS Y OXALATOS .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>24</b>
4.1 DETERMINACION DE FITATOS .....	26
4.1.1 <i>Fundamento</i> .....	26
4.1.2 <i>Material</i> .....	26
4.1.3 <i>Reactivos</i> .....	26
4.1.4 <i>Preparación de soluciones</i> .....	27
4.1.5 <i>Procedimiento</i> .....	29
4.1.6 <i>Reproducibilidad</i> .....	30
4.1.7 <i>Recuperación</i> .....	30
4.1.8 <i>Variabilidad intra-laboratorio</i> .....	30
4.1.9 <i>Cálculos</i> : .....	31
4.1.10 <i>DIAGRAMA DE FLUJO: Determinación de fitatos</i> : .....	32
4.2 DETERMINACIÓN DE OXALATOS .....	33
4.2.1 <i>Fundamento</i> .....	33
4.2.2 <i>Material</i> .....	33
4.2.3 <i>Reactivos</i> .....	33
4.2.4 <i>Preparación de soluciones</i> .....	34
4.2.5 <i>Procedimiento (2)</i> : .....	37
4.2.6 <i>Cálculos</i> : .....	40
4.2.7 <i>Diagrama de flujo: Determinación de oxalatos</i> : .....	41
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
5.1 DETERMINACION DE FITATOS .....	43
5.1.1 <i>Reproducibilidad de la determinación de fitatos</i> .....	46
5.1.2 <i>Recuperación en la determinación de fitatos (Tabla 5.4)</i> .....	48
5.1.3 <i>Variabilidad intra-laboratorio</i> .....	54
5.2 DETERMINACION DE OXALATOS .....	57
5.2.1 <i>Reproducibilidad de la metodología</i> .....	57
5.2.2 <i>Recuperación de la metodología</i> .....	58
5.2.3 <i>Variabilidad intra-laboratorio</i> .....	61
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>63</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>64</b>

## 1. RESUMEN

Nuestros antepasados consumían ciertos alimentos locales que les proporcionaban beneficios o eran fuentes importantes de proteína, grasa, carbohidratos, entre otros; estos alimentos después de la colonia quedaron olvidados o restringidos debido a la imposición de las culturas colonizadoras, por lo tanto actualmente se pretende encontrar o redescubrir posibles fuentes alternativas alimenticias importantes ( entre las que destacan los vegetales de la familia *leguminosae* ) ya sea para alimentación animal o inclusive para alimentación humana, por su gran potencial como complemento alimenticio y fuente importante de los nutrimentos antes mencionados.

En alimentos no convencionales es de vital importancia además de realizar una caracterización bromatológica, determinar su posible efecto tóxico o indeseable que pueda provocar dicho alimento. De aquí la importancia de realizar la determinación de factores tóxicos que provocan daños fisiológicos y anatómicos irreversibles. Además de los factores tóxicos es de suma importancia la cuantificación de los factores antinutricionales, los cuales aunque no provocan daños de toxicidad aguda con sintomatología clínica inmediata, sí pueden causar la mal absorción o la limitación de ciertos nutrimentos y producir daños subclínicos que a largo plazo por su ingesta prolongada puedan producir daños irreversibles.

Cabe mencionar que en el laboratorio de Bioquímica y Farmacia existe una línea de investigación en la búsqueda de nuevas fuentes alimenticias como suplemento en la alimentación animal y posiblemente humana. Por otra parte también se han montado metodologías para la determinación de factores tóxicos que con más frecuencia se

presentan en alimentos de origen vegetal, por ejemplo lectinas, glucósidos cianogénicos y alcaloides, entre otros. Sin embargo, también es necesaria la determinación de factores antinutricionales.

Los métodos de análisis de factores antinutricionales que se pretenden desarrollar deben ser de fácil aplicación sin equipo sofisticado y en forma de selección (screening), que permitan determinar la presencia de estos factores, que para nuestro criterio consideramos importantes como son: fitatos, y oxalatos, entre otros. En estas metodologías se pretende evitar el uso de equipo sofisticado ya que debido a su elevado costo, este muchas veces no se encuentra accesible para realizar el análisis pertinente, por lo que es de gran importancia seguir teniendo metodologías de fácil aplicación en cualquier laboratorio hasta que los equipos sofisticados se encuentren disponibles con gran facilidad.



## 2. GENERALIDADES

Cuando se ingiere un determinado alimento, puede presentarse la acumulación de una o más sustancias sin ninguna actividad nutricional, que con el tiempo pueden provocar una enfermedad o disminuir el óptimo estado de salud. Este aspecto lo presentan los alimentos, en especial los de origen vegetal (11, 14, 6). Se ha obtenido abundante información sobre la presencia de sustancias tóxicas que se encuentran en forma natural en las plantas al realizar experimentación animal. Los términos descriptivos de "Factor Tóxico" o "Tóxico" que se usan comúnmente en los alimentos, se refieren a aquellas sustancias presentes en éstos, que produzcan un efecto dañino cuando son ingeridos por el hombre y los animales. Tal daño puede ir desde efectos muy sutiles, que sólo pueden ser observados después de una prolongada ingesta del alimento en cuestión, o producir reacciones violentas que puedan incluso provocar la muerte. Dentro de los efectos que con más frecuencia se presentan por la ingesta de alimentos que contengan tóxicos, tenemos: inhibición del crecimiento, deficiencia del valor alimenticio (disminución de la digestibilidad), respuesta bociogénica, hipertrofia pancreática, hipoglicemia, daño del hígado y enfermedades neoplásticas (15, 6, 24).

Vale la pena mencionar lo expresado por el Dr. Eduard Saouma (Director General de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), quien establece: " No cabe duda que el uso, la domesticación y el cultivo de las especies vegetales más extendidas han sido determinados en gran medida por el azar, y están condicionados por los valores sociales, económicos y políticos de las culturas dominantes. Es muy probable que si el proceso hubiera sido cuidadosamente

programado y las especies hubieran sido seleccionadas en base a los datos científicos de que hoy disponemos, el resultado hubiera sido distinto". Considerando lo anterior, mediante el descubrimiento de América se pusieron en contacto dos entornos culturales tradicionales e históricos, que provocaron un cambio significativo en los hábitos alimenticios, principalmente para el nuevo continente (4).

En el curso de este intercambio desaparecieron o quedaron marginadas una gran diversidad de especies vegetales ( entre las que se encuentran algunas leguminosas ), que en el pasado habían destacado en la economía y la alimentación de vastas regiones, que cedieron su lugar a cultivos extraños que no siempre fueron bien adaptados a las condiciones agro-ecológicas locales, limitando su desarrollo económico y autosuficiencia alimentaria, por lo que sería de gran importancia retomar las especies bien adaptadas locales para un pleno desarrollo ( 4, 10, 25 ).

El continente americano tiene una gran biodiversidad, o sea, una enorme riqueza de especies animales y vegetales, lo que dió pauta a el desarrollo de culturas tan importantes como la Mesoamericana. Esta biodiversidad a nivel mundial está concentrada en regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, en épocas recientes en base al modelo agrícola-ganadero, se pone en alto riesgo la biodiversidad, ya que con tal de obtener tierras adecuadas para este sistema de monocultivos, se talan bosques silvestres o semi-silvestres que ponen en peligro de extinción el potencial germoplásmico, que se denomina "Erosión Genética".

Cada día el crecimiento de la población está más desproporcionado al suministro de alimentos, por lo cual es urgente realizar acciones tendientes a su solución, entre las

cuales se propone el estudio de alimentos "no convencionales" (entre los que se encuentran ciertas leguminosas) como complemento en la alimentación animal y humana.

Liener y otros investigadores, consideran que una solución a plazo relativamente corto, consiste en incrementar la producción de los alimentos de origen vegetal, en especial las semillas de oleaginosas tales como soya, algodón y cacahuate, o de leguminosas como frijol, garbanzo y chícharo; que en países tropicales o sub-tropicales como el nuestro, no es difícil de llevar a cabo ( 15, 9, 4, 10 ).

Los granos de los cereales junto con las semillas de las leguminosas, fueron los primeros alimentos seleccionados por el hombre, esta selección fue probablemente muy difícil en el caso de las leguminosas por dos razones: es una familia botánica amplia, con aproximadamente 600 géneros y alrededor de 13,000 especies; y segundo, aunque parezca irónico, esta familia que se tiene en gran estima por su importancia en la dieta humana y animal, contiene una amplia variedad de factores tóxicos y factores antinutricionales, que los hacen llegar a ser plantas de alto riesgo en su consumo ( 12, 17, 27 ).

A pesar de las características tóxicas de las leguminosas que se oponen a sus cualidades nutricionales y agronómicas; el estudio sistemático como alimento "no-convencional" se convierte en un reto y por lo tanto es de suma importancia desarrollar como parte fundamental el estudio toxicológico analítico, con la finalidad de poder identificar los factores tóxicos y antinutricionales, asimismo con el apoyo del avance científico y tecnológico, poder proponer un mecanismo de eliminación o disminución

de estos factores. Por todo lo anterior, es importante la investigación de nuevas fuentes de alimentos, y no caer como lo manifiesta Ferrando, en un espíritu rutinario, que en muchos casos no es otra cosa que falta de imaginación y pereza intelectual (9, 23, 7).

Los efectos nocivos de las sustancias antinutritivas pueden pasar desapercibidos en el caso de una copiosa alimentación, por otro lado, la compensación del nutriente deficitario puede mejorar rápidamente el estado general de nutrición. Cuando la carencia determina un estado grave del organismo resulta imposible restablecer la actividad normal por simple administración del elemento deficitario.

Según la naturaleza y las propiedades biológicas las sustancias antinutritivas pueden manifestar su actividad en diversas fases:

- Durante la masticación, cuando las enzimas liberadas por este proceso destruyen algunos nutrientes.
- Durante la ingestión, cuando las sustancias inhiben las hidrolasas digestivas.
- Durante el metabolismo, cuando la destoxicación de la sustancia implica una pérdida de moléculas endógenas.

Desde el punto de vista nutricional, las sustancias antinutritivas de origen natural se clasifican en función del tipo de nutrientes con los que interfiere, por ejemplo:

- Las sustancias que afectan la utilización digestiva o metabólica de las proteínas.
- Las sustancias que interfieren en la asimilación de los minerales.

- Las sustancias que inactivan o aumentan el requerimiento en vitaminas.

Los antinutrientes pueden interferir sobre uno o varios de estos grupos.

