

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO OXÁLICO EN ALIMENTOS DE ORIGEN
VEGETAL CRUDOS Y COCIDOS POR EL MÉTODO OFICIAL DE LA AOAC

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

CLAUDIA PEÑA CUEVAS

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Ángela Sotelo López
Vocal	Prof. Bernardo Lucas Florentino
Secretario	Prof. I. Ma. Lourdes Flores Téllez
1er. Suplente	Prof. Rosa María Argote Espinosa
2º. Suplente	Prof. Iliana Elvira González Hernández

Sitio en donde se desarrolló el tema:
Facultad de química, Conjunto E, Departamento de Farmacia
Laboratorio 111

Asesor del tema:
Maestra en Ciencias Ángela Sotelo López

Supervisor técnico:
Maestra en Ciencias Rosa María Argote Espinosa

Sustentante:
Claudia Peña Cuevas

AGRADECIMIENTOS

♪ A Dios por darme una segunda oportunidad.

♪ A mi muy querida Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha albergado desde hace doce años y la cual me formó como el profesionista que soy ahora.

♪ A mi Facultad de Química que me ha dado tanto, porque además de aprendizaje me deja muy buenos profesores y excelentes amigos.

♪ A todos y cada uno de los profesores que he tenido a lo largo de mi vida universitaria, principalmente a los que hicieron que amara mi carrera. Gracias a la Maestra Ángela por su apoyo, a la Maestra Rosita mil gracias por tu paciencia y tiempo, a Iliana y Lety por su ayuda.

♪ A todos mis amigos que conocí en esta, mi Facultad de Química, porque hicieron que fuera más liviana esta pesada jornada: Andrés Adolfo, Ricardo, Francisco Javier, Paulette, Nazul, Jorge Antonio, Alejandro, Enrique, Adalid, Karlo Isaac, Mitzi; gracias por cada momento que me regalaron.

♪ A todos mis amigos que estuvieron conmigo y que llevan años aguantandome: Diana Atzín, Lucero, Liliana, Juan Armando, Eva Elizabeth, Graciela, Victor David, Brenda: mil gracias a todos por su increíble amistad, los adoro.

♪ A mis nuevos amigos de la COFEPRIS: mi banca Yattzel y Lorena, Roberto, Aarón, Alejandro, Manuel, mis compañeros de área Lulú y Juan Carlos, mil gracias por su apoyo en todo momento, por darme fortaleza para cerrar este ciclo y por tener las palabras adecuadas para no darme por vencida.

♪ A mi familia, porque todos a su manera me apoyaron siempre y aguantaron mis malos humores y ausencias.

♪ A mis dos ángeles que me acompañan en todo momento, sé que no están físicamente conmigo pero siento su presencia y su ayuda; no las olvidó, seguirán formando parte de mi vida.

♪ A mi papá, por enseñarme lo más importante de una persona: los valores, y por demostrarme con su ejemplo que el éxito no tiene límites.

♪ A la persona que más admiro, mi madre, a quien le debo todo lo que soy; porque durante estos 24 años te esforzaste para darme todo tu tiempo y sacrificios. Gracias por ser mi ejemplo de vida y espero que estés tan orgullosa de mí como yo lo estoy de ti. TE AMO.

DEDICATORIAS

♪ A mi hermosa sobrina Azul Sheccid por darle un nuevo sentido a mi vida.

♪ A mi hermano por su incondicional apoyo y por todas esas platicas que tuvimos.

♪ A mi papá por demostrarme su apoyo cuando más lo necesitaba y por la nueva etapa que estamos viviendo.

♪ A mi madre, porque no tengo palabras para agradecerle el haberme obligado a hacer cosas que hoy me ayudaron a llegar al lugar en donde estoy. Por siempre apoyarme en todo momento y por ser una gran mujer y excelente madre.

INDICE

Introducción.....	1
Objetivos.....	3
Capítulo 1 Antecedentes.....	5
Capítulo 2 Metodología.....	19
Capítulo 3 Resultados y Discusión.....	31
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	45

INTRODUCCIÓN

Los vegetales son comúnmente consumidos por los seres humanos porque son fuente de fibra, vitaminas, minerales y antioxidantes.

El ácido oxálico se encuentra de manera natural en algunos alimentos como espinacas, acelgas, etc. el problema principal que determina el oxalato es el de la disponibilidad de calcio en la ración alimentaria, ya que se combina con el calcio para formar un complejo insoluble; además de que la ingesta de altos niveles de oxalato puede producir hiperoxaluria, potencialmente conduciendo a cálculos en riñón y vejiga, y en el extremo, edema renal y calcificación.

Existe el método oficial de la AOAC (1995)¹ para la determinación de ácido oxálico en vegetales enlatados que permite cuantificarlo, pero es un método que lleva mucho tiempo y que no está probado en plantas comestibles crudas o sin haber llevado a cabo un proceso industrial, de manera que en este trabajo se decidió aplicar el método oficial para vegetales enlatados a plantas comestibles en crudo y cocidas (sometidas a un tratamiento de cocción convencional) y comparar los resultados obtenidos con los nuevos métodos propuestos en recientes artículos que publican nuevos métodos de menor tiempo de realización y con extractos de muestras crudas; además de que proporcionan información sobre la cantidad de oxalato soluble, insoluble y total, lo cual no se obtiene por el método oficial de la AOAC con el que solo se obtiene la cantidad de oxalato total.

