



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

**VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE ÁCIDO
FÍTICO DEBIDO AL PROCESO DE GERMINACIÓN
EN CEREALES**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Karlo Isaac Jiménez Castillo

MÉXICO, D.F.

Año: 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 Profesora ANGELA SOTELO LÓPEZ

Vocal Profesor BERNARDO LUCAS FLORENTINO

Secretario Profesora LUCIA CORNEJO BARRERA

1er. Suplente Profesora INÉS MIRANDA MARTÍNEZ

2º. Suplente Profesora ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

El tema fue desarrollado en el Laboratorio 111, Departamento de Farmacia,
Conjunto E de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

Asesora: M. en C. ANGELA SOTELO LOPEZ

Supervisora técnica: QFB LETICIA GIL VIEYRA

Sustentante: KARLO ISAAC JIMÉNEZ CASTILLO

A mis padres Artemio Jiménez y Angélica Castillo:

Por su sabiduría y su visión para dejarme tomar mis decisiones pero nunca dejarme solo, por apoyarme en cada paso, por su amor y la educación que me dieron, porque sin ustedes jamás habría llegado hasta este momento, esta tesis se la dedico a ustedes, con todo mi cariño y respeto. Gracias!!!

A mis abuelos Juan Castillo y Josefina Aviña:

Aunque estén lejos jamás están fuera de nuestros pensamientos, esta tesis también va por ustedes.

A mi tía Ada Castillo

Se que siempre estás al pendiente de mí.

A mis hermanos Juan y Edgar:

Estoy seguro que ustedes tienen la capacidad de llegar hasta donde quieran si se lo proponen.

Agradecimientos

- ☼ A Dios, como cada persona lo entienda, por permitirme estar en la época, en el país, en la universidad y en la familia en la que estoy. Gracias porque tengo todas las herramientas para hacer grandes cosas.
- ☼ A mis padres, sin su apoyo, sabiduría y amor no se donde estaría.
- ☼ A mi asesora, la profesora Ángela Sotelo, por su guía durante el desarrollo del tema.
- ☼ A mi supervisora técnica, Leticia Gil, siempre estuvo en excelente disposición para aclarar mis dudas.
- ☼ A la profesora Rosita Argote, nunca me negó su asesoría cuando la necesité.
- ☼ Al programa 127 de la Facultad de Química, por el apoyo económico que me brindaron.
- ☼ Al programa PAPIME PE 205005, por su apoyo en el desarrollo del tema.
- ☼ A mis amigas de la Facultad de Química, Silvia y Claudia, el camino recorrido fue mucho más agradable y provechoso con ustedes a mi lado.
- ☼ A mis amigas Miriam y Bety, siempre estuvieron al pendiente de mí.
- ☼ A Argelia ya que constantemente me asistió en trámites y cuestiones administrativas.
- ☼ A la Señora Vicky, por su amabilidad y disposición para brindarme su ayuda.

ÍNDICE.

	Página
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>2. OBJETIVOS</u>	3
<u>3. ANTECEDENTES</u>	4
<u>3.1 El ácido fítico</u>	4
3.1.1 Estructura química y propiedades.....	4
3.1.2 Problemática causada por el ácido fítico.....	6
3.1.3 Algunos beneficios y usos del ácido fítico.....	9
<u>3.2 La germinación</u>	11
3.2.1 Aspectos generales.....	11
3.2.2 Beneficios por el proceso de germinación.....	12
<u>3.3 La germinación y el contenido de ácido fítico</u>	14
<u>3.4 Los cereales</u>	15
<u>3.5 El hierro</u>	20
3.5.1 Aspectos generales.....	20
3.5.2 Absorción y aprovechamiento del hierro.....	21
3.5.3 Contenido de hierro de las carnes.....	22
3.5.4 Necesidades de hierro.....	23
<u>4. METODOLOGÍA</u>	24
<u>4.1 Diagrama general de trabajo</u>	24
<u>4.2 Selección de las muestras</u>	25
<u>4.3 Acondicionamiento de las muestras</u>	25
4.3.1 Muestras sin germinar.....	25
4.3.2 Muestras germinadas.....	25
<u>4.4 Determinación de humedad</u>	26
4.4.1 Fundamento.....	26
4.4.2 Equipo y materiales.....	26
4.4.3 Procedimiento.....	26
4.4.4 Cálculos.....	26
<u>4.5 Determinación del ácido fítico</u>	27
4.5.1 Fundamento.....	27
4.5.2 Equipos y materiales.....	27
4.5.3 Reactivos y soluciones.....	28
4.5.4 Procedimiento.....	29
4.5.4.1 Preparación de columnas de intercambio iónico.....	29
4.5.4.2 Extracción del ácido fítico.....	29
4.5.4.3 Purificación por columna de intercambio iónico.....	30
4.5.4.4 Determinación espectrofotométrica.....	30
4.5.5 Cálculos.....	31

1. INTRODUCCIÓN

El ácido fítico (AF) y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en semillas de cereales y leguminosas. Sin embargo, en esta forma el P permanece no disponible para el hombre y animales monogástricos, debido a que éstos no están provistos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato. El AF es además un compuesto con actividad antinutricional, debido a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales y proteínas convirtiéndolos en no asimilables por el organismo bajo condiciones fisiológicas.¹

Por otro lado se tiene el proceso de germinación, diversos estudios en diferentes productos muestran beneficios debido a éste, por ejemplo el incremento en el contenido de las vitaminas B₂, E y C, la reducción de antinutrientes como α -galactosidasa, fosfatos de inositol e inhibidores de tripsina.² También se ha encontrado que la germinación aumenta la capacidad antioxidante y en consecuencia la inhibición de la peroxidación lipídica.³

En el presente trabajo se midió el contenido de ácido fítico en diversos cereales (amaranto, avena, cebada, centeno, maíz, trigo, triticale y sorgo) ya que éste representa un factor antinutricional, además se determinó cómo la germinación afecta dicho contenido para lo cual se empleó una modificación de la metodología propuesta por Frühbeck et al.⁴, realizada por Sotelo et al.⁵, debido a la versatilidad y accesibilidad que ésta ofrece. De manera general se encontró que durante la germinación disminuye el contenido de ácido fítico.

Adicionalmente se evaluó la extractabilidad del hierro usando una modificación de la metodología empleada por M.H. Badau et al.⁶ en los cereales, hallándose que en general una disminución en el contenido de ácido fítico aumentó la extractabilidad del hierro.

Además se midió el porcentaje de germinación de los cereales, encontrando una tendencia en la cual a un mayor contenido de ácido fítico inicial en la semilla se observa un mayor porcentaje de germinación de la misma.

A pesar de que se han hecho estudios sobre los efectos de la germinación en la calidad de los alimentos y sobre como afectan el contenido de ácido fítico, en realidad la mayoría de dichos estudios se enfoca a las leguminosas. Ya que los cereales son un grupo de alimentos de gran importancia en México se desea tener mas datos sobre ellos.

2. OBJETIVOS

- 2.1 Objetivo general:

- ✓ Determinar el efecto que la germinación tiene en el contenido de ácido fítico en diversos cereales (amaranto, avena, cebada, centeno, maíz, trigo, triticale y sorgo.)

- 2.2 Objetivos particulares:

- ✓ Germinar diversos cereales y determinar el porcentaje de germinación de éstos.
- ✓ Cuantificar el ácido fítico.
- ✓ Medir la extractabilidad del hierro de los cereales en estudio.
- ✓ Determinar como el cambio en el contenido de ácido fítico afecta la extractabilidad del hierro.

3. ANTECEDENTES

3.1 El ácido fítico

3.1.1 Estructura química y propiedades

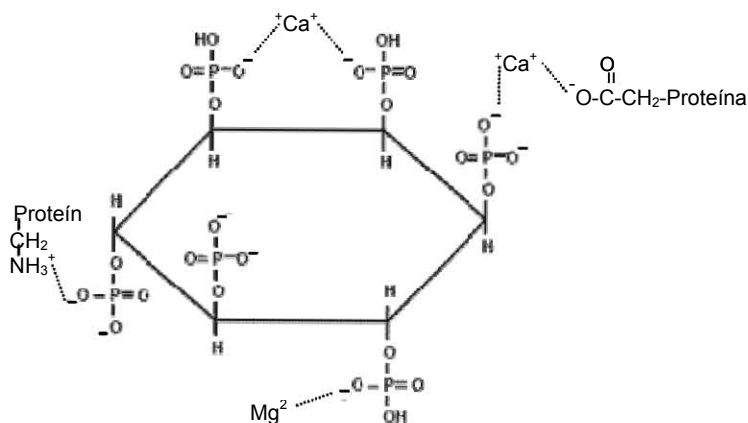
Se han propuesto varios modelos para la estructura del AF. Según el modelo propuesto por Anderson⁷, el AF sería una molécula con seis grupos ortofosfato (InsP6), de nombre químico *myo-inositol* 1, 2, 3, 4, 5, 6 - *hexakis* (dihidrógeno fosfato). Según esta estructura, el AF, a pH neutro y al pH que normalmente presentan los alimentos, es una molécula cargada negativamente y por tanto muy reactiva, por lo que presenta una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas.

La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes la interacción es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato: éstos pueden unirse bien a un sólo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfato de distintas moléculas de AF (Figura 1). En la semilla el AF se encuentra como una mezcla de sales con varios cationes como K, Mg, Ca, Mn, Zn y Fe; el término fitina se ha empleado para designar una mezcla de sales de Ca y Mg del AF.

Es importante considerar que la solubilidad de las sales del AF varía con el pH, ya que el grado de protonación de los grupos fosfato que no se han unido a los metales está en función de dicho parámetro. Aparentemente, en la semilla el AF se encuentra como sales relativamente solubles de Na o K más que como fitina insoluble. Las sales de Ca y Mg son solubles a pH bajos (por debajo del punto isoelectrico de las proteínas alrededor de 5) e insolubles a pH elevados (por encima de 9), por lo tanto a pH fisiológico (7.35-7.45) serían muy poco solubles, de ahí el descenso de la biodisponibilidad mineral. En general, las sales

hidrogenadas y monovalentes del AF son solubles en agua, mientras que las sales metálicas divalentes y trivalentes son bastante insolubles.