## 2.1 PRINCIPALES TÓXICOS Y FACTORES ANTINUTRICIONALES EN LEGUMINOSAS COMESTIBLES

Entre los principales tóxicos y factores antinutricionales asociados a las leguminosas y vegetales en general están: los oxalatos, fitatos, taninos, glucósidos cianogénicos, promotores de flatulencia, inhibidores de proteasas, fitohemaglutininas, etc.

Aún cuando los oxalatos se presentan en una diversidad de materia viviente, existen ciertas familias y especies de plantas que contienen relativamente grandes cantidades de esta sustancia, básicamente en su forma soluble como sales de sodio o potasio, y como sales insolubles de calcio. Su nombre (oxalatos) se le atribuye a su presencia en la planta *Oxalis* (wood sorrel) (8).

El interés por el estudio de la toxicidad de los oxalatos se debe a las incidencias de casos de envenenamiento humano graves o fatales seguidos a la ingestión de grandes cantidades de ciertas plantas (ej. ruibarbo) conocidas por contener grandes cantidades de oxalatos. La ingestión accidental de ácido oxálico en forma química pura, producía efectos corrosivos severos y otros efectos tóxicos; por tanto, se llegó a la conclusión de que los efectos graves de envenenamiento debidos a la ingestión de plantas con alto contenido de oxalatos estaban probablemente relacionados con esta característica.

Los oxalatos (ácido oxálico) interfieren en la asimilación del calcio y además

contribuyen en la formación de cálculos renales (6). La presencia de oxalato de calcio en la mayoría de los casos de cálculos renales humanos dió pauta a la preocupación del papel que tenía la ingestión de oxalatos en su formación. La insolubilidad del oxalato de calcio, dio lugar a muchos estudios en cuanto a la relación de la ingestión de oxalatos y la absorción del calcio, con la posibilidad de deficiencias de calcio debido al contenido de oxalatos en los alimentos (8).

El ácido oxálico,  $\text{HOOC-COOH}$  es el más sencillo de los ácidos dicarboxílicos. Es un sólido blanco cristalino, poco soluble en agua (alrededor del 10% a 20 °C). Es un ácido fuerte (  $\text{pK}_1$  de 1.46 y  $\text{pK}_2$  de 4.40 ) que comúnmente existe como un dihidrato. Las sales neutras de Na y K son solubles en agua, mientras que las sales alcalino térreas o metálicas son menos solubles. La sal de calcio es insoluble a pH neutro o alcalino pero se vuelve soluble en ácido.

El ácido fítico (fitato) es un constituyente común del tejido vegetal. Aunque se encuentra principalmente en cereales, se ha encontrado en soya, como un complejo de fitato-mineral-proteína. Este compuesto inhibe la unión de gastroferrina ( $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ ), disminuyendo así la absorción de iones metálicos di y trivalentes como calcio, magnesio, zinc, cobre, hierro, fósforo y molibdeno y forman complejos insolubles que no pueden ser absorbidos en el tracto intestinal (15).

Existen nueve estereoisómeros posibles del inositol (hexahidroxiciclohexano) de los cuales siete se han encontrado en la naturaleza. De todos ellos el mioinositol junto con sus derivados, es el más frecuente. La substitución de los grupos hidroxilo crea la asimetría. El término fitato incluye generalmente no solo los ésteres hexafosfato del

mioinositol sino también los de todos los demás inositoles estereoisómeros. Los fitatos son compuestos biológicos importantes puesto que representan una forma de reserva de fósforo. El contenido de fitatos en los alimentos se analiza generalmente haciendo precipitar complejos fitato-hierro.

La estructura del ácido fítico no se conoce con absoluta certeza, aunque es posible que la incertidumbre se deba a la formación de anhídridos entre los grupos fosfato individuales, reacción que puede tener lugar fácilmente durante el aislamiento, purificación y secado de los ácidos fíticos. Los fitatos y probablemente los ésteres más pequeños se acomplejan mediante enlaces iónicos a los metales esenciales de la dieta, como por ejemplo el calcio, magnesio y zinc. Los fosfoésteres de inositol más pequeños se forman durante la desfosforilación secuencial del ácido fítico mediante la acción de una fitasa. Numerosos estudios han indicado que el fitato reduce la biodisponibilidad del Mg, Ca, Zn y Fe en los monogástricos, lo que significa que la presencia de cantidades substanciales de fitato en la dieta puede dar lugar a la aparición de deficiencias minerales; los complejos se pueden formar entre el lado aniónico de una cadena proteica, los cationes metálicos y los grupos fosfato del fitato. El aumento de disponibilidad y el empleo de muchos nuevos productos derivados de las plantas, como por ejemplo aislados de proteínas de soya, derivados del salvado, así como proteínas de las plantas que pueden contener cantidades substanciales de fitatos, pueden dar lugar a la aparición de deficiencia de minerales, a menos que se obtengan productos que carezcan de fitatos, para lo que probablemente ciertas plantas se traten con fitasas con el fin de que degraden a los fitatos (21).

Los taninos son sustancias derivadas de los ácidos gálico y elágico. Estos actúan principalmente aumentando las necesidades de proteínas, pero por su actividad acomplejante de iones di y trivalentes pueden también disminuir la disponibilidad de calcio, hierro, cobre, y otros metales divalentes. Del mismo modo, los taninos contribuyen a aumentar los requerimientos en vitaminas disminuyendo las reservas hepáticas de vitamina A y la disponibilidad digestiva de la vitamina B12 (6). Desde hace tiempo se conoce la reducción en la biodisponibilidad de las proteínas cuando estas se administran junto con los taninos; sin embargo no es concluyente que estos compuestos provoquen cáncer (26).

En la naturaleza se estima que hay más de 100 especies que contienen glucósidos cianogénicos y no exclusivamente asociados a las leguminosas. El material biológico al ser macerado o dañado, puede liberar cianuro por acción enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa. El glucósido no es tóxico por sí mismo, pero sí el  $CN^-$  generado por la hidrólisis, el cual inhibe la cadena respiratoria (26).

Contenido de HCN en algunas plantas (26).

Vegetal	HCN (mg / 100 g)
Frijol ( <i>Phaseolus limatus</i> )	14.4 - 167.0
Frijol común (casos especiales)	210.0 - 312.0
Alubias ( <i>Phaseolus sp.</i> )	2.0
Chícharo	2.3
Sorgo (café)	250.0
Yuca	113.0
Linaza	53.0



Los promotores de flatulencia se presentan al consumir alimentos que contienen oligosacáridos y otros compuestos no biotransformables. Respecto a carbohidratos, el ser humano no posee actividad enzimática de  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -fructosidasa; es decir, que los siguientes azúcares no son metabolizables: rafinosa, estaquiosa, verbascosa. Estos oligosacáridos pasan al intestino delgado, en donde microorganismos de la flora intestinal producen gases como:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{CH}_4$ , siendo los causantes de este malestar.

Los inhibidores de tripsina son proteínas que han sido aisladas del frijol y de la soya. Nutricionalmente causan un retraso en el crecimiento o un bajo índice de eficiencia proteica (PER), pero pueden ser inactivados por tratamiento térmico (hasta 90% en agua hirviendo durante 3 minutos).

Las fitohemaglutininas o lectinas se les conoce por su propiedad de aglutinar los eritrocitos de la sangre humana o de otros animales, debido a la especificidad con que reconocen a carbohidratos complejos, como los que forman parte de la estructura de las membranas celulares. pero pueden ser inactivadas térmicamente. Entre los efectos tóxicos de algunas fitohemaglutininas en animales de laboratorio, se presenta un retraso en el crecimiento e incluso la muerte, y también se tienen indicios de que las hemaglutininas se pueden combinar con las proteínas de células epiteliales del intestino, impidiendo que varios nutrientes sean absorbidos.

## **2.2 LEGUMINOSAS (DEFINICIÓN, VARIEDADES, NOMBRES, CARACTERÍSTICAS GENERALES)**

Las leguminosas o legumbres, como los frijoles, chícharos y lentejas, son las semillas o granos de las plantas que pertenecen a la familia leguminoceae, de donde

proviene el nombre dado a los alimentos de este grupo (5). Esta familia se caracteriza por producir vainas y por tener en sus raíces nódulos de bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico (3). Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*) son los que probablemente más variedades presentan (blanco, canario, pinto, rojo, bayo, negro, etc.). Dentro de las leguminosas también se incluyen a los chícharos (*Pisum sativum*); el chícharo de cubierta lisa, que cuando madura produce el chícharo comercial separado y el chícharo arrugado o dulce de jardín, que se cosecha antes de madurar, y se le considera como una hortaliza verde. Así mismo se encuentran las habas (*Vicia faba*), el garbanzo (*Cicer arietinum*), las lentejas (*Lens culinaris*), los cacahuates (*Arachis hypogaea*), y el frijol soya (*Glycine max*)(5).

### 2.3 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS EN LA ALIMENTACIÓN MUNDIAL

Las leguminosas aportan el 20% de la proteína alimenticia consumida en todo el mundo (5), y la de mayor producción y consumo en el mundo, aunque no directamente, es la soya, cuyos principales países productores son Estados Unidos y Brasil. También son fuentes importantes de lípidos especialmente el cacahuete y la soya. En México, la leguminosa de mayor importancia es el frijol, del cual se cuentan con numerosas variedades, y su producción en 1993 ascendió a 1,300,000 toneladas (22).

## 2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PRINCIPALES LEGUMINOSAS COMESTIBLES

En las tablas 1 y 2 se presenta la composición química de las leguminosas más importantes (5).

*Tabla 1.* Composición de macronutrientes de algunas leguminosas (por cada 100 gramos de ración comestibles seca).

Leguminosa	Agua (%)	Calorías (Kcal)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
Frijol, común blanco	10.9	340	22.3	1.6	61.3
Frijol, pinto, rojo	8.3	349	22.9	1.2	63.7
Habas	10.3	345	20.4	1.6	64.0
Lentejas	11.1	340	24.7	1.1	60.1
Cacahuates tostados	1.8	582	26.2	48.7	20.6
Chícharos secos	9.3	348	24.2	1.0	62.7
Frijol soya	10.0	403	34.1	17.7	33.5

*Tabla 2.* Composición de micronutrientes de algunas leguminosas (por cada 100 gramos de ración comestibles seca).

