

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*SIMPLIFICACIÓN DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA
LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO EN CEREALES*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Mitzi Arisbeth López Estrada



México, D. F.

2007



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. Ángela Sotelo López

Vocal: Prof. Bernardo Lucas Florentino

Secretario: Prof. Lucia Cornejo Barrera

1^{er} Suplente: Prof. Rosa María Argote Espinosa

2^{do} Suplente: Prof. Iliana Elvira González Hernández

Sitio en donde de desarrolló el tema:

Laboratorio 111 Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química U.N.A.M

Asesor del Tema: M en C. Ángela Sotelo López

Asesor Técnico: Q.F.B Leticia Gil Vieyra

Sustentante: Mitzi Arisbeth López Estrada

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones recibidas a lo largo de mi vida y haberme permitido llegar a este momento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por haberme permitido aprender muchas lecciones tanto dentro como fuera de las aulas.

A la M en C. Ángela Sotelo López por todo su apoyo e invaluable guía durante todo el desarrollo de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo económico otorgado en la realización de este trabajo.

Al Proyecto PAPIME PE 205005 ya que esta tesis forma parte de él.

A Lety por su disponibilidad, apoyo y asesoría para la realización de esta tesis, así como por compartir tan gratos momentos.

A Arge, Jeannette y Ericka por permitirme compartir con ustedes tantos momentos importantes, por toda su ayuda y amistad que me han brindado durante mi estancia en el laboratorio. Mil Gracias.

A Rosita por su alegría, compañía y amistad que siempre me ha brindado.

A Ili por las recomendaciones y apoyo durante la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado designado para la revisión de la tesis y sus valiosas observaciones.

A la Sra. Vicky por todos sus consejos, ayuda y detalles que siempre ha tenido conmigo. Gracias por compartir tantos momentos y anécdotas.

A mis compañeros Karlo, Claudia, Brenda, Manuel por toda su compañía, amistad y apoyo durante nuestra estancia en el laboratorio.

A todas aquellas personas que han compartido momentos imborrables durante la carrera y que nos han llevado hasta alcanzar esta meta. Por ser parte importante de una de las mejores etapas en la vida: Gaby, Naye, Alma, Katy, Karis, Vivi, Elena, Carmen, Rubén, Persy, Miguel, Andrés, Dariana.

DEDICATORIAS

A mis padres:

María del Carmen Estrada Yañez y Bulmaro López Sosa.

No hay palabras para agradecer todo el amor, la paciencia y la confianza que siempre han tenido para mí. Gracias por estar en cada momento importante de mi vida y proporcionarme las herramientas para abrirme camino en la vida, por todo su cariño, comprensión e incondicional apoyo durante toda mi formación profesional como personal. Este logro es su logro.

A Alberto

Beto, gracias por ser más que un hermano un gran amigo, escucharme y entenderme, por toda la ayuda que siempre me has brindado y compartir conmigo tantos momentos buenos, malos o chuscos durante esta etapa y que espero seguir compartiendo, te quiero mucho.

A Alonso

Mi hermanito por toda tu paciencia, comprensión y cariño.

A Clara e Inés Estrada

Dos grandes mujeres ejemplo a seguir de fortaleza y decisión en la vida, gracias por su afecto y apoyo.

... el conocimiento es el que nos hace mejores...

Sócrates



ÍNDICE DE CONTENIDO



| | Página |
|--|---------------|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción | 2 |
| 3. Objetivos | 4 |
| 4. Antecedentes | 5 |
| 4.1 Características de los cereales | 5 |
| 4.2 Estructura de los cereales | 6 |
| 4.3 Ácido fítico | 7 |
| 4.4 Ácido fítico como factor antinutricional | 8 |
| 4.5 Ácido fítico en los alimentos | 10 |
| 4.6 Hidrólisis del ácido fítico | 12 |
| 4.7 Método de análisis de ácido fítico | 12 |
| 4.8 Validación de un método analítico | 17 |
| 4.8.1 Parámetros de desempeño | 17 |
| 5. Metodología | 20 |
| 5.1 Muestras | 21 |
| 5.2 Acondicionamiento de las muestras | 22 |
| 5.3 Determinación de fósforo en el estándar | 22 |
| 5.4 Método de Frühbeck | 25 |
| 5.4.1 Fundamento del método de Frühbeck | 25 |
| 5.5 Método modificado de Frühbeck | 29 |

| | |
|---|----|
| 5.6 Parámetros de Validación | 31 |
| 6. Resultados y Discusión | 34 |
| 7. Conclusiones | 43 |
| 8. Bibliografía | 44 |
| 9. Anexos | 48 |
| 9.1 Anexo A. Curva Patrón de Ácido Fítico | 48 |
| 9.2 Anexo B. Formulas para los parámetros de validación | 49 |
| 9.3 Anexo C. Cálculo del contenido de ácido fítico | 50 |
| 9.4 Anexo D. Análisis Estadístico | 51 |



El método de Frühbeck permite cuantificar el ácido fólico del extracto ya purificado a través de una columna de intercambio aniónico, realizando ajustes de pH para obtener mejores recobros, sin embargo el tiempo requerido para la determinación es una de las limitantes.

En este trabajo se modificó la metodología de Frühbeck para disminuir el tiempo de análisis; dicho cambio se realizó principalmente en la preparación de las columnas empleadas en la purificación, disminuyendo la altura de la resina de 14 a 8 mm.

Se validó tanto el método de Frühbeck como la modificación al método y ambas metodologías fueron lineales en un intervalo de 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fólico, así como precisos considerando como criterios de aceptación la reproducibilidad y la repetibilidad con un coeficiente de variación menor o igual al 5% además de ser exactos, el límite de cuantificación se determinó en 4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fólico para la metodología de Frühbeck y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fólico para la modificación del método. El método de Frühbeck, así como la simplificación del método de Frühbeck se emplearon para la determinación del ácido fólico, evaluando el contenido en maíz, tortilla, nixtamal, avena, sorgo crudo y cocido. No se observó diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre el contenido de ácido fólico determinado por la metodología de Frühbeck y por la simplificación propuesta del método de Frühbeck al modificar las columnas.



2. INTRODUCCIÓN



Los cereales y sus derivados constituyen un buen alimento tanto para los humanos como para los animales, proporcionando importantes cantidades de hidratos de carbono (fuente de energía), proteínas y minerales así como de fibra. Una desventaja es que pueden contener factores antinutricionales como el ácido fítico (IP6) que tiene la capacidad de secuestrar cationes divalentes como el Ca (II), Fe (II) y Zn (II) formando complejos insolubles teniendo como consecuencia la disminución de la capacidad de absorción de estos minerales en el tracto gastrointestinal de los monogástricos. Además, el ácido fítico también puede formar complejos con proteínas lo que hace que disminuya la calidad nutricional.

El ácido fítico al ser hidrolizado da como resultado inositol pentafosfato (IP5), inositol tetrafosfato (IP4), inositol trifosfato (IP3), sin embargo es importante remarcar que únicamente los IP6 y IP5 tiene la capacidad de formar complejos.

Debido a las características antes mencionadas es importante contar con un método analítico para la determinación del ácido fítico que proporcione buenos resultados. Existen diversos métodos para la cuantificación del ácido fítico, algunos de los cuales aprovechan la formación de sales de hierro insolubles en una solución ácida, pero los valores pueden variar por la proporción de hierro y fósforo en el precipitado, además de la precipitación de fósforo inorgánico y otros polifosfatos, lo que hace sobrestimar el valor del ácido fítico y por tanto el efecto adverso de éste, por ser métodos inespecíficos. Se han probado métodos como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) o la resonancia magnética nuclear los cuales son más específicos, sin embargo implica contar con equipos costosos que no siempre se encuentran disponibles en los laboratorios.

El método de Frühbeck consiste en una separación a través de una resina de intercambio iónico, para eliminar compuestos que interfieren y que sobreestiman los valores reales, sin embargo, éste es un método que requiere de un mayor tiempo para realizarlo, es por esto que se ha pensado en optimizar la metodología reduciendo el tiempo de análisis, haciendo que la muestra pase con mayor rapidez a través de la columna, para ello se propone disminuir la altura de la columna de purificación.

La validación de una técnica es el proceso por el cual se demuestra que el método tiene la capacidad de satisfacer los requisitos para la aplicación analítica deseada, por medio de la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado. La validación se lleva a cabo a través de la comprobación de los parámetros de desempeño, de tal manera que cumplan con la linealidad, la precisión y exactitud. En este caso al comparar dichos parámetros del método propuesto con el original de Frühbeck.



Objetivo General:

Modificar la metodología de Frühbeck y comparar los resultados obtenidos del método propuesto con los del método de Frühbeck, empleando muestras de cereales, así como realizar la validación de ambas metodologías.

Objetivos Particulares:

- ☞ Determinar el contenido de ácido fólico empleando el método de Frühbeck en cereales y algunos alimentos procesados.
- ☞ Determinar el contenido de ácido fólico con el método modificado propuesto en las mismas muestras empleadas para el método original de Frühbeck.
- ☞ Disminuir el tiempo de análisis para la determinación de ácido fólico con el método propuesto.
- ☞ Verificar si hay diferencia estadísticamente significativa en el contenido de ácido fólico al emplear el método Frühbeck y el método modificado para la determinación de ácido fólico en distintos cereales.



4.1 Características de los Cereales

Los cereales desempeñan un papel predominante en el aporte de nutrimentos a la población. En todo el mundo los cereales constituyen la principal fuente de energía y son por ende, la base de la alimentación. Los cereales más importantes son el maíz, trigo, arroz, cebada, centeno, avena, sorgo y el mijo.

El maíz es originario de América y en la actualidad es un alimento dominante en el hemisferio occidental; su uso se extendió, a Europa, Asia y África durante varios siglos. En México el maíz constituye la base de la alimentación y la principal fuente de energía de la mayoría de la población.

El maíz es nixtamalizado principalmente para la producción de la tortilla; la nixtamalización es un proceso muy antiguo desarrollado por los aztecas, que todavía se sigue utilizando para producir tortillas. Consiste en cocer el maíz con la cal $[Ca(OH)_2]$, el producto obtenido llamado nixtamal, se lava con agua para eliminar el exceso de cal en seguida es molido para obtener una pasta suave conocida como masa. La masa es utilizada para producir tortillas, las cuales son uno de los alimentos básicos de México, además de ser la principal fuente de calorías, proteínas y calcio para las poblaciones de bajos recursos, ya que son económicas y la población la ingiere frecuentemente [1,2].

4.2 Estructura de los cereales

Los cereales son las semillas comestibles de las plantas Gramíneas, son especies capaces de crecer en condiciones climáticas semiáridas (como el sorgo y el mijo), en climas cálidos (arroz, maíz y mijo) y fríos (trigo, centeno y cebada). La característica común de estas plantas es su semilla o grano, conocida botánicamente como cariósipide. La cariósipide está formada por una cubierta el fruto o pericarpio que rodea a la semilla y se adhiere fuertemente a la cubierta. La semilla está constituida a su vez por el embrión o germen y endospermo encerrados dentro de una epidermis y de la cubierta [3].