Figura 1. Interacciones del AF con proteínas y minerales



El grado de interacción entre AF y proteínas es dependiente de la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con minerales a un pH dado. A un bajo pH, por debajo del punto

isoelectrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el AF negativamente. En estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas, y ésteres fosfato aniónicos del AF, formándose un complejo binario (Figura 1). A pH intermedio, por encima del punto isoelectrico de las proteínas, dado que la carga de las proteínas al igual que la del AF es negativa, su interacción sería casi imposible, sin embargo si puede realizarse a través de la formación de un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} . Ésta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo imidazol desprotonado de la histidina, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos.

A pH intermedio también pueden existir algunos complejos binarios, ya que a dicho pH los residuos lisil y arginil de las proteínas están aún cargados positivamente. A pH elevado la interacción entre las proteínas y el AF disminuye, los grupos lisil y arginil pierden su carga, y por tanto su capacidad de formar complejos binarios. Los complejos

ternarios se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta a pH elevado; un incremento en la concentración del ión Na^+ hace que la reacción de equilibrio del complejo ternario se desplace hacia la derecha liberándose fitato cálcico insoluble y proteína-Na soluble (Figura 1).⁸

3.1.2 Problemática causada por el ácido fítico.

El AF se encuentra en los alimentos en niveles del 0,1- 6%, dependiendo su concentración de la parte de la planta que se consuma: en semillas los niveles son elevados, en tubérculos, raíces y frutas moderados, y en verduras bajos. En países subdesarrollados y en vías de desarrollo, así como en la población vegetariana de países desarrollados, el consumo de alimentos con altos niveles de AF es muy elevado. El consumo medio de AF en la dieta se ha estimado en 0,75-0,79 g/persona/día, siendo estos niveles 2 ó 3 veces mayores en países en vías de desarrollo como la India.⁹

Los fitatos reducen la biodisponibilidad mineral e inhiben enzimas proteolíticas y amilolíticas. A pesar de que la naturaleza exacta y el grado de unión del AF a minerales y proteínas son difíciles de determinar, y su papel en la nutrición es complejo, sí está claro que altos niveles de AF en la dieta están asociados con efectos nutricionales adversos en el hombre.

La interacción del AF con las proteínas ha sido ampliamente estudiada, principalmente en soya, sin embargo su naturaleza no es totalmente conocida y los efectos antinutricionales en la disponibilidad de dichas proteínas no están aun claros.

La existencia de una correlación negativa ($p < 0.05$) entre el AF y la digestibilidad proteínica ha sido puesta de manifiesto en varios alimentos. Sin embargo en varios estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre el efecto del fitato en la digestibilidad de las

proteínas queladas y la absorción de aminoácidos, el efecto adverso del fitato es o muy pequeño o nulo.¹⁰

Otros investigadores han atribuido el efecto negativo de los fitatos en el metabolismo proteínico más que a la formación de un complejo fitato-proteína a la capacidad de inhibir enzimas digestivas. Es conocido que el AF inhibe a la amilasa de diferentes orígenes, tripsina, tirosinasa y pepsina. Que el fitato inhiba enzimas como la pepsina no es extraño, ya que al pH ácido al cual ésta es activa se promueven fuertes uniones electrostáticas entre ambos; lo mismo ocurre con aquellas enzimas que tienen un pH óptimo ácido.

A diferencia de lo que ocurre con la pepsina, la interacción con la tripsina y la quimiotripsina no sólo depende del pH, sino también de otros factores entre los que se encuentra la relación proteína/fitato. A pH 3 el fitato forma complejos insolubles tanto con la tripsina como con la quimiotripsina, sin embargo a pH 7.8, en el que la actividad de estas enzimas es algo mayor, es necesario el Ca^{2+} para la formación de estos complejos, no obstante las condiciones a las que se producen fuertes interacciones rara vez se dan *in vivo*. Varios estudios han mostrado claramente que aunque la digestibilidad de la proteína, y por lo tanto la absorción de aminoácidos, es solamente marginalmente mayor en dietas con bajo contenido en fitato, las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas.¹¹

Una cuestión clave a tener en cuenta para entender el efecto antinutricional del AF sería conocer cuánto fitato está aun disponible tras el procesado. Si se considera la fuerte afinidad del AF hacia varios cationes y el tipo de interacciones que supone su asociación con proteínas de la dieta, así como el efecto del procesado de los alimentos, la degradación térmica de los ésteres inositol y el pH, habría que esperar que quedara poco fitato libre que interaccionara con enzimas y sistema digestivos para causar una influencia significativa.

Por otro lado hay que tener en cuenta que estudios anteriores han mostrado que en presencia de minerales como Ca^{2+} o Mg^{2+} , la inhibición *in vitro* de las enzimas podría ser mucho menor. Existen también evidencias de que el complejo fitato-proteína es menos susceptible a la digestión proteolítica que la proteína sola, sin embargo es lógico que las proteínas en las cuales alguna cadena lisil o arginil están queladas por el fitato, no sean efectivamente hidrolizadas por la tripsina, en estas condiciones serían más efectivas enzimas como la quimotripsina que muestra gran afinidad por las cadenas hidrofóbicas .

Dado que la interacción fitato-proteína y su efecto en la digestibilidad proteínica se produce bajo una amplia gama de condiciones, aunado a que tanto las condiciones simuladas *in vitro* como los resultados obtenidos son limitados, el estudio de los efectos adversos de los fitatos en la nutrición debería ser dirigido exclusivamente hacia el punto de vista de la biodisponibilidad mineral.

Por su estructura altamente reactiva, el AF es un excelente agente quelante presentando gran afinidad por todos los elementos trazas polivalentes y minerales como Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Mg^{2+} y Ca^{2+} . La mayor parte de los estudios realizados sobre la interacción entre el fitato y los minerales ponen de manifiesto la existencia de una relación inversa entre la absorción de estos micronutrientes y el AF, aunque existen grandes diferencias en el comportamiento individual de cada elemento mineral.

Los efectos adversos del AF en la biodisponibilidad mineral dependen de un gran número de factores entre los que destacan la concentración de AF y la fuerza de su unión con los diferentes minerales. También influyen otros factores como: (a) las condiciones de procesado del alimento (especialmente el pH), así como el tipo de AF (añadido o endógeno) y la concentración de minerales en dicho alimento, (b) si el AF es ingerido en la

misma comida que la fuente mineral o en comidas separadas, *(c)* la concentración de proteínas de la dieta, y por tanto la presencia de proteínas, péptidos o aminoácidos en el intestino que pueden interferir en la formación del complejo fitato- mineral, *(d)* la presencia de otros agentes quelantes como fibra dietética, ácido oxálico, ácido ascórbico, ácido cítrico o taninos, que pueden competir con el AF en su unión con minerales, *(e)* la presencia de fitasa de origen intestinal, bacteriana o de la dieta, así como la inhibición de dicha enzima, y *(f)* la adaptación metabólica del individuo a altos niveles de AF.¹²

3.1.3 Algunos beneficios y usos del ácido fítico

Del AF a bajas concentraciones, ha sido descrita bibliográficamente la existencia de efectos positivos, entre los que se pueden citar: retardo de la digestibilidad del almidón y disminución de la respuesta a la glucosa en sangre, hipocolesterolemia, prevención de cálculos renales, control de la caries dental y cáncer, y finalmente mejora de la capacidad de captación de oxígeno de los glóbulos rojos. Estudios epidemiológicos y estudios en ratas sugieren también un posible papel preventivo del AF frente a diversas patologías cardíacas, derivado del control de la hipercolesterolemia y la arteriosclerosis en el hombre. También se ha indicado el papel del AF como antídoto frente a la intoxicación aguda por plomo, debido principalmente a su capacidad de unirse a minerales.¹³

La adición de AF (en niveles de 0,2-9%) en la dieta de ratas reduce significativamente los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos. Esto parece estar relacionado con la capacidad del AF de unirse al Zn disminuyendo los niveles séricos de Zn y la razón Zn/Cu, ya que altos valores en esta relación tienden a predisponer al hombre a enfermedades cardiovasculares por implicar hipercolesterolemia. Además, posiblemente este efecto está también relacionado con la reducción de los niveles plasmáticos de glucosa

y la concentración de insulina, la cual conduce a una disminución del estímulo para la síntesis hepática de lípidos.

Por otra parte, el AF disminuye la velocidad de la digestión del almidón por los mismos mecanismos por los que ejerce su acción antinutrientes, esto es, puede unirse o bien directamente a la α -amilasa inactivándola, o al Ca que es necesario para estabilizar la actividad amilasa, o al almidón, modificando así su grado de gelatinización o su accesibilidad para las enzimas digestivas, además influye en la respuesta sanguínea a la glucosa por producir retardo del vaciado gástrico.

Estudios realizados en animales y en el hombre han mostrado que la inclusión en la dieta del salvado de trigo supone un papel protector frente a diversos tipos de cáncer, especialmente de colon y mama, sin embargo en un principio no estaba claro si este efecto era debido exclusivamente a la fibra o a otros componentes como el AF. En este sentido, se ha observado que el AF presente en el salvado de trigo, así como el AF añadido a dietas con bajo contenido en fibra reduce la presencia de biomarcadores del riesgo de cáncer. Además estudios realizados en ratas alimentadas con AF muestran una relación negativa significativa entre los niveles de AF (0,6-2,0%) y la proliferación de células epiteliales en el colon ascendente y descendente. El AF disminuye el riesgo de cáncer a través de varios mecanismos: (a) al unirse al Fe disminuye la formación de radicales libres durante la oxidación de los lípidos, ya que ésta es catalizada por dicho ión, (b) al unirse al Zn, que es necesario para la síntesis de ADN, reduce indirectamente la proliferación celular, (c) al retardar la digestión del almidón, éste puede llegar al colon y ser fermentado por las bacterias produciéndose ácidos grasos de cadena corta cuya actividad protectora frente al cáncer es conocida. Algunos investigadores han revisado el papel del AF sobre el cáncer,

llegando a la conclusión de su papel no solo en la prevención sino también como agente terapéutico ya que los InsP6 (inositol hexafosfato) incrementan la diferenciación de células malignas que a menudo resulta en una reversión al fenotipo normal. No obstante, el efecto del AF no es igual en todos los órganos: aunque se ha encontrado una reducción en la incidencia de nódulos hiperplásicos en el hígado, de carcinoma hepatocelular y de cáncer de mama, estudios realizados con distintos carcinógenos en esófago, intestino delgado, colon, riñones y tiroides muestran un efecto nulo del AF en la incidencia de cáncer en estos órganos.