En este estudio el propósito fue obtener la cantidad de ácido oxálico presente en las muestras de plantas comestibles: espinacas (***Spinacia oleracea***),

acelgas (*Beta vulgaris var. cicla*), verdolagas (*Portulaca oleraea L.*), berros (*Nasturtium officinale*); y verificar el efecto del tratamiento térmico de las mismas en la determinación por el método oficial de la AOAC.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la cantidad de ácido oxálico en muestras de plantas comestibles crudas y cocidas por el método oficial de la AOAC.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer la concentración de ácido oxálico en muestras de espinacas (*Spinacia oleracea*), acelgas (*Beta vulgaris var. cicla*), verdolagas (*Portulaca oleraea L.*), y berros (*Nasturtium officinale*) crudos.
- Analizar el efecto del tratamiento térmico convencional a las muestras de espinacas (*Spinacia oleracea*), acelgas (*Beta vulgaris var. cicla*), verdolagas (*Portulaca oleraea L.*), y berros (*Nasturtium officinale*).
- Realizar un análisis estadístico a los resultados para verificar la tendencia que se obtiene entre los resultados.
- Comparar los resultados obtenidos por la metodología oficial de la AOAC con los de la bibliografía.

- Analizar las ventajas y desventajas entre los métodos actuales publicados en los recientes artículos con respecto al oficial de la AOAC.

Capítulo 1 ANTECEDENTES

La presencia de oxalato en hongos, animales, humanos y plantas ha sido conocida durante muchos años. Numerosos estudios han documentado los efectos del oxalato cuando es consumido por animales y por el hombre. El oxalato puede ser producido tanto en plantas como en hombres a partir de precursores, incluyendo el ácido ascórbico.²

El ácido oxálico es corrosivo. Los oxalatos se combinan con el calcio sérico para formar oxalato de calcio insoluble. La reducción del calcio disponible conduce a una estimulación muscular violenta con convulsiones y colapso.³

El ácido oxálico, presente en forma natural en alimentos como espinaca, acelga, betabel, etc., puede causar cálculos renales e inhibir la disponibilidad de calcio. Presenta dos pKas (1.46 y 4.4).⁴

Tabla 1 Propiedades del ácido oxálico

Nombre	Fórmula	Pf°C	Solubilidad g/100g H ₂ O a 20° C	pK ₁	pK ₂
Ácido Oxálico	HOOC-COOH	189	9	1.46	4.4

Fuente: Morrison⁵

Los oxalatos se forman por neutralización del ácido oxálico con la base correspondiente o por intercambio del catión. Así se puede obtener el oxalato potásico a partir del ácido oxálico y del hidróxido potásico:



Los ésteres del ácido oxálico pueden obtenerse con las reacciones clásicas de esterificación a partir del ácido o del cloruro de oxalil.⁶

El ácido oxálico se obtiene en el cuerpo humano por medio de la síntesis del ácido ascórbico. Una vía de metabolismo de la vitamina en seres humanos comprende su conversión en oxalato, y la excreción a la postre en la orina; el deshidroascorbato probablemente es un intermediario. También se ha identificado ácido ascórbico-2-sulfato como un metabolito de la vitamina C en la orina humana.⁷

El ácido ascórbico, *in vivo*, es oxidado en dos pasos en los que pierde cada vez un electrón, pasando por una forma ascorbilo de radical libre. Este intermediario es seguidamente oxidado de ácido dehidroascórbico que es irreversiblemente hidrolizado para dar ácido 2,3-dicetogulónico. La descarboxilación de este último genera varios compuestos de 5 carbonos (xilosa, ácido xilónico) o es oxidado para dar ácido oxálico y varios fragmentos de 4 carbonos. Además, el ácido ascórbico puede ser también convertido a ácido ascórbico-2-sulfato.⁸

Algunas de sus propiedades son: cristaliza con dos moléculas de agua. A 100° C pierde el agua de cristalización, y el ácido anhídrido funde a 190° C. Se utiliza en análisis químico por su poder reductor y en especial en la

determinación de magnesio y calcio. También se emplea en tintorería, en el curtido de pieles, en síntesis de colorantes y como decapante.⁹

Existe una variedad de vegetales y alimentos que contienen cantidades considerables de oxalato. La tabla 2 presenta una relación de estos alimentos.

Tabla 2 Contenido de oxalato en alimentos
(contenido por 100 g de alimento)

> 100 mg	70-100 mg	40-70 mg
Betabel	Col rizada	Zarzamora
Manteca de cacao	Puerro	Apio
Perejil	Quimbombó	Camote
Cacahuete		
Espinaca		
Ruibarbo		
Acelga		
Té		
Germen de trigo		

Fuente: FELDMAN Elaine¹⁰



Acelgas



Espinacas

El oxalato aparece como sales solubles de Na^+ y K^+ , ácido oxálico y/o como oxalato de calcio insoluble (CaC_2O_4 ; estado cristalino con dos formas hidratadas, dihidratado y monohidratado). Los cristales de CaC_2O_4 son visibles en la orina de animales y humanos y en varios tejidos donde ocurren las condiciones de sobresaturación.²

Las formas de los cristales de CaC_2O_4 varían considerablemente y se encuentran en el interior de las células (la mayoría de los oxalatos fueron encontrados en el interior de las vacuolas de las células) o en las paredes celulares.¹¹

Los cristales de CaC_2O_4 están presentes en una variedad de tejidos de aproximadamente 75% de las plantas, que incluyen la enorme mayoría de legumbres comestibles.²

El oxalato está presente en las plantas en forma soluble e insoluble. El oxalato soluble incluye las sales de sodio, potasio y ácido oxálico, y las sales de oxalato que son pobremente solubles pertenecen a las de magnesio.¹¹

En los tejidos de las plantas el oxalato se presenta como una combinación de fuentes de oxalato soluble así como sales de oxalato insolubles.¹²

En la tabla 3 se presentan las cantidades de oxalato total y soluble que se obtuvieron mediante un método enzimático y de electroforesis capilar para muestras de espinacas crudas y cocidas.