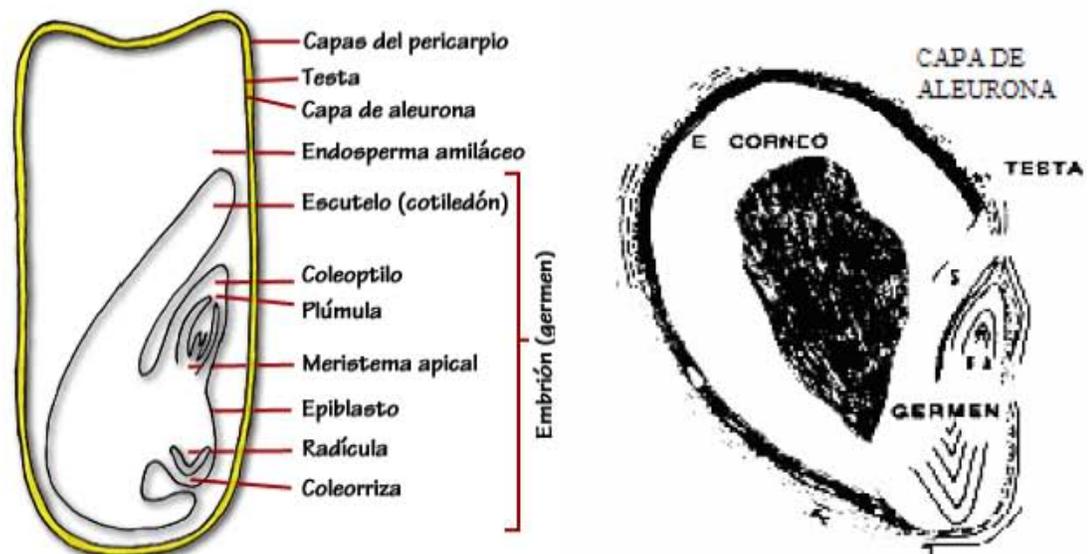


Figura 1. Estructura del grano de maíz y del grano de sorgo

4.3 Ácido Fítico

El ácido fítico es una molécula con seis grupos ortofosfato cuyo nombre químico es mioinositol 1,2,3,4,5,6 – hexakis dihidrogeno fosfato el cual también es llamado ácido mioinositol hexafosfórico (IP6).

El término de ácido fítico es designado en forma más restringida para los hexakis-o-fosfoésteres del mioinositol IP6, fitato para las sales y fitina para las sales de calcio y magnesio nombres comúnmente usados para describir IP6 [4].

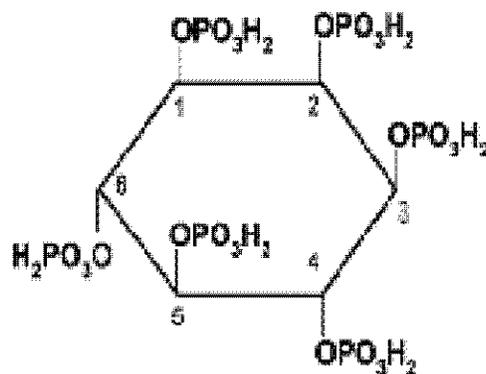


Fig. 2 Estructura del ácido fítico

Esta estructura con doce protones reemplazables y una alta densidad negativa por los grupos fosfatos, es la responsable de la característica de formar complejos estables con cationes divalentes, a un pH neutro que normalmente es el que presentan los alimentos, esta molécula es muy reactiva tiene la capacidad de formar complejos con proteínas. La solubilidad de las sales del ácido fítico varía con el pH debido al grado de protonación de los grupos fosfatos.

El ácido fítico es soluble en agua, alcohol al 95%, glicerol y en agua, en mezclas con alcohol-éter y muy poco soluble en alcohol absoluto, metanol y prácticamente insoluble en éter anhidro, benceno y cloroformo [5,6].

4.4 Ácido fítico como Factor Antinutricional

De forma genérica, las sustancias antinutricionales se definen como aquellos compuestos que están presentes de forma natural en algunos alimentos y actúan provocando una pérdida de nutrientes esenciales o interfiriendo en su utilización y función metabólica [7].

Los factores antinutricionales pueden interferir con los componentes del alimento antes de su consumo, durante la digestión en el tracto gastrointestinal y en la absorción en el cuerpo. Por tanto las condiciones bajo las cuales los factores antinutricionales tienen importantes implicaciones son diversas en un estado nutricional marginal.

Las sustancias antinutricionales pueden ser de origen natural o sintético y se pueden clasificar de la siguiente forma:

Tipo A: Sustancias que principalmente interfieren con la digestión o la absorción de proteínas, son llamados factores antiproteínicos.

Tipo B: Son sustancias que interfieren con la absorción o funcionamiento metabólico de los minerales.

Tipo C: Son sustancias que inactivan o destruyen a las vitaminas, de tal manera que provocan una mayor necesidad en el consumo de estas [8].

El ácido fítico ha sido considerado como un factor antinutricional debido a su fuerte capacidad de formar complejos con metales divalentes, porque en su estructura tiene seis grupos fosfato con carga que facilitan la formación de varias sales, especialmente con Zn (II), Ca (II) y Fe (II). En

consecuencia, el consumo de grandes cantidades de alimentos que contienen elevados niveles de ácido fítico pueden producir un déficit en la absorción de minerales en la dieta. Los vegetarianos son afectados por el alto contenido de ácido fítico o fitatos en los alimentos que consumen, en algunos países el promedio de consumo de fitatos de un menú típico puede exceder en 2000 mg/día [4,6,9].

Debido a que los fitatos no pueden ser absorbidos y los humanos no tienen la capacidad para hidrolizar esta molécula da un efecto adverso en la biodisponibilidad de minerales, además de que el fósforo del fitato no es nutricionalmente disponible.

Al ser un excelente agente quelante el ácido fítico forma complejos con minerales y proteínas, muchos de estos complejos son insolubles y se considera que la solubilidad es un factor esencial para que los nutrimentos sean absorbidos, ya que el sitio de absorción en el organismo posee un pH cercano a la neutralidad y el complejo del fitato tiene un mínimo de solubilidad, haciendo que se reduzca la biodisponibilidad de éstos y en consecuencia influye en el valor nutricional de los alimentos [10].

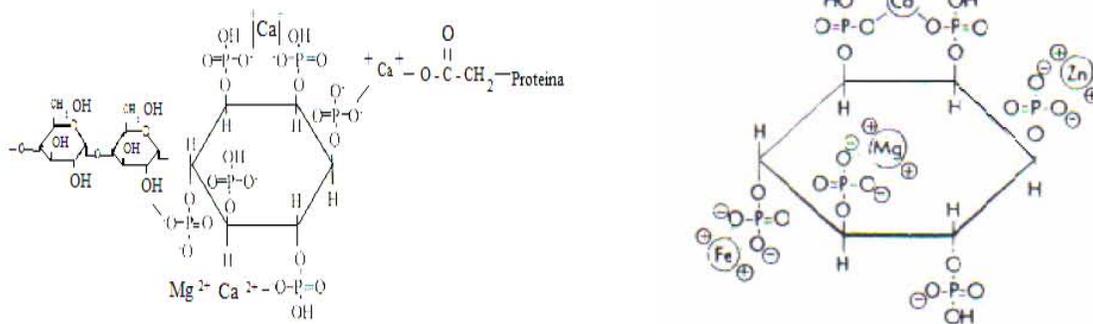


Fig. 3 Interacción del ácido fítico con minerales, proteínas y almidón

4.5 Ácido Fítico en los Alimentos

El ácido fítico esta ampliamente distribuido en alimentos que comúnmente se consumen, particularmente en vegetales, se ha encontrado en altas concentraciones en cereales, leguminosas y productos oleaginosos y en menor cantidad en tubérculos.

En cereales aproximadamente 1 – 2 % del peso de la semilla es ácido fítico, generalmente el 90% del ácido fítico se localiza en aleurona y solamente el 10% en el embrión [6].

Tabla 1. Distribución de ácido fítico en los componentes morfológicos de los cereales

| Cereal | Localización | Ácido Fítico (%)^a | Distribución (%)^b |
|---------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Maíz | Híbrido Comercial | 0.89 | - |
| | Endospermo | 0.04 | 3.20 |
| | Germen | 6.39 | 88 |
| | Cascarilla | 0.07 | 0.40 |
| Trigo | Endospermo | 0.004 | 2.20 |
| | Germen | 3.91 | 12.90 |
| | Aleurona | 4.12 | 87.10 |
| | Cascarilla | 0.00 | 0.00 |
| Arroz | Endospermo | 0.01 | 1.20 |
| | Germen | 3.48 | 7.60 |
| | Pericarpio | 3.37 | 80 |

a Contenido de ácido fítico calculado asumiendo un contenido de 28.20% de fósforo

b Distribución del total del grano en el cereal. Fuente: Reddy et al 1982 ¹⁵.

El contenido de ácido fítico está influenciado por el cultivo, las condiciones del suelo, la genética, la aplicación de fertilizantes y las condiciones de irrigación. Todos estos factores también influyen en la disponibilidad del fósforo en los cereales, su acumulación en las semillas se da principalmente en la capa de la aleurona, sin embargo existen algunas excepciones como el maíz donde más del 80% del ácido fítico se concentra en el germen. Los niveles de ácido fítico encontrados en el arroz entero oscilan desde un 0.86 a 0.99 % localizándose el 80% del fitato en la capa externa del salvado [6,9,11].

Un alto porcentaje de fósforo presente en cereales, leguminosas y oleaginosas existe como ácido fítico el cual representa la principal forma de almacenamiento, el cual comprende de un 1- 5 % del peso de los cereales. Sin embargo esta forma de fosfato permanece no disponible para el hombre y animales monogástricos, debido a que no tienen actividad de fosfatasas endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar los grupos fosfato de la estructura del fitato.

En forrajes un tercio del fósforo esta presente como fósforo inorgánico digerible, mientras que dos terceras partes como fósforo orgánico en forma de fitina [12].

Tabla 2. Contenido de Ácido Fítico en Cereales

| Cereal | Ácido Fítico (g/100g) |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Arroz (<i>orizze sativã</i>) | 0.86-0.99 |
| Trigo (<i>triticum aestivum</i>) | >1.13 |
| Maíz (<i>zea mays</i>) | 0.77-0.99 |
| Sorgo (<i>sorgum vulgare</i>) | 0.82-0.96 |
| Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) | 0.99 |
| Avena (<i>avena sativã</i>) | 0.77 |

Fuente: Martínez et al 2002 ⁵

4.6 Hidrólisis del ácido Fítico

El ácido fítico es hidrolizado química y enzimáticamente (por fitasas) originando : inositol pentafosfato (IP5), inositol tetrafosfato (IP4), inositol trifosfato (IP3) y probablemente inositoles difosfato y monofosfato. Con el retiro de los grupos fosfato del anillo, la capacidad de enlace con los minerales disminuye, dando como resultado una biodisponibilidad creciente del mineral. Sin embargo, como ya se ha mencionado el IP6 y IP5 tienen un marcado efecto sobre la biodisponibilidad de los minerales [13,14].