En cuanto a la prevención de cálculos renales y tratamiento de la hipercalcemia (excesiva excreción de calcio urinario), existen evidencias experimentales de que los inositol di- y trifosfato (InsP2, InsP3) son efectivos en la prevención de cristales de hidroxapatita *in vitro*, que son los que actúan como núcleo en la formación de cálculos. Además estudios *in vivo* e *in vitro* y estudios clínicos, han mostrado claramente que el fitato juega un papel importante como inhibidor de la cristalización de sales cálcicas en los fluidos biológicos, siendo considerado una alternativa clara en el tratamiento de la litiasis renal.¹

3.2 La germinación

3.2.1 Aspectos generales

Se llama germinación al proceso por el que se reanuda el crecimiento embrionario después de la fase de descanso. Este fenómeno no se desencadena hasta que la semilla no ha sido transportada hasta un medio favorable por alguno de los agentes de dispersión. Las condiciones determinantes del medio son: aporte suficiente de agua y oxígeno y temperatura apropiada. Cada especie prefiere para germinar una temperatura determinada; en general, las condiciones extremas de frío o calor no favorecen la

germinación. Algunas semillas necesitan también un tiempo determinado de exposición a la luz para iniciar la germinación.

Durante la germinación, el agua se difunde a través de las envolturas de la semilla y llega hasta el embrión, que durante la fase de descanso se ha secado casi por completo. El agua hace que la semilla se hinche, a veces hasta el extremo de rasgar la envoltura externa. El oxígeno absorbido proporciona a la semilla la energía necesaria para iniciar el crecimiento. Diversas enzimas descomponen los nutrientes almacenados en el endospermo o en los cotiledones en sustancias más sencillas que son transportadas por el interior del embrión hacia los centros de crecimiento. La radícula es el primer elemento embrionario en brotar a través de la envoltura de la semilla. Forma pelos radicales que absorben agua y sujetan el embrión al suelo. A continuación empieza a alargarse el hipocótilo, que empuja la plúmula, y en muchos casos el cotiledón o los cotiledones, hacia la superficie del suelo. Los cotiledones que salen a la luz forman clorofila y llevan a cabo la fotosíntesis hasta que se desarrollan las hojas verdaderas a partir de la plúmula. En algunas especies, sobre todo de gramíneas, los cotiledones no alcanzan nunca la superficie del suelo, y la fotosíntesis no comienza hasta que no se desarrollan las hojas verdaderas; mientras tanto, la planta subsiste a costa de las reservas nutritivas almacenadas en la semilla. Desde que comienza la germinación hasta que la planta logra la completa independencia de los nutrientes almacenados en la semilla, la planta recibe el nombre de plántula.¹⁴

3.2.2 Beneficios por el proceso de germinación

Algunos estudios han puesto de manifiesto el efecto que tiene la germinación en la extractibilidad de varios minerales en HCl (lo cual puede ser tomado como un indicativo de

la biodisponibilidad de éstos). Se tiene como ejemplo el caso del mijo en el cual se observa que de 0 a 72 horas de germinación hay un aumento en la extractibilidad de Ca^{2+} casi de manera constante. En el mismo estudio se aprecia que después de 72 hrs. de germinación, la extractabilidad en HCl para el hierro incluso marca una diferencia en el contenido de éste mineral según sea el cultivo de mijo, siendo que sin germinar no había diferencias en el contenido de hierro entre los cultivos. Asimismo se aprecia que otros minerales tales como Zn, P, I, Cu y Mn, también aumentan su grado de extracción después de ser germinados.⁶

Otro estudio de germinados en *Cajanus cajan* (“arvejas de paloma”) muestran que la germinación parece ser una efectivo proceso para realzar los parámetros químicos y nutricionales de ésta leguminosa, particularmente el incremento en vitaminas B, E, C y la reducción de factores antinutricionales como α -galactosidasa, fosfatos de inositol y la actividad de inhibidores de tripsina. Cuando éstos germinados fueron incorporados como ingrediente de alta proteína en una pasta hecha a base de semolina el resultado fue un producto con buena aceptabilidad y mayores sumas de proteínas, total de azúcares disponibles, fibra dietaria, micronutrientes, vitaminas y un mayor PER que la pasta hecha 100% de semolina.²

Por otro lado está el interés que se tiene en la relación entre dietas basadas en plantas y la prevención de ciertas enfermedades del ser humano en las cuales están implicados aumentos en los niveles de radicales libres, mas aun cuando el consumo de leguminosas enteras es muy alta en países del tercer mundo, donde las enfermedades crónicas del ser humano son persistentemente encontradas. Los investigadores en enfermedades del corazón y cáncer están observando los beneficios de comidas específicas tales como frijol de soya y otras dietas derivadas de plantas. Compuestos bioactivos tales

como antioxidantes, incluyendo tocoferoles, carotenoides, vitamina C y compuestos fenólicos parecen estar asociados con estos beneficios a la salud. La germinación de semillas de leguminosas es uno de los métodos de procesamiento para incrementar el valor nutritivo y las cualidades de salud como germinados, además de que éste proceso es simple y económico. En el estudio hecho en semillas de lupino por Juan Frías et al. se encontró que la germinación de dicha semilla es una adecuada tecnología para incrementar las vitaminas antioxidantes E y C, para aumentar la actividad antioxidante medida como TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) e incrementar la inhibición de la peroxidación de los lípidos dentro de grandes vesículas unilamelares.¹⁵

3.3 La germinación y el contenido de ácido fítico

Numerosos estudios han puesto de manifiesto un incremento en la acumulación de AF con la maduración de la semilla. Aunque dicha acumulación ha sido interpretada por algunos autores como una manera de prevenir –niveles excesivamente altos de P inorgánico durante la maduración, la mayoría coincide en que su función principal es el almacenamiento de P. En la semilla, el AF constituye el principal almacén de P inorgánico, en forma de fosfatos y *myo*-inositol, así como de determinados cationes, como el Mg^{2+} que son movilizados durante la germinación para la síntesis de ácidos nucleicos, además el *myo*-inositol es un importante precursor de los polisacáridos de la pared celular y de fosfolípidos incluidos en la señal de transducción. Por otro lado, la capacidad antioxidante del AF hace que éste contribuya a aumentar el tiempo de latencia de la semilla, ya que previene la peroxidación de lípidos, y se ha visto que inositoles metilados participan en la osmoprotección en plantas halofílicas.

La regulación de la acumulación de AF durante el desarrollo de la semilla no es totalmente conocida, parece ser que se lleva a cabo mediante un control genético en el que

participan numerosos genes. Altas concentraciones de AF en semilla de soya aparecen como paralelas a mayores concentraciones de P en la hoja, y ambas están relacionadas de una manera compleja determinada tanto por factores ambientales (influyen en la cantidad de P disponible), como genotípicos (influyen en la absorción de P), de modo que determinan el suministro de P durante la germinación.

Numerosos investigadores han encontrado una reducción del AF durante la germinación en las semillas de leguminosas, aparentemente como resultado de un elevado aumento de la actividad fitasa. La enzima fitasa (*myo-inositol- hexaquisfostato 3-fosfohidrolasa*, EC 3.1.3.8), que cataliza la hidrólisis del AF en myo-inositol, myo-inositol fosfatos y fosfatos inorgánicos está ampliamente distribuida en plantas, tejidos animales y en numerosas especies de mohos. Las semillas presentan tanto actividad fitasa constitutiva, así como enzimas fitasa que son sintetizadas "de novo" durante la germinación.¹

3.4 Los cereales

La importancia de estudiar a los cereales radica en que sólo el 10 % (en países en vías de desarrollo como el nuestro) de los alimentos básicos amiláceos se obtiene de raíces y tubérculos mientras que el resto se obtiene precisamente de los cereales.

Los granos de cereales contienen del 60 al 70 % de almidón y son alimentos excelentes, ricos en energía, para los humanos. De las últimas investigaciones realizadas se ha visto evidentemente que las dietas saludables de los adultos deben proporcionar la mayor parte de sus calorías en la forma de carbohidratos complejos, como los almidones de los cereales. Una dieta humana sana debe incluir 20-30 g de fibra vegetal que se puede conseguir fácilmente comiendo productos a base de cereales integrales, en forma de pan, galletas o papillas, etc.

Algunos de los cereales y granos de mas importancia tanto a nivel mundial como en México son: Amaranto, avena, cebada, centeno, maíz, trigo, triticales y sorgo. A continuación se incluyen una breve serie de datos sobre cada uno:

Trigo: Generalmente se ha establecido que el trigo fue uno de los primeros granos de cereal en ser cultivados. Muchas variedades de trigo emmer han sido encontradas en los depósitos de desechos de los habitantes de los lagos de Wangen y Robenhausen los cuales datan del final de la era Neolítica, un poco antes de la era de bronce. Tanto el trigo emmer como el durum se han encontrado en tumbas egipcias de la primera dinastía, indicando cultivos a lo largo del Nilo al menos hace 6000 años.

La adaptabilidad del trigo a varios climas y suelos se evidencia en su amplia distribución en todo el mundo. El trigo es cultivado a cierto nivel en cada continente excepto en la Antártica. Incluso Asia, considerado como una zona en la que el cultivo y consumo de arroz es predominante, posee una mayor producción de trigo. En una gran cantidad de regiones del mundo, el trigo es la mayor fuente de carbohidratos y proteínas para el habitante promedio.

Maíz: Originario del hemisferio occidental, fue el único cereal sistemáticamente cultivado por los indígenas americanos (aunque algunos otros granos en estado salvaje se cosecharon). Los lugares que se han sugerido como los centros del origen del maíz son América central (incluido el sur de México) y los altiplanos de Perú.

La vasta cantidad de maíz dentado que es producido en EUA y algunos otros países es extremadamente importante en la alimentación y procesadores industriales. El maíz dentado no fue conocido por los indígenas americanos, se originó a inicios del siglo XIX, supuestamente como una cruce entre el maíz Virginian Gourdseed y la variedad Northeastern. Los actuales cultivos de dentado son el resultado de casi dos siglos de intensa

selección, cultivo y, eventualmente, hibridación. Las superiores cualidades del dentado para alimentación y uso industrial, sus muy altos rendimientos bajo condiciones satisfactorias y su relativamente buena resistencia a enfermedades y pestes han causado que desplace otras especies de maíz de campo. Cabe destacar que EUA domina la producción mundial y exportaciones de maíz.

