



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

208

DETERMINACIONES DE ACIDO FITICO

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

p r e s e n t a :

Gustavo Adolfo Alejandro García Uriza

1979



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.

TESIS 1979

M.T.

137

NO _____
FECHA _____
PROC _____



Jurado Asignado
originalmente
según el tema :

PRESIDENTE: KUFFO PEREZ PLIEGO
VOCAL: FRANCISCO FERNANDEZ NORIEGA
SECRETARIO: CARLOS ROMO MEDRANO
1er. SUPLENTE: RODOLFO SAMANO IBANEZ
2o. SUPLENTE: PEDRO VILLANUEVA GONZALEZ

Sitio donde se desarrolló
el tema:

Biblioteca Central de la Es-
cuela Nacional de Agricultu-
ra y del Instituto de Quími-
ca.

Nombre completo y firma del
sustentante:

GUSTAVO ADOLFO ALEJANDRO
GARCIA URIZA

Nombre completo y firma del
asesor del tema:

FRANCISCO FERNANDEZ NORIEGA

DEDICATORIA

A mi madre, por los muchos trabajos que pasé en los días difíciles.

A mi padre por sus enseñanzas.

A mi hermano Rafael, Por su ejemplo Profesional y responsable

A mi hermana Elvia por su ejemplo trabajador y creativo.

A mis hermanos menores Paty y Juan, cuyo cariño es de importancia en el desarrollo de mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad y Facultad de Química,
a quienes debo mi formación como Univer
sitario.*

*A los Profesores que contribuyeron a mi
formación Profesional, especialmente al
Ing. Francisco Fernández por su valiosa
ayuda.*

*A mis compañeros y amigos, que siempre
me impulsaron.*

INDICE

CAPITULO	PAGINA
I <i>Introducción.</i>	1
II <i>Generalidades.</i>	16
III <i>Métodos de Determinación.</i>	30
IV <i>Resumen.</i>	64
V <i>Conclusiones.</i>	66
VI <i>Bibliografía.</i>	68

INTRODUCCION

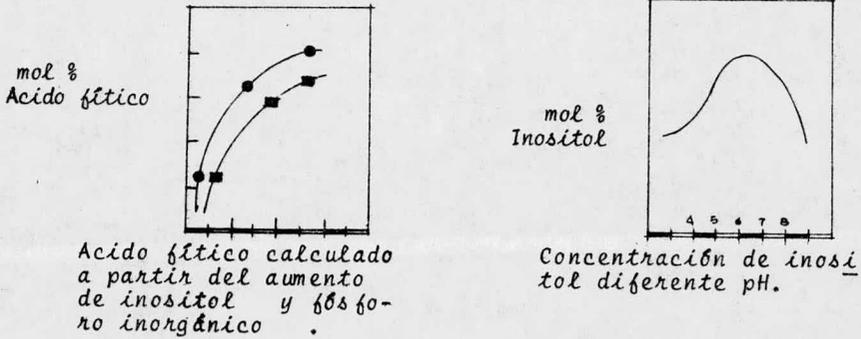
El ácido fítico se encuentra distribuido en una amplia variedad de semillas en una proporción relativamente alta, por ejemplo en trigo el fósforo de fitina (ác. fítico sal de Ca^{+2} y Mg^{+2} generalmente) se estima en un 72% del fósforo total del grano (16) y hay evidencia experimental de que el ácido fítico podría ser una reserva vegetal de fósforo inorgánico (59) que se acumula antes de la germinación y posteriormente se observa un aumento en la actividad de las fitasas durante la época de la germinación.

Esta reserva no es disponible para humanos ni para organismos monogástricos debido a la carencia de enzimas adecuadas para liberar el fósforo de este compuesto. Además de que no puede ser utilizado; su presencia en el intestino entorpece la absorción de iones divalentes y trivalentes como Ca^{+2} , Mg^{+2} y Fe^{+3} , es un hecho comprobado que el ácido fítico aumenta los requerimientos normales de Mg^{+2} en pollos (20) más aun se ha experimentado su uso como resina intercambiadora de iones como por ejemplo fijando iones Fe III (21).

Es importante hacer notar que si fuese factible hacerle hidrólisis como Becker y colaboradores comprueban en su experimento (12) el cual consiste en lo siguiente: efectúan una autólisis basada en la liberación de las enzimas propias de la semilla que en este caso es frijol de la variedad pinto; por medio de la molienda y después se hace una incubación con solu-

ciones reguladoras que tienen diferente pH obteniendo por conclusión que existe un máximo de autólisis en un pH cercano a 5.3, esta autólisis fue calculada indirectamente a partir de la determinación de un aumento en las concentraciones de inositol y de fosfato inorgánico.

Fig. # 1



mol %
Acido fítico

Acido fítico calculado a partir del aumento de inositol y fósforo inorgánico .

mol %
Inositol

Concentración de inositol diferente pH.

Por otra parte Kon y colaboradores (42) diseñan una serie de tratamientos en los que manipulan las siguientes variables: pH, tiempo de cocido, temperatura de cocido, y todo esto conjuntamente con la adición de fitasa de trigo, estos investigadores llegan a la conclusión de que es posible a partir de una sustancia totalmente inaprovechable conseguir una fuente de fósforo inorgánico que podría tener importancia, no obstante queda implícito en esta investigación que el trabajo por hacer es todavía muy amplio, si se deseara aprovechar la mayor parte

de Este fósforo por ahora no disponible y es una sugerencia de estos investigadores que se continúe con la idea de diseñar más tratamientos que resultarán finalmente en un rendimiento alto de fósforo inorgánico. De acuerdo con lo antes mencionado se cree conveniente el estudiar con más detenimiento las publicaciones que tratan del problema de la liberación del fósforo inorgánico del ácido fítico.

Las experiencias de Kon (42) son una de las que mayor claridad dan al respecto pues el número de variables con que hace su experiencia y la forma en que las combina presentan un panorama amplio con muchas posibilidades sobre el punto. Se describirá a continuación estas, con objeto de formar una idea más clara acerca de la complejidad del problema para lo cual reproduciremos en primer término la tabla 1 con la secuencia de tratamientos.

Tabla # 1

Muestra n.º	pH tratamiento	Tabla 1 tratamiento			
1	5.2	I	C	B	-
2	5.2	E	I	C	B
3	5.2	C	B	I	-
4	5.2	C	B	E	I
5	5.2	B	C	I	-
6	5.2	B	C	E	I
7	5.2	B	E	I	C
8	5.2	-	-	-	-
9	3.5	B	I	C	-
10	3.5	B	E	I	C

I = Incubar a 55°C por 20 horas.

B = Mezclar.

C = Cocer por dos horas.

E = Adicionar fitasa de germen de trigo 1.2%.

Después de estos tratamientos las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue analizado para peso seco, nitrógeno, azúcares totales, fósforo total, fósforo inorgánico y varios azúcares incluyendo inositol.

Tabla # 2

Muestra	% peso seco	Azúcares totales (%)	Nitrógeno (mg%)	P total (mg%)	P Inorgánico (mg %)
1	16.5	4.2	740	280	200
2	16.2	3.9	740	300	230
3	15.6	3.7	640	250	60
4	16.7	3.6	530	270	150
5	18.7	3.2	620	240	70
6	37.8	12.5	780	290	180
7	15.1	3.9	740	240	180
8	15.6	4.4	740	270	250
9	19.0	4.4	880	230	130
10	17.0	4.4	870	260	190

El grado a que el fitato fue degradado por la enzima nativa y adicionada fue detectado examinando el incremento de inositol y fósforo inorgánico siguiendo cada tratamiento. Hay una diferencia muy pequeña entre el fósforo total contenido de los extractos, sobre el promedio de alrededor de 65% del -

fósforo total presente en el frijol que puede ser extraído ba
jo las condiciones de este experimento.

Las cantidades de fósforo inorgánico e inositol libre -
presentes varían con el tratamiento.

La tabla 3 muestra los incrementos de fósforo inorgánico
(Pi) e inositol como resultado de los tratamientos individua-
les usando 3 y 5 como control.

Tabla # 3

Muestra	Inositol	Pi
1	90	140
2	80	170
3	-	-
4	-	90
5	-	-
6	-	120
7	70	120
8	120	190
9	30	70
10	20	130

La fitasa de germen de trigo usada no hidroliza los seis
fosfatos del fitato solo cinco para producir inositol monofos-
fato Este puede ser observado en los tratamientos 4 y 6 que -
contienen la enzima adicionada pero que fueron incubados des-
pués de hervidos, el inositol libre no aumentó pero el Pi sí.

La muestra 6 con sus paredes celulares rotas y consecuen-
temente más acceso de la enzima adicionada muestra valores -
más altos de Pi que la muestra 4 con sus células intactas.

En frijoles enteros sin cocinar (muestras 1 y 2) la adición de fitasa de germen de trigo produce más Pi pero no más inositol.

Este no es el caso de las muestras 7 y 8 donde el contacto más íntimo de los constituyentes celulares debido a las células rotas, permite una mayor acción de la fosfatasa de frijol sobre el inositol monofosfato producido por la fitasa de trigo. La incubación de frijol macerado o entero bajo las condiciones de este experimento reduce el fitato presente medido por el incremento del Pi e inositol y la fitasa de germen de trigo incrementado esta hidrólisis por lo menos en 15%.

El hecho de poner los alimentos en condiciones que permitan a las enzimas efectuar cambios para hacerlos más aceptables han sido practicadas por el hombre hace siglos, no obstante no entendemos todas las razones o mecanismos involucrados en tales procesos.

La maduración es un excelente ejemplo en que se producen cambios deseables en los niveles de azúcares.

Los resultados de este trabajo sugieren la posibilidad de un esquema de tratamientos que podrían transformar componentes no deseables de frijol en componentes disponibles nutricionalmente y tener un producto más aceptable.

El problema restante es formidable, ya que se requiere un

número extenso de datos sobre la influencia de un número de variables sobre las actividades de las diferentes enzimas involucradas (42).

Por lo que respecta a su papel fisiológico los autores no se ponen de acuerdo por ejemplo, los autores japoneses Asada y Kasai (10) tratan del problema con el fin de encontrar el papel del mio-inositol durante el proceso de maduración de los granos de arroz es decir, como es su distribución, formación y conversión llegando a los siguientes resultados.

a) Para estudiar la formación de inositol se utilizaron azúcares marcados con ^{14}C encontrándose que: El contenido de mio-inositol en diferentes partes de la planta de granos de arroz durante el período de maduración se muestran en la tabla #4 junto con los de levadura y *Chlorella ellipsoulea*.

Tabla # 4

Fuente	mio-inositol libre	mio-inositol fosfatos	Fosfo inositol	Total
granos de arroz al 10° día des- pués de la flo- ración (a)	0.97 (26.4)	2.62 (71.1)	0.091 (2.5)	3.68 (100)
granos de arroz en maduración (b)	0.58 (3.5)	15.3 (93.3)	0.52 (3.2)	16.40 (100)
<i>Chlorella</i> (c)	0.4 (2.7)	12.7 (87.2)	1.48 (10.1)	14.58 (100)
Levadura (d)	0.33 (33.3)	.62 (62.6)	0.041 (4.1)	.99 100%

Los valores entre paréntesis proporcionan los valores de mio-
inositol en % de los estados respectivos.

a) micromoles de mio-inositol/100 granos (peso fresco=2.26g)

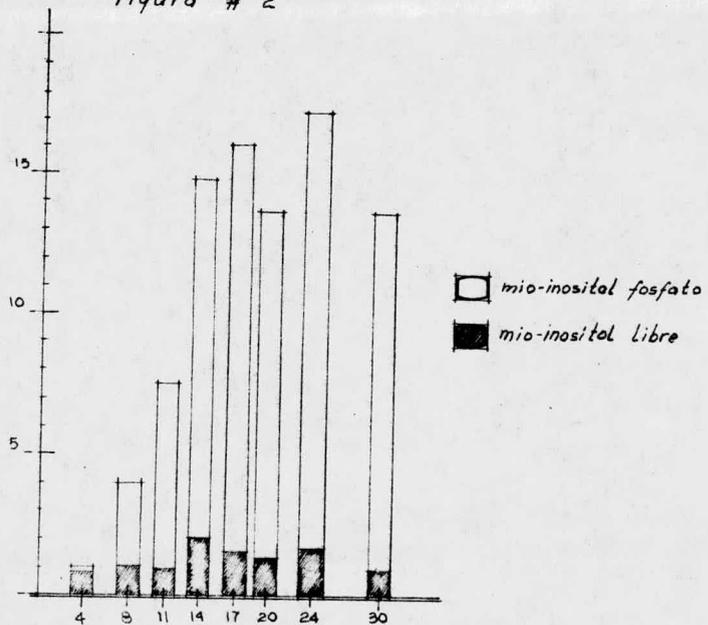
b) micromoles de mio-inositol/100 granos (peso fresco=3.13g)

c) micromoles de mio-inositol/g de Chlorella.

d) micromoles de mio-inositol/g peso seco de levadura comercial

Como se puede observar en las primeras etapas de la madu-
ración se encuentra una considerable fracción de inositol li-
bre; misma que se ve transformada en fracción fosfato al térmi-
no de este período. Y como se puede ver en la figura 2 el ni-
vel de mio-inositol aumenta hasta llegar a un máximo el 14 día
después de la floración.

figura # 2



Estos datos confirman que el contenido de fósforo del ácido fítico de los granos de arroz se incrementa hasta el día 25 después de la floración. Entonces es de suponerse que de el día 14 al 25 después de la floración el cual corresponde a la mitad de la etapa de maduración es cuando ocurre la fosforilación del mio-inositol.