Las fitasas (myoinositol hexaquisfosfato fosforilasas, catalizan la hidrólisis del ácido fítico de manera que los convierte en myoinositoles y fosfato inorgánico. Las fitasas sólo están presentes en los tejidos de las plantas y son consideradas como endógenas y actúan durante el crecimiento de los granos [12].

4.7 Métodos de análisis para ácido fítico

El ácido fítico, no presenta un espectro de absorción característico en la región UV o la visible y por tanto no existen reactivos específicos para su determinación. Se han publicado varios métodos para la determinación cuantitativa de fitatos, la mayoría tiene que ver con la extracción mediante ácidos (ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido tricloroacético) a diferentes concentraciones y tiempos de extracción.

Los métodos más usados para la determinación del ácido fítico están basados en el método de precipitación desarrollado por Heuber y Stadler en 1914 el cual se basa en la formación de complejos insolubles de los fitatos de hierro, que precipitan a bajo pH en presencia de un exceso

del ión férrico (por la adición de cloruro férrico) y la subsiguiente cuantificación de fósforo, hierro o del inositol en el precipitado o indirectamente mediante la determinación del hierro residual en la solución ácida después de la precipitación del complejo fitato- hierro [4,5,15].

En 1935 McCance y Widdowson desarrollaron la medición directa del fósforo en el precipitado al convertir el fitato de hierro en fitato de sodio soluble usando hidróxido de sodio. El contenido de fósforo que proviene del fitato soluble es medido colorimetricamente después de una digestión ácida.

En 1971 Wheeler and Ferrel modificaron el método de McCance y Widdowson proponiendo extraer el fitato con ácido tricloroacético y precipitarlo como fitato férrico. El fitato de hierro fue convertido en hidróxido de hierro (que precipita) solubilizando al fitato adicionando hidróxido de sodio y calentando, mientras que el precipitado es disuelto en ácido diluido para determinar el contenido de hierro colorimetricamente, y calcular el contenido de fitatos asumiendo una proporción constante de Fe:P de 4:6 en el precipitado [15].

Sin embargo se ha demostrado que otros polifosfatos, así como fósforo inorgánico y fracciones menores de fosfatos de inositol, los cuales ya no tienen la suficiente capacidad quelante como el ácido fítico, se incluyen en las determinaciones, de tal forma que también precipitan en estas condiciones dando como resultado valores superiores a los reales. Además se presenta una variabilidad natural en la proporción molar de hierro y el fósforo (relación teórica 4Fe: 6P) en el precipitado [16]. Estos métodos son laboriosos, consumen mucho tiempo, son poco sensibles y no específicos para el fitato (IP₆) debido a la coprecipitación de fracciones menores de los fosfatos de inositol [16,17].

Harland y Oberleas (1977) eliminaron el paso de la precipitación y extrajeron directamente el fitato con 1.2% de HCl, el cual fue eluído a través de una resina de intercambio iónico para

separar las fracciones menores de inositolfosfato (IP3-IP5) y de fósforo inorgánico. El fitato eluido se digiere con H_2SO_4 y HNO_3 concentrado, sin embargo en este método se tienen pérdidas por la incompleta o excesiva digestión. Y la cantidad de ácido fítico se determina asumiendo que por cada molécula de ácido fítico contiene seis moléculas de fósforo orgánico [18].

Haug & Lantzsch en 1983 emplean la 2,2-bipiridina para cuantificar hierro en el sobrenadante, siendo hasta ahora uno de los métodos más usados por su relativa sencillez, a pesar de que cuantifica al fósforo fítico y la absorbancia de las muestras debe ser medida después de un período corto de tiempo debido a que el color del complejo es muy inestable.

En 1986 la AOAC aceptó el método de Ellis y Morris, como método oficial para la cuantificación de fitatos. El método implica la extracción del fitato usando HCl diluido, el extracto es mezclado con una solución de EDTA-NaOH y este es vertido en una columna de intercambio iónico, cuya finalidad es purificar el extracto. El fitato se eluye con una solución de NaCl 0.7 N una vez que se tiene purificado se somete a una digestión con una mezcla de HNO_3 y H_2SO_4 concentrado para liberar el fósforo, el cual es medido espectrofotométricamente. La cantidad de fitatos es calculado como equivalentes de hexafosfatos [19]. Este método asume que todo el ácido fítico es retenido en la columna y que únicamente el ácido fítico es eluido de la columna de intercambio aniónico. Sin embargo los alimentos pueden contener apreciables cantidades de isómeros desfosforilados de ácido fítico (IP1-IP5), los cuales son retenidos en la resina de intercambio aniónico y eluidos, estos fosfatos pueden ser incluidos en el cálculo del ácido fítico, sobrestimando su efecto negativo, ya que solamente el IP6 y IP5 interfieren apreciablemente con la biodisponibilidad de minerales, proteínas y elementos traza [20].

Kamaya (1995) utiliza cloranilato de zinc para cuantificar el fósforo, basándose en la reacción de reemplazo de ácido fítico y el cloranilato de zinc, el cual en presencia de alcohol, reduce su

solubilidad y libera cloranilato proporcionalmente a la cantidad de ácido fítico presente, sin embargo éste método usa bastantes reactivos además de utilizar simultáneamente dos resinas de intercambio iónico, por lo cual es una técnica cara [17].

El principal inconveniente tanto de los métodos de precipitación como de los de intercambio iónico es la falta de especificidad, como consecuencia de la dificultad del ajuste de las condiciones de hidrólisis necesarias para que sólo IP6 sean liberados para su cuantificación. Por ello éstos métodos son apropiados para cereales y leguminosas que se encuentren en estado natural, ya que en ellos básicamente sólo hay ácido fítico (IP6), no para alimentos procesados, ya que éstos contienen cantidades apreciables de isómeros del ácido fítico [5].

La técnica de Harland & Oberleas (1977) que consiste en una extracción del ácido fítico con 1.2% de HCl permitiendo disociar los complejos que se pueden formar con proteínas y hierro, así como la purificación a través de una resina de intercambio iónico. La técnica de Latta & Eskin (1980) que propone una determinación colorimétrica usando el reactivo de Wade (cloruro de hierro y ácido sulfosalicílico) para la determinación del ácido fítico por la formación del complejo fitato de hierro y por tanto la disminución de color por el remplazo del hierro del ácido sulfosalicílico. Ambas técnicas (Harland y Latta) fueron retomadas en 1995 por Frühbeck quién realizó un ajuste de pH en las tres etapas principales del método; en la extracción a pH de 0.6 para disociar el fitato del complejo de hierro, en la purificación (pH 6.0) para obtener mejores recobros, al disociar al ácido fítico de las proteínas y en la detección a un pH de 3.0 para obtener mejor estabilidad del complejo colorido y mejorar los recobros; empleando la columna de intercambio aniónico para purificar los extractos antes de cuantificarlos [18,22]. Este método fue validado en 2002 [17, 21]. El principal inconveniente de esta metodología es el tiempo requerido para la determinación por el paso preliminar de las muestras a través de la columna.

También se ha recurrido a la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación, ya que es un método que ha tenido una buena sensibilidad y reproducibilidad en productos de baja concentraciones de ácido fítico. Se han propuesto distintas modificaciones como el uso de diferentes columnas, fases móviles, flujos, extracción con solventes y técnicas de preparación, como métodos de monitoreo se han ocupado índice de refracción y determinación de productos de reacción postcolumna. Además se han combinado métodos de intercambio iónico con la cromatografía de líquidos de alta eficiencia en una columna de fase inversa.

Entre las ventajas que presenta el HPLC en la determinación de ácido fítico destacan que los distintos inositol fosfatos son determinados como entidades independientes permitiendo la cuantificación de IP5 o IP6 en mezclas que incluso contienen todos los isómeros, además de cuantificar los inositol fostatos en presencia de nucleótidos [5].

Otras determinaciones cromatográficas que se han empleado son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cromatografía de líquidos con detección conductimétrica, cromatografía por par iónico, la cromatografía de alta resolución e intercambio aniónico.

Otras técnicas que se han ocupado en la determinación de ácido fítico son la Resonancia magnética nuclear de P^{31} la cual proporciona una elevada especificidad, y produce cuatro puntos de resonancia o la espectroscopia infrarroja, sin embargo estas técnicas requieren de equipos más sofisticados y no permiten el análisis rápido del contenido del ácido fítico, además de ser métodos que no se incluyen en los programas de enseñanza [5].

4.8 Valiación de un Método Analítico ^{23,24}

Mediante un proceso de validación, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones fijadas.

La validación de un procedimiento consiste en tres pasos:

- a) El establecimiento de las condiciones por cumplir conforme a criterios.
- b) Determinación de los parámetros de desempeño del procedimiento.
- c) Valoración de los resultados, comparación de los parámetros obtenidos con las condiciones establecidas y decisión de la validez del procedimiento para el propósito establecido.

Los parámetros de validación o desempeño que se deben considerar varían según los requisitos exigidos por distintas organizaciones. Los más comúnmente evaluados son: linealidad, sensibilidad, exactitud, precisión y la selectividad.

4.8.1 Parámetros de Desempeño

Linealidad. Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales están estrictamente relacionado con la aplicación del método.

La curva de calibración se determina sobre los puntos individuales sin promediar por el método de los mínimos cuadrados. En el eje de la "x" aparecerá la cantidad o la concentración del analito y en el eje de la "y", la respuesta analítica (absorbancia para métodos espectrofotométricos, área o altura para métodos cromatográficos, cantidad de agente valorante gastado en el caso de métodos de titulación etcétera). Los estimadores de regresión para un

nivel de significancia dado son: el coeficiente de correlación, la pendiente (que indica la sensibilidad analítica y relaciona la aleatoriedad de la respuesta con la aleatoriedad debida a la variación de la concentración) y la ordenada al origen.

Precisión. Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí.

Repetibilidad. La precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto. El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media.

Reproducibilidad. Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad.

Exactitud. Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. La exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a ellos, cuando existen interferencias en el método por falta de selectividad, o cuando se trata de métodos analíticos muy laboriosos, con varias etapas, como extracciones, purificaciones, entre otros.