Tabla 3 Contenido de oxalato total y soluble
en espinacas crudas y cocidas medido
por un método enzimático y de electroforesis capilar

Muestra	Contenido de oxalato (ac. Oxálico mg / 100 g mtra húmeda)	
	Método enzimático	Método de electroforesis capilar
Espinacas crudas		
Oxalato total	1145	1114
Oxalato soluble	803	791
Espinacas cocidas		
Oxalato total	797	794
Oxalato soluble	468	489

Fuente: WEIWEN, Chai.¹²

El ácido oxálico y sus sales solubles, como el oxalato potásico, precipitan en el organismo en forma de oxalato cálcico, cuyos cristales se depositan en los conductos renales de los intoxicados e incluso en el interior de las células si la cantidad ingerida es grande. Por este mecanismo el ácido oxálico puede producir un descenso de la calcemia.¹³

Desde un punto de vista estrictamente nutricional, el problema principal que determina el oxalato es el de la disponibilidad de calcio en la ración alimentaria. Si consideramos que 2.5 g de ácido oxálico precipitan 1 g de calcio, la disponibilidad de calcio de un alimento viene determinada por la relación de ácido oxálico g/kg / calcio g/kg.

Tabla 4 Relación de ácido oxálico g/kg / calcio g/kg
en diferentes alimentos

Alimento	Relación de ácido oxálico g/kg / calcio g/kg
Ruibarbo	100
Espinacas	10
Patatas	5
Cacao	4.16
Té	2.6

Fuente: DERACHE¹⁴

Todos los alimentos que tengan una relación de ácido oxálico/calcio superior a 2.5 constituyen una mala fuente de calcio y además pueden considerarse como descalcificantes.¹⁴

Otros resultados experimentales realizados en el hombre y en otros animales, confirman un efecto antinutritivo del oxalato en relación al calcio, que puede ser sumamente peligroso durante los períodos en que son especialmente importantes los aportes de calcio (crecimiento, lactancia). El aporte de calcio debe ser como mínimo suficiente para satisfacer las necesidades del

organismo, considerando las cantidades que quedan acomplejadas por el alimento.¹⁴

Tanto los animales como los humanos accidental o intencionalmente comen plantas con alto contenido de oxalato (espinacas). Como se mencionó antes, la ingesta de altos niveles de oxalato puede producir hiperoxaluria, potencialmente conduciendo a cálculos en riñón y vejiga, y en el extremo, edema renal y calcificación.²

Hay verduras como el apio y nabo rojo, que contienen cantidades no despreciables de ácido oxálico y que no producen intoxicaciones.¹³

La biodisponibilidad del oxalato juega un papel importante en la determinación de si un alimento es de alto riesgo para personas con hiperoxaluria.¹²

Los efectos negativos del ácido oxálico en la absorción del calcio se pueden predecir a partir del rango oxalato/calcio en los alimentos. Los alimentos con rango de 1 o menor no interfieren con la absorción de calcio. El calcio es irreversiblemente ligado al ácido oxálico, así que un alimento con un rango de oxalato/calcio de 1 no será una buena fuente de calcio, aunque éste sea rico en calcio.¹⁵

El ácido oxálico reduce la disponibilidad de los cationes divalentes esenciales. Es un ácido fuerte y con iones alcalinos metálicos de la tierra y otros iones metálicos divalentes, forma sales que son difícilmente solubles en agua. El oxalato de calcio es insoluble en agua a un pH neutro o alcalino, y se disuelve fácilmente en medio ácido. En muchos experimentos con animales, se han encontrado efectos negativos de alimentos ricos en oxalato, especialmente con la absorción de calcio.¹⁵

Normalmente la orina contiene pequeñas cantidades de ácido oxálico, ya que se trata de un producto del metabolismo intermediario. Sin embargo, es imposible que por consumo de verduras que contengan ácido oxálico lleguen a ingerirse cantidades tales que causen un descenso del nivel de calcio en sangre y una elevada eliminación renal.¹³

El consumo de altas cantidades de oxalato puede producir oxalosis y una excreción elevada de oxalato en la orina. Un incremento en la concentración de oxalato en la orina tiene mayores efectos en la cristalización de oxalato de calcio que un incremento de la concentración del calcio. El oxalato de la orina es derivado de producción endógena y absorción intestinal, se ha encontrado que la contribución de oxalato ingerido y oxalato en la orina está entre 10 y 72%. La biodisponibilidad y la absorción intestinal del oxalato dependen de la proporción de oxalato soluble e insoluble.¹¹

Este ácido es prácticamente excretado en orina o heces sin modificarse. Considerando su forma ionizada (I) y la no ionizada (NI) se podría calcular su distribución para un pK 1.46.⁴

El oxalato se une al calcio en la orina formando una sal pobremente soluble que típicamente está cercana a la saturación. La formación de cristales pequeños ocurre cuando las concentraciones de calcio y oxalato en la orina alcanzan la sobresaturación. Un cálculo renal se forma cuando los cristales de oxalato de calcio se añaden o depositan en un cristal "semilla" tal como ácido úrico. En la orina humana, la sobresaturación del oxalato de calcio está influenciada más por la concentración de oxalato que por la concentración de calcio.¹⁶

La excreción normal en orina de oxalato es de 10-39 mg/día, y cerca de más de la mitad del oxalato de la orina humana es derivado de los alimentos más que de la síntesis endógena.²

El ácido oxálico puede inducir efectos tanto tóxicos como antinutritivos. Para los humanos, puede ser ligeramente tóxico. Sin embargo, se requieren dosis masivas de 4 a 5 g para inducir algún efecto tóxico.¹⁵