También encontramos que la biosíntesis del mio-inositol en los granos de arroz, durante la maduración se confirmó por medio de experimentos con ^{14}C que se incorporó a mio-inositol de azúcares marcados ^{14}C y también se encontró en un experimento con inositol ^3H que el inositol no sufre otras reacciones diferentes de la fosforilación.

Así mismo en otro experimento en que se administró glucosa 1 fosfato marcada con ^{32}P mostró que el patrón de distribución de ^{32}P en diferentes fracciones del grano fue el mismo, - como el de ^{32}P de fosfato indicando que el ácido fítico es uno de los productos finales del metabolismo de fósforo en la etapa de maduración. Estos resultados podrían llevar a la suposición de que el mio-inositol puede actuar como aceptor de P para quitarlo en favor de la síntesis de almidón por la fosforilasa no obstante esta última afirmación no queda muy bien fundada debido a que no se conoce bien el mecanismo que la explicara.

S.G. Williams (83) expone que los tres papeles fisiológicos sugeridos para el ácido fítico podrían ser:

- a) Almacenador de fósforo (34)
- b) Un almacenador de energía (75) y (54)
- c) Su rápida síntesis crece de la madurez representa un gasto de ATP en el que el metabolismo de la semilla es inhibido y la latencia asegurada (71).

El primer papel ha sido descubierto también por Hall y -
Hodges (34) desde que el ácido fítico contribuye en una gran
proporción del fósforo presente en el grano de trigo maduro -
Asada y Kasai (10) y es indudable que este compuesto se hidro
liza durante los primeros días de la germinación para produ-
cir fosfato inorgánico (4), el papel de este compuesto es pues
proveer a la planta en crecimiento con un suministro de fosfo
ro inorgánico y en este tiempo no puede ser suspendido. La -
cuestión real es más bien si el ácido fítico desarrolla otro
papel adicional así que enfocaremos nuestra atención a estas
posibilidades.

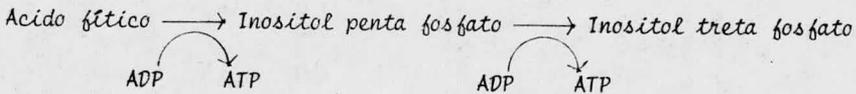
fuerza
de
Fosforo
proveer
las
plantas.

El potencial de transferir grupos fosforil de ácido fíti-
co (8) nos lleva a la sugerencia de Morton & Raisen (54) que
dice que el ácido fítico está involucrado en síntesis de pro
teínas en el endospermo de trigo y también como han sugerido
Biswas (14) que el ácido fítico puede proveer energía para su
almacenamiento y su posterior utilización durante el desarro-
llo de la semilla en los comienzos de la germinación. Los re
sultados de este investigador muestran sin embargo que no hay

un nivel significativo de ácido fítico en el endospermo en acuerdo con los resultados de Rijven (63). Esta conclusión no es congruente con el trabajo de Morton y Raisen, ya que el ácido fítico puede estar presente en la preparación pero probablemente debido a la contaminación del endospermo con granos de la capa de aleurona. Este tejido puede ser fácilmente dañado durante el proceso y entonces obtener así una cantidad considerable de granos de aleurona en el endospermo.

La sugerencia de Biswas y Biswas implica que la enzima responsable de la utilización de la energía contenida en el ácido fítico durante la germinación tendría que estar presente en la semilla madura por lo que se requeriría energía para la síntesis de novo del ácido fítico.

La enzima fitasa que puede ser purificada de la semilla madura y que es responsable por la degradación del ácido fítico durante los primeros días de la germinación, tiene sin embargo todas las características de una fosfomonoesterasa no específica (55). Si esta enzima cataliza reacciones ligadas con ATP del tipo.



Entonces se puede esperar que el fosfato inorgánico se pueda intercambiar con el ATP.

No hay evidencia suficiente para postular propiedades de fosfotransferasa en la fitasa y estas propiedades no fueron observadas ni con la enzima purificada o el extracto crudo de salvado.

Entonces no hay evidencia substancial para apoyar la hipótesis de que la fitina aporta energía durante el proceso de germinación de la semilla, por el contrario trabajos recientes han mostrado que la respiración en trigo (grano) empieza muy temprano.

Figura # 3

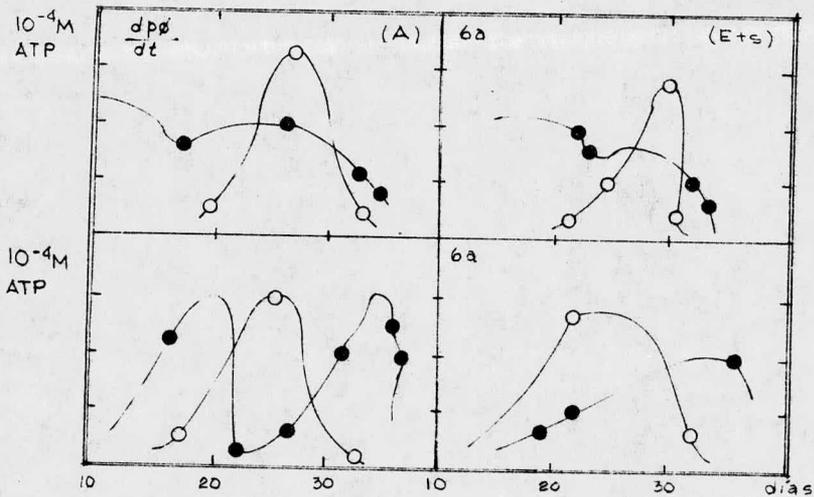


Figura 3. Valores para la concentración molar de ATP (O) en la fracción de aleurona (A) y la fracción el embrión más escutelo (E+S) del grano normal que fue calculado dividiendo el contenido de ATP de estas fracciones por el respectivo contenido de humedad y graficado contra el tiempo después de la salida de la flor masculina.

La velocidad relativa de cambio en el fósforo de AF Pi con respecto al T ($d Pi/dt$) para esta fracción igualmente es graficada así (●).

Esta función es determinada gráficamente en un punto de P contra el tiempo para estos tejidos durante la germinación y justo antes de que se hidrolicen cantidades importantes de ácido fítico (56) esto es incongruente, entonces con que la energía almacenada se requiera en este período.

Si el postulado (c) de Sobolev es cierto entonces el nivel de ATP debería caer substancialmente cuando el nivel de ácido fítico aumenta. De hecho los resultados presentados en la figura muestran que esto no es así porque la concentración de ATP no cae a nivel bajos hasta aproximadamente 7 días después de que se alcanza la máxima rapidez de formación del ácido fítico figura no obstante en grano de arroz (14) y en tubérculos de papa (66) se produce un fuerte incremento en la concentración de ácido fítico poco antes de la madurez que sugiere la producción de ácido fítico esta asociada con la latencia.

Una comparación de la figura 6a con la figura 6b muestra que la máxima velocidad de acumulación de ácido fítico en la aleurona del grano normal ocurre (28 días) en tanto que el grano estresado ocurre a los 25 días. Se puede sugerir que la síntesis prematura del ácido fítico es parte de la reacción a el estres ambiental y se refleja por un mecanismo por el cual la síntesis de ácido fítico tiene una parte en la disminución de el metabolismo previa a la latencia. Los resultados descritos aquí indican que la remoción del pool de ATP no es el mecanismo para tal reacción. Un mecanismo alternativo, es que la síntesis de el fuerte quelatante de ácido fítico (60) produce un efecto en el metabolismo celular por combinación con cationes multivalentes (69) que son conocidos que juegan un papel significativo en muchos procesos celulares particularmente aquellos que involucran fosfotransferasas de las cuales depende la energética de el metabolismo (19). También podríamos citar los ejemplos más recientes de 1977 en la que investigadores se ocupan del ácido fítico la fitasa y de la hidrólisis con las propias enzimas (autólisis) o bien usando microorganismos.

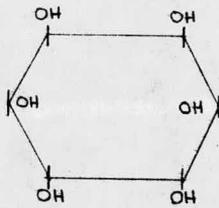
Así Lolos y Markakis aislan fitasa con CaCl_2 al 2% y la caracterizan (44) Schwimmer y Burr (70) autolizan la fitina también en *Phaseolous vulgaris* y Sudarmadji y Markakis (74) hidrolizan una tercera parte del fitato con microorganismos -

basados en el procedimiento de elaboración de un plato tradicional tailandes llamado Thempe.

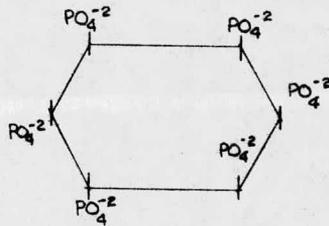
Como puede observarse diversos autores aun no pueden -- asignar un papel importante a el ácido fítico pero su aumento previo a la latencia y su disminucíon en los primeros días - de la germinación implica que debe tener una importancia además de que representa alrededor de el 70% del fósforo total - del grano maduro por esta razón además del hecho de que es po sible utilizarlo como fuente de fósforo inorgánico hacen reco mendable su estudio.

GENERALIDADES

El ácido fítico conocido también como ácido inositol hexafosfórico o bien 1,2,3,4,5,6, ciclo hexano hexafosfórico cuya estructura fue elucidada por los trabajos de Anderson (4) y fue sintetizada un poco más tarde por Posternak (60) basándose en la esterificación del ácido ortofosfórico (H_3PO_4) con el mio-inositol alcanzando un rendimiento de apenas el 8%. Debido a la formación de homólogos inferiores del ácido fítico a continuación estructura, composición y algunas propiedades.



mio-inositol



ácido fítico

Las proporciones que guardan el C, H, P y O elementos que forman parte de este son respectivamente C=10.92% H=2.75% - P=28.16% y O=58.18% su peso molecular es 660.08 en seguida anotamos las solubilidades

SOLUBILIDAD

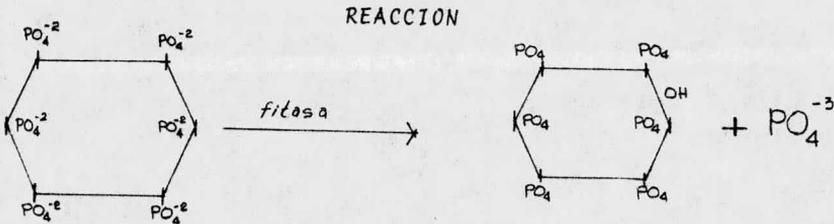
SOLUENTE	SOL	POCO SOL	INSOL
H ₂ O	+		
EtOH-Et ₂ O		+	
EtOH abs-M ₂ OH	+		
Et ₂ O			+
			+
CH Cl ₃			

Comunmente se obtienen del licor de malz (76) y (11) sus sales de Ca⁺² y Fe⁺³ comunmente obtenidos por el procesamiento del malz tienen el aspecto de un polvo gris siendo escasamente solubles en agua y ácidos minerales.

Las sales de Ca⁺² y Mg⁺² tienen el nombre tribal de fitina y su fórmula es Ca₅Mg (C₆H₂O₂₄P₆·3 H O) se obtienen de una gran variedad de granos y semillas; el jugo de papa y del licor de malz son buenas fuentes (11), (80), (37) y (84). Es importante hacer notar que junto con el ácido ftico en forma de sus sales de sodio, calcio, magnesio y potasio también se han encontrado compuestos de mio-inositol con menos de seis grupos fosfato en pequeñas cantidades en las semillas los pr

meros trabajos que detectaron estos compuestos durante la extracción seguramente debido a la acción de la fitasa. Por ejemplo se han encontrado en pequeñas cantidades en arroz almacenado no siendo así en arroz durante la germinación también han sido determinadas en semillas de girasol, maíz, cebada y trigo cuando las semillas han sido secadas con aire forzado y temperatura antes del análisis se ha encontrado que los lípidos de la planta tienen mio-inositol fosfato.

La fitasa (enzima que degrada el ácido fítico en inositol + Pi) hasta inositol mono fosfato ha sido encontrada en



semillas donde hay fitato registrándose que su actividad es baja en los estudios previos de la germinación encontrándose que su actividad aumenta durante la germinación y que esta se ve afectada por la gibberelina y el Pi la fitasa produce - por hidrólisis de ácido fítico mono, di, tri y tetra fosfatos - que son separables por cromatografía de intercambio iónico.