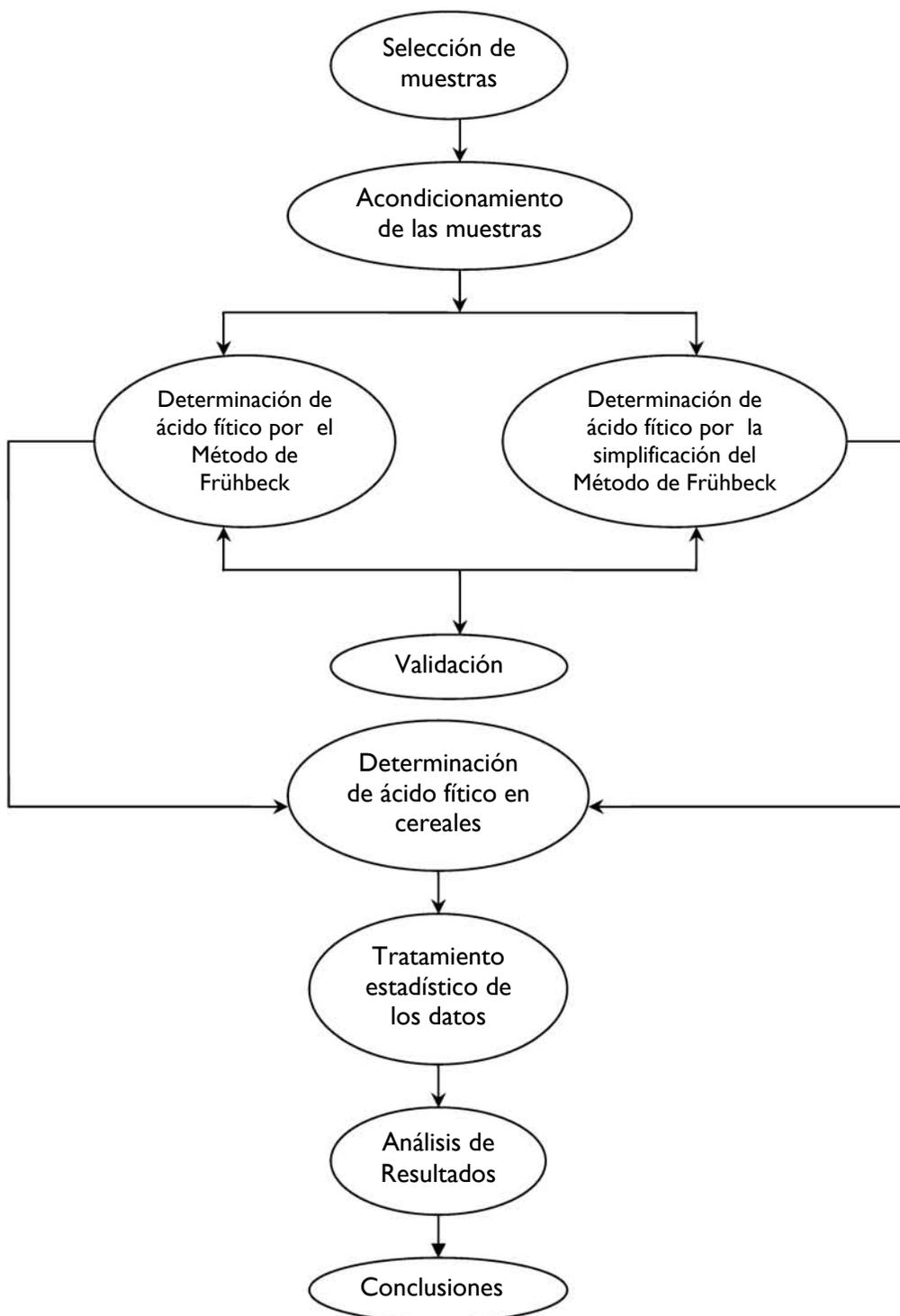
Selectividad. Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra, se expresa como el grado de inexactitud del método. La evaluación de este parámetro es especialmente importante en el caso de los métodos analíticos diseñados para la cuantificación del analito en formulaciones y en estudios de estabilidad [23,24].



5. METODOLOGÍA



DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



5.1 MUESTRAS

Las muestras seleccionadas fueron dos de los cereales de mayor consumo que son el maíz y la avena así como un derivado del maíz que es el nixtamal y la tortilla. El sorgo también se decidió estudiar debido a que es usado ampliamente en alimentación animal.

Sorgo (*sorgum vulgare*) se adquirió en el mercado de sonora de la ciudad de México.

Avena (*avena sativa*) se adquirió en el mercado de sonora de la ciudad de México.

Maíz blanco (*zea mays*) se adquirió en la tortillería de la colonia panamericana de la ciudad de México.

Nixtamal y la Tortilla se adquirieron en la misma tortillería de la ciudad de México.

MATERIAL Y EQUIPO

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Vasos de precipitado de 30 y 50 mL.• Pipetas volumétricas de 5 y 10 mL.• Matraces aforados de 25 mL• Tubos de ensaye de 5 mL.• Jeringas de 3 mL. Plastipak.• Fibra de vidrio.• Tubos para centrífuga.• Molino Thomas-White Modelo 4• Parrilla de agitación• Centrífuga. SORVALL RC5B .• Espectrofotómetro. Sequoia-Turner modelo 340• Estufa imperial III | <p style="text-align: center;">REACTIVOS</p> <ul style="list-style-type: none">• Ácido Clorhídrico 0.65 N• Hidróxido de Sodio 5 N• Cloruro de Sodio 0.1 N• Cloruro de Sodio 0.7 N• Cloruro de hierro (Sigma F-2877)• Ácido sulfosalicílico (Sigma S-0640)• Sal sódica de ácido fítico (Sigma P-3168)• Resina de intercambio aniónico Dowex AG1-X8, 200-400 mesh, Bio Rad. |
|--|---|

5.2 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La avena como el sorgo crudo se molieron en un molino de acero inoxidable (Thomas-White Modelo 4), por malla de 1 mm, se obtuvo la harina la cual se homogenizó y se guardó a temperatura ambiente en frascos de plástico. En el caso del sorgo cocido se llevó a cabo una cocción en parrilla de calentamiento empleando un volumen de agua equivalente a dos veces el volumen de la muestra medidos en una probeta llevando hasta sequedad, es decir la evaporación completa del agua, posteriormente se sometió la muestra a un secado en estufa a una temperatura de 50 a 55 °C por 24 horas. Una vez seca la muestra se molió hasta obtener una harina que pasó por la malla de 1mm.

El nixtamal fue secado en estufa de 50 a 55 °C por 24 horas y posteriormente molido por malla 0.5 mm, en el caso de la tortilla ésta se cortó en tiras de aproximadamente de 1.5 cm y se sometió a un secado en estufa (50 a 55 °C) y posteriormente a una molienda en las mismas condiciones que el nixtamal.

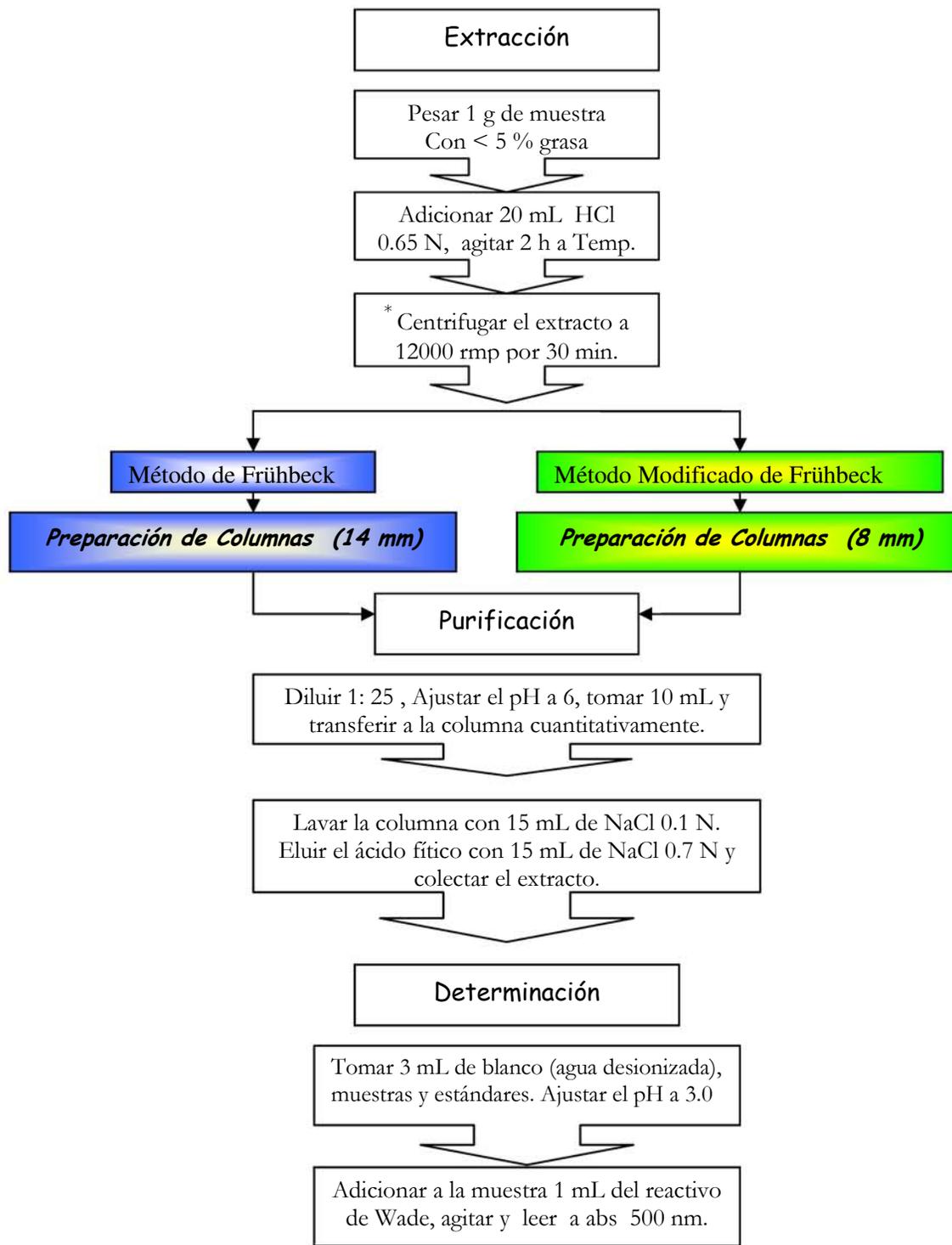
5.3 DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN EL ESTÁNDAR ²⁵

Antes de comenzar las determinaciones de ácido fítico se llevó a cabo la cuantificación de fósforo en la sal sódica de ácido fítico para conocer la pureza del reactivo, para ello se realizó la técnica para fósforo de la AOAC la cual consiste en lo siguiente:

Se pesó la muestra, la cual se carbonizó en mechero y posteriormente se colocó en la mufla a 550 °C para obtener las cenizas blancas. Las cenizas se disolvieron en ácido clorhídrico y se evaporaron a sequedad a baño maría. El residuo se disolvió en 10 mL de HCl y se llevó a un volumen de 100 mL, se tomaron 10 mL de este volumen para desarrollar color con 5 mL del reactivo de molibvanadato.