Avena: Al amanecer de la agricultura, una forma de avena salvaje aparentemente existió como una cizaña en regiones ampliamente separadas del mundo. Núcleos de avena, no se si cultivados o no, fueron encontrados en la caverna de Franchthi en Grecia que datan del 10500 A.C. Los agricultores primitivos, sin embargo, concentraron sus esfuerzos en el cultivo de los precursores de los modernos trigo y cebada. La avena continuó apareciendo en los campos y fue cosechada junto con los granos mas deseados. En algún momento no registrado en la era histórica la avena empezó a ser cultivada en sembrados mas o menos puros probablemente a que dieron mayores o mas consistentes rendimiento que otros granos cultivados bajo las condiciones climáticas y de suelo existentes en algunas partes del noroeste europeo.

La avena se coloca en el sexto lugar en la producción mundial de cereales aunque ha tenido una tendencia a la baja, debido a que otros cultivos poseen mayores rendimientos, particularmente mientras variedades mejoradas de arroz o trigo sean introducidas.

El clima es el principal factor que gobierna el crecimiento de la avena, la cual se favorece en climas fríos y húmedos pero la diversidad en los tipos de variedades hace la producción exitosa posible sobre un rango de climas más extenso que aquellos disponibles para cualquier otro cereal.

Cebada: Es uno de los cultivos domesticados más antiguos del mundo y compite con el trigo por el “honor” de ser la primera forma de planta salvaje en ser cultivada. Hay

evidencia de que un tipo de cebada, parecida en varios aspectos a la cebada cultivada hoy en día, fue usada como alimentos en asentamientos a lo largo del Nilo alrededor de hace 18300 años A.C.

Es ampliamente aceptado que la cebada fue un importante grano alimenticio en varias áreas durante los tiempos prehistóricos. Fue probablemente usada en mayor medida como papillas y como base para bebidas fermentadas.

En general, la cebada es capaz de madurar en periodos más cortos que cualquier otro de los granos mayormente cosechados. Hay tipos de primavera que maduran de 60 a 70 días y tipos de invierno que pueden requerir tanto como 180 días. La planta, sin embargo, no es extremadamente resistente al invierno y no prospera en climas cálidos y húmedos. Es el cereal con mayor tolerancia a la sal de acuerdo a algunos expertos y es por tanto el mejor adaptado a suelos alcalinos, aunque desde luego posee mejores rendimientos en tierras fértiles.

Centeno: El centeno puede ser considerado un cereal de cultivo menor en las Américas pero es importante en Europa y en partes de Asia donde encuentra un substancial uso como cereal para pan. Su habilidad para producir aceptables cultivos bajo condiciones de suelo, temperatura y precipitación que hacen el cultivo de trigo impráctico es la principal razón de su dominio en estas regiones. Por su puesto, la tradición juega un rol muy importante y los granjeros continúan sembrando centeno mucho después que han sido desarrolladas variedades de trigo que podrían rendir sembrados aceptables en sus áreas de cultivo.

La persistencia del centeno como un ingrediente para el pan esta basada no en alguna superioridad que ofrezca a las características del sabor, textura o apariencia de producto final sino a un apego de los consumidores, panaderos o sembradores a producto

tradicionales, a una posible ventaja en el precio en la situación de algunos muy limitados mercados, un deseo de algunos consumidores por “algo diferente” o una percepción, no necesariamente correcta, que el centeno tiene alguna clase de características de aporte a la salud que el trigo no tiene.

Sorgo: Algunas autoridades consideran que fue domesticado en África por la gente de la tribu cushita quienes migraron a Etiopía del medio éste. Algunos autores sugieren que el sorgo bicolor, la especie mas tempranamente domesticada, se originó hace alrededor de 5000 años en la región de Sudán.

Actualmente al cultivo de sorgo es muy importante en África, India, porciones de China, el centro y sur de las grandes llanuras de EUA, Australia y Argentina, y en ciertas regiones de México y centro y Sudamérica.

El sorgo no es nativo del hemisferio occidental pero alcanzó la zona del Caribe durante el tiempo del comercio de esclavos. Una variedad llamada “maíz pollo” escapó de los cultivos y ahora crece salvaje en algunos países meridionales. Otra variedad, “maíz de guinea” estuvo una vez ampliamente distribuida pero prácticamente ha desaparecido de los cultivos.

Triticale: Se trata de un híbrido de trigo y centeno. Se le conoce desde hace mas de 100 años pero su origen es incierto. Es sembrado en gran medida en Francia Rusia y Polonia.

Las plantas de triticale son generalmente similares a las de trigo, excepto que el anterior posee espigas y endospermos más grandes y muestra un mayor vigor en el crecimiento. Se conocen los tipos tanto de invierno como de primavera. La planta parece ser más resistente que el centeno a la infección del ergot pero menos resistente que el trigo.

Su calidad nutricional puede ser de alguna manera mejor que la del trigo, aunque puede ser debatible. Los promotores de éste grano enfatizan que el triticales contiene mayor cantidad de lisina que el trigo. Bajo condiciones favorables el triticales es capaz de igualar o superar los niveles de vitaminas, minerales y proteínas. En algunos países de Sudamérica el triticales se ha usado como base para la producción de malta. Generalmente es aceptado que, bajo ciertas circunstancias, este grano provee mejores rendimientos por acre que el trigo, también crece bajo condiciones que mataría muchas variedades de trigo.

Amaranto: Las semillas de amaranto fueron un importante alimento para varias de las civilizaciones indígenas de América en épocas tan tempranas como el 4000 A.C. Los mayas estuvieron probablemente entre los primeros en cultivar la planta y fue extensamente cultivada tanto por los incas como por los aztecas. Algunos estimados colocan la producción total de los aztecas de 15 a 20 miles de toneladas por año antes de la conquista española, tiempo para el cual era el tercer cultivo más importante tras maíz y frijol.

En la mayoría de los países fuera de América central, el amaranto es considerado como una cizaña. Su proteína tiene un PER que es relativamente alto comparado con, por dar un ejemplo, maíz pero bajo si se le compara con frijol de soya. La planta de amaranto posee un rápido crecimiento y tolerancia al estrés. En adición a su fuerte constitución ambiental, tiene una alta capacidad para el uso eficiente del agua.¹⁶

3.5 El hierro

Aspectos Generales

El hierro es un nutrimento de suma importancia para los seres humanos, debido a que forma parte de las células sanguíneas que transportan el oxígeno a todas las células del

organismo. Aproximadamente el 30% del hierro en nuestro cuerpo permanece almacenado para reemplazar fácilmente el hierro perdido.

El hierro es esencial en la formación de la hemoglobina y la mioglobina que transportan el oxígeno en la sangre y en los músculos. El hierro forma parte de diversas proteínas y enzimas del cuerpo.

La deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional más común a nivel mundial y aunque la anemia total pocas veces se manifiesta, la deficiencia parcial está difundida ampliamente.

Los síntomas de reducción en las reservas de hierro son entre otros: fatiga, dificultad para respirar, dolor de cabeza, irritabilidad y/o letargo. Otros síntomas incluyen pica (desarrollo de apetito por sustancias inusuales como papel o productos hechos de barro) y pagofagia (desarrollo de apetito por el hielo).¹⁷

Absorción y aprovechamiento del hierro

Cuando se habla de alimentos ricos en hierro hay que tener en cuenta no sólo su contenido en este mineral, sino la forma en que se presenta en ellos y la proporción que nuestro organismo es capaz de asimilar o aprovechar, pues hay grandes diferencias. Como sucede con otros minerales, la cantidad de hierro absorbida es sólo una pequeña parte del total que se ingiere y está condicionada por los depósitos corporales, la cantidad que se ha tomado, la naturaleza química del hierro y por otros factores que favorecen o dificultan su aprovechamiento. A continuación se menciona el tipo de hierro que se puede encontrar en los alimentos:

- hierro hemo o hemínico, en vísceras, carnes y derivados, pescados y mariscos. Los lácteos

apenas contienen hierro. Se aprovecha entre el 15%-35% de la cantidad ingerida, según los depósitos del cuerpo.

- hierro no hemo, en legumbres, frutos secos, verduras de hoja verde, cereales enriquecidos y huevos. Se absorbe entre el 3% y el 8% de la cantidad ingerida. El hierro no hemo se absorbe en menor medida que el hemínico o hemo, y su grado de asimilación varía mucho en función de los componentes, ya sean favorecedores o inhibidores, que incluya la ración de consumo.

Existen varios factores que afectan la absorción del hierro, en la tabla 1 se pueden apreciar varios de ellos.

Tabla 1. Factores que afectan la absorción del hierro	
Factores que favorecen la absorción del hierro	Factores que obstaculizan la absorción del hierro
✖ Las proteínas animales. ✖ Los ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido láctico). ✖ La vitamina C. ✖ Los azúcares como el sorbitol y la fructosa.	✖ Los taninos: sustancias presentes en el té, el café, el vino, etc. ✖ Los oxalatos: presentes en espinacas, chocolate amargo, remolacha, té, etc. ✖ Los fitatos: en la cubierta de granos de cereal. ✖ La carencia de vitaminas. ✖ El exceso de ciertos minerales (fósforo, calcio, cinc, cobalto, cadmio, manganeso, plomo...) que compiten con los mecanismos de transporte del hierro. ✖ El déficit de cobre. ✖ Una dieta pobre en proteínas.

Contenido de hierro de las carnes

No todas las carnes contienen la misma cantidad de hierro. En función de la presencia de este mineral se distingue entre carnes rojas y blancas. Que sean rojas o de color más claro depende de la concentración que tengan de mioglobina, pigmento que contiene hierro y que se encuentra en las fibras musculares. La cantidad de mioglobina varía según la especie del animal, su edad y sexo, etc.

Carnes rojas: contienen, en promedio, entre 2,5 y 4 mg/100 grs. (Pichón: 20 mg/100 grs., Faisán: 8,5 mg/100 grs., Visceras (hígado, el riñón y corazón): 5-10 mg/100 grs., Codorniz: 4 mg/100 grs., Caballo: 4 mg/100 grs., Cordero y vacuno: 3 a 3,5 mg/100 grs.

Carnes blancas: contienen de 1 a 1,5 mg/100 grs.