Leguminosa	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Vit. A (U.I.)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)
Frijol, común blanco	144	425	7.8	0	0.65	0.22	2.4
Frijol, pinto, rojo	135	457	6.4	-	0.84	0.21	2.2
Habas	72	385	7.8	Trazas	0.48	0.17	1.9
Lentejas	79	377	6.8	60	0.37	0.22	2.0
Cacahuates tostados	72	407	2.2	-	0.32	0.13	17.1
Chícharos secos	33	268	5.1	120	0.74	0.29	3.0
Frijol soya	226	554	8.4	80	1.10	0.31	2.2

Como grupo, las leguminosas contienen aproximadamente de 20 a 35% de proteína, dos veces más que los cereales, y aproximadamente la mitad de las proteínas de la carne de res seca (64.8% de proteína y 16.3% de humedad). Los frijoles de soya maduros tienen mayor contenido de proteínas que la mayoría de las leguminosas, y son más abundantes en aminoácidos esenciales. La calidad de la proteína es tan importante como la cantidad. Las leguminosas son mejores que los cereales como fuente de aminoácidos esenciales en especial en: isoleucina, lisina, fenilalanina, treonina y valina. En particular, su alto contenido de lisina, un aminoácido esencial muy escaso en los cereales, hace que las leguminosas constituyan un buen complemento para los cereales y también porque éstos son ricos en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), mientras que las leguminosas no lo son (3).

Los frijoles y los chícharos son escasos en grasa (menos del 2%) y ricos en carbohidratos (aproximadamente 60%), los cacahuates y los frijoles de soya son las excepciones. Los cacahuates, debido a su alto contenido de aceite, se semejan a las nueces, y los frijoles de soya son tan abundantes en proteínas como en lípidos(5). El aceite de las leguminosas es rico en ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E (3). Los frijoles de soya contienen más calcio que las otras leguminosas y constituyen una fuente importante de este mineral. El contenido de fósforo de las leguminosas es alto, pero en los frijoles maduros se encuentra en gran parte como ácido fítico, en contraste con los inmaduros. Las leguminosas son buena fuente de hierro y tiamina, pero no lo son tanto de riboflavina y niacina, con excepción de los cacahuates que son fuente excelente de niacina. Las leguminosas aportan además vitamina B<sub>6</sub>, folacina, ácido pantoténico,

biotina, y otras vitaminas del complejo B. El ácido ascórbico está ausente en las leguminosas y el valor de vitamina A es prácticamente nulo. El contenido de almidón de la mayoría de las leguminosas es alto (5).

## 2.5 GENERALIDADES SOBRE MÉTODOS ANALÍTICOS

Las técnicas de análisis clásico o química húmeda como volumetrías y gravimetrías se utilizan todavía en muchos laboratorios y también se enseñan ampliamente en los cursos de Química Analítica. Dichas técnicas suministran excelentes introducciones a la manipulación y otras prácticas requeridas en el trabajo analítico; son ideales para el análisis de alta precisión, especialmente cuando utiliza un pequeño número de muestras y son necesarias para el análisis de materiales estándar. Sin embargo, en este momento muchos análisis se efectúan por métodos instrumentales. Las técnicas que utilizan espectrometría de absorción y emisión a varias longitudes de onda, los métodos electroquímicos, espectrometría de masas, cromatografía gaseosa y líquida y métodos radioquímicos y térmicos, probablemente suponen 90% o más de todo el trabajo analítico actual. Esto se debe a su alta sensibilidad que permite detectar especies químicas a extremadamente bajas concentraciones, además para una gran variedad de muestras el análisis instrumental suele ser más rápido y barato (una vez que ya se tiene el equipo) que por los métodos clásicos. Los instrumentos analíticos modernos tienen la ventaja de poderse poner en conexión con computadoras, haciendo así menos laborioso el análisis, monitoreo y la captura de datos (16).

El análisis de tipo selección (*screening*) que se elabora en este trabajo pretende

utilizar metodologías que se puedan aplicar en cualquier laboratorio por dos razones principales: que se puedan realizar en laboratorios donde no se tengan todavía los recursos suficientes para adquirir equipos sofisticados como un aparato de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y donde el método analítico empleado no necesariamente deba ser de una alta sensibilidad como el HPLC ya que las sustancias en estudio en el material seleccionado se encuentran en concentraciones altas.

## 2.6 MÉTODOS PARA DETERMINAR FITATOS Y OXALATOS

De acuerdo a la revisión bibliográfica, la cual se realizó tanto en el Centro de Información Químico-Tecnológico de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, como la consulta directa al acervo de la biblioteca de posgrado de la misma institución, se encontraron diversos métodos para la determinación cuantitativa de fitatos y oxalatos; en el caso de fitatos se encontraron métodos principalmente colorimétricos y cromatográficos. Se seleccionó un método colorimétrico propuesto por Haug y Lantzsch (13) debido a que el material que manejaron era similar al que se estudia en éste trabajo, además es sencillo, rápido y de fácil aplicación en cualquier laboratorio. La metodología mostró una baja variación entre los resultados y comparada con otros métodos también mostró una mínima variación. Este método realiza la medición del fitato indirectamente al igual que muchos otros métodos debido a que no existen reactivos ni métodos específicos para determinar fitatos, por lo que se depende de la estimación del inositol, el fosfato o de la relación estequiométrica existente entre el fitato y algún catión que pueda ser medido

fácilmente. Los métodos más comunes se derivan de los propuestos por Heuber y Stadler, quienes realizaron determinaciones por medio del complejo férrico insoluble en ácido diluido. El fitato es un ácido fuerte y forma una gran variedad de sales con algunos metales pesados. La formación de una sal en particular es dependiente del pH y de la presencia de cationes secundarios, entre los cuales el calcio ha sido el más ampliamente mencionado. Las sales fíticas férricas y de escandio son las menos solubles en ácido diluido y se disocian en ácido concentrado. Las sales de zinc y de cobre son lo más insolubles a valores de pH entre 4 y 7; las de calcio, magnesio y bario precipitan mejor bajo condiciones ligeramente alcalinas. A pH 7.4 el fitato forma complejos con metales en el siguiente orden decreciente:  $\text{Cu}^{++}>\text{Zn}^{++}>\text{Co}^{++}>\text{Mn}^{++}>\text{Fe}^{+++}>\text{Ca}^{++}$ . La presencia de dos o más cationes en la precipitación de sales del fitato tiene una acción sinergista incrementando la cantidad de precipitado metálico precipitado. Este fenómeno ha sido demostrado solo para zinc y calcio y para cobre y calcio a un pH = 6 (18, 19).

Para los oxalatos se encontraron métodos cuantitativos volumétricos, fluorimétricos, y por colorimetría. El primero resultó ser aplicado en alimentos (verduras enlatadas), sencillo, relativamente rápido y de fácil aplicación, por lo que fue elegido. Otra razón por la cual se seleccionó la metodología propuesta en el AOAC para determinar oxalatos en verduras enlatadas es que son metodologías ya validadas y que se ha demostrado que funcionan en materiales biológicos complejos como lo son los vegetales y los materiales en estudio. En los materiales que se estudian en este trabajo, el contenido de oxalato es relativamente grande y conforme a nuestros objetivos, no se

esperan determinar trazas de estos compuestos, sino que se esperan detectar cantidades elevadas. Otras metodologías encontradas se basan más en análisis clínicos de orina y tejidos biológicos por lo que la metodología propuesta en el AOAC se adapta mejor a nuestro experimento (2).



### 3. OBJETIVOS

- Montar y validar metodologías que sean relativamente sencillas, rápidas y de adecuada sensibilidad, tipo selección (screening), preferentemente sin la necesidad de utilizar equipo sofisticado para el ensayo en materiales biológicos complejos como son los alimentos de origen vegetal.
- Aplicar los métodos propuestos en material biológico, con la finalidad de una mejor caracterización de aquellos alimentos no-convencionales.

## 4. METODOLOGÍA

Se recolectaron vainas secas de cada leguminosa o se consiguieron las semillas ya limpias. De estas vainas se tomaron las semillas, procurando escoger las que se encontraban en buen estado, maduras y de tamaño y color uniformes. Las semillas se tamizaron en seguida con el fin de eliminar polvo y cualquier residuo de materia extraña (ramas, pedazos de vaina, etc.). En el caso de los vegetales utilizados como el ruibarbo, acelga, espinaca y té negro se seleccionaron lo más fresco posible, se descartaron las hojas en mal estado y se secaron.

Las muestra de referencia utilizada para la determinación de fitatos fue el maíz amarillo, con un contenido de ácido fítico bibliográfico de 0.519-1.254% (9).

Las muestras de referencia utilizadas para la determinación de oxalatos y sus contenidos de oxalato de acuerdo a la bibliografía son: Ruibarbo con 0.1-1.3%, Acelga con 0.3-0.9%, Espinaca con 0.1-1.2% y Té negro con 0.13-2.0%.

Se utilizaron estas muestras debido a que son las que en la bibliografía reportan su contenido de oxalatos, y así se pueden comparar los datos experimentales con los teóricos y valorar la metodología aplicada.

Se molieron las semillas y vegetales con malla de 1 mm. y la muestra se guardó en frascos de vidrio opaco cerrados.

Muestras para aplicarle	- Pata de Vaca ( <i>Bauhinia purpureae</i> )
los métodos validados:	- Cacahuanano ( <i>Gliricidia sepium</i> )
	- Colorín ( <i>Erythrina americana</i> )
	- Frijol gordo ( <i>Phaseolus</i> sp.)
	- Frijol sarabando ( <i>Vigna unguiculata</i> )

Como estas metodologías se pretenden aplicar a leguminosas no convencionales de las cuales no se tiene ninguna información acerca de la cantidad de oxalatos y fitatos que estas pudieran contener, se ensayaran primero en vegetales de los que si se tiene una referencia en cuanto a su contenido de éstos. De los resultados que se obtengan se calculará su reproducibilidad, precisión y recobro. Una vez obtenidos estos datos se aplicarán entonces estas metodologías a las leguminosas en estudio.

## 4.1 DETERMINACION DE FITATOS

### 4.1.1 Fundamento

La determinación de fitatos se basa en la extracción del ácido fítico por medio de agitación mecánica en medio ácido del material vegetal en estudio, seguido de la adición de una cantidad conocida de Fe III en exceso, el cual formará un complejo insoluble con el fitato. Posteriormente se cuantifica el fierro residual (Fe III) que el ácido fítico no alcanzó a acomplejar mediante una reacción colorida que se produce con la solución de la 2,2' - Bipiridina y que es fácilmente medible espectrofotométricamente.