Se preparó una solución estándar (0.5 mg P_2O_3 /mL) para preparar soluciones con concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, y 0.35 mg P_2O_3 /mL respectivamente. Para la determinación tanto de la curva como de la muestra se tomaron 10 mL, se adicionaron 5 mL de la solución de molibvanadato y se llevó a un volumen de 25 mL se mezcló y se dejó reposar 10 minutos para desarrollar color y finalmente se leyó la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro Sequoia-Turner modelo 340.

DIAGRAMA 1. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO POR EL MÉTODO DE FRÜHBECK Y MODIFICACIÓN DEL MÉTODO DE FRÜHBECK



* De acuerdo a la muestra. Maíz, nixtamal y tortilla se centrifugó a 1500 r.p.m por 40 min.

5.4 MÉTODO DE FRÜHBECK²²

5.4.1 Fundamento del método de Frühbeck

La metodología de Frühbeck se basa en la purificación de los extractos del ácido fítico, empleando una columna de intercambio iónico (Dowex AG1 X8 (200-400 mesh, Bio Rad), la cual permite eliminar fracciones de inositol con menor número de fosfatos. La determinación se realiza por medio de un complejo colorido basada en la reacción entre el ión férrico y el ácido sulfosalicílico, que en presencia del fitato, el hierro se enlaza al éster del fosfato y deja de ser disponible para reaccionar con el ácido sulfosalicílico, resultando en la disminución de la intensidad del color.

5.4.2 Metodología de Frühbeck

Extracción de la muestra

Se pesó 1 gramo de alimento con un contenido menor al 5% de grasa, para evitar interferencias con la extracción del fitato, se adicionaron 20 mL de HCl al 2.4% (0.65N), y se verificó que el pH de la mezcla estuviera entre 0-1. La mezcla se sometió a agitación (400 r.p.m aproximadamente) durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente el extracto se transvasó cuantitativamente a los tubos de centrifuga para centrifugar a 12000 rpm a temperatura ambiente por treinta minutos, después se colectó el sobrenadante y se guardó en refrigeración. Este procedimiento se realizó para las muestras de sorgo tanto crudo como cocido y para la avena. En el caso del maíz, nixtamal y tortilla la centrifugación se llevó a cabo a 15000 rpm por 40 minutos, debido a que estas muestras presentan mayor contenido de almidón y retarda el paso de la muestra por la resina.

Preparación de columnas

Se pesó aproximadamente 0.5 g de resina de intercambio aniónico Dowex AG1 X8 (200-400 mesh, Bio Rad) la cual se hidrató con 0.6 mL de agua desionizada. Como columnas se emplearon jeringas plastipack de 3 mL, colocadas en un soporte (gradilla) a la cual se le introdujo en el fondo un tapón de fibra de vidrio, doblando la fibra en forma envolvente sin que rebase una altura de 0.5 cm de la columna. Se le agregó a la columna la resina hidratada cuidando que quedara asentada uniformemente. Una vez que la resina estuvo bien empacada en la columna se adicionaron 15 mL de NaCl 0.7 N y posteriormente se lavó con 30 mL de agua desionizada cuidando de dejar líquido suficiente (aproximadamente 0.5 cm de altura arriba de la resina empacada) para que no se seque la resina y quede lista para usarse.

Purificación

Del sobrenadante colectado en la extracción se tomó una alícuota de 5 mL y se diluyó con agua desionizada, se recomienda la dilución de 1:25 para alimentos que contengan 1% o más de ácido fítico y la dilución 5:25 para contenidos menores; para el caso de los cereales analizados la dilución empleada fue 5:25. El pH se ajustó a un valor de 6.0 (superior al punto isoeléctrico de las proteínas) con una solución de NaOH 5 N. Para las muestras de maíz, nixtamal y tortilla se centrifugó a 2500 r.p.m por 15 minutos, posteriormente se tomó una alícuota de 10 mL y se transfirió cuantitativamente a la columna de resina. La columna se lavó con 15 mL de NaCl 0.1 N y se desechó el agua de lavado (para eliminar el fosfato inorgánico y fracciones menores de inositol). El ácido fítico se eluyó con 15 mL de NaCl 0.7 N y se colectó el extracto purificado.

Determinación

Preparación de la curva estándar

Se preparó una solución de ácido fítico de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fítico: se pesó exactamente 0.1051 g de la sal se fitato de sodio con una pureza del 75% y una humedad de 11.3%, se aforó con agua desionizada hasta un volumen de 50 mL. A partir de esta solución concentrada se prepararon las soluciones de los estándares de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la siguiente manera:

Tabla 3. Preparación de la curva estándar para ácido fítico

| mL solución concentrada 1000 μg ácido fítico/mL) | Aforo con agua desionizada (mL) | Concentración final (μg ácido fítico/ mL) |
|---|---------------------------------|---|
| 0.125 | 25 | 5 |
| 0.250 | 25 | 10 |
| 0.500 | 25 | 20 |
| 0.750 | 25 | 30 |
| 1.000 | 25 | 40 |
| 1.250 | 25 | 50 |

Preparación del reactivo de Wade

Se pesaron 0.03 g de cloruro de hierro hexahidratado y 0.3 g ácido sulfosalicílico y se disolvieron en agua desionizada hasta un volumen de 100 ml. El reactivo debe ser preparado en el momento de hacer la determinación espectrofotométrica y una vez preparado debe leerse en menos de 30 minutos.

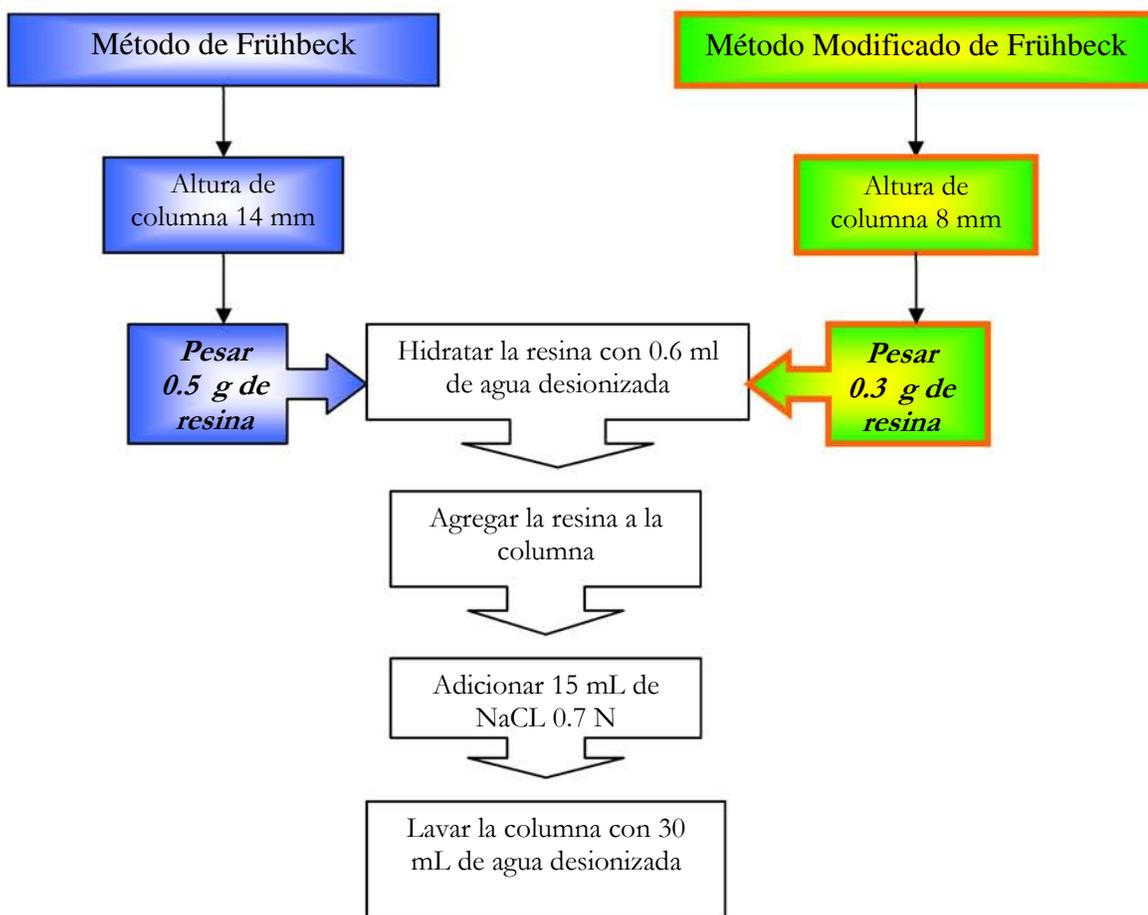
El extracto purificado de las muestras, las soluciones de la curva patrón y el blanco (agua desionizada) se ajustaron a un pH de tres, posteriormente se tomaron 3 mL de cada muestra como de las soluciones de la curva patrón y se les adicionó un mililitro de reactivo de Wade se agitó, y se leyó la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro. Se utilizó una celda con agua destilada para calibrar el espectrofotómetro en cero, se leyó la absorbancia a 500 nm del blanco, las muestras y los estándares; a cada una se le restó el blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.

5.5 MÉTODO MODIFICADO DE FRÜHBECK

Extracción de la muestra

La extracción del ácido fítico se realizó de igual forma que en el método original, siguiendo los pasos que se muestran en el diagrama 1. Las muestras empleadas para probar el método original de Frühbeck y la modificación fueron las mismas: sorgo crudo y cocido, avena, maíz blanco, nixtamal y tortilla.

DIAGRAMA 2. PREPARACIÓN DE COLUMNAS PARA EL MÉTODO DE FRÜHBECK Y MODIFICACIÓN DEL MÉTODO DE FRÜHBECK



La modificación realizada a la metodología de Frühbeck se llevó a cabo en la preparación de columnas, para ello se emplearon columnas de resina con una altura menor, reduciendo la cantidad de resina utilizada para empacarlas. En el diagrama 2 se muestran los pasos que se siguieron para la preparación de las columnas de acuerdo al el método de Frühbeck como a la propuesta de modificación.

Preparación de columnas

Se pesó aproximadamente 0.3 g de resina de intercambio aniónico Dowex AG1 X8 (200-400 mesh, Bio Rad) la cual se hidrató con 0.6 mL de agua desionizada. Como columnas se emplearon jeringas plastipack de 3 mL, colocadas en un soporte (gradilla) a la cual se le introdujo en el fondo un tapón de fibra de vidrio que se realizó doblando la fibra en forma envolvente sin que rebase una altura de 0.5 cm de la columna. Se le agregó a la columna la resina hidratada cuidando que quede asentada uniformemente. Una vez que la resina esté bien empacada en la columna se adicionaron 15 ml de NaCl 0.7 N y posteriormente se lavó con 30 mL de agua desionizada cuidando dejar líquido suficiente (aproximadamente 0.5 cm de altura arriba de la resina empacada) para que no se seque la resina y quede lista para usarse.