N.C. Mandal y B.B. Biswas (50) observan que el ácido fítico se degrada durante la germinación de frijoles de la va--

riedad "Phaseolos Aureus" encontrando que esta degradación es asociada con un incremento en la actividad de las enzimas en cotiledon. En tanto que en embrión diferenciado el incremento comparativo de esta actividad es muy bajo a través de los períodos de tiempo estudiados, la fitasa aparece en el cotiledon durante la germinación no obstante no parece encontrarse actividad. Observan también que la ciclo heximida es un inhibidor de la fitasa ya que presente en concentraciones de $10^{-6}M$ inhibe la aparición de la fitasa en un 61% aproximadamente durante las 24 y 48 horas posteriores al inicio de la germinación.

Esta fitasa incrementa su dependencia de la síntesis de RNA nuevo en el cotiledón, pero no fue detectada síntesis de DNA en el cotiledón durante la germinación.

Estas observaciones pueden establecer que el fósforo del fitato es movilizado en las semillas y que su movilización sigue de cerca a la germinación.

FITASAS

La fitasa es una de las enzimas descrita por Suzuki y colaboradores (75) como una enzima que libera el fósforo inorgánico de compuestos orgánicos y se dijo de ella que estaba ampliamente difundida en tejidos vegetales y animales.

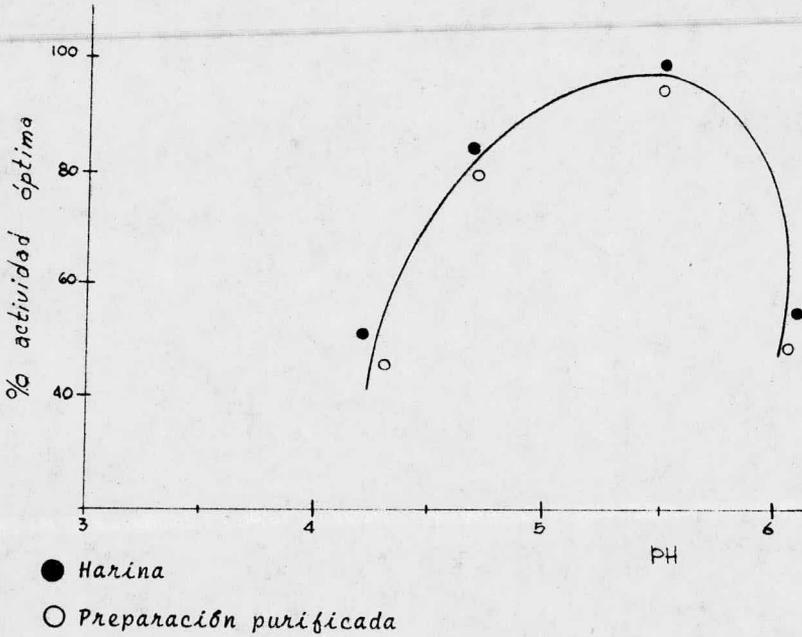
En los granos de cereales una parte considerable de el -

fosforo presente se encuentra bajo la forma de fitato - principal (16) esto hace razonable sugerir que la función de la fitasa es proveer de fosforo inorgánico a la planta durante las primeras etapas de la germinación a partir de fitato - además Giri & Sreenvoion (1938) (32) demostraron que la porción de fosforo inorgánico aumentó durante la germinación en la semilla de trigo, avena, maíz y arroz. Siendo también una observación que la actividad de la fitasa aumenta durante la germinación. También Essery en (1951) (29) encontró que la actividad de la fitasa sufría un incremento durante la germinación de granos de cebada con la consecuente disminución de fosforo de fitato que en este caso fue relativamente pequeña y dudosa respecto a la validez que puede tener la concepción simplificada de la función de la fitasa antes mencionada.

En 1952 F.G. Peers (59) desarrolla una serie de experimentos con el fin de caracterizar la fitasa de trigo, utilizando como sustrato de la enzima fitina comercial (fitato de sodio) y preparando fitasa parcialmente purificada a partir de harina de trigo y también un extracto de harina de trigo y también un extracto de harina sin purificar.

La curva de pH obtenida que reproducimos a continuación en la fig. 4 usada para establecer la relación entre el pH y la actividad.

Figura # 4.



Influencia del pH sobre la actividad de la fitasa

Velocidades iniciales (expresas % de la act.max.) medida a 55°C usando solución .1 M de acetato x 10^{-3} M de fitato.

El efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de Km y Vm calculados de la gráfica de 1/V contra 1/s

	Km	V Max. Mg P/i./ml digest.
Experimento con la harina completa	$0.29 \times 10^{-3} \text{ M}$	127
Experimento con enzima purificada	$0.33 \times 10^{-3} \text{ M}$	127

Encontró también que la inactivación térmica de la enzima en solución (705 unidades/ml) que fue investigada de 40-70° C dió como resultado que las temperaturas de 55 y 65°C eran adecuadas para observar la rapidez de inactivación (52).

En 1971 Mandal, Burman y Biswas (50) logran aislar y purificar la fitasa de frijol variedad de Phaseolous Aureus. Algunas de las observaciones de estos investigadores se presentan a continuación:

Es posible afirmar que la fitasa es estable a pH=7.0 y T=0°C sin que sea necesario congelar; si bien congelar y descongelar produce una baja en la actividad de la enzima. Por lo que respecta a pH óptimo reportan que en buffer Trisácido-maleato-sosa la fitasa de frijol exhibe una actividad máxima a un pH de 7.5, mientras que la fosfatasa presente en la preparación de fitasa tuvo un pH óptimo de 6.0.

En tanto el efecto de la temperatura fue determinado por incubación a diferentes temperaturas durante una hora. Se midió también la liberación de fósforo por fitasa resultando que cuando la temperatura fue elevada por sobre 57° disminuyó rápidamente mostrando solamente un tercio de la actividad que a 57°C cuando la temperatura fue de 65°C.

Se encontró también que utilizando diferentes concentraciones de sustrato a un pH=7.5 con 25 microgramos de proteína a 37° y 57°C. El valor calculado para Km de la ecuación de recíprocos fue de 0.65×10^{-3} M a 37°C, cuando la enzima -

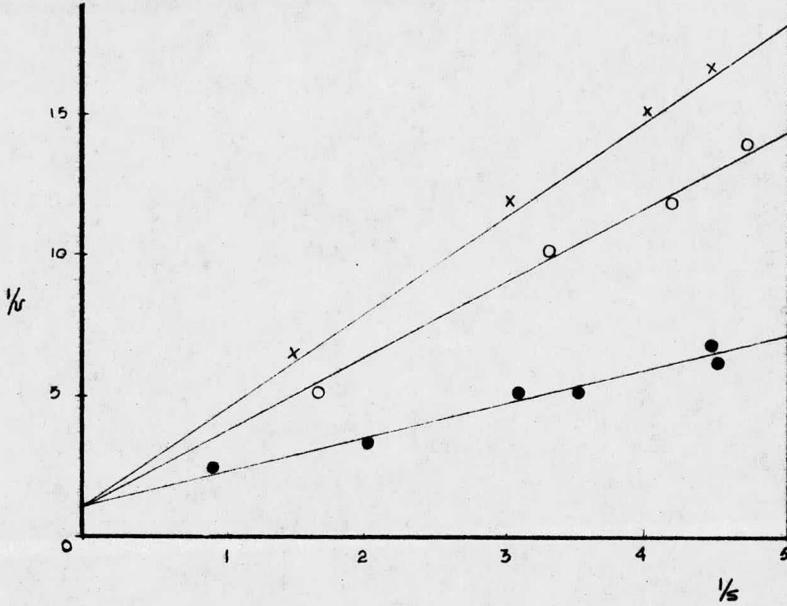
tienen como sustrato homólogos inferiores del ácido fítico se observan diferentes valores de Km como se observa en la tabla 5.

Tabla # 5

Sustrato	V max. (M mol Pi/mg)	Km (M x 10 ⁻³)
16P	44.4	0.65
15P	68.3	0.29
14P	88.4	0.24
13P	88.4	0.24
12P	88.0	0.20

Así mismo se encontró que el fosfato inorgánico es un - inhibidor de la fitasa así como también lo es de la fosfatasa, este efecto fue medido con diferentes cantidades de fosfato, - este experimento es descrito por la gráfica en la figura 5.

Figura # 5



Efecto de fosfato inorgánico sobre la actividad de la fi
tasa -0- sin Pi; -o- micromoles Pi/ml y -x- 2 micromoles Pi/ml

Es importante hacer notar que cuando se incubó ácido fti
co marcado con ^{32}P junto con la enzima, se encuentra a dife-
rentes tiempos la presencia de homólogos de éste y en el mis-
mo experimento se detectó un incremento en la radiactividad -
de el fosfato inorgánico liberado no obstante el ácido ftico

no desaparece de la solución sino hasta 150 minutos después - de la incubación y también es importante notar el I_5P aparece en menor cantidad durante los períodos de incubación aun en - 30 minutos todos los homólogos inferiores han sido determina- dos; el nivel de I_3P decrece rápidamente en tanto que el de - I_3P lo hace lentamente; el nivel de I_2P permanece casi inalte- rado, y el de IMP aumenta.

Por lo que respecta al comportamiento bajo electrofore-- sis sobre gel de poliacrilamida este muestra dos bandas la ma yor correspondiente a la fitasa y la menor a fosfatasa y piro- fosfatasa. Posteriormente Maiti Lahiri Majumder & Biswas - (48) determinaron con mayor exactitud la forma de acción de la fitasa en *Phaseolus aureus*.

La fitasa aislada en este experimento es proveniente de cotiledón de frijol durante la germinación la cual tuvo un - pH óptimo 7.5.

También encontraron que la fitasa aislada de otras fuen- tes es activa a pH ácido, sin embargo la fitasa inducida en *Ba* cillos subtilis mostró tener un pH óptimo en 7. Recientemente la fitasa F_2 aislada de salvado de trigo (43) mostró un pH óptimo a 7.2 se observa también que la fitasa purificada par- cialmente se encuentra invariablemente asociado con fosfatasa y pirofosfatasa de diferentes fuentes y que el pH óptimo se - ve afectado por estas enzimas con objeto de distinguir esta - preparación se realizó una purificación extensiva por medio - de filtración en biogel, poliacrilamida, electroforesis de -

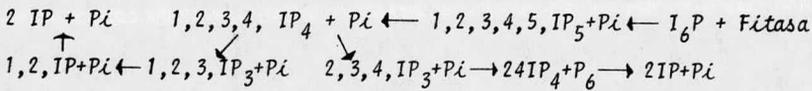
gel ADS y parece ser que la enzima está formada por subunidades de peso molecular 158,00.

Solamente Tomllimson & Ballou (77) reportaron una purificación parcial de fitasa.

La forma de acción de esta fitasa fue estudiada desde varios puntos de vista especialmente por medio de la preparación de ácido fítico marcado usando sustratos apropiados de la enzima fosfoinositol Kinasa (48).

Se ha observado que la degradación del fitato es un proceso en pasos, y empieza por la posición 6 siguiendo con la 5, la 4, la 1 y la 3 ó bien 1 y 4.

Estos son los pasos de la degradación:



Esto fue determinado sin tomar en cuenta la configuración D y L; estas observaciones denotan cierta diferencia con la fitasa de trigo de F.G. Peers (59) y la de salvado de trigo (43).

A su vez Matheson & Strother exponen que en el trigo (52) durante la germinación cuando las semillas son tratadas con HClO_4 procedimiento que tiene las cualidades de ser rápido, inactivar las fitasas y no romper las uniones Ester del

inositol con los fosfatos, la hidrólisis del fitato por fitasa no produce ningún intermediario en concentración significativa durante la hidrólisis del ácido fítico para producir inositol y fosfato inorgánico. Esto está en contraste con la hidrólisis que se efectúa usando cantidades semejantes de fitato soluble y fitasa aislada.

La cantidad de mio-inositol monofosfato que detectó fue menor de 0.1 micromoles/g de peso seco en semillas de trigo durante la germinación (primeras etapas). En esto se notó que la actividad de la fitasa era tan baja que no se detectaba reducción en la concentración de fitato después de 48 horas de la imbibición.

La interpretación de la significancia de concentraciones de fosfatos de inositol por debajo de este nivel en trigo será tan difícil como lograr obtener valores finitos para la velocidad de inactivación por exprimido en un medio desnaturalizante. Una razón para la pérdida de ésteres fosfatos más bajos sería la baja solubilidad de la sal de fitato mezclado - llevando a una solución baja en concentración de fitato relativo a fitasa, sin embargo en este caso hidrólisis del fitato de calcio indica que las semillas existe una situación más compleja y probablemente involucrada la estructura de globoides de fitato.

Suponiendo que los ésteres fosfato intermediarios no son utilizados como tales entonces una consecuencia de su ausencia es un suministro continuo de fosfato y de mio-inositol -

disponible.

La proporción constante de Pi en semillas frescas indica que este nivel es controlado. El fosfato inorgánico como ya se ha encontrado reduce la proporción de fitasa en embriones de trigo aislados en la germinación temprana sin afectar otros procesos (49).

Los iones fosfato solo inhiben preparaciones de fitasa (79) y (73). El control de la fitasa sería más simple si solo se produjera dos compuestos el inositol y el Pi en concentraciones significativas.