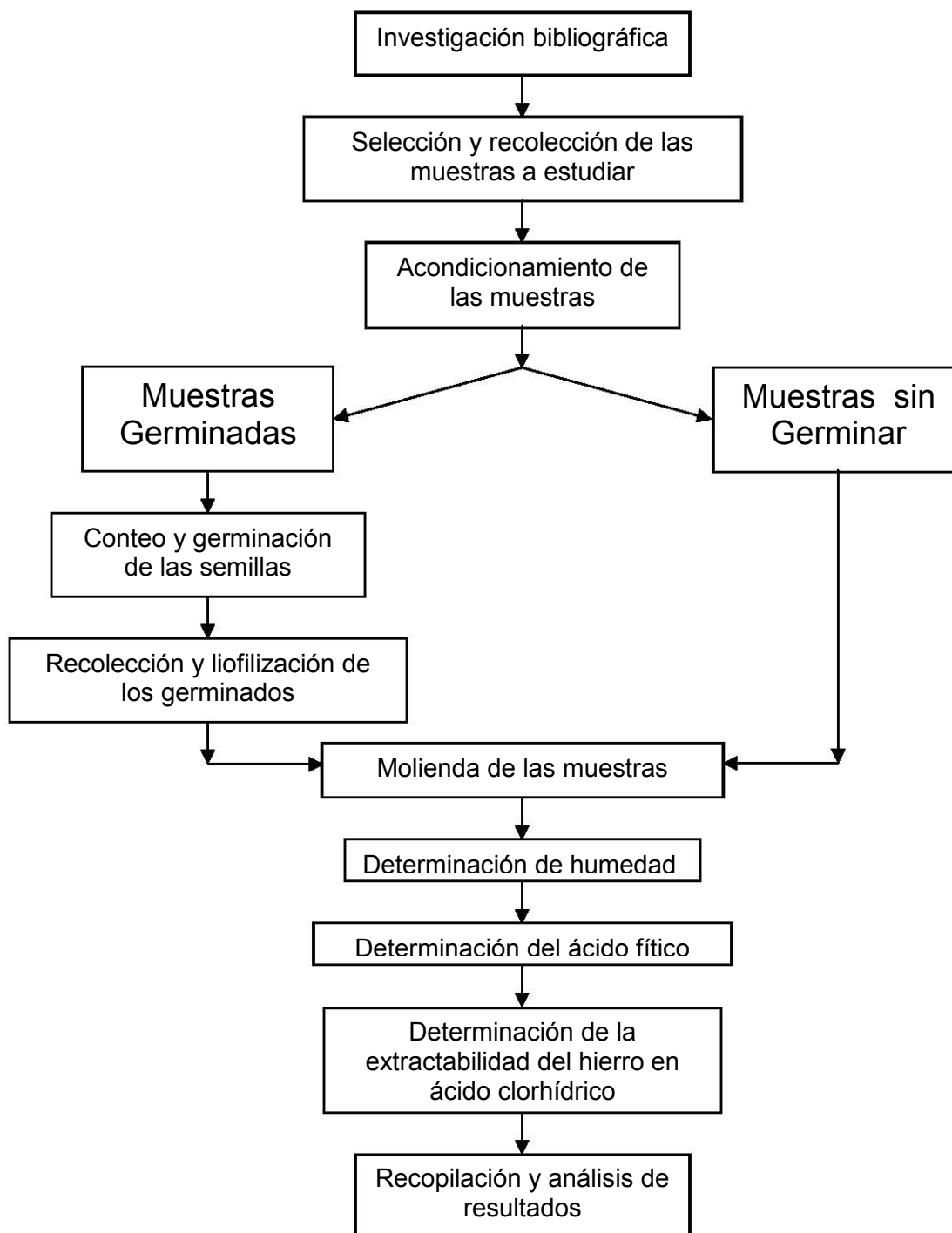
Necesidades de hierro

Para compensar la cantidad que el organismo pierde cada día a través de la descamación de la piel, la orina y las heces (1 miligramo en un hombre adulto ó 1,5 miligramos en una mujer en edad fértil), es necesario ingerir entre 10 y 18 miligramos diarios. Hay que tener en cuenta que los requerimientos de hierro aumentan en los periodos de crecimiento y desarrollo y en caso de ciertas alteraciones o patologías. Una dieta sana y equilibrada cubre las necesidades de hierro de la persona en buenas condiciones de salud, y en ella, las carnes y sus derivados aportan en promedio un 15% del total que se ingiere.¹⁸

4. METODOLOGÍA

4.1 Diagrama general de trabajo

A continuación se presenta el diagrama general de trabajo en el cual se presentan todos los pasos seguidos. En cada ensayo la determinación se hizo por triplicado.



4.2 Selección de las muestras

Las muestras que se trabajaron fueron las siguientes: Amaranto, avena, centeno (Estas muestras se obtuvieron de la central de abastos en el Distrito Federal (Casa Cobo SA de CV. Bodega A 91, Col. Central de Abastos, C.P. 9040, Ciudad de México, DF.), cebada, trigo, triticale, maíz y sorgo (Estas muestras se obtuvieron del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo [CIMMYT] ubicado en el municipio de Texcoco del Estado de México.)

4.3 Acondicionamiento de las muestras

Enseguida se menciona el acondicionamiento previo dado a las muestras antes de determinar la humedad, el contenido de ácido fítico y la extractabilidad del hierro

4.3.1 Muestras sin germinar

Debido a que los cereales poseen menos del 5% de grasa y una humedad tal que permite la obtención de la harina después de moler, a la semilla no se le realiza ningún tratamiento previo. Solo se muelen y hacen pasar a través de una malla 0.5 mm.

4.3.2 Muestras germinadas

En primer lugar se lleva a cabo un conteo de las semillas a germinar (alrededor de 400) las cuales se lavan con una solución de hipoclorito al 10%. Posteriormente éstas se colocan en una charola (aproximadamente de 30x30 cm) en una plancha de algodón. La germinación dura alrededor de 7 días (aunque depende de que semilla se trate) y se lleva a cabo en ausencia de luz y a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C). Después de éste periodo se recolectan los germinados. En éste aspecto se consideran germinados del cereal

a aquellas semillas cuya radícula alcanzó al menos 10 veces la longitud de la semilla. En realidad la germinación termina justo cuando la planta logra la completa independencia de los nutrientes de reserva, el anterior criterio se emplea con fines de homogeneizar los resultados. En seguida se deshidratan los germinados por liofilización y una vez secos se muelen y hacen pasar a través de una malla de 0.5 mm.

4.4 Determinación de humedad

4.4.1 Fundamento

Esta técnica se basa en la medida del peso del agua perdida por una muestra después de someterla a calentamiento.

4.4.2 Equipo y materiales

- | | |
|------------------------|--------------------------------|
| ✓ Espátula | ✓ Estufa de vacío |
| ✓ Charolas de aluminio | ✓ Balanza analítica (Sartorius |
| ✓ Desecador | Analytic). |

4.4.3 Procedimiento

Se pesan aproximadamente 2 gramos de la muestra en charolas de aluminio a peso constante. La muestra se seca al menos por 24 horas en estufa conectada a vacío a una temperatura de alrededor de 70 °C. Posteriormente la charola se retira, se deja enfriar en el desecador y se pesa en balanza analítica. Esta operación se repite hasta lograr peso constante.

4.4.4 Cálculos

$$\%Humedad = \frac{Peso_{inicial\ de\ la\ muestra} - Peso_{muestra\ seca}}{Peso_{inicial\ de\ la\ muestra}} \times 100$$

4.5 Determinación del ácido fítico

4.5.1 Fundamento

En ésta metodología una modificación de la técnica propuesta por Frühbeck et al.⁴, realizada por Sotelo et al⁵. En primer lugar se hizo un extracto de la muestra con una solución de HCl con el fin de bajar el pH a niveles entre 0 y 1, dicho pH es necesario para disociar el fitato de los complejos de proteína y hierro. Este método emplea una columna de intercambio iónico con el fin de purificar los extractos del ácido fítico, eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol (por medio de un lavado de la columna con NaCl 0.1 N) que comúnmente se incluyen en otros métodos, permitiendo la cuantificación real del ácido fítico. Para obtener mejores resultados el pH de la alícuota se ajusta a 6 (superior al punto isoeléctrico de las proteínas.) La determinación colorimétrica se fundamenta en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo FeCl₃-ac. sulfosalisílico (reactivo de Wade) debido al enlace del Fe (III) con el ácido fítico. En ésta determinación colorimétrica se ajusta previamente el pH a 3 ya que a éste pH el ion férrico tiene una máxima estabilidad en su complejo con el ácido fítico⁴.

4.5.2 Equipos y materiales

- | | |
|---|----------------------------------|
| ✓ Vasos de precipitado de 30 y 50 mL | ✓ Pipeta graduada de 10 mL |
| ✓ Barras magnéticas | ✓ Ultracentrífuga Sorvall® RC-5B |
| ✓ Agitador magnético múltiple
(Corning) | ✓ Matraz volumétrico de 25 mL |
| ✓ Balanza analítica (Sartorius
Analytic) | ✓ Probetas de 25 y 50 mL |
| ✓ Pipeta volumétrica de 5 y 10 mL | ✓ Jeringas Plastipak de 3 mL |
| | ✓ Gradilla |
| | ✓ Tubos de ensaye de 5 mL |

- ✓ Potenciómetro calibrado a pH 7 y 4
- ✓ Fibra de vidrio
- ✓ Tubos para centrifuga
- ✓ Espectrofotómetro (Sequoia-Turner)
- y celda

4.5.3 Reactivos y soluciones

- ✓ Ácido clorhídrico RA
- ✓ Hidróxido de sodio RA
- ✓ Cloruro de sodio
- ✓ Cloruro férrico RA (SIGMA F-2877)
- ✓ Ácido sulfosalicílico RA (SIGMA S-0640)
- ✓ Resina de intercambio iónico Dowex AG1 X8 (200-400 mesh, Bio Rad No. De catálogo 140-1451)
- ✓ Sal sódica de fitato (SIGMA P-3168).
- ✓ Solución de HCl 0.65 N: Para preparar 500 mL tomar una alícuota de 26.7 mL de HCl concentrado con una pureza de 37.3% y una densidad de 1.189 g/mL y aforar.
- ✓ Solución de NaOH 5N: Para preparar 500 mL pesar aproximadamente 101.01g de lentejas de NaOH con una pureza aproximada de 98.15%.
- ✓ Solución de NaCl 0.1 N. Para preparar 500 mL pesar 2.9 g de sal (NaCl) y aforar.
Solución de NaCl 0.7 N. Para preparar 500 mL pesar 20.3 g de sal (NaCl) y aforar.
- ✓ Reactivo de Wade. Pesar 0.03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.3 g de ácido sulfosalicílico y disolverlos 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 adicionado a las muestras debe leerse en menos de 30 min.