Los dos aspectos de toxicidad presentados por el ácido oxálico, interferencia con la asimilación del calcio y formación de cálculos renales, son consecuencia de la débil disociación de las sales de oxalato cálcico. El umbral de toxicidad del ácido oxálico es bastante bajo; la dosis letal mínima en el hombre se valora en 5 g aproximadamente. Por otro lado el margen de seguridad es limitado, un consumo excesivo de ruibarbo puede representar una décima parte de la dosis letal mínima.¹⁴

SINTOMAS POR INTOXICACION CON OXALATO Y TRATAMIENTOS

Las células de las plantas con oxalato contienen cristales puntiformes de oxalato de calcio, pero sobre todo unas células superficiales en forma de ampolla, donde los cristales de oxalato forman haces espesos que ocupan todo su interior. Estas células se comportan como aparatos eyectores, y la irritación o la presión provoca la súbita expulsión de los cristales de oxalato y del ácido oxálico libre contenido también en las células. Se especula, además, sobre la existencia de sustancias de acción histaminiforme y de enzimas proteolíticas. La riqueza en sales cálcicas de las plantas es tal que los extractos de sus raíces se utilizan como componente abrasivo en la composición de pastas dentríficas.¹⁷

La manifestación principal del envenenamiento con ácido oxálico es la anuria. Existen 2 tipos, el agudo y el crónico:

Envenenamiento agudo (por ingestión de ácido oxálico): los síntomas comienzan con irritación local y corrosión de la boca, esófago y estómago con dolor y vómito. Estos síntomas son seguidos poco después por temblores musculares, convulsiones, pulso débil y colapso. La muerte puede ocurrir en minutos. Después de una aparente recuperación o si se ingiere oxalato, puede aparecer insuficiencia renal aguda debida al bloqueo de los túbulos por oxalato de calcio.

Envenenamiento crónico (por contacto cutáneo): el contacto cutáneo prolongado puede causar cambio de color y gangrena por el efecto corrosivo local.³

Los síntomas en general se desarrollan tan sólo con masticar la planta, sin que ésta llegue a ser ingerida. Se presenta de forma inmediata un dolor urente en el labio y la boca. Esta sensación de quemazón de la mucosa oral se acompaña de tumefacción (edema) de labios, lengua y garganta, junto a hipersalivación. Es característico que impida el habla. Existe la posibilidad de que el edema alcance la glotis, pero es raro y excepcional, en contra de lo que a menudo se ha afirmado sobre esta intoxicación. Tal complicación no se ha observado en series recientes de numerosos casos. De llegarse a ingerir el fragmento de vegetal masticado, se presentarán náuseas, vómitos y posterior diarrea e inflamación del tubo intestinal. Se ha mencionado, en ocasiones, la posibilidad de una necrosis esofágica. Sin embargo, tampoco se ha observado esta complicación en series extensas de reciente publicación. Los síntomas son provocado por la lesión directa de las mucosas por los cristales de oxalato y tal vez por la acción de las otras sustancias acompañantes. La incidencia de este tipo de intoxicación oscila entre el 5 y 10% de las consultas hospitalarias por vegetales ponzoñosos, es la forma más frecuente de afectación asociada a vegetales registrada en los centros de información toxicológica.¹⁷

Los tratamientos para el envenenamiento agudo consisten en:

- Medidas de urgencia: precipitar el oxalato mediante la administración oral de calcio en cualquier forma, como leche, agua de cal, gluconato de calcio, cloruro de calcio, o lactato de calcio. No se debe practicar lavado gástrico o emesis si ha ocurrido corrosión tisular. Disolver 10 g de lactato de calcio en los líquidos (o añadir leche) para lavado gástrico o emesis.
- Antídoto: administrar lentamente gluconato de calcio o cloruro de calcio a 10%.

- Medidas generales: si la función renal permanece normal, administrar líquidos en una cantidad hasta de 4 L diariamente para prevenir la precipitación del oxalato de calcio en los túbulos renales.

El tratamiento por envenenamiento crónico es evitar nuevas exposiciones.³

Suele aliviar mucho el cuadro chupar lentamente fragmentos de hielo (cubitos).

Los antihistamínicos y corticoides son poco eficaces e en general innecesarios, ya que los síntomas remiten espontáneamente en 12-24 horas. Si la tumefacción mucosa alcanza la glotis y se obstruye la vía aérea (eventualidad rarísima), deberá realizarse una intubación traqueal, o en su defecto una traqueotomía.¹⁷

En los pacientes que fallecen a consecuencia del envenenamiento con ácido oxálico, se encuentran cristales de oxalato de calcio en los túbulos renales y otros tejidos. Los riñones presentan tumefacción turbia, degeneración hialina y esclerosis de los túbulos. Pueden ser encontrados cambios corrosivos en boca, esófago y estómago. El edema cerebral es también un hallazgo frecuente.³

DETERMINACION DE ACIDO OXALICO

Además del método oficial de la AOAC, existen otras metodologías propuestas en recientes investigaciones para determinar ácido oxálico, que incluyen métodos enzimáticos, HPLC, espectrofotometría y combinaciones de ellos, por mencionar algunos. A diferencia del método oficial de la AOAC, que es una metodología para vegetales enlatados, las investigaciones recientes se realizan con extractos de muestras frescas, crudas y cocidas para el caso de vegetales, muestras frescas de cereales y leguminosas, soya, etc.

Los métodos enzimáticos consisten básicamente en preparar los extractos de las muestras en HCl concentrado y posteriormente centrifugadas, utilizando únicamente el sobrenadante que se somete a una serie de extracciones para posteriormente añadirle la enzima al extracto (por ejemplo oxalato oxidasa). Determina la cantidad de oxalato total presente en las muestras.