Purificación

Del sobrenadante colectado se tomó una alícuota de 5 mL al igual que en método de Frühbeck y se diluyó con agua desionizada a un volumen de 25 mL. El pH se ajustó a un valor de 6.0 con una solución de NaOH 5 N, para las muestras de maíz, nixtamal y tortilla se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos, posteriormente se tomó una alícuota de 10 mL y se transfirió cuantitativamente a la columna de resina de 8 mm.

La columna se lavó con 15 mL de NaCl 0.1 N y se desechó al agua de lavado. El ácido fítico se eluyó con 15 mL de NaCl 0.7 N y se colectó el extracto purificado.

Determinación

Se preparó de igual forma la curva estándar que el método de Frühbeck, se tomarón 3 mL del blanco, los estándares así como la muestra y se les adicionó un mililitro del reactivo de Wade se agitó y se leyó a una longitud de onda de 500 nm.

5.6 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Precisión

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia. La cual se determinó mediante la repetibilidad y reproducibilidad del método.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método. Se realizó mediante el análisis del contenido de ácido fítico en la muestra (sorgo crudo) por sextuplicado en un mismo día teniendo como criterio de aceptación un coeficiente de variación $\leq 5\%$.

Reproducibilidad: Precisión de un método analítico, expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas en diferentes condiciones. Se realizó al determinar el contenido de ácido fítico en sorgo crudo por triplicado durante tres días diferentes considerándose como criterio de aceptación un coeficiente de variación $\leq 5\%$.

Linealidad

La habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Se prepararon por sextuplicado seis niveles de concentración de la solución de referencia (sal sódica de ácido fítico de Sigma) en un rango de 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fítico y se midió la respuesta analítica (espectrofotométricamente a 500 nm), se calculó el valor de la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación, empleado como criterio de aceptación en un valor de $r^2 \geq 0.98$

Exactitud (Recobro)

Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia (ácido fítico Sigma). Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de la muestra.

La determinación se llevó a cabo preparando tres niveles de concentración de la sustancia de referencia (sal sódica ácido fítico) 8, 25 y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fítico, el análisis se realizó por sextuplicado bajo las mismas condiciones, es decir cada una de las concentraciones se pasó por la columna, se lavó con NaCl 0.1 N y después se eluyó con NaCl 0.7 N para continuar con la determinación colorimétrica. Se determinó la cantidad recuperada del analito teniendo como criterio de aceptación un porcentaje de recuperación del 95 a 105% así como un coeficiente de variación del método $\leq 5\%$.

Límite de cuantificación

Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

Se analizó por sextuplicado la concentración más baja de trabajo ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$ ác. Fítico) en un mismo día, considerando como punto de validez del límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del $\pm 20 \%$ del valor nominal ($4 - 6 \mu\text{g} / \text{mL}$ ác. Fítico, ya que la concentración analizada fue de $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ ác. Fítico) con un coeficiente de variación $\leq 5\%$.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Uno de los criterios establecidos para la validación del método de Frühbeck, así como para las modificaciones del método de Frühbeck y el análisis de las muestras fue un coeficiente de variación menor o igual a cinco por ciento, debido a que la técnica implica gran manipulación de la muestra, ya que se realiza una extracción, diluciones y por último una purificación, lo cual puede llevar a errores aleatorios que hacen que aumente la variación de los valores obtenidos, no obstante también se consideraron los criterios de aceptación de cada uno de los parámetros de acuerdo al manual de validación [24].

La modificación que se realizó a la metodología establecida por Frühbeck fue en la etapa de preparación de columnas, ya que se disminuyó la cantidad de resina de intercambio iónico de 0.5 g a 0.3 g, disminuyendo la altura de la columna de 14 mm a 8 mm, con esta característica en las columnas se evaluaron los parámetros de validación, respetando los mismos criterios para cada parámetro evaluado en ambas metodologías.

Tabla 4. Precisión para el método de Frühbeck y modificación del método de Frühbeck

| Precisión | Método de Frühbeck AF (g/100g) | Modificación del Método de Frühbeck AF (g/100g) |
|------------------|-----------------------------------|---|
| Reproducibilidad | 0.588 ± 0.030 | 0.531 ± 0.023 |
| Repetibilidad | 0.603 ± 0.029 | 0.527 ± 0.025 |

Promedio ± Desviación Estándar, n=3 para la reproducibilidad en 3 días diferentes, n=6 para repetibilidad en un día. AF= ácido fítico, C.V ≤ 5%.

Dentro de los parámetros considerados para la validación del método de Frühbeck así como la modificación propuesta fue la precisión del método, evaluándose repetibilidad y reproducibilidad, resultados que se muestran en la tabla 4. Este parámetro se determinó mediante la medición

del contenido de ácido fítico en una muestra de sorgo crudo considerando como criterio de aceptación un coeficiente de variación $\leq 5\%$ criterio que se cumplió en cada una de las determinaciones tanto de reproducibilidad como de repetibilidad para ambos métodos.

La linealidad del método de Frühbeck como la de la modificación se determinó mediante la construcción de una curva estándar (anexo A), observándose que en un rango de 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fítico, la correlación entre la concentración de las soluciones y la respuesta que se obtuvo fue lineal, dicha correlación se calculó mediante el tratamiento de los datos empleando el modelo matemático de mínimos cuadrados, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.99 valor que cumple con el criterio de aceptación $r^2 \geq 0.98$ lo cual indica que las lecturas obtenidas son proporcionales a la concentración en dicho rango para el método de Frühbeck como para la modificación del método.

Tabla 5 Porcentaje de recuperación de ácido fítico por el método de Frühbeck y el método modificado propuesto.

| Concentración analizada $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF | Método de Frühbeck | Modificación del Método de Frühbeck |
|---|--------------------|-------------------------------------|
| | % Recuperación | % Recuperación |
| 8 | 99 | 95 |
| 25 | 95 | 95 |
| 45 | 96 | 96 |

Criterio de aceptación 95 –105% de recuperación, $n= 6$, $\text{CV} \leq 5\%$
AF= ácido Fítico.

La exactitud de las metodologías se determinó mediante el análisis de porcentaje de recuperación a tres concentraciones diferentes de ácido fítico, el porcentaje de recuperación se muestra en la tabla 5.

El porcentaje de recuperación de ácido fítico para las concentraciones de 25 y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fítico fue el mismo en ambas metodologías, para la concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación en el método de Frühbeck que para el método modificado, sin embargo la recuperación se encuentra en el límite inferior de criterio de aceptación, lo que indica que aun cuando la columna tiene menor resina y una menor altura la retención del ácido fítico es buena.

Tabla 6. Recuperación de ácido fítico en el límite de cuantificación para el método de Frühbeck y modificación del método de Frühbeck.

| Concentración analizada $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF | Método de Frühbeck | Método Modificado de Frühbeck |
|--|--------------------|----------------------------------|
| | % Recuperación | % Recuperación |
| 5 | 4.67 ± 0.22 | 3.97 ± 0.24 |

Promedio \pm Desviación Estándar, Criterio de aceptación 4-6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AF, $n=6$, $C.V \leq 5\%$
AF = ácido fítico

El límite de cuantificación para el método de Frühbeck fue de 4.6 ± 0.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fítico y el obtenido para la modificación del método fue de 3.97 ± 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fítico, el cual se encuentra en el límite inferior del criterio de aceptación de 4 a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya que se considero un margen $\pm 20\%$ del valor nominal o analizado que en este caso fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fítico (tabla 6), sin embargo, para este último si se considera que se emplearon columnas con una menor altura de resina y que se analizó la mínima concentración del rango de trabajo, además de las características del método, la recuperación tiende a ser menor ya que es más fácil que se tengan pérdidas en la manipulación de la muestra.

Tabla 7. Comparación de tiempos de preparación de columnas entre los métodos para la determinación de ácido fítico en cereales

| Muestra | Método de Frühbeck (columna 14 mm) | Método Modificado (columna 8 mm) | Reducción del tiempo de preparación de columnas (%) |
|--------------|--|--|--|
| | Tiempo de Preparación de Columnas (min) | Tiempo de Preparación de columnas (min) | |
| Maíz | 72 ± 4 | 38 ± 6 | 47 |
| Tortilla | 59 ± 6 | 34 ± 3 | 42 |
| Nixtamal | 64 ± 5 | 32 ± 5 | 50 |
| Avena | 65 ± 2 | 31 ± 3 | 52 |
| Sorgo Crudo | 60 ± 5 | 30 ± 6 | 50 |
| Sorgo Cocido | 63 ± 4 | 35 ± 3 | 44 |

Promedio ± Desviación Estándar, n=3

Se cuantificó el tiempo de preparación de columnas de 14 y 8 mm, para todas las muestras de cereales analizadas (tabla 7). Se puede observar que los tiempos de preparación de columnas en todos los caso disminuye desde un 42 hasta un 50% (aproximadamente de una hora a treinta y cinco minutos se redujo el tiempo) aunque no debería haber variación en los tiempo de preparación entre las columnas, se observó que el acomodo del tapón de fibra de vidrio es fundamental, ya que es el principal factor que puede afectar en el paso de las soluciones por la resina y retardarlas, debido a que la cantidad de resina es la misma y los volúmenes para la preparación son los mismos.

Tabla 8. Comparación de tiempos de purificación en cereales por el método de Frühbeck y el método modificado de Frühbeck.

| Muestra | Método de Frühbeck | Modificación del Método de Frühbeck | Reducción del Tiempo Purificación (%) |
|--------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | Tiempo de Purificación (min) | Tiempo de Purificación (min) | |
| Tortilla | 120 ± 12 | 71 ± 6 | 41 |
| Maíz | 98 ± 20 | 52 ± 10 | 47 |
| Nixtamal | 90 ± 5 | 60 ± 3 | 33 |
| Avena | 75 ± 5 | 38 ± 3 | 50 |
| Sorgo Crudo | 67 ± 5 | 35 ± 4 | 47 |
| Sorgo Cocido | 75 ± 3 | 39 ± 5 | 48 |

Promedio ± Desviación Estándar, n=3

Las muestras que más tardaron en la etapa de purificación tanto por el método de Frühbeck como en el método modificado fueron el maíz y sus derivados, es decir el nixtamal y la tortilla (tabla 8) los tiempos fueron de 90 minutos para el nixtamal y 120 minutos para la tortilla empleando el método de Frühbeck, y 52 minutos para maíz y 71 minutos en tortilla empleando la modificación propuesta del método, estas muestras presentan una peculiaridad, en el sobrenadante que se recupera de la centrifugación después de la extracción se forma un estratificado blanquecino en la superficie del sobrenadante. En estos alimentos se encuentra una gran cantidad de almidón (75 % aproximadamente) que puede ser liberado con la extracción y puede formar estos estratificados los cuales impiden el flujo a través de la resina, debido a esta característica las muestras se sometieron a otra centrifugación antes de la etapa de purificación, con lo cual se logró que la muestra pasara a través de la resina, sin embargo el tiempo fue mayor que en la avena y el sorgo.