- ✓ Solución patrón de ácido fítico (1000µg/mL): Pesar exactamente 0.1052 g de la sal sódica de fitato ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$ con peso molecular de 923.8 g/mol) el cual tiene una pureza del 75% y una humedad del 11.3% y aforar hasta un volumen de 50 mL

4.5.4 Procedimiento

4.5.4.1 Preparación de columnas de intercambio iónico.

Pesar aproximadamente 0.5 g. de resina de intercambio iónico Dowex AG1 X8 (200-400 mesh, Bio Rad No. De catálogo 140-1451) e hidratarla con 0.6 mL de agua desionizada. Al mismo tiempo preparar las columnas utilizando jeringas de 3 mL (Plastipak) e introduciéndole en el fondo de la misma un tapón de fibra de vidrio (cuidando de no poner en exceso) y colocarla sobre un soporte como puede ser una gradilla metálica. Agregarle a la columna la resina hidratada cuidando de que quede asentada uniformemente. Una vez que la resina esté bien empacada en la columna adicionarle 15 mL de NaCl 0.7 N y posteriormente lavar 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.

4.5.4.2 Extracción del ácido fítico

Se pesa un gramo de la muestra y se coloca en un vaso de precipitado de 50 mL. Posteriormente se adicionan 20 mL de HCl 0.65 N y se somete a agitación durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador magnético a 400 rpm. El extracto obtenido se transfiere a tubos de centrifuga para centrifugarlos a 12 000 rpm a temperatura ambiente

por 30 minutos. Enseguida se colecta el sobrenadante el cual, si es necesario, se puede almacenar en refrigeración teniendo una vida de 8 días como máximo.

4.5.4.3 Purificación por columna de intercambio iónico

Primero se toma una alícuota de 1 o 5 mL del sobrenadante anterior (se recomienda tomar 1 mL para alimentos que contengan mas de 1% de ácido fítico y 5 mL en el caso de contener menos del 1% de éste) y se afora a 25 mL con agua desionizada. Posteriormente el pH se ajusta a 6 con NaOH 5 N. Enseguida se toma una alícuota de 10 mL y se transfiere cuantitativamente a una columna previamente preparada. Después ésta se lava con 15 mL de NaCl 0.1 N y se desechan las aguas de lavado. Finalmente se eluye el fitato con 15 mL de NaCl 0.7 N y se colecta el extracto purificado en un vaso de precipitado de 30 mL.

Nota: En todo momento la columna debe tener al menos 0.5 mL de líquido arriba del nivel de la resina.

4.5.4.4 Determinación espectrofotométrica

A partir de una solución patrón de 1000µg de ácido fítico / mL, preparar las soluciones de los estándares de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg de ácido fítico / mL de la siguiente manera:

Tabla 2. Construcción de la curva patrón para el ácido fítico

mL de solución concentrada (1000µg de ácido fítico/mL.)	Aforar con agua desionizada hasta (mL)	Concentración final (µg de 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

Los estándares, los extractos purificados y el agua desionizada usada como blanco se ajustan a pH 3 con HCl 1N. Enseguida se toman 3 mL de cada uno y se ponen en tubos de ensayo. A continuación se agrega 1 mL del reactivo de Wade (se adiciona justo al momento de leer cada una de las muestras) y se agita hasta homogeneizar lo mas pronto posible después de lo cual se lee la absorbancia a 500 nm a la brevedad.

Es importante tomar en cuenta que:

- ✓ Se utiliza una celda con agua desionizada para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- ✓ El agua desionizada a pH 3 a la que se le agrega 1 mL de reactivo de Wade es el blanco.
- ✓ Se lee la absorbancia del blanco, las muestras problema y los estándares, a cada una de éstas se les resta el blanco por separado para así obtener la absorbancia corregida respectiva (es con estos valores con los que se realizan los cálculos.)

4.5.5 Cálculos

Se elabora la curva patrón con los datos de absorbancias corregidas obtenidas de las soluciones estándar contra la concentración de ácido fítico de éstas. Posteriormente se realiza la regresión lineal de éstos datos obteniendo una ecuación de la línea recta de éste tipo:

$$Absorbancia_{corregida} = Pendiente (m) \times Concentración_{\mu g / mL} + Ordenada al origen (b)$$

de la cual se desprende que:

$$Concentración_{\mu g / mL} = \frac{Absorbancia_{corregida} - b}{m}$$

Con lo cual se calcula la concentración de ácido fítico en los extractos purificados (μg de ácido fítico/mL). Tomando en cuenta las diluciones realizadas se tiene que:

$$\%_{ac.fítico} = Concentración_{extracto\ purificado} \times \frac{15}{10} \times \frac{1}{10^6} \times \underbrace{\frac{25}{1 \text{ ó } 5}}_{\substack{\text{Este valor esta en funcion de} \\ \text{la alicuota de sobrenadante} \\ \text{tomada}}} \times \frac{20}{Peso_{muestra} (g)} \times 100$$

4.6 Determinación de la extractabilidad del hierro en ácido clorhídrico

4.6.1 Introducción

Esta técnica es una modificación de la metodología empleada por M.H. Badau y colaboradores⁶. Se divide en dos partes, la determinación de hierro total y la determinación de hierro extraíble en ácido clorhídrico de la misma muestra.

4.6.2 Equipo y materiales

- | | |
|--|--|
| ✓ Barras magnéticas | ✓ Probeta de 100 mL |
| ✓ Agitador magnético múltiple (Corning) | ✓ Gradilla |
| ✓ Vasos de precipitado de 100 mL | ✓ Tubos de ensaye de 15 mL |
| ✓ Tupos de centrífuga | ✓ Tubos para centrífuga |
| ✓ Balanza analítica (Sartorius Analytic) | ✓ Probeta de 100 mL |
| ✓ Pipeta graduada de 10 mL | ✓ Espectrofotómetro (Sequoia-Turner) y celda |
| ✓ Ultracentrífuga Sorvall [®] RC-5B | ✓ Molino (Cyclotec 1093) |
| ✓ Matraces volumétricos de 50 mL | ✓ Equipo para liofilizar (Labconco) |
| | ✓ Incubadora a 37 °C (Blue M.) |

- ✓ Rotavapor Büch RE 111
- ✓ Matracez bola de 500 mL para el rotavapor.

4.6.3 Reactivos y soluciones

- ✓ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- ✓ Ácido Nítrico.
- ✓ Ácido clorhídrico.
- ✓ Peróxido de hidrógeno.
- ✓ Hidrocloruro de hidroxilamina ($\text{H}_2\text{NOH} \cdot \text{HCl}$) SIGMA
- ✓ O-fenantrolina SIGMA
- ✓ Acetato de sodio anhidro Reactivos y producto químicos finos S.A.
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Hidróxido de sodio RA
- ✓ Solución de NaOH al 23.22%. Para preparar 100 mL pesar 23.66 g de lentejas de NaOH con una pureza de 98.15% y aforar.
- ✓ Solución de HCl 0.03 N: Para preparar 1L de solución tomar 2.48 mL (2.5 mL) de HCl concentrado con una pureza de 36.7% y una densidad de 1.187 g/mL y aforar.
- ✓ Solución patrón de hierro: Disolver 3.512 g de sulfato de amonio ferroso exahidratado $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ en agua desionizada, adicionar dos gotas de ácido clorhídrico concentrado y aforar a 500 mL. De la anterior solución se toman 10 mL y se lleva a un litro. La solución final tiene una concentración de $0.01 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}_{\text{solución}}$.
- ✓ Solución de clorhidrato de hidroxilamina: Disolver 10 g de $\text{H}_2\text{NOH} \cdot \text{HCl}$ (hidrocloruro de hidroxilamina) en agua desionizada y aforar a 100 mL.

- ✓ Solución de buffer de acetatos: Disolver 8.3 g de acetato de sodio anhidro ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) en agua desionizada y agregar 12 mL de ácido acético glacial. Aforar ésta mezcla hasta 100 mL.
- ✓ Solución de o-fenantrona: Pesar 0.1 g de o-fenantrolina y disolverlo en 80 mL de agua desionizada previamente calentada a 80 °C. Después de permitir enfriar a temperatura ambiente, aforar a 100 mL.

4.6.4 Procedimiento

4.6.4.1 Determinación del hierro total

La determinación de hierro se hizo de acuerdo al método oficial de la AOAC (2000). En primer lugar se pesan 2 gramos de la muestra en un crisol y se calcinan usando un mechero de Fisher para posteriormente introducirlo en la mufla hasta la obtención de cenizas. Una vez frío el crisol se agregan 2 mL de HCl concentrado para disolver las cenizas, de ser necesario se usa una varilla de vidrio. Después se evapora el ácido usando baño maría y se permite enfriar. A continuación se añade 1 mL de HCl concentrado y 3.5 mL de agua desionizada y se procede a disolver las cenizas. La anterior solución se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL y se afora. Finalmente se filtra a través de papel filtro Whatman #2. A ésta última se le llama solución del hierro total.

4.6.4.2 Determinación del hierro extraíble en ácido clorhídrico

Pesar dos gramos de la muestra (que debe ser la misma empleada en la determinación de hierro total) y disolverla en 100 mL de HCl 0.03 N, ésta mezcla se deja en agitación durante 3 horas en una incubadora a 37 °C. Enseguida se centrifuga a 4400

rpm por 20 minutos, después de lo cual el sobrenadante se hace pasar a través de papel filtro Whatman #2. Después se toman 90 mL de éste extracto y se evapora el líquido en el rotavapor usando un matraz bola de 500 mL hasta que queden aproximadamente 1 ó 2 mL de líquido. Posteriormente se adicionan 4 mL de HNO_3 concentrado y 2.25 mL de H_2O_2 al 30% y se pone a baño maría a temperatura de ebullición por 5 minutos. A continuación se adicionan 10 mL de solución de NaOH al 23.22% en baño de hielo con el fin de neutralizar el exceso de ácido. Finalmente esta solución se transfiere cuantitativamente a un matraz y se afora a 50 mL. A ésta última se le llama solución del hierro extraíble.