### 4.1.2 Material

- Pipetas volumétricas.
- Placa de calentamiento en bloques. Supelco Blok Heater, Supelco Inc. No. de Catálogo 3-3315
- Tubos de centrífuga con tapón esmerilado y dispositivo de cierre.
- Centrífuga. DYNAC, Clay Adams, No. de Catálogo 0101.(3000 g. = 1700 rpm.)
- Espectrofotómetro, Sequoia-Turner Corporation, modelo 340.

### 4.1.3 Reactivos

- Sal sódica del Acido Fítico. (Sigma No. P- 5756), tipo V, 98% pureza, 15.3% humedad.
- HCl 0.2 N y concentrado.

- Sulfato férrico (III) amoniacal.12H<sub>2</sub>O (Merck art. 3776), P.M. 482.2, 99.2% pureza.
- 2,2' - Bipyridina. (Merck art. 3098), P.M. 156.19, 99.5% pureza.
- Acido tioglicólico (Merck art. 700)
- Solución de referencia de fitato (Solución 1)
- Solución 2; Solución Férrica (Fe III) (Solución 2)
- Solución 3; Solución de 2,2' - Bipyridina (Solución 3)

#### 4.1.4 Preparación de soluciones

1.- Solución de Referencia de Fitato: Se utiliza la sal sódica del Acido fítico. La solución de referencia (patrón), se prepara para que contenga 1.5 mg/ml de fitato de sodio con HCl 0.2 N. Las soluciones para la curva patrón se preparan diluyendo el patrón (solución 1) con HCl 0.2N en un rango de 3 a 30 µg/ml de fósforo de fitato (aproximadamente de 1.2 a 11.7 ml. de la solución patrón en 100 ml. de HCl 0.2N \*).

El fitato de sodio y/o el ácido fítico contienen 6 átomos de P por lo que (6 × 30.97) = 185.82 g de P/ mol. El Peso Molecular del ácido fítico es de 660 g /mol. El Peso Molecular del fitato de sodio es de 923.8 g /mol.

La solución patrón contiene:

$$\frac{1500 \mu\text{g fitato de sodio}}{\text{ml}} \times \frac{185.82 \mu\text{g P}}{923.8 \mu\text{g fitato de sodio}} = 301.72 \mu\text{g P / ml}$$

Ejemplo para curva patrón (\*):

Tubo	ml Patrón (301.72 $\mu\text{g P/ml}$ )	Conc. Final ( $\mu\text{g P/ml}$ )
1	1	3.0172
2	2	6.0344
3	4	12.0688
4	6	18.1032
5	8	24.1376
6	10	30.1720

2.- Solución 2; Solución Férrica: Disolver 0.2 g. sulfato férrico amoniacal  $12\text{H}_2\text{O}$  (Merck art. 3776) en 100 ml. 2N HCl y aforar a 1000 ml. con agua destilada.

3.- Solución 3; Solución de 2,2' - Bpiridina: Disolver 1 g. 2,2'-Bpiridina (Merck Art. 3098) y 1 ml ácido tioglicólico (Merck art. 700) en agua destilada y aforar a 100 ml.

Estas tres soluciones son estables a temperatura ambiente por varios meses.

#### 4.1.5 Procedimiento

Se pesan de 1 a 3 gramos de muestra y se colocan en un matraz Erlenmeyer (la muestra debe de estar seca y desengrasada si su contenido de grasa es mayor a 5%, ya que un alto contenido en grasa puede causar interferencias), se le adicionan aproximadamente 70 ml. de HCl 0.2 N y se somete a agitación mecánica (parrilla de agitación magnética) por espacio de 20 minutos. Se lleva a un aforo de 100 ml con HCl 0.2 N. Se filtra a través de papel de filtración rápida (Whatman No. 40 o equivalente). Se toma una alícuota de 0.5 ml. del extracto filtrado (3-30 mg de fósforo fítico/ml de extracto) y se coloca en un tubo de centrifuga con tapón esmerilado y que cuente con un dispositivo de cierre (clip acondicionado). Se adiciona 1 ml. de la solución 2, se tapa el tubo y se asegura con el dispositivo de cierre. Se calienta el tubo en un baño de agua hirviendo o una placa de calentamiento en bloques a una temperatura de  $95 \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Asegurarse que dentro de los primeros 5 minutos los tubos queden bien tapados.

Dejar atemperarse por 2-3 minutos y enfriar en agua con hielo por 15 min. y después dejar llegar a temperatura ambiente. Mezclar el contenido del tubo y centrifugar por 30 minutos a 3000 g. o 1700 rpm. en la centrifuga Dynac. Transferir 1 ml. del sobrenadante a otro tubo de ensaye y añadir 1.5 ml. de la solución 3, medir la absorbancia a 519 nm. usando agua destilada como blanco. Para evitar desviaciones en las lecturas se recomienda leer después de un tiempo definido una vez llevada a cabo la reacción con la 2,2' - Bipyridina en un rango de 0.5-1 minutos.

NOTA: El rango de detección de esta metodología es de 10.6 - 117.2  $\mu\text{g}$  ácido fítico / ml.

#### 4.1.6 Reproducibilidad

Se debe de realizar varias veces la misma prueba (3 mínimo) a un material del cual se conoce el contenido de fitatos con el fin de conocer la variación existente en el método, y de esta manera conocer la precisión.

#### 4.1.7 Recuperación

Para determinar la recuperación en la metodología se debe de conocer el contenido de fitato de algún material por medio de esta misma metodología. Se añade una cantidad conocida de fitato al material del que se conoce su contenido de fitato y se le hace la determinación calculando así la cantidad recuperada del fitato añadido, con respecto al valor teórico.

#### 4.1.8 Variabilidad intra-laboratorio

Para determinar la variabilidad intra-laboratorio, se debe aplicar la metodología por varios colaboradores del mismo laboratorio y se compara su resultado con el valor obtenido por el analista.

Una de las distribuciones que tienen mayor uso en el análisis de datos provenientes de experimentos científicos es la llamada  $t$  de Student. Esta distribución fue descubierta por William Sealy Gosset (1876-1937), y debe su nombre al hecho de que Gosset publicó varios artículos bajo el seudónimo de Student. La distribución  $t$  es simétrica, con media cero y de forma muy semejante a la normal estándar.

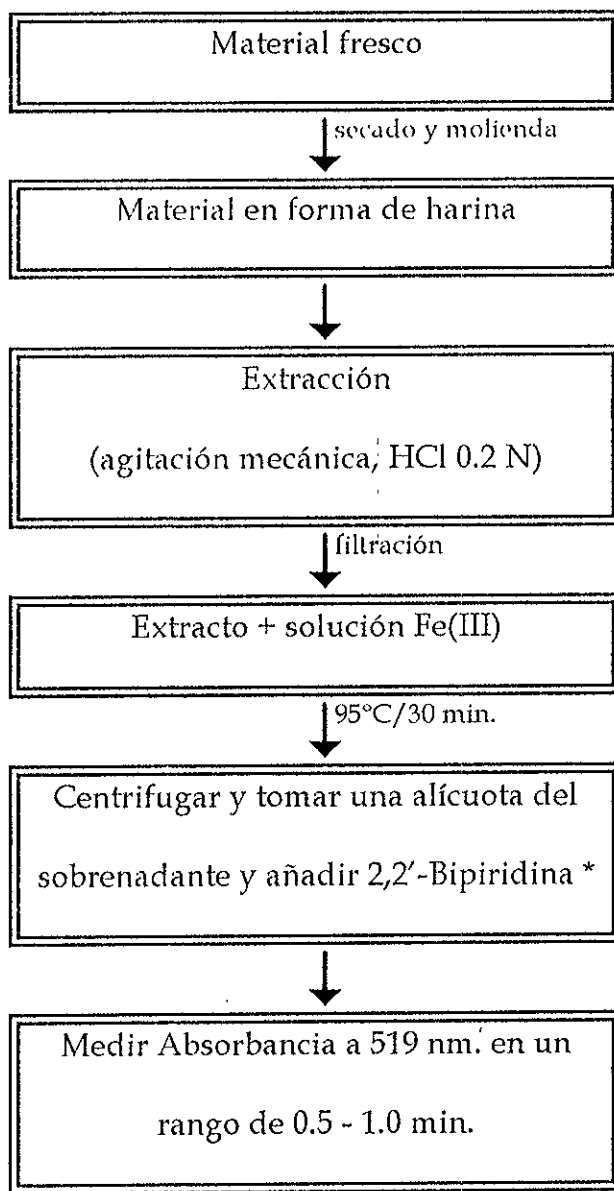


#### 4.1.9 Cálculos:

Relación existente entre el Pfitico y Acido fitico:

$$3.0172 \mu\text{g. Pfitico} \times \frac{660 \mu\text{g. acido fitico}}{185.82 \mu\text{g. Pfitico}} = 10.7166 \mu\text{g. acido fitico}$$

## 4.1.10 DIAGRAMA DE FLUJO: Determinación de fitatos:



\* En donde al añadir la 2,2' - Bipiridina se forma un complejo Fitato-Fe(III) y se mide el Fe residual espectrofotométricamente.

## 4.2 DETERMINACIÓN DE OXALATOS

### 4.2.1 Fundamento

La determinación de oxalatos se basa en la extracción del ácido oxálico por medio de calentamiento y agitación mecánica en medio ácido del material vegetal en estudio, después precipitando el oxalato como oxalato de calcio y cuantificándolo por medio de una determinación permanganimétrica en donde se realiza una titulación del ácido oxálico ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) con una solución valorada de  $\text{KMnO}_4$  0.01 N (Solución 1); en donde el ácido oxálico se oxida hasta  $\text{CO}_2$ .

### 4.2.2 Material

- Parrilla con agitación magnética.
- Matraz digestor de 600 ml. Bercellius.
- Digestor LABCONCO No. catálogo 30001
- Tubos cónicos para centrifuga de 50 ml.
- Centrifuga. DYNAC, Clay Adams, No. de Catálogo 0101.
- Papel Whatman No. 30.