El mio-inositol liberado en hidrólisis es utilizado intensamente y la pérdida por lixiviación es muy pequeña (64). La marca de D-glucosa uniformemente marcada con C^{14} es también incorporada.

La distribución de la marca del mio-inositol UC^{14} muestra una incorporación a la fracción de pectina, de hemicelulosa y celulosa como ha sido descrito por Loewus (45) la marca de D-glucosa $U^{14}C$ es también incorporado, el mio-inositol es intensamente convertido a CO_2 e incorporado a otras fracciones en forma similar que la D-glucosa lo cual indica que puede ser rápidamente utilizado por la semilla de trigo probablemente después de la conversión a pentosa (45).

La distribución de la marca de mio-inositol y D-glucosa difiere en dos fracciones, la fracción lipídica después de hidrólisis y remoción de todos los productos excepto mio-inositol.

La enzima que cicliza D-glucosa 6 fosfato ha sido aislada de dos plantas *Phaseolus vulgaris* y *Sinapis alba* (18). La síntesis de fosfatos de inositol en animales involucra reacciones mio-inositol libre con un glicero nucleotido. Las semillas de trigo de tres a cuatro días no convierten la D-glucosa a mio-inositol. Esto puede ser por la carencia de la D-glucosa 6 fosfato ciclasa o su inhibición y se sugiere un posible papel para el inositol que es uno de los productos de la ruptura de la fitasa en el trigo durante la germinación.

MÉTODOS DE DETERMINACION

El método más aceptado generalmente para la determinación de ácido fítico (inositol hexafosforico), era el Heubner y Stadler 1914 (38) fue subsecuentemente aplicada a productos de plantas e ingredientes por otros trabajadores (Rather, - 1917, Arbens, 1922, Averill and King

Siendo Rather quien descubrió que su exactitud no era afectada por substancias diferentes de ácido fítico en extractos de plantas. Este método involucra la titulación del ácido fítico en solución de HCl al 0.6% con una solución de $Fe - Cl_3$ (0.5-2.0mgFe/ml) de concentración conocida en HCl 0.6% se uso el tiocianato de amonio como indicador interno.

Heubner y Stadler consideraron que el punto final es alcanzado cuando se obtiene un color rosa claro que persiste - por 5 minutos.

Una desventaja de Este método es que el punto final de - la titulación no es claro debido a la prescencia del fitato - férrico en forma de precipitado coloidal que se forma durante la titulación. Se hicieron varios intentos para salvar esta dificultad (Knowels and Walging) (1932) (41) y poco después - Andrews and Bailey (1933) (5) no obstante el método más satisfactorio fue ideado por Harris y Masher (1934) (36) que titularon hasta rebasar el punto final de la titulación y después filtraron y con la posterior cuantificación colorimétrica de el $FeCl_3$ en exceso se efectuaba esta determinación.

El ácido fítico es determinado en materiales biológicos por extracción con ácido clorhídrico diluido desarrollando la titulación posteriormente sobre el extracto pero tienen el impedimiento bastante serio de no ser aplicable a materiales - que produzcan en extracto colorido.

Experimentos de Lestie Young (84) indican que el ácido - fítico es parcialmente absorbido por sustancias como Novite, carbón activado tierra de diatomeas y alumina por lo cual la decoloración de los extractos por tales absorbentes no puede ser empleada antes de la titulación se encontró además que - las soluciones de $FeCl_3$ en $HCl_2N/6$ no producen precipitado a temperatura ambiente con soluciones muy diluido de ácido fítico de ácido fítico en $HClN/6$ sin embargo cuando se calentaba a $100^{\circ}C$ se obtenía un precipitado fácilmente separable por - centrifugación o filtración más aun bajo condiciones adecuadas fue posible descomponer cuantitativamente el precipitado con $NaOH$ en $Fe(OH)_3$ y fitato de sodio.

Por medio de centrifugación es posible trabajar con pequeñas cantidades de ácido fítico y con objeto de tomar en - cuenta este hecho se desarrollo en micro método para la determinación de ácido fítico para determinar arriba de 2 mg de ácido fítico expresado como P inorgánico.

La determinación colorimétrica de ácido fítico. Este método difiere de los anteriores principalmente en:

- 1.- Se agrega una cantidad fija de $FeCl_3$ a la solución que se rá analizada.

- 2.- El fitato férrico es precipitado a 100°C.
- 3.- La precipitación desarrollada en HClN/6.
- 4.- Los iones Fe^{+3} en exceso son determinados usando colorimetro por el método de tiocianato.

CONDICIONES PARA LA PRECIPITACION

La precipitación es hecha en tubos de ebullición calentados en baño de agua sobre gradillas algunos experimentos probaron que una solución con 2,5 mg de Fe^{+3} en 5 ml de HCl 1.0N es adecuada para la precipitación de cantidades de ácido fítico por encima de 2 mg (expresado como P) en una solución neutra o ligeramente ácida de 25 ml.

La Determinación del Exceso de Fe^{+3} .

El método colorimétrico de el tiocianato parece ser el más adecuado para la determinación de el exceso de iones Fe^{+3} y Brouckere and Gillet (18) demostraron que este procedimiento puede ser aplicado con precisión a soluciones que tienen HCl por encima de la concentración. La precipitación del fitato férrico es desarrollada en HCl 1/6 N (30 ml) y después de la mezcla de reacción es llevada a 50 ml con HCl 1/6 y entonces filtrada, si se toman 20 ml de este filtrado, la máxima cantidad de Fe^{+3} en el exceso de Fe^{+3} si se toman 20 ml de

filtrado debe ser 1.0 mg.

Esto indujo a que se realizara una investigación para hacer la determinación de Fe^{+3} en cantidades por enzima de 1.0 mg. Usando patrones que contienen 2.0% KCNS y 0.5 mg de Fe^{+3} en 50 ml de HCl 1/6 N y así fue posible determinar acertadamente cantidades entre los límites 0.25-1.0 mg.

PROCEDIMIENTO

a) Reactivos

1.- Patrón de $Fe Cl_3$ en HCl N.

(Se prepara una solución de $FeCl_3$ R.A. en HCl N y el Fe^{+3} se determina gravimetricamente).

2.- Por dilución adecuada con HCl se obtiene una solución que tenga 0.5 mg Fe^{+3} /ml.

3.- HCl 1/2 N y 1/6 N.

4.- Una solución 10% de KSCN % R.A. en agua.

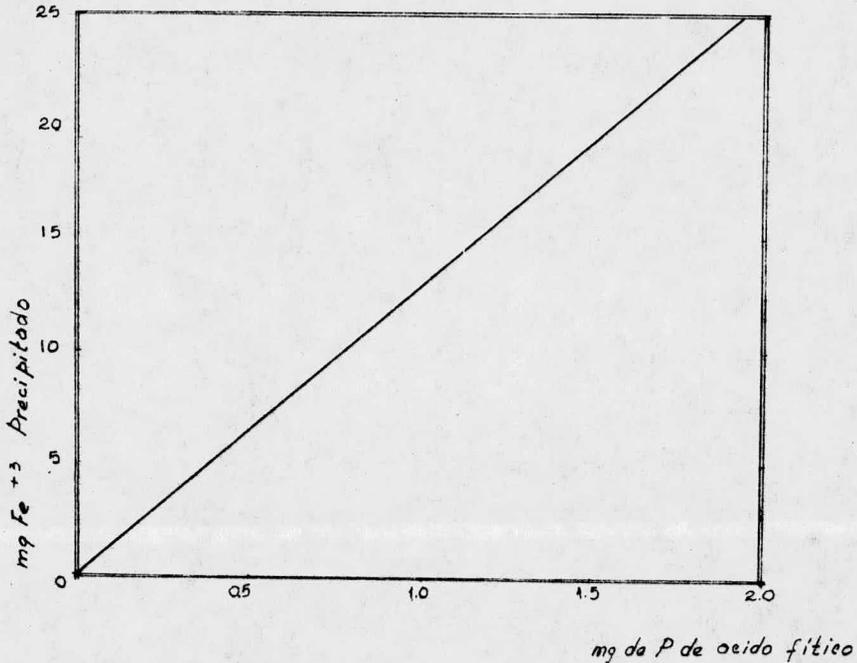
b) En tubos de ebullición seco marca pyrex se pipetea 25 ml- de solución para análisis (neutraoapenas ácida a papel indicador litmus), agregue 5 ml del patrón de $Fe Cl_3 - HCl$.

El tubo es cubierto con una canica y calentado en un baño de agua por 15 minutos teniendo cuidado de que el nivel del baño este por encima del nivel del tubo, el fitato férrico se separa como un precipitado colorido después se enfria - 15 minutos en un baño de agua fría y el contenido se lleva a 50 ml con HCl 1/6 N. el contenido del matraz es filtrado en

un tubo seco con papel wathman número 31 y se pipetea 20 ml de este filtrado en un matraz de 50 ml (en caso de que la can-
tidad de ácido fítico sea pequeña use 30 ml) agregue 5 ml de -
HCl 1/2 N y 10 de KCNS 10% y lleve a 50 con HCl 1/6 N mezcle-
y compare contra el patrón en un colorímetro. El patrón se -
prepara como sigue: 5 ml de patrón de $FeCl_3 \cdot HCl$ en el matraz-
de 50 ml son diluidos con 25 ml de H_2O y se lleva el aforo de
50 ml con HCl 1/6 N y se pipetea 10 ml de esta solución en -
un matraz de 50 ml a continuación se toman 10 ml de esta solu-
ción con pipeta y se ponen en un matraz aforado de 50 ml y a-
gregue 5 ml de HCl 1/2 N y agregue 10 ml de KCNS al 10% y afor-
se a la marca con HCl 1/6 N, el colorímetro más adecuado para
leer el patrón es el número 20 (2.0 cm) y usando 20 ml y esta
lectura y 20 ml de filtrado para la determinación de el exce-
so de Fe^{+3} . Los mg de Fe^{+3} precipitado por el ácido fítico -
pueden ser calculados de la expresión $2.5 \frac{25}{\text{lectura del problema}}$
la cantidad de Fe^{+3} precipitado la cantidad de fósforo ácido-
fítico es obtenido por referencia a la gráfica.

El factor para conversión de los resultados para ácido -
fítico en ácido fítico ($C_6 H_{18} O_{24} P_6$) es 3.55, esta gráfica
puede observarse en la figura 6.

Figura # 6



Gráfica que muestra la relación de mg de fósforo de ácido fítico y el ión férrico en el método colorimétrico.

Esta curva patrón fue preparada por precipitación del fitato férrico a partir de un patrón de FeCl_3 y fitato de sodio recristalizado determinando posteriormente el Fe^{+3} por medio de colorimetría (todo esto variando las cantidades de ácido fítico).

Por su parte George Anderson (4) concluye que los resul-

tados analíticos obtenidos por él indican que las técnicas estándar para estimación del fitato que dependen de la extracción y la precipitación del fitato férrico deben ser usadas con precaución y que no deben ser de aplicación general además de que cierto nivel de Fe^{+3} en el material por analizar es un factor que afecta, además de que la extracción sería incompleta.

En granos y fuentes similarmente ricas en fitato la concentración de Fe^{+3} no afecta la extracción. Por otra parte si solamente se encuentra presente el inositol hexafosfato se deberá obtener una precipitación cuantitativa por los métodos de Common Pringles & Moran (23) y (61). Se encuentran otros ésteres en suficiente concentración; también se precipitan y se les puede denominar el grupo fitato. Hay evidencia de que sucede en una gran variedad de tejidos vegetales. Marrese y colaboradores (51) encontraron que la precipitación del fitato en extractos de plantas proporcionaba valores más altos que con un método de resinas intercambiadores específicos para inositol hexafosfato. Agrega además que la precipitación del fitato férrico de extractos de suelo es complicada por el hecho de tener cantidades considerables de Fe^{+3} y con la consecuente formación de complejos

"Método indirecto para la determinación de ácido fítico" en extractos de plantas que contengan sustancias reductoras.

La mayor parte de los métodos elaborados para la determi

nación de ácido fítico están basados en la insolubilidad del fitato férrico en solución ácida. En el método directo el contenido de fósforo del fitato férrico cuidadosamente preparado aislado por precipitación en la presencia de $FeCl_3$ ácido a partir de los extractos ácidos del tejido en cuestión se determina como (Mc Cance & Widdowson) (47) algo que ya se ha visto de esto con Young (84) solo que Young empleó el factor 1.06 que es algo menor que 1.2 para inositol completamente fosforado.

Se puede expresar resultados altos por el método indirecto cuando se aplica a un extracto ácido recientemente preparado debido a la presencia de sustancias reductoras tales como el ácido ascórbico y los clorogénicos produce valores altos - y naturalmente falsos, se deben a la disminución de la concentración de Fe^{+3} debido a su reducción a Fe^{+2} .

No obstante es posible eliminar esta fuente de error introduciendo un agente oxidante apropiado. (tabla 6).