4.6.4.3 Determinación espectrofotométrica del Fe_{total} y el $\text{Fe}_{\text{extraíble}}$ en HCl

A partir de la solución patrón de hierro con una concentración de 0.01 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}_{\text{solución}}$ se obtienen los estándares para construir la curva patrón de hierro de la siguiente manera:

Tabla 3. Construcción de la curva patrón para hierro

mL de solución estándar (0.01 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}_{\text{solución}}$)	mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{desionizada}}$ agregados para completar 10 mL	Concentración final ($\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}_{\text{solución}}$)
0 (blanco)	10	0
0.5	9.5	0.5
1	9	1
1.5	8.5	1.5
2	8	2
2.5	7.5	2.5
3	7	3
4	6	4
5	5	5
6	4	6

Los 10 mL de cada estándar, 10 mL de solución del hierro extraíble y 10 mL de la solución del hierro total deben estar en tubos de ensayo en una gradilla. A cada tubo se le agrega primero 1 mL de solución de clorhidrato de hidroxilamina y se homogeneiza. Enseguida se agregan 5 mL de buffer de acetatos y se homogeneiza. Posteriormente se agrega 1 mL de o-fenantrona y se homogeneiza, después de lo cual se deja reposar de 10 a 15 minutos para luego leer en el espectrofotómetro a 530 nm.

Es importante tomar en cuenta que: Se utiliza una celda con agua desionizada para ajustar el espectrofotómetro a cero.

4.6.5 Cálculos

Se elabora la curva patrón con los datos de absorbancias obtenidas de las soluciones estándar contra la concentración de hierro de éstas (en $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}_{\text{solución}}$). Posteriormente se realiza la regresión lineal de éstos datos obteniendo una ecuación de la línea recta de éste tipo:

$$\text{Absorbancia} = \text{Pendiente } (m) \times \text{Concentración}_{\text{mg de hierro/mL}} + \text{Ordenada al origen } (b)$$

de la cual se desprende que:

$$\text{Concentración}_{\text{mg de hierro/mL}} = \frac{\text{Absorbancia} - b}{m}$$

Con lo cual se calcula la concentración del hierro en las diluciones finales (solución del hierro extraíble y solución del hierro total) en mg de hierro/mL). Tomando en cuenta las diluciones realizadas en cada caso se tiene que:

✓ Para el hierro total:

$$Fe_{total} \text{ (mg Fe/100g}_{ muestra}) = Concentracion_{solucion\ del\ hierro\ total} \times \frac{50}{Peso_{muestra} \text{ (g)}} \times 100$$

✓ Para el hierro extraíble en ácido clorhídrico

$$Fe_{extraible}_{en\ HCl} \text{ (mg Fe/100g}_{ muestra}) = Concentracion_{solucion\ del\ hierro\ extraible} \times \frac{50}{Peso_{muestra} \text{ (g)}} \times \frac{100}{90} \times 100$$

✓ Para la extractabilidad del hierro en ácido clorhídrico:

Ya que el valor de hierro total se obtiene de un promedio de 3 datos lo primero es obtener ésta cifra.

La extractabilidad se define como:

$$Extractabilidad\ Fe_{En\ HCl} = \frac{Fe_{extraible}_{en\ HCl} \text{ (mg Fe/100g}_{ muestra})}{Fe_{total\ promedio} \text{ (mg Fe/100g}_{ muestra})} \times 100$$

Ya que se tienen 3 valores de $Fe_{extraible}_{en\ HCl}$, estos se sustituirán en la fórmula (siempre con el mismo valor de $Fe_{total\ promedio}$). La extractabilidad del hierro en ácido clorhídrico es el resultado de promediar estos 3 valores obtenidos.

4.7 Análisis estadístico

En todos los casos se empleó la prueba t de Student a dos colas con una α al 5% con 3 datos (2 grados de libertad.) La Procedencia de las tablas empleadas es R. A. Fisher y F. Yates. *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medicine Research* (5ª edición), Tabla III, Oliver and Boyd Ltd., Edimburgo. En todos los casos la t de tablas empleada fue 4.3

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En lo que respecta al ácido fítico, tal como puede apreciarse en la tabla 4 y el Gráfico 1, a excepción de la avena, en todos los casos se presentó una disminución en el contenido de ácido fítico de alrededor de 45 a 80% después de la germinación. Esto se atribuye al hecho, que durante la germinación, la planta requiere de fósforo que tiene almacenado en forma de ácido fítico, por lo cual incrementa la actividad de las fitasas endógenas (*myo-inositol- hexakisfostato* 3-fosfohidrolasa, que cataliza la hidrólisis del AF en *myo-inositol*, *myo-inositol* fosfatos y fosfatos inorgánicos)¹⁹ con la consecuente degradación de éste. En el caso del amaranto se considera que dicha actividad es la mas alta ya que es la semilla que presenta el mayor porcentaje de reducción del fítico después de germinar (81.2%).

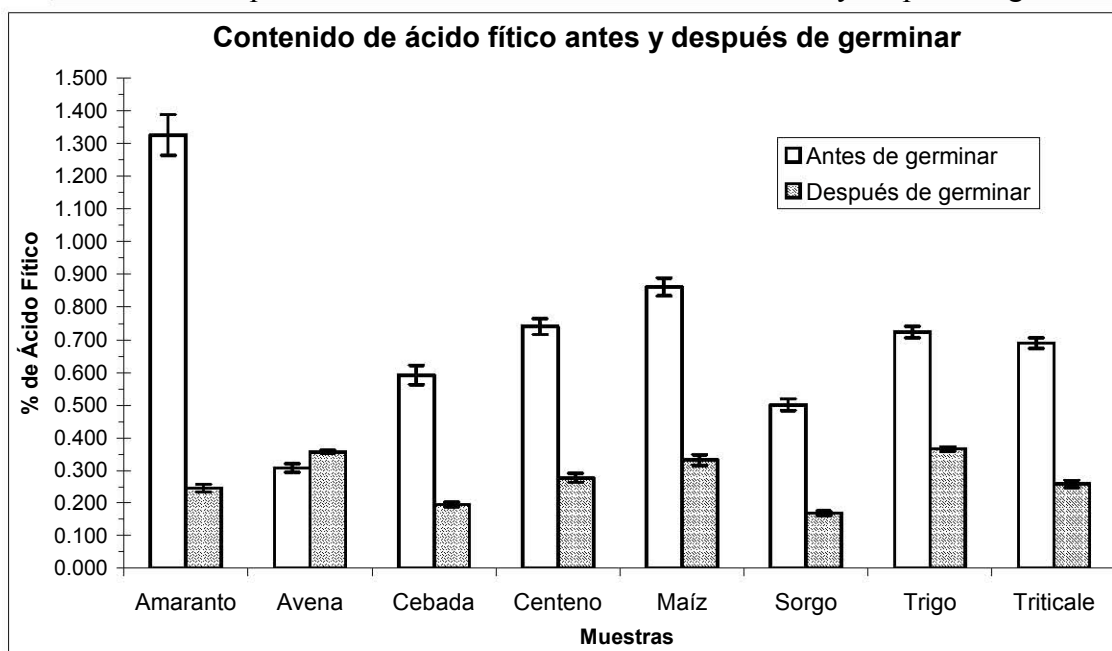
Al contrario, en la avena se presento una acumulación de ácido fítico, la cual ha sido interpretada por algunos autores como una manera de prevenir niveles excesivamente altos de P inorgánico durante la maduración, sin embargo la mayoría coincide en que su función principal es de almacenamiento de P.²⁰ Al mismo tiempo es posible que su actividad de fitasas sea muy pobre.

Tabla 4. Resumen de los resultados (% de ácido fítico inicial y final y % de disminución del ácido fítico)

Muestra	% de ácido fítico inicial (pregerminación)	% de ácido fítico final (posgerminación)	% de disminución de ácido fítico
Amaranto	1.33±0.063 ^b	0.25±0.012 ^a	81.2
Avena	0.31±0.013 ^a	0.36±0.005 ^b	-15.96
Cebada	0.59±0.029 ^b	0.19±0.007 ^a	67.07
Centeno	0.74±0.024 ^b	0.28±0.014 ^a	62.60
Maíz	0.86±0.027 ^b	0.33±0.017 ^a	61.49
Sorgo	0.50±0.018 ^b	0.17±0.007 ^a	66.37
Trigo	0.72±0.018 ^b	0.37±0.007 ^a	49.42
Triticale	0.69±0.016 ^b	0.26±0.011 ^a	62.56

- Los valores son la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones
- La misma letra en superíndice en la misma fila indica que no hay diferencia significativa entre ese par de datos (α al 5%)
- El superíndice **a** se coloca en el valor mas pequeño de la fila y el superíndice **b** en el mas alto
- En todos los casos los coeficientes de variación son menores al 5%

Gráfico 1. Comparación en el contenido de ácido fítico antes y después de germinar



Vale la pena destacar la tendencia observada en la tabla 5 y el gráfico 2, de manera general se aprecia que a mayor contenido inicial de ácido fítico también se tiene una mayor porcentaje de germinación de la

semilla: El amaranto, trigo, centeno y maíz, con los mayores

porcentajes de ácido fítico inicial (antes de la germinación), poseen

los mayor porcentajes de germinación, aunado a esto se

tiene a la cebada sorgo y avena

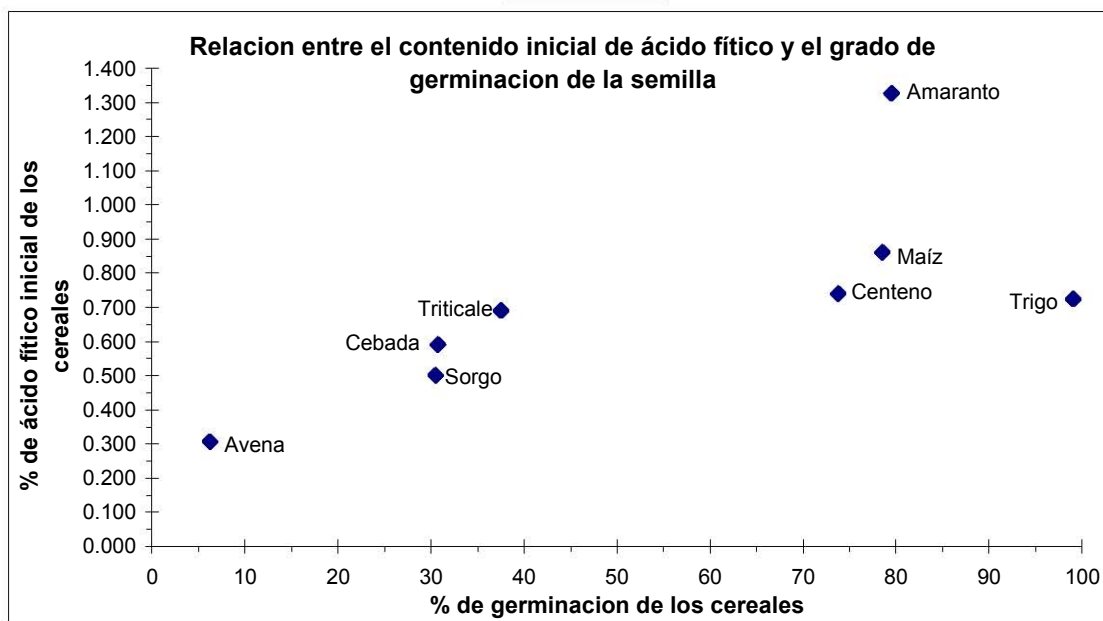
que poseen los menores contenidos de ácido fítico y los menores porcentajes de germinación. Lo anterior se puede justificar con el hecho de que al ácido fítico se le han

Tabla 5. Resumen de los resultados (% de ácido fítico inicial y % de germinación de la semilla)

Muestra	% de germinación	% de ácido fítico inicial (pregerminación)
Amaranto	79.50	1.33±0.063
Avena	6.25	0.31±0.013
Cebada	30.75	0.59±0.029
Centeno	73.75	0.74±0.024
Maíz	78.50	0.86±0.027
Sorgo	30.50	0.50±0.018
Trigo	99.00	0.72±0.018
Triticale	37.50	0.69±0.016

atribuido varias funciones fisiológicas en la planta como son: depósito de P, depósito de energía, fuente de cationes o iniciador de la latencia²¹. Además, algunos metabolitos procedentes del *myo-inositol* y del inositol monofosfato (InsP) juegan un papel importante en el desarrollo de la planta²². Lo anterior es un fuerte indicativo de que el ácido fítico tiene importancia en el metabolismo de la planta más allá que el de un simple depósito de fósforo.