Los métodos espectrofotométricos se realizan por medio de lecturas de absorbancia de los extractos de cada muestra utilizando como blanco agua y pueden ser complementarios a los otros métodos. Se puede determinar la cantidad de oxalato total presente en cada una de las muestras.¹⁶

La HPLC es un método en el que se pueden utilizar diferentes tipos de muestras, como cereales, leguminosas, plantas comestibles crudas y cocidas. Consiste en una preparación de las muestras dependiendo de su origen y la realización de extractos de cada muestra con HCl y se inyecta la muestra en el sistema de HPLC utilizando ácido sulfúrico como fase móvil. La cantidad de ácido oxálico en cada muestra se determina contra una curva de calibración de ácido oxálico. En esta metodología se puede determinar el contenido de ácido

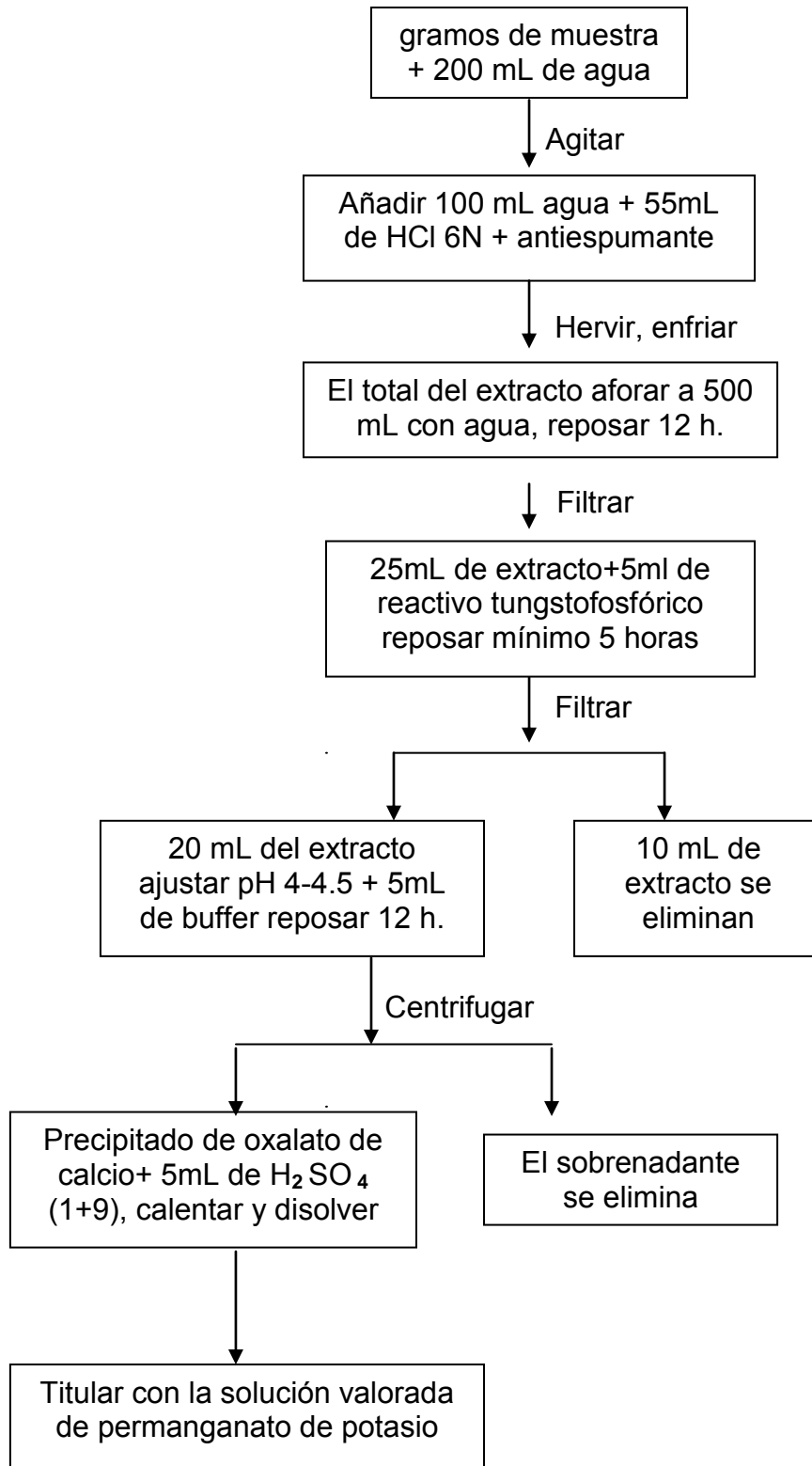
oxálico soluble y total presente en cada una de las muestras analizadas, el ácido oxálico insoluble se determina por diferencia.¹⁸

También existe un método que combina la HPLC con el método enzimático utilizando los extractos de las muestras y pasándolos a través de una columna de intercambio aniónico y una fase móvil de EDTA, posteriormente utilizando la oxalato oxidasa se convierte el oxalato a peróxido de hidrógeno y CO₂. El peróxido de hidrógeno resultante se detecta amperométricamente.¹¹

El estudio del ácido oxálico está relacionado con el ácido fítico por ser también un compuesto con actividad antinutricional. El fitato se ha considerado como un antinutriente porque reduce la biodisponibilidad de minerales en humanos como zinc, hierro, calcio y proteínas convirtiéndolos en no asimilables por el organismo bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, estudios revelan que el fitato a bajas dosis, presenta también efectos positivos sobre la salud como exhibir una acción anticarcinogénica efectiva contra muchos tipos de cánceres. Además de su acción anticarcinogénica, el fitato es también un inhibidor potencial de la formación de cálculos renales, que está relacionada a su actividad antioxidante y su capacidad de inhibir la formación de cristales. A pesar de que los humanos sintetizan fitato, la mayoría del fitato presente en la orina se origina de la ingesta y no de la síntesis endógena.^{16, 19}

Capítulo 2 METODOLOGÍA

A continuación se presenta el diagrama del procedimiento realizado:



PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de las muestras

Las muestras que se utilizaron para la determinación fueron muestras de espinacas (*Spinacia oleracea*), acelgas (*Beta vulgaris var. cicla*), verdolagas (*Portulaca oleraea L.*), berros (*Nasturtium officinale*) que se adquirieron en el supermercado. La parte no comestible de las muestras fue descartada. La parte comestible de las muestras se dividió en dos porciones: una para el análisis de muestras crudas y la otra porción para el análisis de muestras cocidas.