Tabla # 6

Agente reductor agregado	Fósforo de ácido fítico			
	mg P por 100 g de tubérculos		mg de P por 100 mg de fitina comercial	
	$-H_2O_2$	+ H_2O_2	$-H_2O_2$	+ H_2O_2
Ninguno	70.2	17.8	19.4	19.4
Acido ascórbico 50 mg	86.0	17.8	35.2	19.4
Acido clorogénico 50 mg	95.2	17.9	44.4	19.4

Los valores de el ácido fítico de los extractos de ácido tricloroacético obtenidos de papa son mucho mayores en ausencia que en presencia de H_2O_2 adicionada y la adición de ácido ascórbico o bien ácidos clorogénicos da aún valores más altos. La adición de estas sustancias reductoras a la solución ácida de fitina comercial produce también incrementos en los valores aparente de fósforo de ácido fítico y la adición de H_2O_2 los baja nuevamente a su nivel original.

Para determinar la razón correcta de Fe:P del ácido fítico contenido en papa, se aisló la fracción de ácido fítico en forma de sal sódica por precipitación de un extracto con ácido tricloroacético, de 100 g de tubérculos tratado con exceso de $FeCl_3$ en HCl 0.167 N después de precipitar el fitato férrico se separan el fierro del fitato férrico y en seguida una se trata con $NaOH$, para obtener una solución de fitato de sodio que será analizado por el método directo en presencia y ausencia de H_2O_2 , ambos métodos concuerdan bien en la tabla 6.

Se encontró que 1.165 es el factor de conversión para la razón Fe:P que corresponde a una mezcla de 6 partes de ácido fítico y 4 partes de inositol pentafosfato y que es ligeramente mayor que el encontrado por Young de 1.06 para el fitato de sodio preparado de fitina comercial pero está de acuerdo con el valor derivado del análisis elemental de las

fracciones de fitina de papa. Además el tratamiento previo con H_2O_2 de las fracciones de fitina aislada de la papa no cambia la concentración de Fe^{+3} y no se afecta la razón calculada será de Fe:P tabla 7.

Estos resultados y otros experimentos que involucran la variación en la concentración de H_2O_2 y $FeCl_3$ y el orden del tratamiento de los extractos ácidos (con TCA). Esto muestra que la siguiente modificación del método indirecto de valores consistentes para fósforo de ácido fítico que están de acuerdo con el método directo. También esta modificación ha sido aplicada a papas; pero puede ser aplicable a otros tejidos vegetales que contengan sustancias reductoras. El residuo es lavado sucesivamente con 50 ml y 25 ml TCA al 5% y se combinan los filtrados neutralizados con NaOH 5N y aforados a 250 ml se toman 5 ml de alícuota y se le agregan 5 ml de $FeCl_3$ al 0.3% en HCl N después se agrega una gota de H_2O_2 al 30% y se lleva el volumen a 30 ml y la solución es calentada por 15 minutos en baño de agua hirviente. La suspensión que resulta de este tratamiento de fitato se centrifuga a 3000 x g por 15 minutos, posteriormente se toma una alícuota de 5 ml del sobrenadante y se le agregan 2 ml de una solución al 20% de KCNS.

La cantidad de iones Fe^{+3} remanentes en la solución se estima por medio de la medición de la absorbancia del $Fe(CNS)$ efectuado en un colorímetro a 520 nm (filtro verde). Los mg-

de Fe^{+3} permanentes en el sobrenadante se sustraen de los mg adicionados y la diferencia se convierte a mg de P de ácido-fítico multiplicando por el factor de conversión para papas - que es 1.165.

Tabla # 7

Ml de $Fe Cl_3$ agregado

Método	Determ.	1.5		3.0	
		$-H_2O_2$	$+H_2O_2$	$-H_2O_2$	$+H_2O_2$
mg de P. de ácido fítico ó Fe por 100-g de tubérculos.					
Indirecto	Fe	17.9	17.6	17.4	17.8
Directo	Fe	17.4	17.5	17.7	17.2
Directo	P	15.2	15.0	15.0	15.1
Directo		Razón Fe:P			
Directo		1.145	1.167	1.180	1.140
Indirecto		1.178	1.172	1.160	1.180

Determinación de la razón Fe i P del fitato férrico de papa.

R.M. Roberts and F. Loewus (64) realizan un estudio del metabolismo de inositol en plantas e implementan la siguiente técnica para recuperar el ácido fítico al que posteriormente se le hace cromatografía de intercambio iónico usando gradiente de elución en forma semejante a Kyoko Saio (65) solo que -- en lugar de usar ácido clorhídrico usa ácido fórmico y formato de amonio. La recuperación es como sigue:

Las plantas fueron segadas y puestas en un embudo buchner y -

lavadas varias veces con agua destilada y después liberadas - de el exceso en agua secando al aire con el mismo embudo por varios minutos. En seguida el tejido vegetal fué molido en - EtOH (80% v/v) en un homogenizador de vidrio o con un mezclador equipado con un recipiente de 50 ml de acero inoxidable y el tejido tratado así fué centrifugado y lavado repetidas oca- siones con porciones frescas de etanol al 80% v/v hasta que - los lavados se encontraron libres de clorofila y posteriormen- te se lavo con etanol (100%), cloroformo-metanol (1:2, v/v), - eter etílico y secado el producto final, el cual es un polvo- blanco llamado en este artículo porción insoluble en alcohol, contiene el ácido fítico en forma de sal insoluble. En segui- da este residuo es extraído con una solución de EDTA (0.2%p/v 40°C 30 min) (sal disódica); llevando de esta forma el ácido- fítico la solución junto con otras componentes. La separa- ción de estos componentes fué completa por electroforesis en papel y cromatografía de intercambio iónico.

Cromatografía de intercambio iónico.

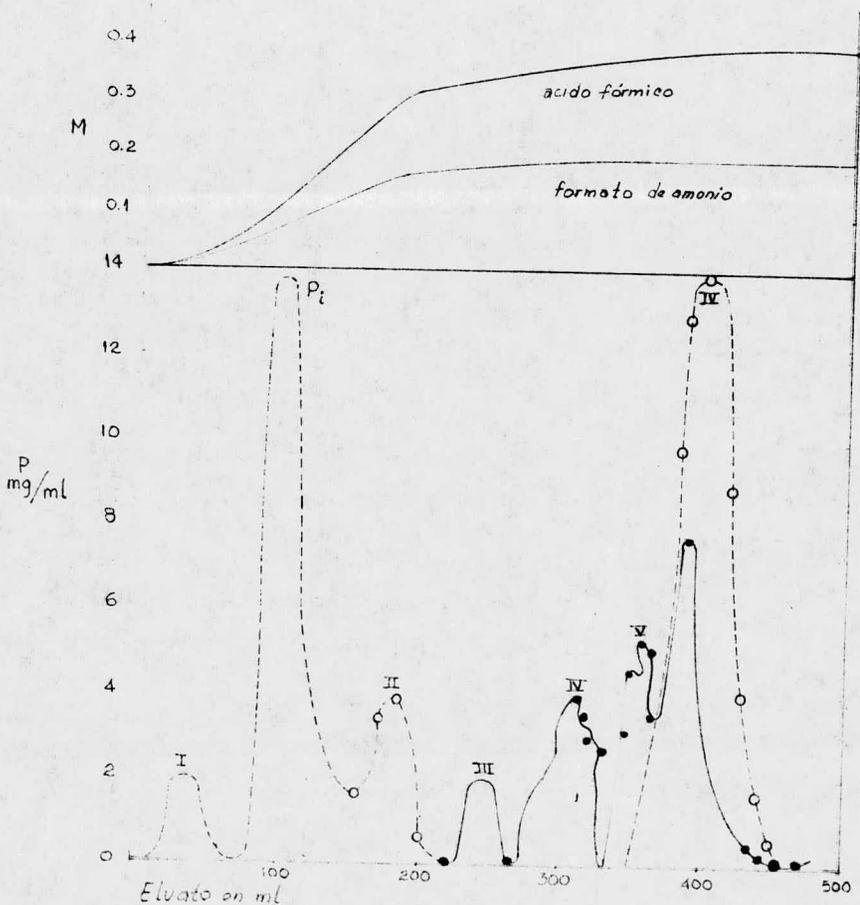
Se utilizó el procedimiento propuesto por Wilson y Ha- rris (82) para separar los esterés fosfato de el mio-inositol- con una pequeña modificación para acomodar muestras más peque- ñas involucradas en este estudio.

La columna tiene cama de resina de 5x0.9 cm y se puso en cada cámara 100 ml inicialmente de eluyente que se mantuvo con un flujo uniforme de 100 ml/h por medio de una bomba peristál-

tica y la fracción de volumen fué de 5 a 10 ml según fuese necesario. Con este sistema fué posible separar una mezcla de mono-di-tri-te tra, penta y hexafosfatos de mio-inositol en un tiempo de 5 horas.

La solución patrón de un fitato parcialmente hidrolizado y que fué tratado con fitasa esta dada en la figura número 7.

Figura # 7



Después de 0 horas de hidrólisis con fitasa
" " 0.5 " " " " "
" " 3 " " " " "

La mezcla de incubación fitato de sodio $.32H_2O$ 10 mg en 15 - ml de preparación de fitasa obtenido de Zea mayz.

El gradiente de concentración de ácido fórmico y formato de amonio usados así está en la parte alta, los números - romanos denotan el grado de fosforación del inositol.

Por su parte Ashton & Evans (7) experimenta con cerea-- les haciendo una modificación del método de Boutwell (17) - que consiste en que el líquido sobrenadante es separado por centrifuga en lugar de filtración y es como sigue: el grano o el salvado de trigo molido es extraído con HCl al 2% por - tres horas y después se centrifuga, las proteínas y la fiti- na fueron precipitados por medio de amoniaco hasta alcanzar- un pH de 8-9 y la muestra fue centrifugada en caliente y la- fitina fue extraída de la proteína en el residuo por extrac- ción con HAcO 8% (pH=3.0) y posteriormente se reprecipitaba- calentando la solución y separando el líquido caliente por - filtración.

Se obtuvo una cantidad menor de fitina que de la forma- anterior, por adiciones de amoniaco a el filtrado frio (pH - 4-5) y calentando hasta obtener precipitación de mayor canti- dad. El filtrado fue nuevamente separado de la mezcla ca--- liente y una posterior adición de amoniaco al filtrado de e-

bullición (pH 8) produjo una tercera precipitación. La si guiente adición no produjo nueva precipitación es decir, las tres fracciones de fitina son preparadas del extracto ácido original de los granos y posteriormente fueron secadas al aire lentamente en la parte alta de una estufa eléctrica debi do a que dentro de la estufa se producía decoloración.

qPara propósitos de análisis se llevo a cabo la oxidación por una combinación del método húmedo y el método seco porque la destrucción del hexafosfato de inositol por el método seco es una operación que toma mucho tiempo y hay cierta incertidumbre de que se haya producido una ruptura total. El procedimiento es como sigue: 0.1 g fue calentado en una mufla a 560°C 1/2 hora. El residuo fue transferido a un matraz Kjeldalh de 100 ml y digerido hasta sequedad con 1 ml de H_2SO_4 y 10 ml HNO_3 ; después se hace una adición de unas cuantas gotas de H_2SO_4 y 10 ml de H_2O .

La mezcla es hervida vigorosamente, enfriada y aforada a 50 ml. Calcio y magnesio se determinaron usando una modificación del método de Green & Allcroft (33) para suero san guíneo.

El potasio se determinó por flamometría y el Mn fue con vertido a MnO_4^{-1} y determinado colorimetricamente. Además el contenido de nitrógeno fue determinado por el método Kjel dalh.

El resultado del análisis de las tres fracciones (ABC)- de dos muestras de avena están en la tabla 1. No se intentó secar ninguna de las fracciones por la razón antes expuesta, así que la composición en porciento no es comparable estrictamente; no obstante la presencia de pequeñas variaciones en las humedades no afectan las proporciones relativas de los elementos presentes cuando están expresados en relación a una proporción constante de uno de ellos.

En la tabla 8, los porcentajes de los elementos han sido divididos por sus pesos atómicos y convenientemente relacionados a el valor de 6 para fósforo porque el ácido fítico es un hexafosfato.

Las razones atómicas así obtenidas están entre paréntesis. Es importante decir que se obtuvieron resultados similares con cebada y centeno.

Es evidente que aún cuando se utiliza el mismo método de extracción la fitina obtenida de un cereal dado varía en composición considerablemente.