Gráfico 2. Relación entre el contenido de ácido fítico inicial y el porcentaje de germinación de la semilla



Respecto a los valores obtenidos, si se comparan con aquellos encontrados en la bibliografía, tienden a ser más bajos. Por ejemplo para el trigo se reportan valores de hasta 1.13%, para el sorgo de 0.82 a 0.96%, cebada: 0.99% y avena: 0.77%¹, mientras que en éste estudio son de 0.72, 0.5, 0.59 y 0.31% respectivamente. Lo anterior era de esperarse ya que en otro tipo de técnicas generalmente también se cuantifican las otras fracciones de inositol como ácido fítico, mientras que la técnica empleada permite la separación del ácido fítico y dichas fracciones por medio de una columna de intercambio iónico.

En lo referente al % extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$, en la tabla 6 se aprecia que en todos los casos en que hubo diferencia significativa, dicho valor aumentó después de la germinación. Este comportamiento era de esperarse ya que al disminuir el contenido de ácido fítico, el Fe se encontraría “mas libre”. Sin embargo no se observa una relación entre el % de disminución del ácido fítico y el aumento en el % extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$ habiendo casos como el de la avena, en la cual no hubo disminución en el contenido de ácido fítico y sin embargo el % extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$ aumento a mas del doble mientras que en la cebada, en donde hubo una notable disminución de ácido fítico, el % extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$ aumentó pobremente con la germinación.

Tabla 6. Resumen de los resultados (% de extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$ inicial y final y % de aumento de la extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$)

Muestra	% de extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$ inicial (pregerminación)	% de extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$ final (posgerminación)	% de aumento de la extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$
Amaranto	12.63±0.81 ^a	19.16±1.89 ^b	14.45
Avena	14.14±0.68 ^a	38.17±3.67 ^b	31.1
Cebada	20.70±1.89 ^a	28.23±1.55 ^b	12.36
Centeno	16.75±1.03 ^a	25.13±1.19 ^b	14.35
Maíz	15.20±1.49 ^a	25.06±2.30 ^b	16.44
Sorgo	25.18±0.81 ^a	24.23±1.59 ^a	No hay cambio
Trigo	36.40±3.07 ^a	63.71±2.31 ^b	30.06
Triticale	21.48±1.69 ^a	18.21±1.71 ^a	No hay cambio

- Los valores son la media ± la desviación estándar de 3 determinaciones
- La misma letra en superíndice en la misma fila indica que no hay diferencia significativa entre ese par de datos (α al 5%)
- El superíndice **a** se coloca en el valor mas pequeño de la fila y el superíndice **b** en el mas alto
- En todos los casos los coeficientes de variación son menores al 10%

Lo anterior indica que hay otros factores que están teniendo un importante papel en la extracción del Fe que no se están tomando en cuenta, por ejemplo se sabe que un aumento en el contenido de vitamina C permite una mejor absorción del Fe, además no se está tomando en cuenta el efecto del ácido oxálico, el cual es otro importante agente quelante. No se determinó como la germinación afecta a estos dos factores. Por otro lado

vale la pena recordar que el ensayo % extractabilidad de $\text{Fe}_{\text{En HCl}}$ es un simil del grado en que el Fe es disponible para el organismo, sin embargo para obtener datos más cercanos a lo que sucede en el organismo y con el fin de apreciar mejor el efecto de la germinación en disponibilidad de minerales vale la pena realizar el ensayo de Fe biodisponible.

6. CONCLUSIONES

- A excepción de la avena, la germinación dio como resultado una disminución en el contenido de ácido fítico, posiblemente debido a un aumento en la actividad de las fitasas.
- Debido al alto porcentaje de disminución de ácido fítico, el amaranto posiblemente tiene la actividad de fitasas más elevada.
- Se observó una tendencia en la cual se da un mayor porcentaje de germinación del cereal entre mayor sea el contenido inicial de ácido fítico de éste, por lo cual se considera que el ácido fítico tiene importantes funciones en el desarrollo de la planta además de depósito de P.
- La germinación dio como resultado un aumento en el % extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$ en casi todos los cereales (en sorgo y triticale no hubo cambios.)
- No se observó una relación clara entre la disminución del ácido fítico y el aumento en % extractabilidad de $Fe_{En\ HCl}$ después de germinar.

7. RECOMENDACIÓN

Se recomienda hacer estudios más profundos (Fe biodisponible, ácido oxálico, vitamina C, etc.) en los cereales trabajados a fin de tener una comprensión mas amplia de los efectos de la germinación en éstas muestras.

8. REFERENCIAS

- ¹ MARTINEZ DOMINGUEZ, Beatriz, IBANEZ GOMEZ, M^a Victoria y RINCON LEON, Francisco. **Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas.** ALAN. [online]. set. 2002, vol.52, no.3 [citado 21 Julio 2006], p.219-231
- ² TORRES Alexia, FRÍAS Juana, GRANITO Marisela, VIDAL-VALVERDE Concepción. **Germinated Cajanus cajan seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation.** *Food Chemistry*. 2007, vol. 101, p.202-211.
- ³ FRÍAS Juana, MIRANDA Martha L., DOBLADO Rosa, VIDAL-VALVERDE Concepción. **Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of Lupinus albus L. var. Multolupa.** *Food Chemistry*. 2005, vol. 92, p. 211–220
- ⁴ FRÜHBECK Gema, ALONSO Rubén, MARZO Florencio, SANTIDRIÁN Santiago. **A Modified Method for the Indirect Quantitative Analysis of Phytate in Foodstuffs.** *Analytical Biochemistry*. 1995, vol. 225, p.206-212.
- ⁵ SOTELO Ángela, MENDOZA José, ARGOTE Rosa Maria. **Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesado. Validación de un método colorimétrico.** *Revista de la Sociedad Química de México*. 2002, vol. 46, p.301-306.
- ⁶ BADAU M.H., NKAMA I., JIDEANI I.A. **Phytic acid content and hydrochloric acid extractability of minerals in pearl millet as affected by germination time and cultivar.** *Food Chemistry*. 2005, vol. 92. p.425-435.
- ⁷ ANDERSON R.J. **Contribution to the chemistry of phytin.** *Journal of Biological Chemistry*. 1914, vol. 17, p. 171.
- ⁸ CHERYAN M. **Phytic acid interactions in food systems.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1980, vol. 13, p. 297-35.
- ⁹ KHOKHAR S, PUSHPANJALI, FENWICK GR. **Phytate content of indian foods and intakes by vegetarian indians of Hisar region, Haryana State.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 1994, vol. 42, p. 2440-444.
- ¹⁰ BARAMPAMA Z, SIMARD R E. **Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi.** *Food Chemistry*. 1993, vol. 47,p. 159-67.
- ¹¹ SERRAINO MR, THOMPSON LU, SAVOIE L, PARENT G. **Effect of phytic acid on the in vitro rate of digestibility of rapeseed protein and amino acids.** *Journal of Food Science*. 1985, vol. 50, p. 1689-692.
- ¹² ZHOU JR, ERDMAN JWJr. **Phytic acid in health and disease.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1995, vol. 35, p. 495-508.
- ¹³ THOMPSON LU. **Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods.** *Food Research International*. 1993, vol. 26, p. 131-49.
- ¹⁴"Semilla." *Enciclopedia® Microsoft® Encarta 2001*. © 1993-2000 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.

- ¹⁵ FRÍAS Juana, MIRANDA Martha L., DOBLADO Rosa, VIDAL-VALVERDE Concepción. **Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. Multolupa.** *Food Chemistry*. 2005, vol. 92, p. 211–220
- ¹⁶ DENDY D & DOBRASZCZYK B. **Cereales y productos derivados. Química y tecnología.** Ed. Acribia, España, 2004. 87-100, 127-156, 341-386, 457-480.
- ¹⁷ A.D.A.M. Inc. **Hierro en la dieta.** SHANDS Health Care. Disponible en línea en: http://www.shands.org/health/spanish/esp_ency/article/002422.htm. Consultado el 02-Ago-07 a las 14:26
- ¹⁸ Consumer EROSKI, la revista del consumidor de hoy. **Carnes de Hierro.** Disponible en línea en <http://revista.consumer.es/web/es/20060601/alimentacion/70453.php>. Consultado el 02-Ago-07 a las 16:27
- ¹⁹ FROSSARD E, BUCHER M, MÄCHLER F, Mozafar A, HURRELL R. **Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn, and Ca in plants for human nutrition.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000; vol. 80, p.861-879.
- ²⁰ WANG CF, TSAY SM, LEE CY, LIU SM, ARAS NK. **Phythate content in taiwanese diet determined by ³¹P Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992; vol. 40, p.1030-1033.
- ²¹ CHERYAN M. **Phytic acid interactions in food systems.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* .1980; vol.13, p.297-335.
- ²² BOHNERT HJ, NELSON DE, JENSEN RG. **Adaptations to environmental stresses.** *Plant Cell*. 1995; vol. 7, p.1099-1111.