Posteriormente las muestras crudas se sometieron a un secado en estufa a 65° C durante 24 hrs, y posterior al secado se muelen para obtener una harina de la muestra que se pasaron por la malla de 0.5 mm de diámetro.

Las muestras cocidas se sometieron a un tratamiento térmico de calentamiento con agua en un volumen 1:1 (100 g de peso neto de muestra con 100 mL de agua), se eliminó el agua de cocción y después se secaron en la estufa a 65° C durante 24 hrs. y también se pasaron por la malla de 0.5 mm de diámetro.

Las muestras se almacenaron en frascos secos y en un lugar libre de humedad.

Metodología

La metodología utilizada para la determinación de ácido oxálico en las muestras es la oficial de la AOAC de la versión de 1995 para vegetales enlatados.¹

El método oficial de la AOAC (1995)¹

Fundamento:

La determinación de ácido oxálico se basa en la extracción de este en medio ácido, seguido de la eliminación de proteínas y posterior precipitación como oxalato de calcio insoluble. El oxalato se cuantifica después de disolverlo con ácido sulfúrico. El oxalato disuelto se hace reaccionar con permanganato de potasio (oxidante) en solución ácida.



El resultado neto de esta reacción es que el oxalato se disuelve en medio ácido sulfúrico, formándose $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ que se oxida a CO_2 , y el KMnO_4 se reduce a Mn^{+2} .

El límite de detección de esta metodología es de 140-700 mg de ácido oxálico.

MATERIAL Y EQUIPO

- ♪ Matraz digestor 600 mL Berzelius
- ♪ Potenciómetro, CORNING pH meter 430
- ♪ Parilla de calentamiento con agitación
- ♪ Bureta 50 mL
- ♪ Papel Whatman #2
- ♪ Tubos cónicos para centrífuga de 50 mL
- ♪ Centrífuga DYNAC
- ♪ Lana de vidrio muy fina

REACTIVOS

- ♪ HCL 6N
- ♪ Tungstato de sodio *2H₂O R. A.
- ♪ Ácido fosfórico ACS.
- ♪ Cloruro de calcio Anhidro R. A.
- ♪ Acido acético R. A.
- ♪ Acetato de sodio *3H₂O R. A.
- ♪ Oxalato de calcio R. A.
- ♪ Permanganato de potasio R. A.
- ♪ Acido clorhídrico R. A.
- ♪ Hidróxido de amonio R. A.
- ♪ Acido caprílico para fines bioquímicos (antiespumante)
- ♪ H₂SO₄

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- ♪ *Reactivo de ácido tungstofosfórico:* disolver 2.5 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en la mezcla de 4 mL de ácido fosfórico y 50 mL de H_2O y aforar a 100 mL con agua destilada.

- ♪ *Buffer de acetato:* disolver 2.5 de cloruro de calcio anhidro en 50 mL de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) y añadir a la solución 33 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ diluido a 50 mL con agua destilada.

- ♪ *Líquido de lavado:* diluir 12.5 mL de ácido acético concentrado con 250 mL de agua destilada y añadir polvo de oxalato de calcio, agitar y dejar reposar. Repetir la adición y la agitación hasta saturación. Enfriar a 4° C antes de su uso filtrar y mantenerla fría durante su uso.

Preparación de las soluciones de Permanganto de potasio:

Para preparar las soluciones de permanganto de potasio se debe considerar que durante la reacción de óxido-reducción, el manganeso cambia su valencia de +7 a valencia +2, por la adición, a un átomo, de cinco electrones; por lo que el peso equivalente del manganeso resulta ser igual a su peso atómico dividido entre cinco. De acuerdo con lo anterior el peso equivalente del KMnO_4 es igual a su peso molecular entre cinco (158g/5).

- ♪ *Solución de KMnO_4 0.1 N:* pesar 3.2 g aproximados de KMnO_4 y disolver en 1 L de agua destilada. Calentar la solución hasta que

hierva durante 1 hr evitando que la ebullición sea tumultuosa, enfriar y completar al volumen. Dejar reposar toda la noche y filtrar por lana de vidrio o filtros de micro fibras de vidrio, NUNCA UTILIZAR PAPEL FILTRO, se retendrá el MnO_2 (producto de la reducción por la materia orgánica). Recibir en frasco ámbar limpio (exento de materia orgánica). Lavar previamente todo el material que se utilice durante la elaboración de la solución de permanganato de potasio con mezcla crómica y agua para que esté libre de materia orgánica. Solución de $KMnO_4$ 0.01N: Diluir 100 mL de la solución de $KMnO_4$ 0.1 N en 1 L de agua destilada. Preparar fresca antes de su uso.

Estandarización de la solución de $KMnO_4$ 0.1 N:

Para titular la solución de permanganato decinormal se utiliza oxalato de sodio, de acuerdo a la reacción de óxido-reducción el peso equivalente del oxalato de sodio es igual a su peso molecular entre dos (134g/2).