Tabla # 8

Muestra 1	Muestra 2					
	A	B	C			
P	18.8(6)	19.1(6.0)	3.1(6.0)	15.3(6.0)	16.1(6.0)	15.5(6.0)
Mg	7.04(2.9)	7.(6.9)	6.7(3.9)	7.6(3.8)	9.12(4.3)	9.5(4.7)
Ca	10.10(2.5)	5.42(1.3)	2.0(0.7)	9.9(3.0)	6.6(1.9)	9.5(4.7)
Mn	1.61(0.3)	0.15(-)	traza	0.97(.3)	traza	

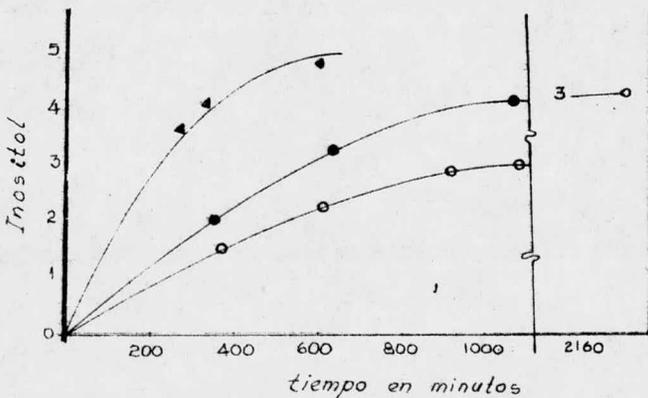
SALVADO DE TRIGO

	Muestra 1			Muestra 2		
	A	B	C	A	B	C
P	14.6(6.0)	14.9.9(6.0)	17.8(6.0)	16.8(6.0)	16.5(6.0)	15.5(6.0)
Mg	7.75(4.1)	8.6(4.4)	9.3(4.0)	9.0(4.1)	10.0(4.6)	10.25(5.0)
Ca	2.09(0.7)	1.19(0.4)	0.49(0.1)	4.5(1.2)	1.66(0.3)	0.69(0.2)
Mn	0.24(0.1008(-)	trazas		0.48(0.1)	traza	

K y N ausente en todos los casos.

Darbe y Norris (25) por su parte determinan la concentración de inositol libre y posteriormente usan autólisis, adición de enzimas y de buffer de pH 5.4 para que se libere el inositol combinado, una de las enzimas que usan es la fitasa y se observa que la concentración de inositol aumenta lo que implica que después de tratar el material con fitasa hay un incremento en la concentración de inositol como se muestra en la gráfica 8

Grafica # 8



1: liberación de inositol de grano completo (frijol) no germi-
nado (1g) por enzimas fitasa (0.025g) con 4 ml de buffer 0.2M
acetato de sodio/ácido acético (pH 5.4)/100ml enzimas autolít-
icas sin buffer inicial pH 6.42 (natural).

Estos autores determinaron la cantidad de inositol libre-
y combinado usando un método microbiológico con el organismo-
de prueba *Schizosaccharomices pombe* como se observa en la grá-
fica la hidrólisis con fitasa adicionada alcanza un máximo en
menor tiempo que los dos tratamientos colaterales, esto impli-
ca que si se determina inositol antes y después de la hidróli-
sis con fitasa por diferencia podríamos determinar el inositol
que proviene de ácido fítico.

Rachel U. Makower (49) en su sección de materiales y méto-
dos incluye los siguientes pasos para la determinación de áci-
do fítico.

- 1.- Macerado el tejido en alcohol caliente y secado del mace-
rado.
- 2.- Estabilización y extracción del ácido fítico con un ácido
fuerte.
- 3.- Precipitación del fitato férrico en el extracto por adi-
ción en exceso de cloruro férrico.
- 4.- Determinación de ácido fítico por uno o varios procedimien-
tos.
 - a) Midiendo la cantidad del ión férrico remanente en la solu-
ción después de la precipitación del fitato (procedimien-

to indirecto)

- b) Conversión del fitato férrico a hidróxido férrico por tratamiento con alcali con la subsecuente determinación de - colorimétrica del ión férrico separado en el hidróxido - (procedimiento del $\text{Fe}(\text{OH})_3$).
- c) Calcinado en seco el fitato férrico precipitado y midiendo la cantidad de fierro presente o bien.
- d) La cantidad de fósforo presente.

Estos procedimientos fueron provados con ácido fítico purificado y también con muestras de tejido de frijol que contenían varias cantidades de ácido fítico las ventajas de los - pasos o métodos son discutidos.

PREPARACION DE ACIDO FITICO PURIFICADO

Una solución de ácido fítico comercial fue tratado con - una resina de intercambios catiónicos (de forma H^+) alternativamente con precipitación con FeCl_3 y acetato de Bario 4 o 5 veces hasta que apareció homogénea por cromatografía en papel. El ácido fítico fue regenerado del fitato de bario por intercambio catiónico (resina en forma H^+) y el fitato férrico por tratamiento con hidróxido de sodio removiendo el $\text{Fe}(\text{OH})_3$ por centrifugación y removiendo el sodio con intercambio catiónico resina (H^+) se empleó agua destilada de vidrio y sustancias grado reactivo se sugirieron las precauciones generales - discutidas por Sandell (67) para la determinación de fierro.

PREPARACION DE MUESTRAS DE FRIJOL PARA ANALISIS Y CALCULOS

Frijol pinto crecido en la localidad (*Phaseolus vulgaris*) variedad pinto fueron cosechados en varios niveles de madurez y almacenados a -29°C antes de la preparaci3n de las tortas--del alcohol.

Las semillas congeladas (o vainas) fueron homogenizadas-- hasta formar una pasta en una licuadora con EtOH caliente si era necesario los componentes duros fueron molidos con arena y regresados a la torta del tejido. Las tortas fueron calentadas por 15 minutos en vapor, enfriadas, y llevadas a un volumen con EtOH 80%.

Las tortas fueron muestreadas y secadas al vacio a peso- constante para el subsecuente an3lisis se llevaron atravez de todos los pasos de extracci3n blancos de reactivos y patrones de referencia y fueron calculados por el m3todo de Dean y Dixon (26) todos los valores del 3cido f3tico fueron calculados sobre la suposici3n de que cuatro iones f3rricos se combinan- con una mol3cula de 3cido f3tico $\text{Fe}_4\text{P}_6(\text{C}_6\text{O}_{24})$ (27) y los c3l- culos fueron en base seca.

EXTRACCION DEL ACIDO FITICO DEL TEJIDO

Se evalu3 la eficiencia de extracci3n por los 3cidos - comunmente usados para el an3lisis del 3cido f3tico contenido en extractos donde se emple3 el m3todo del $\text{Fe}(\text{OH})_3$. La ex-- tracci3n de 3cido f3tico con HCl 0.5 N di3 los resultados m3s

satisfactorios con frijoles maduros e inmaduros de bajo y alto contenido de ácido fítico. La extracción con HClO_4 0.5 N solo fue satisfactoria para frijoles maduros y casi maduros - como se muestra en la tabla 1. La extracción de frijoles inmaduros con HClO_4 0.5N fue menos completa que la extracción con HCl 0.5 N. Agitando y calentando suavemente a 60°C (extracción ayudada).

La extracción de frijoles inmaduros con ácido tricloroacético dio precipitación de fitato con tratamiento de FeCl_3 .

Contrariamente a los reportes iniciales (24), las extracciones múltiples con pequeños volúmenes de ácidos (con agitación y calentamiento suave) fueron más eficientes en la extracción de frijoles que una sola extracción con el mismo volumen total para un período de tiempo total, la ganancia en ácido fítico extraído por extracción múltiple sobre la extracción única fue más evidente en las semillas inmaduras.

Las condiciones adoptadas para extraer el tejido pulverizado y seco fueron tres o cuatro veces con pequeños volúmenes de HCl 0.5N (alrededor de 2 ml de HCl por extracción de 0.2 g de muestra seca) con agitación continua la mezcla fue calentada cerca de 60°C durante los primeros minutos de cada paso de la extracción pero la agitación fue prolongada por 40 min. a temperatura ambiente.

Después de cada extracción la mezcla cremosa fue centri-

fugada a 17.300 x g. por 30 minutos, la acidez de los sobrenadantes combinados fué reducida con alcali pH \pm 2 y el extracto fué llevado a un volumen conocido y refrigerado.

Las vainas que contenian solo pequeñas cantidades de ácido fítico fueron extraídas con HCl 0.5 N solamente. Debido a la naturaleza abultada de las vainas se debieron usar volúmenes mayores de solución ácida en cada paso de la extracción y el volumen final fué reducido por evaporación en vacío se obtuvieron resultados constantes y reproducibles mostrando aún los contenidos de ácido fítico muy pequeños.

PRECIPITACION DEL FITATO FERRICO

El ácido fítico fué precipitado con una solución patrón de \pm 1 mg de Fe/ml en HCl 0.375 N y fué necesario agregar un exceso de Fe para obtener la precipitación cuantitativa del fitato férrico (4) y (47) satisfactoriamente obteniéndose con una razón de moles agregada de Fe a P_2 (Fe/P) total de 4/3 ó superior y con una concentración ácida final de HCl 0.15 N.

Bajo condiciones similares se encontraron Crean y Widdowson trabajando con Guisantes (24) que primero era necesario y a partir de este se calcularon las cantidades requeridas de $FeCl_3$ y HCl.

Se mantuvo un pequeño volumen total con objeto de mantener la concentración de ácido fítico al final de la mezcla de reacción sobre 0.07 mg/m.

La reacción fue llevada a cabo en tubos de centrifuga - colocados en agua hirviendo por 30 minutos o más hasta que - coagulo el fitato férrico. Las concentraciones de ácido fíti- co por debajo de 0.07 mg/ml requieren más de una hora de calen- tamiento para precipitar el fitato férrico después de enfriar los tubos fueron centrifugados a 17,300 x g y decantados los sobrenadantes fueron recolectados y aforados para la determi- nación de ácido fítico basado en el fierro residual mientras que el precipitado de fitato férrico lavado fue usado para to- das las determinaciones restantes.

PRECIPITACION DE $Fe(OH)_3$ DE FITATO FERRICO Y DETERMI-
NACION DE FIERRO

El fitato férrico fue dispersado en los tubos de centri- fuga por la adición de 0.5 ml de agua y fue tratado con 0.5 - ml de NaOH 0.6 N. Después el contenido fue mezclado y los tu- bos fueron calentados de 30 a 50 minutos en un baño de agua - hirviente hasta coagular el $Fe(OH)_3$ y posteriormente se en- - - frió y se centrifugó 10 minutos al 17,300 x g se decanto y se lavo con agua se recentrifugo nuevamente y se decanto el pre- cipitado de $Fe(OH)_3$ fue disuelto con 0.5 ml de HCl 0.5 N con calentamiento en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y transferido a un matraz volumétrico de 10 ó 25 ml con varias porciones de HCl 0.1 N y llevando a la marca con HCl 0.1 N.

El fierro fue determinado colorimetricamente con orto fena

trofina después de reducirlo a Fe^{+2} con hidroxilaminay medido a 515 ó 520 nm (67) y (6). La precipitación del fitrato férrico fue hecho por cuadruplicado, se usaron dos muestras de fitrato férrico para la precipitación del $Fe(OH)_3$ y la determinación colorimétrica de fierro fueron calcinada con $HClO_4$ y H_2O_2 para la determinación de fósforo en el mismo material (3). También se determinó Fe en las muestras calcinadas con ortofenantrolina. Se incluyeron blancos y patrones conocidos de fitrato férrico como controles en todas las determinaciones

El sobrenadante y las aguas de lavado de la precipitación del fitrato férrico se diluyeron en volúmenes de 50-100 ml. El fierro remanente de la precipitación de fitrato fue determinado colorimetricamente de la misma manera y el resultado fue usado para el cálculo de contenido de ácido fítico por diferencia del fierro originalmente agregado (método indirecto).

NOTAS DE LOS PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

La recuperación total de Fe^{+3} agregado a la mezcla se obtuvo de la suma del Fe^{+3} de fitrato férrico y el del sobrenadante agregado (dentro del error experimental con respecto al valor esperado de Fe^{+3} introducido como cloruro férrico) lo cual indica que la pérdida de hierro es pequeña o no existe en los procedimientos analíticos usados. El uso de la centrifuga de alta velocidad minimiza pérdidas de fitrato durante las decantaciones y lavados. El lavado con el ácido clorhídrico

drico es necesario para eliminar el fosfato férrico el cloruro férrico y otras sales que pudieron interferir en los pasos subsiguientes.

El calentamiento prolongado igual que la centrifugación a alta velocidad también ayuda a compactar pequeñas cantidades de hidróxido férrico formado de pequeñas cantidades de fitato férrico tratado con alkali. El uso del mismo tubo de centrifuga para varios de los pasos necesarios ayuda a disminuir los errores de transferencia.

La determinación colorimétrica de fierro como fenantrolina fue adaptada debido a su alta sensibilidad y la estabilidad del color (6) y (67). La determinación colorimétrica del fitato férrico suspendido bajo un juego de condiciones diferentes fue un fracaso debido a que el desarrollo del color fue lento e incompleto para hacer cuantitativa la determinación. La cual pone de manifiesto que el fitato férrico es un compuesto más estable que el formado para la determinación colorimétrica ya que el Fe^{+3} del fitato no es removido ni por E.D.T.A. haciendo necesaria la separación o incineración, el ácido fítico para hacer la determinación de Fe^{+3} .

La cantidad de Fe^{+3} inorgánico presente en el extracto de frijol fue muy pequeña de tal forma que las correcciones por este concepto no fueron necesarias.