### 4.2.3 Reactivos

- HCl 6N
- Alcohol Caprílico (1-octanol).
- Reactivo de Acido tungstofosfórico (1)
- Buffer de Acetato (2)

- Líquido de lavado (3)
- $\text{KMnO}_4$  0.01 N (4)
- $\text{NH}_4\text{OH}$
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 + 9 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

#### 4.2.4 Preparación de soluciones

1. Reactivo de Acido tungstofosfórico: Disolver 2.5 g de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en la mezcla de 4 ml.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y 50 ml.  $\text{H}_2\text{O}$  y aforar a 100 ml con  $\text{H}_2\text{O}$ .
2. Buffer de Acetato pH=4.5: Solución a) Disolver 2.5 g  $\text{CaCl}_2$  (anhidro) en 50 ml.  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1+1) (una parte de agua y una parte de ácido). Solución b) Disolver 33 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  diluido y aforado a 50 ml. con agua destilada. El buffer de acetato se prepara mezclando ambas soluciones a y b. Se ajusta el pH.
3. Líquido de lavado: Diluir 12.5 ml. de ácido acético conc. a 250 ml. con agua destilada, añadir polvo de Oxalato de Calcio (se satura con una pequeña cantidad de ácido oxálico), mezclar y dejar reposar; repetir adición y mezclado hasta saturación. Enfriar a  $4^\circ\text{C}$  y almacenar en refrigeración. Conservar el líquido de lavado frío y filtrar la cantidad necesaria antes de su uso.
4.  $\text{KMnO}_4$  0.01 N
  - a) Preparación del  $\text{KMnO}_4$  0.01 N: (20)
    - Pesar 0.32 g a 0.33 g de  $\text{KMnO}_4$  puro sin preocuparse por la exactitud de la pesada.

- Disolver el  $\text{KMnO}_4$  en un litro de agua destilada en un matr az de 1.5 litros o mayor.
- Calentar la solución hasta que hierva y dejar hervir de 15 a 20 min. evitando que la ebullición sea tumultuosa.
- Dejar enfriar y filtrar en lana de vidrio muy fina, en asbesto purificado o preferentemente con un filtro de vidrio. (se utilizó filtro de vidrio con porosidad ASTM 4-5.5)
- Recibir en frasco ámbar (protegido de la luz) limpio y con boca esmerilada.

NOTA: Se puede forrar la botella con papel obscuro.

b) Titulación de la solución de  $\text{KMnO}_4$  con oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ):

- Pesar con exactitud 0.02-0.03 g de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  previamente secado a 100-110  C y colocar en un Erlenmeyer de 250-300 ml.
- Disolver en agua (50-70 ml) y agregar de 15-20 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) diluido 1:8 (1 parte de ácido:8 partes de agua).
- La solución se calienta a 70  C y se titula con agitación dejando caer la solución de permanganato de potasio lentamente hasta una coloración rosa permanente.

c) Cálculos:

Se pesaron 0.0279 g de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .

ml gastados de la solución de  $\text{KMnO}_4 = 39.8$  ml

El peso equivalente del oxalato es igual a la mitad de su peso molecular:  $134/2 = 67$  g.

correspondientes a 1000 ml de una solución normal de  $\text{KMnO}_4$ . Por lo tanto el

miliequivalente es 0.067, o sea lo que corresponde a un mililitro de solución normal.

$(0.0279/0.0670) = 0.4164$  ml exactamente normales (equivalentes a los 39.8 ml gastados).

39.8 ml ----- 0.41641791 N

1 ml ----- x

x =  $\text{KMnO}_4$  0.0105 N

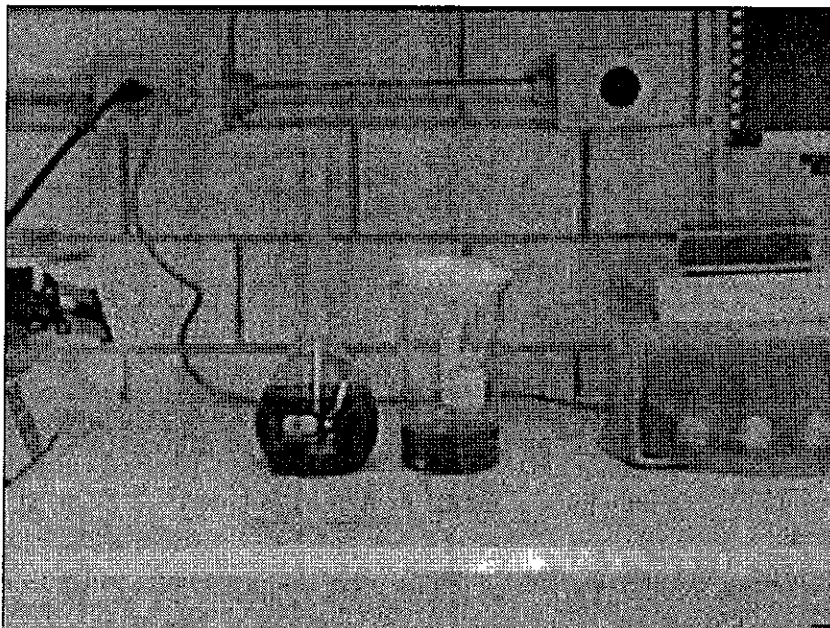
#### 4.2.5 Procedimiento (2):

Se pesan 5 a 10 g de harina del material en estudio, se coloca dentro de un vaso bercellius graduado (digestor de fibra) de 600 ml, se agregan 200 ml (en marca del vaso o con probeta) de agua destilada y se agita mecánicamente con parrilla de agitación magnética por un espacio de 15-20 minutos. Se lleva a 300 ml con agua destilada (en la marca de graduación del vaso) enjuagando las paredes, añadir 55 ml de HCl 6 N, 2 gotas de 1-octanol y se lleva a ebullición durante 15 minutos en reflujo en el digestor, dejar enfriar. Se lleva a un aforo de 500 ml con agua destilada enjuagando las paredes del vaso, agitar y se deja reposar toda la noche. Se filtra a través de papel de filtración Whatman No. 4 y se desechan los primeros 100 ml. (con la finalidad de acondicionar nuestro sistema).

Se toma una alícuota de 25 ml. en un matrás Erlenmeyer de 50 ml. y se añaden 5 ml del reactivo del ácido tungstofosfórico, dejando reposar por un tiempo mínimo de 5 horas. Se filtra a través de papel de filtración rápida (Whatman No. 40 o equivalente). Se toma una alícuota de 20 ml. del filtrado y se depositan en un tubo cónico para centrífuga de 50 ml. Se añade hidróxido de amonio gota a gota con cuidado hasta un pH= 4 - 4.5 utilizando un potenciómetro. Una vez logrado este pH añadir 5 ml. de la solución precipitante y amortiguadora (buffer) de acetato y mezclar con una varilla de vidrio, enjuagarla con un pequeño chorro de agua destilada de la piseta y dejar reposar toda la noche (dentro del tubo de centrífuga). Se centrifuga a 3000g (1700 r.p.m. en nuestra centrífuga) por mínimo 15 minutos para compactar el precipitado. Se decanta el sobrenadante con una inversión suave del tubo de centrífuga. Una vez obtenido el

precipitado de oxalato de calcio hay que tener cuidado de no romper o agitar el precipitado. Se detiene el tubo invertido sobre papel filtro hasta que todo el sobrenadante escurra teniendo precaución de que no se vaya a caer el precipitado. Se lava el precipitado con 20 ml del líquido de lavado frío, aplicándose en forma de un chorro fino rompiendo completamente todo el precipitado. Se Repite la centrifugación y el drenado del líquido de lavado por completo. Se añaden 5 ml. de  $H_2SO_4$  (1+9) al precipitado y se disuelve el precipitado. Homogeneizar en un matríz Erlenmeyer de 250 ml., enjuagar el tubo con 20 ml de  $H_2O$  destilada y 2 veces más con 5 ml de  $H_2O$  destilada a la vez.

Se calientan la muestra y el blanco (5 ml.  $H_2SO_4$  (1+9)) en una parrilla con calentamiento temperatura baja y agitación magnética. Se titulan las soluciones calientes (por lo menos  $60^\circ C$ ) con  $KMnO_4$  0.01 N hasta que persista una coloración rosa por 30 seg.



Extracción de oxalatos como ácido oxálico para la determinación de oxalatos.





Titulación en caliente de ácido oxálico en la determinación de oxalatos.

NOTA: El rango de detección de esta metodología es de 140 a 700 mg de ácido oxálico.

La reproducibilidad, recuperación y variabilidad intra-laboratorio se realizan de manera similar al análisis de fitatos.

## 4.2.6 Cálculos:

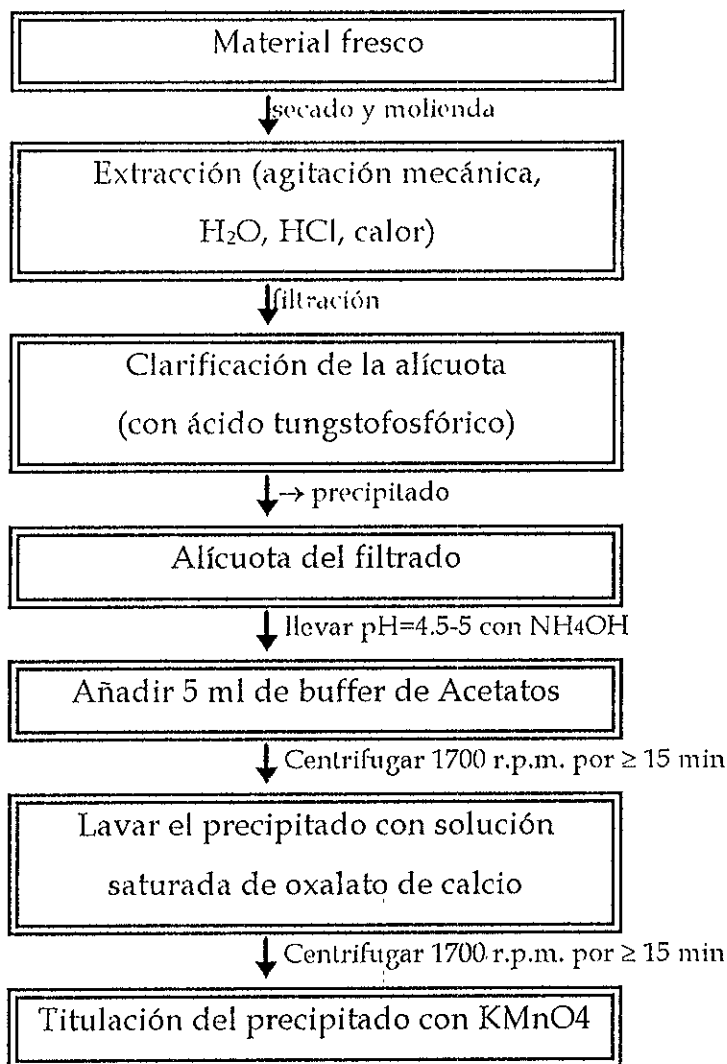
$$(\text{ml. KMnO}_4 \text{ (titulación)} \times \text{Normalidad del KMnO}_4 \times \text{meq.} \times 1000 \times 30) = \text{mg. ác. oxálico}$$