Aún cuando los tiempo de purificación variaron en cada muestra sí se logró disminuir el tiempo de esta etapa de un 33 a 50 por ciento al emplear las columnas con una altura de 8 mm en vez de las de 14 mm empleadas en el método establecido por Frühbeck.

Tabla 9. Contenido de ácido fítico en algunos cereales (g/100g) por el método de Frühbeck y la Modificación del método de Frühbeck.

| Muestra | Método de Frühbeck | Modificación del Método de Frühbeck |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | Ácido Fítico ¹ (g/100g) | Ácido Fítico ¹ (g/100g) |
| Tortilla | 0.39 ± 0.021 | 0.40 ± 0.019 |
| Maíz | 0.51 ± 0.016 | 0.49 ± 0.016 |
| Nixtamal | 0.55 ± 0.032 | 0.49 ± 0.026 |
| Avena | 0.64 ± 0.028 | 0.63 ± 0.027 |
| Sorgo Crudo | 0.56 ± 0.025 | 0.54 ± 0.024 |
| Sorgo cocido | 0.42 ± 0.019 | 0.40 ± 0.018 |

¹ Promedio ± Desviación Estándar, n=3, C.V ≤ 5%

Una vez establecidas y validadas ambas metodologías se realizó la determinación del contenido de ácido fítico en muestras de cereales y derivados (nixtamal y tortilla), resultados que se muestran en la tabla 9.

Los valores del contenido de ácido fítico observados al emplear la técnica de Frühbeck son muy semejantes a los encontrados al realizar la técnica propuesta. Al realizar el análisis estadístico por medio de una prueba de t de student la cual compara las medias utilizando los dos conjuntos de datos. No se encontró diferencia estadísticamente de ácido fítico por el método de Frühbeck y

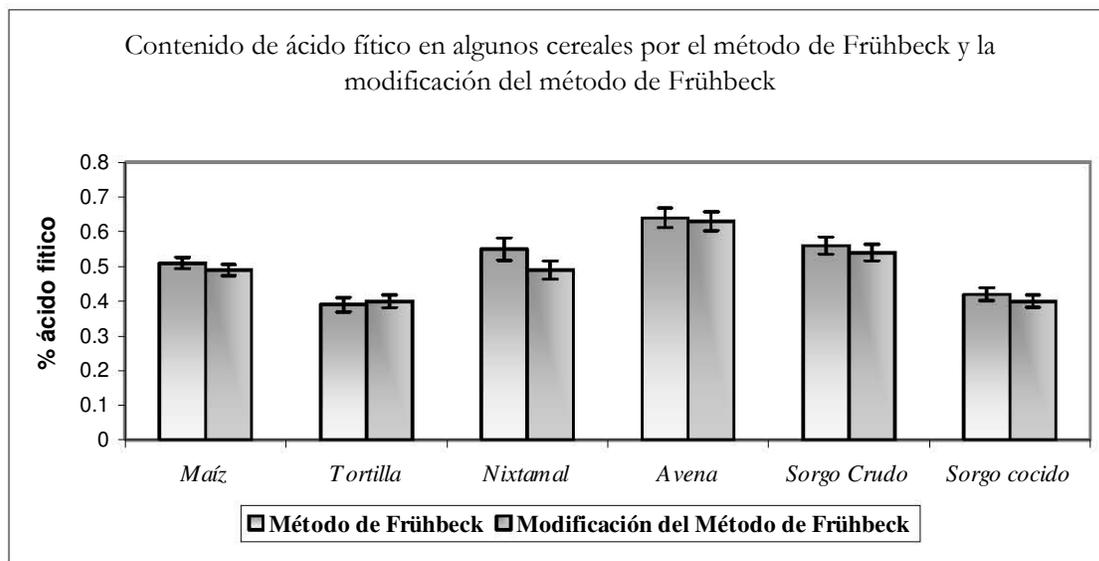
el propuesto en ninguna de las muestras estudiadas. En el caso del nixtamal la diferencia es más notable de 0.55 a 0.49%, sin embargo esta muestra presenta otra peculiaridad que es el alto contenido de almidón, 81% que hace más complicado el análisis del ácido fítico con mayor variabilidad. Ya que presenta la característica de formar estratificados de almidón que dificultan su análisis. En el proceso de nixtamalización el contenido de almidón aumenta en el maíz a un valor de 81% de acuerdo con lo reportado por Agama-Acevedo[26], además que en dicho proceso el almidón sufre un proceso de gelatinización aumentando la viscosidad [1, 27] siendo ésta la posible causa de la formación de la capa blanca que se presenta en la muestra y que causo mayor tiempo de purificación y por tanto en las determinaciones también pudo influir. El contenido de almidón en maíz es de 73% y no difiere en gran proporción con el contenido reportado para tortilla y sorgo 70% almidón de acuerdo al reporte de la FAO [28], sin embargo la muestra sí presentó turbidez la capa blanquecina después de la extracción.

La avena fue la muestra con mayor contenido de ácido fítico, el valor encontrado es ligeramente menor al reportado por Reddy en 1982 0.79-1.01% [15], sin embargo hay que considerar que estas metodologías llevan un paso de purificación que hace que no se cuantifiquen otro tipo de compuestos que no sea el inositol hexafosfato y por tanto no sobreestiman el valor. El menor contenido ácido fítico se presentó en la tortilla lo cual indica que el tratamiento que sufre el maíz para la realización de tortilla; nixtamalización y cocción (que alcanza temperaturas muy altas) permiten la disminución del contenido de ácido fítico, este resultado concuerda con lo reportado por Uriza Hernández en 1997 en donde el contenido de ácido fítico disminuyó significativamente durante el proceso de nixtamalización.

La reducción del ácido fítico puede atribuirse a la labilidad del compuesto al calor aunado al tiempo de cocción, sin embargo, existen otros factores que pueden contribuir a la disminución del ácido fítico, como la etapa de lavado del nixtamal en el cual se remueve el exceso de cal y partes físicas del grano como el pericarpio y una pequeña parte del germen, lo cual permite una remoción del ácido fítico [29].

En la muestra de sorgo tanto crudo como cocido no se presentó diferencia significativa estadística entre los métodos pero sí se puede apreciar que el contenido de ácido fítico disminuye con el tratamiento térmico, esto debido muy probablemente a la degradación del ácido fítico por la degradación térmica como lo reporta Agte en 1999 [30].

Grafica 1. Comparación del contenido de ácido fítico en cereales



En la gráfica 1 se puede observar los contenidos de ácido fítico en las diferentes muestras de cereales analizadas tanto por el método de Frühbeck como por la modificación propuesta del método, en las muestras de maíz, nixtamal, avena y sorgo tanto crudo como cocido, el contenido de ácido fítico es ligeramente mayor por el método de Frühbeck que en el método modificado y únicamente en la tortilla se presentó un valor de ácido fítico mayor en la modificación del método, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas entre los dos métodos como lo muestra la t de student . La avena fue la muestra en la que menor diferencia entre los valores de ácido fítico se encontró y la de mayor contenido de ácido fítico de las muestras analizadas.



7. CONCLUSIONES



- ☞ El método de Frühbeck se modificó en la etapa de purificación del ácido fólico, disminuyendo la cantidad de resina de las columnas de intercambio iónico y por tanto la altura de la columna de 14 a 8 mm.
- ☞ Se logró disminuir del tiempo purificación de la muestra al pasar por las columnas, así como el de preparación, reduciéndose el tiempo total de análisis del ácido fólico.
- ☞ Tanto el método de Frühbeck original como el método modificado son precisos, exactos y lineales en un rango de concentración de 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fólico.
- ☞ El límite de cuantificación para el método de Frühbeck es de 4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ácido fólico y para la modificación del método es de 3.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ácido fólico.
- ☞ No se presentó diferencia significativa estadísticamente entre el valor del contenido de ácido fólico por el método de Frühbeck y por el método modificado, en ninguna de las muestras analizadas al hacer una t de student para datos pareados.
- ☞ El mayor contenido de ácido fólico de las muestras analizadas se observó en la avena y el menor en la tortilla, la cual es un producto procesado, indicando que tanto el proceso de nixtamalización (la cocción del maíz con cal y lavado) como la cocción de la masa para la obtención de la tortilla, a altas temperaturas disminuye la cantidad de ácido fólico.
- ☞ En la muestra de sorgo también se observó que el contenido de ácido fólico se disminuyó por el proceso de cocción.



8. BIBLIOGRAFÍA



1. Bello-Pérez Luís A, Osorio Díaz, Agama-Acevedo E, Núñez Santiago C, Paredes López O, Propiedades químicas, Fisicoquímicas y Reológicas de masas y harinas de maíz nixtamalizado, *Agrociencia*, 36, p. 319-328, 2002.
2. Rosado L. Jorge, Camacho-Solís Rafael, Bourges Héctor, Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y trigo en México, *Salud Pública de México*, 41, p. 130-137, 1999.
3. Dendy David A. V, Cereales y Productos derivados, Editorial Acribia S.A, Zaragoza, 2002 p. 1-4, 442-443.
4. Plaami Sirkka, Myoinositol phosphate: Analysis, content in foods and effects in nutrition, *Food Science and Technology*, 30, p. 633-647, 1997.
5. Martínez Domínguez B, Ibáñez Gómez V, Rincón León F, Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52, p. 1-14, 2002.
6. Kenan Dost, Ozge Tokul, Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 30, p.1-6, 2005.
7. Partearroyo M. A, Fernández Quintela A, C. Cid, Sustancias Antinutritivas en Alimentos de origen Vegetal. Su significado en la alimentación humana, *Alimentaría*, Noviembre, p. 115-120, 1995.
8. Vries de John, Food Safety and Toxicity, Ed. CRC Press, (Florida) U.S.A, 1997, p. 39-42.
9. Febles C. I, Arias A, Hardisson A, Rodríguez C, Sierra A, Phytic acid level in infant flours, *Food Chemistry*, 74, P.437-441, 2001.
10. Erdam J.W. Oilseed Phytates: nutritional implication, *Journal of American Oil Chemistry Science*, 56, p. 736-741, 1979.

11. Maté Divergí, Rodomir Lásztity, Phytic Acid Content of Cereal and Legumes and interaction with proteins, Polytechnica Serial Chemical Engineering, 46, p. 59-64, 2002.
12. Purva V, Uttam C, Banerjee, Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase): overview, Enzyme and Microbial Technology, 35, p. 3-14, 2004.
13. Qing -Chuan C, Betty W, Separation of phytic acid and other related inositol phosphates by high-performance ion chromatography and its applications, Journal of Chromatography A, 1018, p. 41-52, 2003.
14. García –Estepa R.M, Determinación de ácido fítico en legumbres por complexometría indirecta, Alimentaria, octubre, p. 111-116, 1999.
15. Reddy N.R, S.K Sathier, D. K. Salunkhe, Phytates in Legumes and Cereals, Advances in Food Research, 28, p. 1-48, 1982.
16. Johannes J.L, Cilliers, Pieter J. Nieskerk, LC Determination of phytic acid in food by postcolumn colorimetric, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34, p. 680-683, 1986.
17. Mendoza Balanzario José, Validación de una metodología para la determinación de ácido fítico en alimentos. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F, 2001.
18. Latta M, Eskin M, A simple and Rapid colorimetric Method for phytate Determination, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28, p. 1313-1315, 1980.
19. Horwitz William editor, Official methods of analysis of AOAC International, 17th edition, Official method Phytate in foods, Vol. II, U.S.A, 2000 p. 57-58.