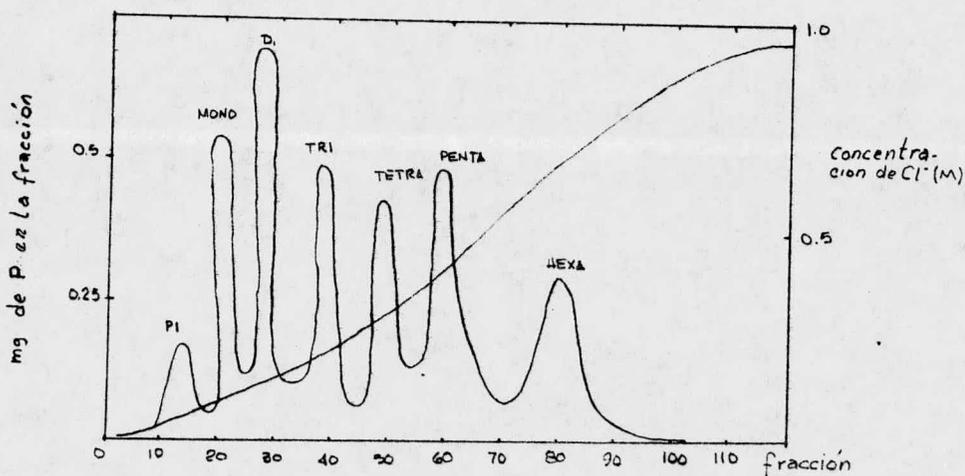
La adición de peróxido de hidrógeno H_2O_2 , para evitar la interferencia de sustancias reductoras (35) también fue encon

encontrada imprescindible en semillas y ballas. En los extrac-
tos de frijol muy inmaduros y ballas obtuvo un precipitado -
con FeCl_3 que no es recuperable como fitato férrico, se preci-
pitan otros compuestos en la mezcla de reacción pero que no
reaccionan con el siguiente paso con Alkali y por lo tanto no
es convertido a $\text{Fe}(\text{OH})_3$, ni es disuelto en el siguiente trata-
miento y permanece como un sólido blanco y no parece ser fita-
to férrico debido a el bajo contenido de fósforo que se le de-
termina por incineración. Puede ser separado por centrifuga-
ción después de la adición de ácido para disolver el $\text{Fe}(\text{OH})_3$
este sólido puede sin embargo ser una fuente de error en la -
determinación de ácido fítico por otros procedimientos de me-
dición de hierro en el precipitado de fitato férrico por inci-
neración en seco o en determinación de Fe^{+3} residual en la --
mezcla de reacción.

Además Saio (65) analizó fosfatos de inositol por cromatografía de intercambio usando gradiente de ión cloruro el -
cual se encontró satisfactorio para la separación completa de
los fosfatos de inositol individuales y en el cual unicamente
fue posible conocer hexafofato de inositol y fósforo inorgá-
nico, el ácido fítico mostro un marcado incremento durante -
las fases más tempranas de la maduración seguido por un incre-
mento gradual en la fase tardia en tanto que el fósforo inor-
gánico disminuyó en las últimas fases de la maduración.

En seguida presentamos el cromatograma en la figura 9 obtenido a partir de hidrólisis de fitina comercial con HCl 6N en el que se observan los diferentes fosfatos y que se observan las diferentes fosfatos y que fue practicada sobre una columna Dowex (X-8, 200-400) forma Cl^- 1.1x10 cm HCl 1N y H_2O a presión atmosférica

Figura # 9



También probaron que durante el almacenamiento el ácido fítico se descompone parcialmente en penta y tetra fosfato de inositol. Recientemente Harland y Oberleas (35) combinan el método de cromatografía de intercambio iónico con el método -

de digestión del fitato obteniendo resultados satisfactorios - a continuación describimos algo de la técnica tomando en cuenta lo siguiente:

Muchos métodos para medir fitato involucran los siguientes pasos.

- 1.- Extracción del grano seco y finalmente molido, con HCl o T.C.A.
- 2.- Precipitación del fitato con Fe^{+3} .
- 3.- Centrifugación y lavado del precipitado.
- 4.- Incineración húmeda o seca del precipitado.
- 5.- Determinación colorimétrica de fósforo en el precipitado - incinerado.
- 6.- Cálculo del fitato a partir de los análisis de fósforo - (57) En muchos métodos indirectos para análisis de fitato se determina el Fe^{+3} en el sobrenadante de un volumen medido y valorado de una solución de este ión en seguida de la precipitación del fitato férrico, aunque este puede también ser determinado en el precipitado lavado con tal que el precipitado sea hidrolizado. La hidrólisis es necesaria en última instancia porque el fitato férrico no es completamente soluble en ácido sulfúrico o nítrico concentrado.

El método que se reporta para la determinación de fitato usa una columna de intercambio iónico antes de la digestión y la medición colorimétrica del fosfato, y se describe en la sección de materiales y métodos como sigue:

Las muestras de 5 g de material seco fueron extraídas por dos horas a temperatura ambiente con 100 ml de solución de HCl 1.2% ó bien con HCl 1.2% y Na₂SO₄ 10% en caso de que los extractos sean precipitados con Fe. En seguida los extractos son filtrados con vacío para evitar cambios o hídrolisis por enzimas bacterianas; los filtrados se almacenaron con refrigeración por no más de una semana antes de su uso (58) y (28) Estos métodos fueron usados para comparar sobre esta base el método de intercambio.

En el método de intercambio iónico se usaron columnas de los laboratorios Biorad Richmond California de 0.7 cm de diámetro y de 15 cm de alto, provistas de una llave de tres pasos, la columna fué fijada verticalmente y se empacó con 5 g de una resina de intercambio iónico en forma de cloruro (AG1x8), de los mismos laboratorios, antes de usar las columnas se efectuó sobre estas un lavado con una solución de NaCl 0.7 M para asegurar la saturación de cloruro de la resina y después lavada con agua destilada hasta que el eluato se encontró libre de sales.

La muestra extraída fué diluída antes de ser colocada en la columna de tal forma que la concentración total de aniones fué menor de 0.05 M alrededor de (1:25), el recipiente de la muestra fué enjuagado y la columna lavada con 15 ml de H₂O destilada para eluir la mayor parte del fosfato inorgánico y el fosfato inorgánico remanente fué eluído-

con 15 ml de NaCl 0.05 M. Entonces el fitato se eluyó de la columna con 15 ml de NaCl 0.7 M se colectó en un matraz de microkjeldalsh al que le fue agregado 0.5 ml de H_2SO_4 concentrado, 3 ml de HNO_3 concentrado y unas perlas de ebullición. La digestión se llevó hasta que solo quedo en la mezcla el H_2SO_4 (25 a 30 minutos).

El punto final de la digestión se alcanza cuando se tiene una nube de vapor blanco suspendida sobre el H_2SO_4 que esta en el recipiente de digestión por 5 minutos (la medición del tiempo es un punto crítico ya que una digestión incompleta no reaccionará con reactivos coloridos y una sobredigestión produce la sublimación del fósforo (58).

Comparación de tres métodos para determinar fitato usando fitato de sodio como patrón (1 mg/ml)^a.

Tabla # 9

Cantidad probada ml	Digestión directa Detr. P	Precipitación con Fe Detr. de P		Intercambio iónico Detr. de P	
	fitato mg	fitato mg	% recuperación	mg	% recuperación
1	0.42 [±] 0.0	0.43 [±] 0.0	101.8	0.43 [±] 0.0	100.4
2	0.81 [±] 0.0	0.82 [±] 0.0	101.2	0.81 [±] 0.0	100.5
4	1.61 [±] 0.0	1.74 [±] 0.0	107.9	1.62 [±] 0.0	100.4
8	3.35 [±] 0.0	3.81 [±] 0.2	113.8	3.28 [±] 0.0	97.9
16	6.74 [±] 0.0	7.20 [±] 0.1	106.9	6.61 [±] 0.0	98.1
% medio de recuperación			106.3		99.5

(a) media [±] error estandard de 6 determinaciones.

Comparación de la separación del fosfato libre de fitato en salvado de trigo por el método de intercambio iónico en la tabla 10.

Tabla # 10

# Muestra	Elución con H ₂ O		Elución NaCl 0.05 N		Elución con NaCl 0.7 M	
	Antes de digerir Mg P/g	Después de digerir Mg P/g	Antes de digerir Mg P/g	Después de digerir Mg P/g	Antes de digerir Mg P/g	Después de digerir Mg P/g de salvado
1	1.35	1.22	0.27	0.30	0.10	10.49
2	1.35	1.24	0.20	0.27	0.12	10.41
3	1.35	1.24	0.17	0.30	0.17	10.41
4	1.35	1.24	0.17	0.32	0.17	10.41
5	1.35	1.24	0.15	0.25	0.30	10.41
6	1.42	1.33	0.12	0.30	0.20	10.70
7	1.44	1.35	0.20	0.30	0.24	10.28
8	1.47	1.33	0.15	0.27	0.15	10.57
9	1.47	1.19	0.15	0.30	0.15	10.41
10	1.47	1.30	0.20	0.30	0.15	10.28
Media ±						
S.E.	1.4 [±] 0.02	1.27 [±] 0.02	0.18 [±] 0.01	0.29 [±] 0.01	0.18 [±] 0.02	10.44 [±] 0.04

Comparación de la separación de fosfato libre de fitato en una solución de fosfato ácido de potasio por el método de columna de intercambio iónico en la tabla 11.

Tabla # 11

# Muestra	Eluato con Agua		Elución con NaCl 0.05 M		Elución NaCl 0.7 M	
	Antes de digerir Mg P	Después de digerir Mg P	Antes de digerir Mg P	Después de digerir Mg P	Antes de digerir Mg P	Después de digerir Mg P
1	1.30	1.30	47	47	0	219.8
2	1.30	1.33	50	53	5	229.2
3	1.33	1.35	50	50	10	219.8
4	1.35	1.30	50	53	5	229.2
5	1.33	1.30	50	49	10	226.1
6	1.33	1.30	53	49	5	229.2
7	1.27	1.30	47	53	5	223.0
8	1.27	1.30	50	53	5	229.2
9	1.30	1.30	47	50	10	229.2
10	1.30	1.35	50	50	7	226.1
Media [±]						
S.E.	131 [±] 0.5	132 [±] 0.8	49 [±] 0.5	51 [±] 0.6	6.0 [±] 1.1	

(57) Se agregaron a los recipientes de digestión alrededor de 10-15 ml de H_2SO_4 destilada, se agitan arremolinando y se colocan en un baño de agua hirviendo por 15 minutos para hidrolizar cualquier fosfato que se pudiera haber formado durante la digestión. El digerido se afora a un volumen conocido y se toma una alícuota para determinar fósforo por el método de Fiske-Subbarrow (30).

DISCUSION

Para determinar la recuperación por el método (tabla 10) se analizaron alícuotas de solución de fitato de sodio (Sigma Chemical Co) para que sirviera como patrón; se tomaron alícuotas idénticas y se analizaron siguiendo la precipitación de fierro y la digestión en seguida de la elución de la columna de NaCl 0.7 M como se muestra en la tabla I hay una diferencia significativa entre ambos métodos (P 0.05).

Se llevó a cabo una prueba de reproducibilidad, se muestra en la tabla 10 hecha con salvado de trigo y fosfato de sodio en la tabla 11 cada una de las tres fracciones de la columna (H_2O , NaCl 0.05 M, NaCl 1.7M), fueron probados colorimétricamente para fosfatos ambos antes de la digestión con el objeto de mostrar la efectividad de las molaridades de NaCl en el aislamiento del ión fitato.

La tabla 11 muestra la recuperación de fósforo y fitato cuando una solución que contiene 186.7 mg de fósforo inorgánico y 228.4 mg de fósforo de fitato que fueron agregados como fosfato ácido de potasio y fitato de sodio respectivamente.

Con el salvado y la mezcla de fósforo-fitato la mayor parte del fosfato inorgánico quedaba en la fracción de agua.

La solución de NaCl 0.05 M removió una cantidad adicional de fósforo inorgánico en vista de esto se observa que cada una pequeña porción de fósforo inorgánico el NaCl 0.7 M no obstante esto no afecta el método para análisis aproximados de fitato.

RESUMEN

Si se tuviese una muestra para determinarle ácido fítico podría escoger alguna de las siguientes secuencias o combinaciones de estas, dependiendo del material reactivos de que disponga el laboratorio así como también tomaría en cuenta el tipo de material que se emplearía y la probable concentración de ácido fítico en la muestra a analizar.

a) El primer paso en muchas de las determinaciones consiste en una extracción del ácido fítico con HCl o HClO₄ diluido.

En este extracto se puede:

- I Precipitar el ácido fítico como fitato férrico con exceso de FeCl₃ valorado y valorar el Fe en exceso con tiocianato de potasio o bien con ortofenantrolina.
- II Podríamos enseguida centrifugar, separar el precipitado e incinerarlo para determinar en las cenizas fósforo o bien fierro.
- III Después de precipitar el fitato férrico podríamos tratarlo con NaOH y recuperar el hidróxido férrico determinar nuevamente fierro por el método de tiocianato o de la ortofenantrolina. Al extracto se le puede determinar fósforo orgánico y fósforo inorgánico.
- IV El extracto ácido puede ser tratado con fitasa y al final de la hidrólisis se puede determinar fósforo, siempre y cuando al principio se haya determinado fósforo; la di-

ferencia entre estas concentraciones será el fósforo de fitatos en la muestra o bien podría determinarse mio-inositol después de esta acción enzimática.