Se titula la solución pesando con exactitud 0.2-0.3 g de $Na_2C_2O_4$ previamente secado a 100-110 ° C y colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Disolver en agua (50-70 mL) y agregar 15-20 mL de H_2SO_4 diluido 1:8. La solución se calienta a 70° C y se titula con agitación dejando caer la solución de permanganato de potasio lentamente hasta una coloración rosa permanente. Como blanco medir el mismo volumen de H_2SO_4 diluido (5+95) previamente hervido por 10-15 minutos y después enfriado a $27 \pm 3^\circ C$ y agregar un volumen de solución de permanganato de potasio a obtener el color

rosa final. Restar el volumen del blanco al de la titulación y este valor se utilizará en los cálculos. Se realizan los cálculos correspondientes para verificar la concentración de la solución. A continuación se presenta un ejemplo del cálculo:

La normalidad de la solución de permanganato se calcula teniendo en cuenta el peso equivalente de oxalato, la cantidad que se pesó de esta sal para la titulación, y el volumen de la solución de permanganato requerida para la oxidación del oxalato.

$$N = \frac{g \text{ Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 \times 1000}{mL \text{ KMnO}_4 \times 67}$$

Solución 0.01 N: Diluir 100 mL de la solución de KMnO_4 0.1 N valorada a un litro con agua destilada en un matraz aforado. Preparar inmediatamente antes de su uso.

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra:

Se pesan de 5 – 10 g de harina del material en estudio, se coloca dentro de un vaso Berzelius de 600 mL, se agregan 200 mL (en marca del vaso o con probeta) de agua destilada y se agita en la parrilla por 15 min. Llevar a 300 mL enjuagando las paredes, añadir 55 mL de HCl 6N, dos gotas de antiespumante y llevar a ebullición y reflujo durante 15 min., después de dicho tiempo dejar enfriar. Aforar a 500 mL con agua destilada enjuagando las paredes del vaso, agitar y dejar reposar toda la noche. Filtrar a través de papel filtro Whatman #4 y desechar los primeros 100 mL (con la finalidad de acondicionar nuestro sistema).

Precipitación de ácido oxálico:

Tomar una alícuota de 25 mL del filtrado con una pipeta y colocar en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, agregar 5 mL de de ácido tungstofosfórico, mezclar y dejar reposar > 5 horas. Filtrar a través de papel Whatman # 40. Pasar 20 mL del filtrado con pipeta en un tubo para centrifuga cónico de 50 mL y adicionar NH_4OH gota a gota con cuidado hasta un pH 4-4.5, utilizando un potenciómetro. Adicionar 5 mL de la solución amortiguadora buffer de acetato y mezclar con una varilla de vidrio. Enjuagar la varilla de vidrio dentro del tubo de centrifuga con un pequeño chorro de agua destilada y dejar reposar toda la noche.

Centrifugar durante 15 min. A 1700 rpm para compactar el precipitado. Decantar el sobrenadante con una inversión suave del tubo de centrifuga

teniendo cuidado no romper o agitar el precipitado de oxalato. Voltar el tubo hacia abajo y dejar que el sobrenadante gotee completamente en un papel filtro limpio. Lavar el precipitado con 20 mL de líquido de lavado frío en un chorro fino rompiendo completamente el precipitado. Repetir los pasos de centrifugación y decantado, cuidando que el precipitado gotee completamente en el papel filtro. Descartar el papel filtro. Añadir 5 mL H_2SO_4 (1:9) al precipitado. Proceder con la titulación con permanganato.

Titulación con permanganato:

Hervir muestra y el blanco (5 mL H_2SO_4 1:9) en un baño de agua hirviendo. Titular las soluciones calientes con KmnO_4 0.01 N hasta que persista una coloración rosa durante 30 segundos. Restar el volumen del blanco al de la titulación de la muestra y con este valor realizar los cálculos para obtener la concentración de ácido oxálico de las muestras.

Cálculos:

Para obtener los mL equivalentes a una normalidad 0.01 se hace la siguiente corrección:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2}$$

C_1 = normalidad experimental de la solución de $KMnO_4$

V_1 = mL obtenidos en la titulación de la muestra

C_2 = normalidad teórica de la solución de $KMnO_4$

Para obtener el contenido de ácido oxálico de las muestras se debe considerar el peso equivalente del ácido oxálico que corresponde al peso molecular entre dos (90.04g/2), el peso de la muestra en gramos, el volumen de solución de permanganato de potasio gastado en la titulación (equivalentes 0.01N = V_2), con estos datos se sustituye en la ecuación:

Ácido oxálico mg/ 100 g muestra =

$$\left(V_2 \langle mL KMnO_4 \ 0.01N \rangle \times 1350 \right) \left(\frac{\text{peso muestra} + 100 \text{ g}}{\text{peso homogeneizado} \times \text{peso muestra}} \right)$$

donde $1350 = 0.45$ (mg ácido oxálico anhidro equivalentes a 1 mL de KmnO_4 0.01 N) * [(30/20) * (500/25) (factores de dilución)] * 100 (para convertir a 100 g de muestra).

Análisis estadístico de t de student

Se realiza el un análisis estadístico para verificar si existe diferencia significativa entre las muestras crudas y cocidas.

Con 2 grados de libertad y $\alpha=5$ se tiene un valor de t de tablas de 4.3 en la tabla de 2 colas. El cálculo se realizó como sigue:

Para obtener los límites de la curva se utiliza la siguiente fórmula:

$$D_0 \pm t_t \sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)}$$

donde

D_0 es el centro de la curva

t_t es el valor de t de student obtenido de tablas

s es la desviación estándar de las muestras comparadas

n es el número de repeticiones del análisis

Posteriormente se propusieron las hipótesis:

$$H_0 = X_1 - X_2 = 0$$

$$H_1 = X_1 - X_2 \neq 0$$

donde

X es el promedio de las muestras

A continuación se presenta un ejemplo del cálculo:

Para determinar los límites de la curva, se sustituye en la fórmula

$$0 \pm 4.3 \sqrt{\left(\frac{0.06^2}{3} + \frac{0.04^2}{3} \right)} = \pm 0.18$$

El valor obtenido de la hipótesis, que es la diferencia del promedio de las muestras, se compara con los valores de los límites obtenidos, así se comprueba si hay diferencia significativa entre las muestras. Cuando el valor de la hipótesis obtenido es mayor a los límites, entonces hay diferencia significativa entre las muestras.