↑  
0.45 meq. para ácido oxálico

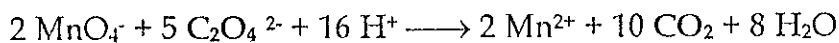
$$\frac{\text{mg. ác. oxálico} \times (100 - \% \text{Humedad muestra})}{1000 \times \text{g. muestra}} = \% \text{ ácido oxálico}$$

\* La Normalidad del  $\text{KMnO}_4$  utilizado = 0.01046 N

## 4.2.7 Diagrama de flujo: Determinación de oxalatos:



En donde se oxida el oxalato hasta  $\text{CO}_2$  como sigue:



## 5. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

A continuación presento los resultados de humedad y grasa que se determinaron para las muestras utilizadas para el análisis de fitatos y oxalatos

Tabla 5.0. Humedad y grasa en materiales utilizados:

MUESTRA	HUMEDAD %	GRASA %
Espinaca	89.33	---- (b)
Acelga	88.19	---- (b)
Ruibarbo	94.1	---- (b)
Cacahuanano	4.69	23.90
Pata de Vaca	5.30	19.53
Colorín	6.33	19.77
Frijol Gordo	10.10	1.10
Frijol Sarabando	10.90	2.20
Té negro	---- (a)	---- (b)
Maíz	8.71	---- (b)

a.- El té negro no se consiguió como hojas frescas sino que fue comprado ya seco y molido, por lo que debido a la manipulación, es más preciso usarlo como material seco y así se utilizó en la metodología.

b.- No se le determinó el contenido de grasa debido a que como los frijoles su contenido es muy bajo y no causa alteraciones en la confiabilidad del método.

## 5.1 DETERMINACION DE FITATOS

En la tabla 5.1 se presentan los datos promedio obtenidos para la curva patrón en la determinación de fitatos en el rango recomendado. Utilizando agua como blanco.

Tabla 5.1. Curva patrón.

conc. Fitato $\mu\text{g P fit/ml}$	conc. Fitato $\mu\text{g ác. Fítico/ml}$	Absorbancia promedio
3.0172	10.7166	1.3485
6.0344	21.4331	1.3210
12.0688	42.8663	1.1085
18.1032	64.2994	0.9245
24.1376	85.7325	0.7680
30.1720	107.1656	0.6385

Datos de Regresión lineal como ác. fítico:

$$y = mx + b \quad m = -0.0078, \quad b = 1.4481, \quad r = -0.9963$$

En la Tabla 5.1 se presentan los datos de una curva patrón de ácido fítico (Gráficos 5.1 y 5.2), calculándose una  $r = -0.9963$  que significa que hubo una alta correlación entre las lecturas y un comportamiento en la metodología casi lineal en el rango analizado. Esto nos indicó que la curva patrón para la determinación de fitatos es confiable.

Se observó una pendiente negativa debido a que existe una relación inversamente proporcional ya que a mayor concentración de fitato se une mayor cantidad de Fe(III) formando el complejo fitato-ferro y así agotándose cada vez más el Fe(III) en solución; el cual es el que reacciona con la 2, 2, - Bipyridina formando el compuesto colorido.

Gráfico 5.1 Curva patrón de fitato expresado como fósforo:

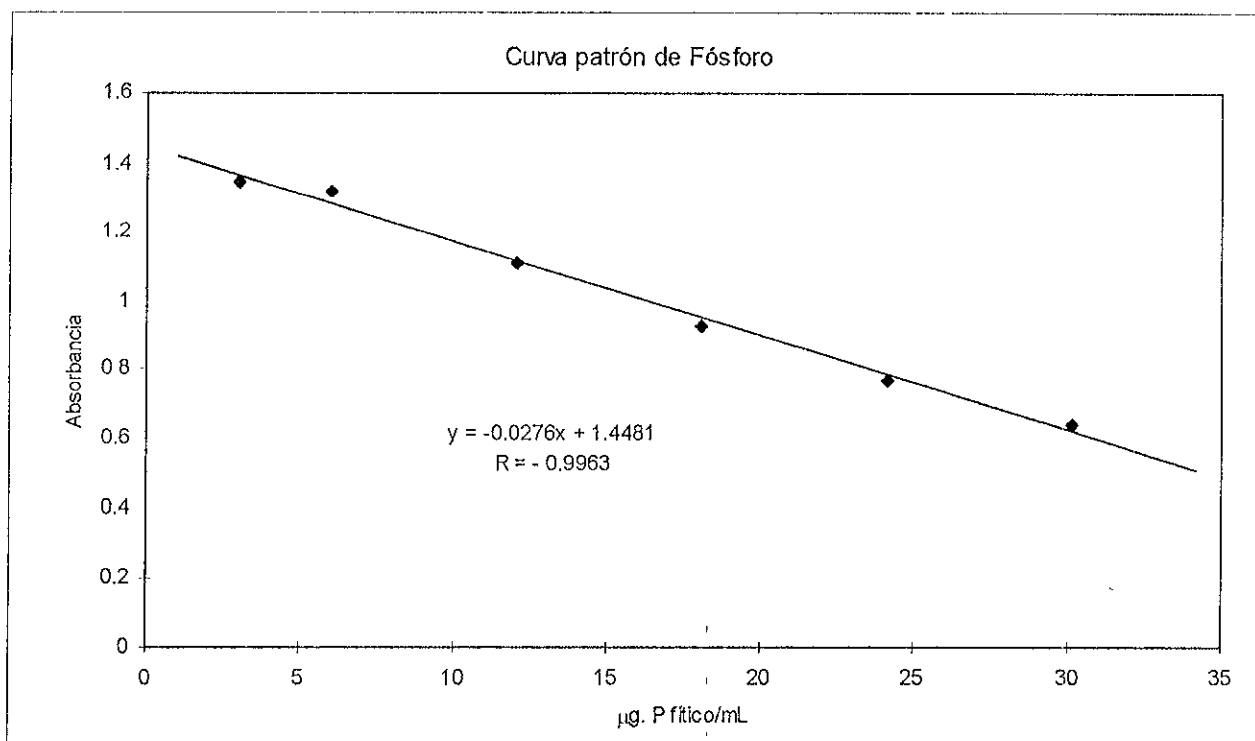
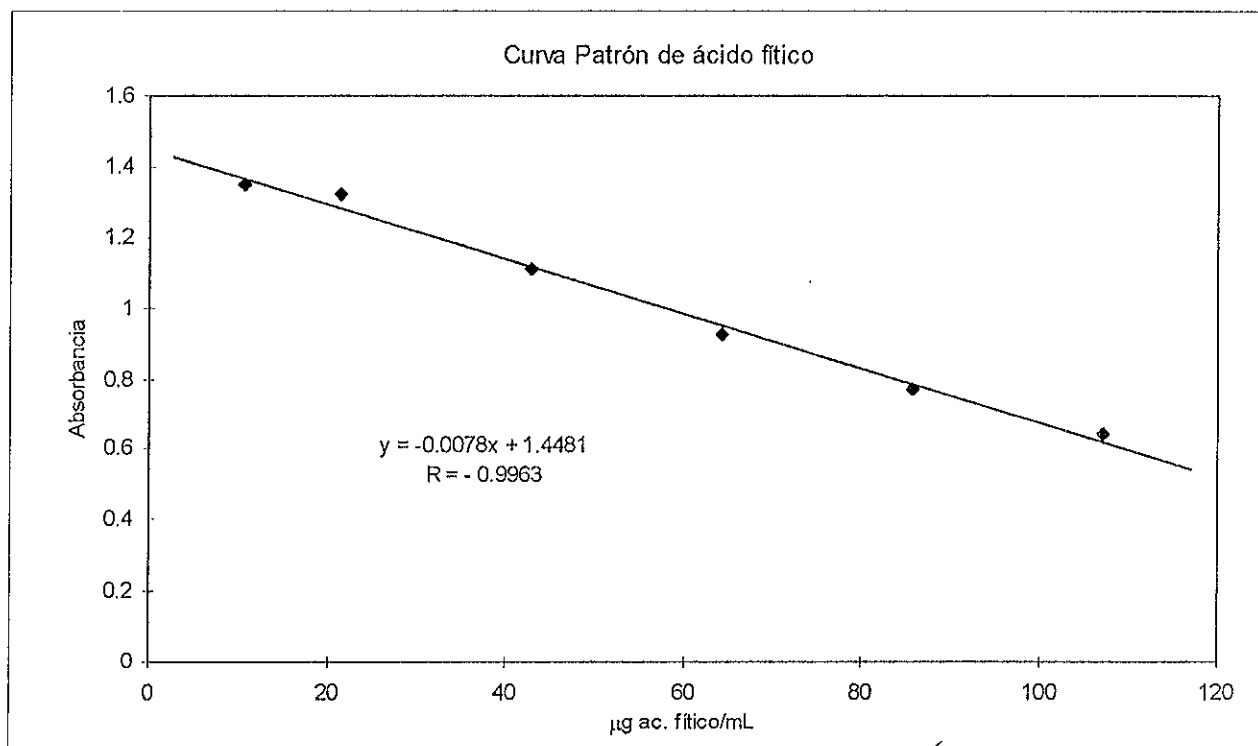


Gráfico 5.2 Curva patrón de fitato expresado como ácido fítico:



### 5.1.1 Reproducibilidad de la determinación de fitatos

En las tablas 5.2 y 5.3 se expresan los datos experimentales obtenidos del análisis repetitivo de la muestra para verificar la reproducibilidad de la metodología.