20. Lehrfeld J, Morris R. Eugene, Overestimation of phytic acid in food by the AOAC Anion-Exchange Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, p. 2208-2210, 1992.
21. Sotelo A, Mendoza J, Argote R. M, Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico, Sociedad Química de México, 46,4 p.301-306, 2002.
22. Frühbeck G, Alonso R, Marzo F, Santillán S. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs, Analytical Biochemistry, 225. p. 206-212, 1995.
23. Castillo Beatriz Aguilar y González Hernández Rolando, Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos, Revista Cubana de Farmacia, 30 , p. 1-10, 1996.
24. García A, Soberón E, Cortés M, Rodríguez, Herrera J.L, Alcántara A. Guía de Validación de Métodos Analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C, 2º edición, México, 2002.
25. Horwitz William editor, Official method of analysis of AOAC International, 17th edition, Official method Phosphorus in Fertilizar, Vol. II, U.S.A, 2000, p. 10-11, 2000.
26. Agama-Acevedo E, Ottenhof M. A, Farhat A, Paredes López O, Cereceres Ortíz J, Bello Pérez L, Efecto de la Nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz, Interciencia, 29, p. 643-649, 2004.
27. Badui Dergal Salvador, Química de Alimentos, Ed. Alhambra Mexicana, México D.F, 1995, p. 197-199.
28. David Lubin, Cap.2 Composición Química y Valor Nutritivo del Maíz, www.fao.org/docreo/T0395S/T0395S03.htm, revisión marzo 2007

29. Uriza Hernández Al, R. Biessani. Efecto de la nixtamalización del Maíz sobre el contenido de ácido fítico, calcio y hierro total y disponible, Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 47, p. 217-223,1997.
30. Agte V.V, Tarwadi K.V, Chipkar S.A, Phytate degradation during traditional cooking: significance of the phytic acid profile in cereal-based vegetarian meals, Journal Food Composition and Analysis, 12, p.161-167, 1999.
31. Robison David S, Bioquímica y Valor nutritivo de los Alimentos, Ed. Acribia S.A, Zaragoza, 1991 p. 43-45.
32. Marfo E.K, Simpson B.K, Idowu J.S, Oke L O, Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, p. 1580-1585, 1990.
33. Fretzdorff B, Brümmer J.M, Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal breads, Cereal Chemistry. 69, p. 266-270, 1992.
34. Elkhailil E.A, Tinay A.H, Mohamed B.E, Elsheikh E.A, Effect of malt pretreatment on phytic acid and in vitro protein digestibility of sorghum flour, Food Chemistry, 72, p. 29-32, 2001.
35. Hernández Hernández, Angélica del Carmen, Validación de Metodologías Instrumentales, tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F, 2005.
36. Norma Oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que se deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
37. Millar James, Estadística y Quimiometría para química analítica, 4º edición, Ed. Prentice Hall, España, 2002, p. 45-52.

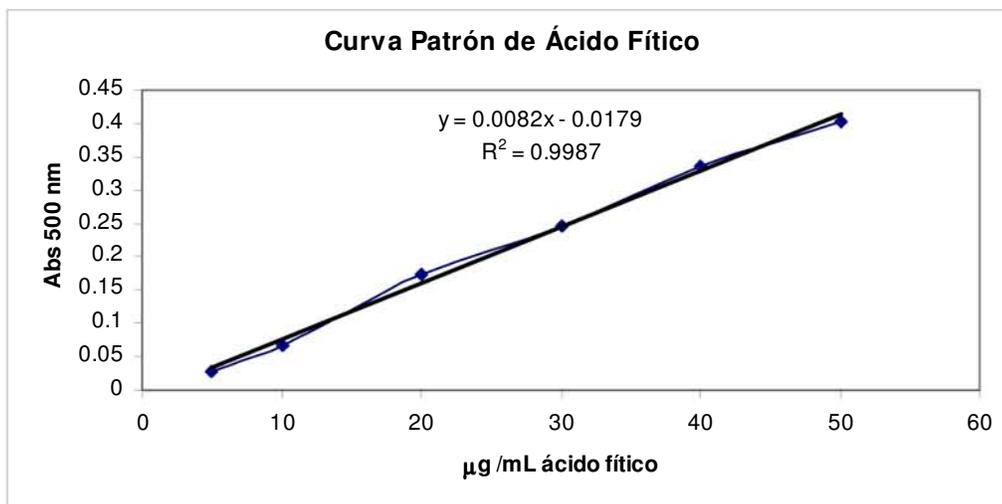


9. ANEXOS



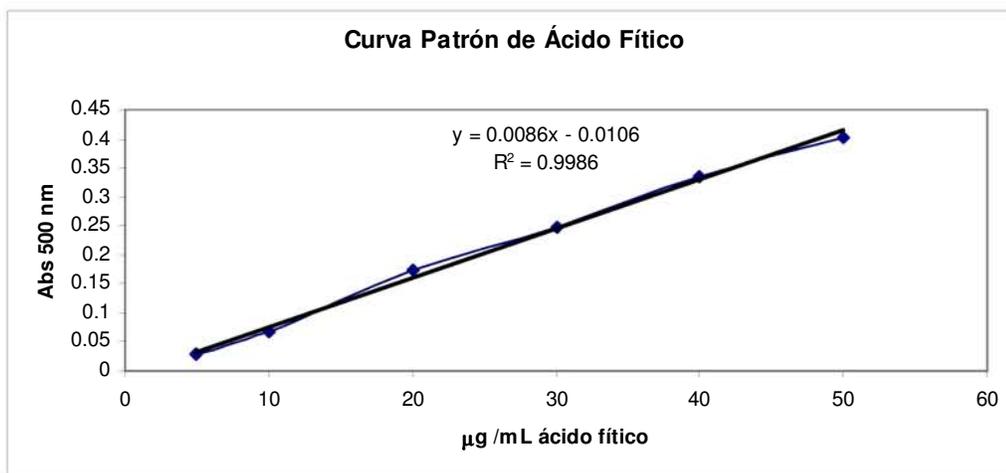
9.1 ANEXO A

Grafica 1. Curva Patrón para el Método de Frühbeck



Criterio de aceptación $r^2 \geq 0.98$, $n=6$

Grafica 2. Curva Patrón del Método Modificado de Frühbeck



Criterio de aceptación $r^2 \geq 0.98$, $n=6$

9.2 ANEXO B Formulas Matemáticas Empleadas en los Parámetros de Validación

Precisión del Método

$$\text{Media Aritmética: } \bar{X} = \frac{\sum y}{n}$$

$$\text{Desviación Estándar: } s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$$\text{Coeficiente de Variación: } CV = \frac{s}{x} \times 100$$

Linealidad del Método

$$\text{Pendiente: } m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$\text{Ordenada de Origen: } b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

$$\text{Coeficiente de determinación: } r^2 = \frac{(n \sum xy) - (\sum x)(\sum y)^2}{(n(\sum x^2))(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

9.3 ANEXO C Cálculos para Obtener los Resultados el Contenido de Ácido Fítico

Muestra: Maíz
 Peso de la muestra: 1.0001g
 Volumen de extracción (HCl): 20 ml
 Volumen de la muestra: 10 ml
 Volumen del eluyente (NaCl 0.7 N): 15 ml
 Dilución de la muestra: 5:25
 Abs muestra: 0.335

Datos de la curva patrón para la muestra

$m = 8.18 \times 10^{-3}$
 $b = -0.016$
 Abs blanco: 0.583

Absorbancia corregida (Ac)

$$Ac = Abs_{\text{blanco}} - Abs_{\text{exp de la muestra}} = 0.583 - 0.335 = 0.248$$

Interpolación del valor de la Ac con la ecuación de la recta

$$Y = mx + b$$

$$X = \frac{y - b}{m} = \frac{0.248 - (-0.016)}{8.18 \times 10^{-3}} = 32.27 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ AF}$$

$$32.27 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ AF} \left(\frac{15 \text{ mL eluyente}}{10 \text{ mL mtra}} \right) \left(\frac{25 \text{ mL aforo}}{5 \text{ mL alicuota}} \right) \times 20 \text{ mL} = 4841 \mu\text{g AF}$$

$$4841 \mu\text{g AF} \left(\frac{1 \text{ g}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}} \right) \left(\frac{1}{1.0001 \text{ g mtra}} \right) \times 100 = 0.484 \% \text{ ácido fítico}$$

9.4 ANEXO D Análisis Estadístico

Se utiliza el test t de Student para comparar un conjunto de medias con otro, y decidir si son o no diferentes. Se fija un nivel de probabilidad para concluir si dos medias difieren entre sí.

Contraste t para datos emparejados (Comparación de pares de medias)

A menudo se comparan dos métodos de análisis estudiando muestras de ensayo que contienen sustancialmente diferentes cantidades de analito y se desea ver si difieren los resultados obtenidos por los dos métodos. El contraste para datos emparejados observa la diferencia, d , entre cada par de resultados dados por los dos métodos. Si no existe diferencia entre los dos métodos, entonces estas diferencias se obtienen de una población con media $\mu_d = 0$. Para probar la hipótesis nula, se prueba si d difiere significativamente de cero utilizando el estadístico t . El número de grados de libertad de t es $n - 1$.

Se calcula el estadístico $t = \frac{\bar{d}}{s_d \sqrt{n}}$

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n - 1}}$$

Donde n = Número de diferencias por pares

\bar{d} = Media de las diferencias muestrales

s_d = Desviación estándar de las diferencias muestrales.

Cálculo de t de student

| Muestra | Contenido de AF | | Diferencia (d_i) |
|---------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|
| | Método de Frühbeck | Modificación del Método | |
| Tortilla | 0.39 | 0.40 | -0.01 |
| Maíz | 0.51 | 0.49 | 0.02 |
| Nixtamal | 0.55 | 0.49 | 0.06 |
| Avena | 0.64 | 0.63 | 0.01 |
| Sorgo Crudo | 0.56 | 0.54 | 0.02 |
| <i>Sorgo Cocido</i> | 0.42 | 0.40 | 0.02 |
| | | | $\bar{d} = 0.02$ |
| <hr/> | | | |
| $n = 6$ | | | |

$$S_d = 0.022$$

$$t_{\text{experimental}} = \frac{0.02}{0.022 \cdot \sqrt{6}} = 2.22$$

Grados de libertad = 5

$$T_{\text{tablas}} = 2.571$$

$t_{\text{experimental}} < t_{\text{tablas}}$ No hay diferencia significativa entre los métodos.