- V Se puede correr cromatografía al extracto ácido de intercambio iónico con gradiente de cloruro o de formato de amonio comparándose con reactivos puros.
- b) Se puede obtener el residuo no soluble en EtOH que contiene al ácido fítico y éste a su vez puede disolverse en HCl dil. para hacerle cualquiera de los tratamientos anteriores.

Es importante hacer notar que la combinación de los métodos de intercambio iónico y de extracción precipitación fueron los que mejores resultados obtuvieron.

CONCLUSION

A partir de la información obtenida hasta entonces posible concluir que el ácido fólico tiene una importancia grande desde el punto de vista del metabolismo de las semillas durante la germinación no obstante no se conoce bien su o sus funciones. Son particularmente interesantes los cambios de concentración que sufre esta sustancia desde un máximo que alcanza durante la germinación hasta que empieza a hidrolizarse a gran velocidad en los primeros estadios de la germinación como ya hemos visto, no hay un acuerdo de los autores, así Mandall (50) encuentra evidencia de que el Pi proveniente de fitina produce G.T.P. no obstante S.G. Williams (83) considera que poca evidencia experimental para afirmar que se forma A.T.P. a partir de ácido fólico y le asigna un papel relacionado con el final de la latencia; también tenemos a Matheson & Stroter (52) que suponen que el mio-inositol se utiliza en la síntesis de lípidos. Esto implica que hay mucho por describir del ácido fólico.

Por otra parte hay la posibilidad de que ese fósforo del ácido fólico se pueda emplear en nutrición humana y nutrición animal ya que con Kon y colaboradores demuestran que se puede volver utilizable, tomando en cuenta que además que no es utilizable entorpece la absorción de otros elementos como los iones metálicos; con esto se quiere considerar que si es interesante el estudio del ácido fólico

Si se considera que toda esta información podría enfocarse a la obtención de un fósforo más disponible para monogástricos en nutrición animal teniendo en cuenta que la roca fosfórica y otras formas en que se suplementa fósforo a las raciones balanceadas para animales alcanzan precios muy elevados, podría ser atractiva la idea de emplear este recurso por ahora no muy aprovechable.

En base a esta observación se puede elaborar un programa por las siguientes etapas:

- a) Seleccionar el método o una combinación de métodos adecuado para determinar ácido fítico y ensayarlo hasta obtener reproducibilidad en los ensayos y congruencia con lo reportado por la literatura.
- b) Ensayar una ruptura ya sea autolítica o con otras enzimas para liberar el fósforo inorgánico con objeto de tener un ingrediente más aceptable por lo que respecta a contenido de fósforo inorgánico y por último,
- c) Hacer un experimento biológico por ejemplo con aves con el fin de verificar que tan efectivo ha sido el tratamiento.

Estas etapas de la investigación propuestas y que son posteriores a la investigación bibliográfica no necesariamente tendrían que concluirse, es decir llegar hasta la parte c sino que dependiendo de los resultados obtenidos en las experimentaciones anteriores el experimentador deberá decidir si continúa o no con esta investigación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abrenz (1922) *Mitt. Lebenim Hyg.* 13:45.
- 2.- Albaun, H, and Umbreit, W. (1943) *Amer, Journal Botany* 30:553.
- 3.- Allen, R.J. (1940). *The Estimation of Phosphorus. Biochem J.* 34:858.
- 4.- Anderson, G. (1963) *Effect of Iron/Phosphorus ratio - and acid concentration of the precipitation of inositol hexaphosphate. J. Food Agr.* 14:352.
- 5.- Andrews and Bajley (1933) *Ind. Eng. Chem* 24:80.
- 6.- A.O.A.C. (1965) *Official Methods of Analysis (10th Ed) The Association Washinton D.C.*
- 7.- Ashton W.M. and Evans C. (1962) *Phosphorus and P compounds oat Composition of Phytin in oats in other cere als. J. Sci. Food Agri.* 18:545-59-21.
- 8.- Atkinson, M.R. and R, K. Morton (1959) *Comparative Biochemistry Vol 2 par Academic Press New York.*
- 9.- Averill and King (1926) *J. Amer. Chem. Soc.* 48,724.
- 10.- Azada Kasai Z. *Formation of mio-inositol in phytic acid on Wolfffiella Florida. Plant Physiol.* 43:1710-1716.
- 11.- Baldwin et al., U.S. pat 2,815,360 (1957) *To Corn Products Refining Co.*
- 12.- Becker R. et al., (1974) *Conditions for the autolysis of alta-galactosides and phytic acid in California white small beans. J. Food Sci.* 39 4:66-769.
- 13.- Bernardini and Umbreit, W. (1943) *Amer, Journal Botany* 30:553.
- 14.- Biswas-Biswas. (1965) *Biochem et Biophysica acta.* 108. 710:713.
- 15.- Bolley Mc. Cormack Naughton U.S. pat 2,732,395. (1956) *To National Lead Company.*
- 16.- Booth, R.G., Carter, R.H. Jones, C.R. and Moran, T. - (1941) *J. Soc. Chem Ind. Lond.,* 60:903.
- 17.- Boutwell P.W.J. (1917) *Amer. Chem. Soc.* 39,491.
- 18.- Brochere and Gillet (1933) *Bull Soc. Chem Belg.* -- 42,281.
- 19.- Bygrave F.L. (1967) *The Ionic Enviroment and Metabolic Control. Nature* 214:667-671.

- 20.- Chem. Abs. (1976) 85 6 37624y.
- 21.- Chem Abs. (1976) 85 13 891870v
- 22.- Chen I.W. and F.C. Charalampous. (1966) *J. Biol. Chem.* 241 2194.
- 23.- Common R.H. (1940) *Analyst*, 65,791.
- 24.- Crean, D.E.C., and Widdowson Elsie M. (1963) *Phytin in human nutrition Biochem. Journal* 29B2694.
- 25.- Darbe A and F.W. Norris (1957) *Determination of Free - and Combinated inositol in the ungerminated Bean Seed. and The Young Plant. Biochem. J.* 3:404.
- 26.- Dean. R.B. and Dixon W.J. (1951) *Simplified Statistics for small number of observations. Anal. Chem.* 23:636.
- 27.- Earley G. (1944) *Determining phytin phosphorus. Ind. - Eng. Chem. (Anal. Ed)* 16:389.
- 28.- Earley, E.B. and Deturk, E.E. (1944) *Time and rate of synthesis of phytin in corn grain during the reproductive period. J. Amer. Soc. Agron.* 36:803.
- 29.- Essery, R.E. (1951) *J. Inst. Brew.* 48,125.
- 30.- Fiske C.H. and Subarrow. (1925) *The Colorimetric Determination of Phosphorus. J. Biol. Chem.* 47 3:288-295.
- 31.- Giri, K.V. and Sreenwaban, A. (1938). *Biochem* 2,296,428
- 32.- Giri, K.V. and Sreenwaban, A. (1935). *Biochem* 2,296,428
- 33.- Green and Allcroft W.M. (1937) *Thech. commun. Bur Anim. Nutr. Aberd no* 9,39.
- 34.- Hall J.R. and T.K. Hodges (1966). *Phosphorus metabolism of germinating oat seeds. Plant Physiol.* 41:1459-1464.
- 35.- Harland B.F. and D. Oberleas. (1977) *Cereal Chem.* 544 - 827-832.
- 36.- Harria and Mosher (1934). *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* - 6:320.
- 37.- *Helv Chim, Acta* (1921) 4,153.
- 38.- Heubner and Stadler (1914) *Biochem.* 2:64-422.
- 39.- *J. Food Sci.* (1973) 38:215.
- 40.- Jones, W.M. Jr (1949) *Inorganic Chemistry*, P 377 Blakiston Co:Philadelphia Pa.
- 41.- Knowles and Walking (1932) *J. Agric. Sci.* 22,755.
- 42.- Kon S. *et al.*, (1973) *Effects of different treatments on Phytate and soluble Sugars in California small beans (Phaseolous vulgaris).* 38:215-217.

- 43.- Lim P.E. and Tate (1973) *Biochim. and Biophys Acta* 302, 316.
- 44.- Lolás G.M. and Markakis P. (1977) *The Phytase of Navy Beans (Phaseolus vulgaris)* *Journal of Food Sci.* 42 4 - 1094-1097.
- 45.- Loewus F.A. and B.J. Finkle and R. Jong, (1958) *Biochem and Biophys acta.* 30:629.
- 46.- Luerus, H. and Maesch, L. (1929) *Wichr, Braus* 46, 143.
- 47.- Mac Cance, R.A. and Widdowson E.M. (1935) *Biochem J.* - 29, 2694.
- 48.- Maiti B.A. Lahire Majumder and B.B. Biswas. (1974) *Purification and mode of action of Phytase from phaseolus aureus.* *Phytochemistry* 13:1047-1051.
- 49.- Makower J. (1969). *Changes in phytic acid and soluble phosphorus in maturing. Pinto beans* *J. Sci. Food Agr.* 20:82.
- 50.- Mandal, N.C. Biswas, Brenda B. (1970) *Bese Inst. Calcutta India* *Plant Physiol.* 45 1:4-7.
- 51.- Marrese R.J. Duell. R.W. and Sprague M.A. (1961) *Crop Sci.* 1:80.
- 52.- Matheson and Strother. (1969). *The utilization of Phytate by germinating wheat.* *Phytochem.* 8:1349-1356.
- 53.- Mayer A.M. (1958) *The Breakdown of phytin and Phytase activity in germinating lettuce seeds.* *Enzimology* - 19:1-8.
- 54.- Morton R. and, K, Raisen (1963). *Acomplete Intraceluler unit of incorporation of a.a. into storage protein utilizing ATP generateds from phytin.* *Nature* 200:429-433.
- 55.- Nagai and Funahashi. (1963) *Phytase from wheat grain.* *Agr. Biol. Chem.* 27:619-624.
- 56.- Negvovoriva, L.A. and N.M. Borisova. (1967) *Trigger mechanism of germinating seeds.* *Soviet Plant physiol.* -- 14:65-71.
- 57.- Oberleas, D. (1973). *Phytates P 363.* In: *Toxicans occurring naturally in foods* (2nd ed) by F.M. Strong. *Nat. Acad. of Sci. Washington, D.C.*
- 58.- Oberleas A. (1964) *Dietary factors affecting zinc Availavility.* pH D. *Dissertation Univ. of Missouri.*
- 59.- Peers F.G. (1953) *The Phytase of Weat* *Biochem Journal* 53:102-110.

- 60.- Posternak T. (1965) *The Cyclitols*, Holden Day. Inc. - San Francisco p.223.
- 61.- Pringle, W.J.S. and Moran T.J. (1942) *Soc. Chem. Ind. Lond.*, 61:108 T.
- 62.- Rather (1917) *J. Amer. Chem. Soc.* 39,2506.
- 63.- Rijven, A. (1964) *Distribution of phosphorous, during wheat grain development*, *Aust J. Biol. Sci.* 17:572-574
- 64.- Robert R.M. and Loewus. (1968) *Inositol metabolism in Plants VI Conversion of myo-inositol in Phytic acid - on Wollfffiella Florida*. *Plant physiol.* 43:1710-1716.
- 65.- Saio, K. (1964) *The change on inositol phosphates during the ripening of rice grains* *Plant Cell Physiol.* 5:393:400.
- 66.- Samotus B. and Schwimmer. (1962) *Indirect methods for the determination of phytic acid in plants extract*. *Biochem. et Biophys Acta* 27:382.
- 67.- Sandel E.B. (1959) *Determinación colorimétrica de trazas de metales* 3th ed. Interscience. New York.
- 68.- Sartirahna, M.L. and J.E. Darnel. (1962) *The effect of phosphate on development of phytase in the wheat embryo* *Physiol. Plant* 20:1066-1075.
- 69.- Sen, T.L. and A.M. Altschul. (1967) *Isolation of globoids from cotton seeds. Aleurone grain*. *Arch. Biochem. Biophys.* 121:678-684.
- 70.- Schuimmer S. and Burr H.K. (1977) *Phytate Removal from whole dry beans by enzymathe hydrolisis an diffusion*. *Journal of food Science* 42 4 1098-1101.
- 71.- Sobolew, A.M. and M. A. Rodinova. (1966) *Phytin by aleurone grain in ripening sun flower seeds*. *Soviet - plant Physiol. (Eng trasln)* 13:958-961.
- 72.- Stanley George (1970) *Role of Phytic acid in wheat grain*. *Plant Physiol.* 45 4:376-81.
- 73.- Sugiura M. and Y. Sunobe (1962) *Botom Mg. (Tokyo)*. - 75,334.
- 74.- Sudarnadji S. and Markakis P. (1977) *The Phytate and Phytase of soybean Tempeh* *J. Sci. Fd. Agric.* 28 381-1383.
- 75.- Suzuki, V. Yoshimura, K. and Takshishi M. (1907) *Bull Agri. Tokio.* 7,503.
- 76.- Thomas, U.S. pat 2,718.532 (1955 to Staly M/g Co.).