Tabla 5.2

Reproducibilidad del análisis de ácido fítico en maíz amarillo expresado como P fítico

Tubo	Absorbancia	peso de muestra para extracto	$\mu\text{g P fítico/ml}$ de extracto	$\mu\text{g P fítico/gr}$ de muestra
1	1.001	0.75	16.1993	2159.9034
2	0.902	0.75	19.7862	2638.1643
3	0.914	0.75	19.3514	2580.1932
4	1.241	0.3	7.5036	2501.2077
5	1.234	0.3	7.7572	2585.7488
			promedio	2493.0435
			d.s.	192.5476
			c.v.	7.7234%



Tabla 5.3

Reproducibilidad del análisis de ácido fítico en maíz amarillo expresado como ác. fítico

Tubo	Absorbancia	peso de muestra para extracto	$\mu\text{g}$ ác. fítico/ml de extracto	$\mu\text{g}$ ác. fítico/gr de muestra
1	1.001	0.75	57.3205	7642.7350
2	0.902	0.75	70.0128	9335.0427
3	0.914	0.75	68.4744	9129.9145
4	1.241	0.3	26.5513	8850.4274
5	1.234	0.3	27.4487	9149.5727
			promedio	8821.5385
			d.s.	681.3224
			c.v.	7.7234%

En cuanto a la reproducibilidad del experimento se observa que a pesar de ser un método muy sensible, solo tuvo un coeficiente de variación de 7.7%. Debido a la sensibilidad del método se debe trabajar con cautela ya que si no se utilizan micropipetas y macropipetas para maniobrar con las soluciones que producen coloración y las alicuotas pueden existir mayores variaciones.

Para el maíz se encontró que su contenido de fitato se encuentra dentro del rango teórico ( 5190 - 12540  $\mu\text{g}$  de ácido fítico / gr ), por lo que la metodología se considera apropiada para determinar adecuadamente fitatos.

### 5.1.2 Recuperación en la determinación de fitatos (Tabla 5.4)

Se extrajo el ácido fítico contenido en 0.5 g de harina de maíz y se le añadió 3 ml de solución de referencia de fitato.

La harina de maíz contiene 2493.0435  $\mu\text{g}$  P fítico/g

Contenido de P fítico/ml en extracto de maíz:

$$(2493.0435 \mu\text{g P fítico/g}) \times (0.5 \text{ g harina})/100 \text{ ml} = 12.4652 \mu\text{g P fítico/ml}$$

Contenido de 3 ml de solución de referencia de fitato (stock):

$$(3 \text{ ml stock}) \times (301.72 \mu\text{g P fítico/ml})/100 \text{ ml} = 9.0516 \mu\text{g P fítico/ml}$$

Concentración final en extracto para medir reproducibilidad:

$$0.5 \text{ g harina de maíz} + 3 \text{ ml stock} = 21.5168 \mu\text{g P fítico/ml}$$

Tabla 5.4 Contenido de P fítico en extracto para reproducibilidad:

Tubo	Absorbancia	$\mu\text{g}$ P fítico/ml
1	0.856	21.4529
2	0.821	22.7210
3	0.829	22.4312
4	0.908	19.5688
5	0.830	22.3949
6	0.851	21.6341
	Promedio	21.7005
	d.s.	1.1547
	c.v.	5.3213

Teórico = 9.0516  $\mu\text{g P fítico/ml}$

Recuperado = 21.7005-12.4652 = 9.2353  $\mu\text{g P fítico/ml}$

% Recuperación = 102.03%

Se realizó un análisis estadístico de prueba t para una sola muestra utilizando como herramienta el programa computacional Statgraphics 5.0. Se obtuvo una  $t = 0.38963$  con un nivel de significancia = 0.712853 con un intervalo de confianza del 95% y  $\alpha = 0.05$ ; encontrándose que no existe diferencia significativa entre los datos, obteniendo una metodología confiable.

### Contenido De Fitatos En Leguminosas Utilizadas Para El Análisis De Fitatos:

Tabla 5.5 Contenido de P fítico en algunas leguminosas:

MUESTRA	peso g	Abs	$\mu\text{g P fítico/ml}$	mg P fítico/g	mg ác fítico/g
Cacahuanano	0.5601	0.803	23.3897	4.1760	14.8324
Cacahuanano	0.5601	0.817	22.8821	4.0854	14.5105
Cacahuanano	0.5601	0.791	23.8247	4.2537	15.1082
					d. s. =0.2991
					c. v. =2.0189%
Pata de Vaca	0.6138	1.031	15.1235	2.4639	8.7514
Pata de Vaca	0.6138	0.997	16.3563	2.6648	9.4648
Pata de Vaca	0.6138	0.984	16.8276	2.7415	9.7375
					d. s. =0.5092
					c. v. =5.4647%
Colorín	2.7314	0.796	23.6435	0.8656	3.0745
Colorín	2.7314	0.765	24.7674	0.9068	3.2207
					d. s. =0.1034
					c. v. =3.2844%
Frijol Gordo	2.3277	0.778	24.2961	1.0438	3.7073
Frijol Gordo	2.3277	0.838	22.1208	0.9503	3.3754
					d. s. =0.2347
					c. v. =6.6271%
Frijol Sarabando	2.3452	0.712	26.6889	1.1380	4.0421
Frijol Sarabando	2.3452	0.706	26.9064	1.1473	4.0750
					d. s. =0.0233
					c. v. =0.5732%

Las muestras analizadas de la tabla 5.5 mostraron un coeficiente de variación menor o igual a el coeficiente de variación del maíz por lo que las muestras tienen un comportamiento homogéneo.

En la tabla 5.6 se presentan los valores promedio de fitato obtenidos experimentalmente.

Tabla 5.6 Contenido promedio de fitato en algunas leguminosas:

MUESTRA	mg P fítico/g	mg ác fítico/g
Cacahuanano	4.1717	14.8170
Pata de Vaca	2.6234	9.3179
Colorín	0.8862	3.1476
Frijol Gordo	0.9971	3.5414
Frijol Sarabando	1.1427	4.0585

En las tablas 5.7 y 5.8 se presenta el contenido de fitatos obtenido experimentalmente en comparación con el contenido teórico.

Tabla 5.7 Valor promedio de P fítico en maíz y algunas leguminosas:

Muestra	% P fítico experimental	% P fítico teórico
Maíz	0.2493	0.146 a 0.353 (2)
Cacahuanano	0.4171	----
Pata de Vaca	0.2623	----
Colorín	0.0886	----
Frijol Gordo	0.0997	----
Frijol Sarabando	0.1143	----

Tabla 5.8 Valor promedio de ácido fítico en maíz y algunas leguminosas:

Muestra	% ácido fítico experimental	% ácido fítico teórico
Maíz	0.8821	0.519 a 1.254 (2)
Cacahuanano	1.4817	----
Pata de Vaca	0.9318	----
Colorín	0.3148	----
Frijol Gordo	0.3541	----
Frijol Sarabando	0.4059	----

La metodología se utilizó para determinar el contenido de fitatos en diferentes leguminosas de interés (Tablas 5.5 y 5.6) se encontraron valores relativamente bajos en cuanto al contenido de fitatos para todas las muestras excepto para el cacahuanano que si muestra casi el doble de la cantidad que tiene el maíz. El contenido de fitatos para el cacahuanano fue el más alto de todas las muestras analizadas sin ser una cantidad muy notoria aunque de cantidad similar a la soya (1). Se debe tener cuidado de mantener una dieta rica en minerales sobre todo de calcio para que el contenido de fitatos en cacahuanano no provoque deficiencias de este mineral. La pata de vaca tuvo un contenido de fitatos similar al maíz. El colorín, frijol gordo y frijol sarabando, tuvieron aproximadamente la mitad de cantidad de fitatos que contiene el maíz, por lo que su contenido de fitatos de estas muestras puede considerarse bajo.

### 5.1.3 Variabilidad intra-laboratorio

Para determinar la variación existente en la metodología se realizó la metodología por otra persona a la misma muestra de maíz que se utilizó para la determinación del contenido de fitatos:

Tabla 5.9 Curva patrón

conc. Fitato $\mu\text{g P fit/ml}$	conc. Fitato $\mu\text{g \acute{a}c. Fítico/ml}$	Absorbancia
3.0172	10.7166	0.883
6.0344	21.4331	0.839
12.0688	42.8663	0.699
18.1032	64.2994	0.527
24.1376	85.7325	0.452
30.1720	107.1656	0.385
36.2064	128.5988	0.287

Datos de Regresión lineal como  $\acute{a}c.$  fítico:

$$y = mx + b \quad m = -0.0052, \quad b = 0.9219, \quad r = -0.9890$$

En la tabla 5.9 se pudo apreciar que la curva patrón que realizó otro colaborador tuvo un buen coeficiente de correlación ( $r = -0.989$ ) comparable al obtenido en el análisis de los datos de la tabla 5.1.



Tabla 5.10 Contenido de P fítico en maíz:

MUESTRA	peso g	Abs	$\mu\text{g P fítico/ml}$	mg P fítico/g	mg ác fítico/g
Maíz 1	1.0549	0.487	23.7070	2.2473205	7.9821
Maíz 2	1.0549	0.499	23.0445	2.1845186	7.7590
Maíz promedio	1.0549	0.493	23.3757	2.2159195	7.8706

Tabla 5.11 Variabilidad de ácido fítico en maíz intra-laboratorio:

Muestra	% ácido fítico experimental	% ácido fítico teórico
Maíz en Metodología	0.8821	0.519 a 1.254 (2)
Maíz para Variabilidad	0.7871	0.519 a 1.254 (2)
Promedio	0.8346	
d. s.	0.0672	
c. v.	8.0487	

En la tabla 5.10 y 5.11 se observó que el coeficiente de variación entre dos sujetos de un mismo laboratorio fue muy semejante, alrededor del 8%, siendo este porcentaje mayor al 5%, el valor límite para que una metodología sea considerada confiable, pero no fue tan alto como para decir que la metodología no funciona. Por lo que se realizó un

análisis estadístico de prueba de t para dos muestras con la ayuda de el programa computacional Statgraphics 5.0. De este análisis se obtuvo una  $t= 1.85278$  y un nivel de significancia = 0.123108, con lo que se llegó a la conclusión de que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los dos colaboradores con un intervalo de confianza del 95% y un  $\alpha=0.05$ .

## 5.2 DETERMINACION DE OXALATOS

### 5.2.1 Reproducibilidad de la metodología

Tabla 5.12 Contenido de ácido oxálico en ruibarbo

Muestra	ml. corregidos de Titulación *	mg. de ácido oxálico	gramos de muestra	% ácido oxálico
Ruibarbo 1	11.4	160.9794	1.5851	0.5992
Ruibarbo 2	10.3	145.4463	1.6033	0.5352
Ruibarbo 3	10.4	146.8584	1.5465	0.5603
Promedio				0.5649
d. s.				0.0322
c. v.				5.7084

\* Restados del Blanco (0.3 ml)

En la tabla 5.12 se observa un contenido promedio de ácido oxálico en ruibarbo de 0.5649% con un coeficiente de variación del 5.7%, siendo este último no muy elevado ya que se trata de una metodología volumétrica.

## 5.2.2 Recuperación de la metodología

Tabla 5.13 Análisis de muestras añadidas con ácido oxálico

Muestra	ml. corregidos de Titulación *	mg. de ácido oxálico totales	gramos de muestra	% ácido oxálico
Ruibarbo 4	17.5	247.1175	1.5111	0.9649
Ruibarbo 5	24.8	350.2008	1.5106	1.3678
Ruibarbo 6	32.2	454.6962	1.5032	1.7847

\* Blanco = 0.3 ml.

Tabla 5.14 Recuperación de ácido oxálico en muestras añadidas

Muestra	mg. totales ác. oxálico	mg. oxálico en muestra	mg. oxálico añadidos	mg. oxálico recuperado	% Recuperación
Ruibarbo 4	247.1175	144.6810	102.2	102.4365	100.2314
Ruibarbo 5	350.2008	144.6332	206.3	205.5676	99.6450
Ruibarbo 6	454.6962	143.9246	307.2	310.7716	101.1626
				Promedio	100.3463
				d. s.	0.7653
				c. v.	0.7627

Para el análisis de ácido oxálico se tuvo una recuperación de ácido oxálico promedio de 100.3% (Tablas 5.13 y 5.14), con una desviación estandar y coeficiente de variación muy bajos.

Se realizó un análisis estadístico de prueba t para una sola muestra utilizando como herramienta el programa computacional Statgraphics 5.0. Se obtuvo una  $t = 0.786497$  con un nivel de significancia = 0.513969 con un intervalo de confianza del 95% y  $\alpha = 0.05$ ; encontrándose que no hubo diferencia significativa entre los datos, indicando una metodología confiable.

Tabla 5.15 Valor Promedio de ácido oxálico en Ruibarbo y otros vegetales:

Muestra	% ácido oxálico experimental	% ácido oxálico teórico (9, 15)
Ruibarbo ( <i>Rumex patientia</i> )	0.565	0.1 - 1.3
Espinaca ( <i>Spinacea oleracea</i> )	0.979	0.1 - 1.2
Acelga ( <i>Beta vulgaris</i> )	0.574	0.3 - 0.9
Té negro ( <i>Camellia sinensis</i> )	0.029	0.13 - 2
Cacahuanano ( <i>Gliricidia sepium</i> )	no se detectó	----
Pata de vaca ( <i>Bauhinia purpureae</i> )	no se detectó	----
Colorín ( <i>Erythrina americana</i> )	0.026	----
Frijol gordo ( <i>Phaseolus sp.</i> )	0.016	----
Frijol sarabando ( <i>Vigna unguiculata</i> )	0.047	----

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Se encontró una cantidad de oxalatos (Tabla 5.15) en el ruibarbo intermedia a la cantidad reportada teóricamente. Siendo el contenido de oxalatos en ruibarbo alto como se reporta en la bibliografía, se puede decir que las espinacas estudiadas podrían causar mayores problemas que el ruibarbo si se consumen en grandes cantidades. La acelga proporciona una cantidad de oxalatos similar a la del ruibarbo, pudiendo ocasionar problemas si se consume en grandes cantidades. Estas tres últimas muestras se encontraron dentro de sus valores teóricos de contenido de oxalatos.

Lo anterior no sucedió para el Té negro; en este se encontraron cantidades muy inferiores a las reportadas en la literatura, lo que provoca duda sobre la autenticidad del té negro analizado. La muestra adquirida, además mostró un aroma como a pasto, tanto en polvo como en infusión, que pudiera indicar adulteración y por ello su bajo valor obtenido.

De las muestras estudiadas el Ruibarbo es una de las más mencionadas en la bibliografía inclusive en casos de intoxicación graves y se reporta que para que fuese letal la ingestión de ruibarbo, como dosis mínima, se tendrían que comer 4 Kg. aproximadamente, que equivale de 4 a 52 gramos de ácido oxálico.

Las leguminosas estudiadas no mostraron tener oxalatos o lo tuvieron muy bajo por lo tanto su ingesta no representa ningún riesgo cuando se consumen. Este contenido fue alrededor de 10 veces menor al contenido mínimo de oxalatos reportada para ruibarbo, el cual es consumido en cantidades considerables en países anglosajones.

## 5.2.3 Variabilidad intra-laboratorio

Tabla 5.16 Variabilidad intra-laboratorio de la metodología en Ruibarbo:

Sujeto	% ácido oxálico experimental
1	0.5992
1	0.5352
1	0.5603
2	0.5275
2	0.5479
2	0.5661
3	0.5885
3	0.5424
Promedio	0.5545
d. s.	0.0235
c. v.	4.2387%

\* % de ácido oxálico teórico 0.1 - 1.3 (9, 26)

La variación entre las tres personas del mismo laboratorio fue del 4% (tabla 5.16). Siendo un valor muy bajo a pesar de haberse preparado nuevos reactivos. Esta variación fue menor cuando la realizaron todos los individuos, debido principalmente al número de repeticiones. En la reproducibilidad de la metodología se tuvo un coeficiente de variación de 5.7% y la variabilidad intra-laboratorio fue de 4.2%, por lo que el método resultó más preciso tomando en cuenta a todos los experimentadores.

Se realizó un análisis de varianza de un sólo criterio de clasificación utilizando como herramienta el programa estadístico Statgraphics 5.0. El valor F obtenido con intervalo de confianza al 95% y  $\alpha=0.05$  es de  $F=0.389$  con un nivel de significancia de 0.6967, mostrando que no hubo diferencia significativa entre los grupos y por lo tanto la metodología es confiable.



## 6. CONCLUSIONES

Se montaron dos metodologías para determinar fitatos y oxalatos para su aplicación en cualquier laboratorio sin la necesidad de equipo sofisticado. Estas metodologías resultaron ser muy reproducibles por uno o varios individuos y totalmente cuantitativas, ya que hubo recuperaciones del 100%.

Las metodologías se aplicaron a materiales biológicos con diferentes concentraciones obteniendo resultados favorables para ambas pruebas. En ninguna de las leguminosas estudiadas (con excepción del cacahuanano en fitatos) hubo cantidades elevadas de fitatos ni de oxalatos, que pudieran causar problemas en la disponibilidad de minerales.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson R.L. and Wolf W.J. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125: 581S-588S.
2. AOAC, 1990. "Official Methods of Analysis.", XV edición, Arlington, Virginia, USA, 974.24.
3. Badui S. 1993. "Química de los alimentos (3a. edición)", Alhambra Mexicana, México. p.p. 557-558, 631-632.
4. Bermejo, J.E. y León, J. 1992. "Cultivos marginados (otra perspectiva de 1942)." FAO, Colección de producción y protección vegetal # 26, Roma, pp. XIX-XII y 3-33.
5. Charley H. 1990. "Preparación de alimentos (1a. edición)", Limusa, México, p.p. 623-627, 632-633.
6. Derache R. 1990. "Toxicología y seguridad de los alimentos." Ediciones Omega, S.A.; Barcelona, p. p. 1-6, 33-55 y 111-121.
7. D'mello, J.P.F. 1992. "Chemical constrains to the use of tropical legumes in animal nutrition." *Animal Feed Science Technology* 38: 237-261.
8. Fassett, D.W. "Oxalates" en: *Toxicants occurring naturally in food.* National Academy of Science. Pp. 346-362, Washington, D. C. (1973).
9. Ferrando, F. 1980. "Alimentos tradicionales y no tradicionales." FAO, colección de alimentación y nutrición # 2, Roma, pp. IX-XI y 83-130.
10. Flores N. (editor). 1988. "¿Producir para la desnutrición?" Centro de Ecodesarrollo, México, D.F., pp. 13-34 y 243-266.

11. Grande, F. C. 1988. "Nutrición y Salud." Ediciones Temas de Hoy S.A., Madrid, pp. 11-43.
12. Harlan, J. R. 1976. "Las plantas y los animales que alimentan al hombre." *Rev. Investigación y Ciencia*, 2: 65-83.
13. Haugh W., Lantzsches H. J., 1983. "Sensitive Method for the Rapid Determination of Phytate in Cereals and Cereal Products." *J. Sci. Food Agric.* 34: 1423-1426.
14. Leopold, A. C. and Ardrey, R. 1972. "Toxic substances in plants and the food habits in early man. *Science*.", E.U.A., 176: 512-514.
15. Liener, I. E. 1980. "Toxic constituents of plant foodstuffs." Academic Press, N. Y., pp. 1-5, 7-102, 143-263, 452-453.
16. Miller, J. C. y Miller J. N. 1993. "Estadística para la Química Analítica." Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, Delaware.
17. Muller, H.G. y Tobin, G. 1986. "Nutrición y Ciencia de los Alimentos." Acribia, S. A., Zaragoza, p.p. 119-153.
18. Oberleas D., 1971. "The Determination of Phytate and Inositol Phosphates", *Methods of Biochemical Analysis*, 20: 87-101.
19. Oberleas, D. "Phytates" en: *Toxicants occurring naturally in food*. National Academy of Science, Washington, D. C. (1973). p. p. 363-371.
20. Orozco F., 1967. "Análisis Químico Cuantitativo.", Ed. Porrúa, México, pp. 307-310.
21. Robinson S. D. 1991. "Bioquímica Y Valor Nutritivo De Los Alimentos", Ed. Acríbia, Zaragoza, España, p.p. 41-45.
22. Sarmiento S. 1994. "Libro del año 1994. (editado por Diorki, S.A.)". *Encyclopedia*

Britannica Publishers, Inc, EUA, pp. 52, 279.

23. Sotelo A. 1981. "Leguminosas silvestres, reserva de proteína para la alimentación del futuro." Rev. ICyT. México, 54: 28-32.
24. Taylor, S.L. and Scanlan, R.A. 1989. "Food Toxicology (a perspective on the relative risks)." Marcel Dekker, Inc. N.Y., p.p. 1-10.
25. Urquiza, G. 1988. "Y ahora, ¿que comemos?". Rev. ICyT. México, 10(144), 41-43.
26. Valle, P. 1991. "Toxicología de Alimentos (2a. edición)",. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, México, pp. 1-6, 17,24,25,105.
27. Watson, D.H. 1987. "Natural toxicants in foods." Ellis Howood LTD. Inglaterra, p.p. 9-10 y 76-109.