Capítulo 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados de la determinación de ácido oxálico en base seca, de las muestras tanto crudas como cocidas. Los valores que se presentan son más altos en las muestras crudas que en las muestras cocidas.

Tabla 1. Contenido de ácido oxálico en plantas comestibles crudas y cocidas (g/100 g de muestra seca)¹

Muestras	Crudas	Cocidas
Espinacas	9.56 ± 0.44	7.81 ± 0.32
Acelgas	7.47 ± 0.15	5.58 ± 0.28
Verdolagas	10.41 ± 0.02	5.41 ± 0.11
Berros	2.90 ± 0.06	1.10 ± 0.05

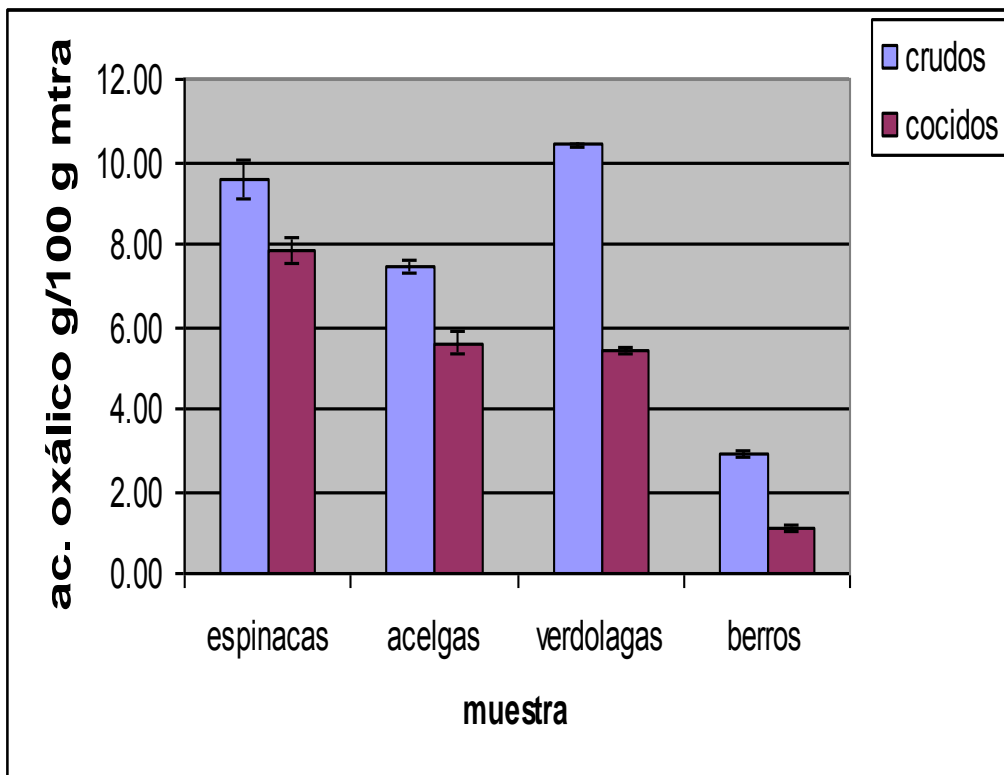
¹ promedio ± desviación estándar de un triplicado, CV < 5%

Se observa que hay una disminución en la concentración de ácido oxálico entre las muestras crudas y cocidas para cada caso, con lo que podemos comprobar que el tratamiento térmico tiene un efecto de pérdida de ácido oxálico.

Probablemente en el agua de cocción, que se eliminó, se perdió oxalato soluble.

En la gráfica 1 se observa más claramente el efecto del cocimiento del material y eliminación del agua de cocción en el nivel de ácido oxálico.

Gráfica 1. Contenido de ácido oxálico en plantas comestibles crudas y cocidas (g / 100 g de muestra seca \pm desviación estándar)



Considerando la cantidad de agua presente en cada muestra, la tendencia de la pérdida es la misma que en las muestras en base seca, únicamente que los valores obtenidos son mucho menores que en la muestra seca debido a la

cantidad de humedad presente en cada una. También se presentan los valores de humedad obtenidos en las muestras que se utilizaron.

Tabla 2. Contenido de ácido oxálico en plantas comestibles crudas y cocidas (g / 100 g de muestra húmeda)¹

Muestras	Crudas		Cocidas	
	Humedad %	Ácido oxálico	Ácido oxálico	Humedad %
Espinacas	87.57	1.19 ± 0.06	0.88 ± 0.04	88.75
Acelgas	86.71	0.99 ± 0.02	0.70 ± 0.04	87.42
Verdolagas	92.52	0.78 ± 0.00	0.34 ± 0.01	93.74
Berros	88.85	0.32 ± 0.01	0.11 ± 0.01	89.92

¹ promedio ± desviación estándar de un triplicado, CV < 5%

Como se trata de plantas comestibles se sabe que se tienen valores altos de humedad para todas las muestras, mayores a 80%, y para el caso de las verdolagas se tiene un valor mayor a 90%, con lo cual tenemos en cuenta que las muestras contienen muy baja cantidad de sólidos totales, ya que en su composición está presente mayoritariamente el agua.

En la gráfica 2 se observa con mayor claridad.

Gráfica 2. Contenido de ácido oxálico en plantas comestibles
crudas y cocidas (g / 100 g de muestra húmeda \pm desviación estándar)

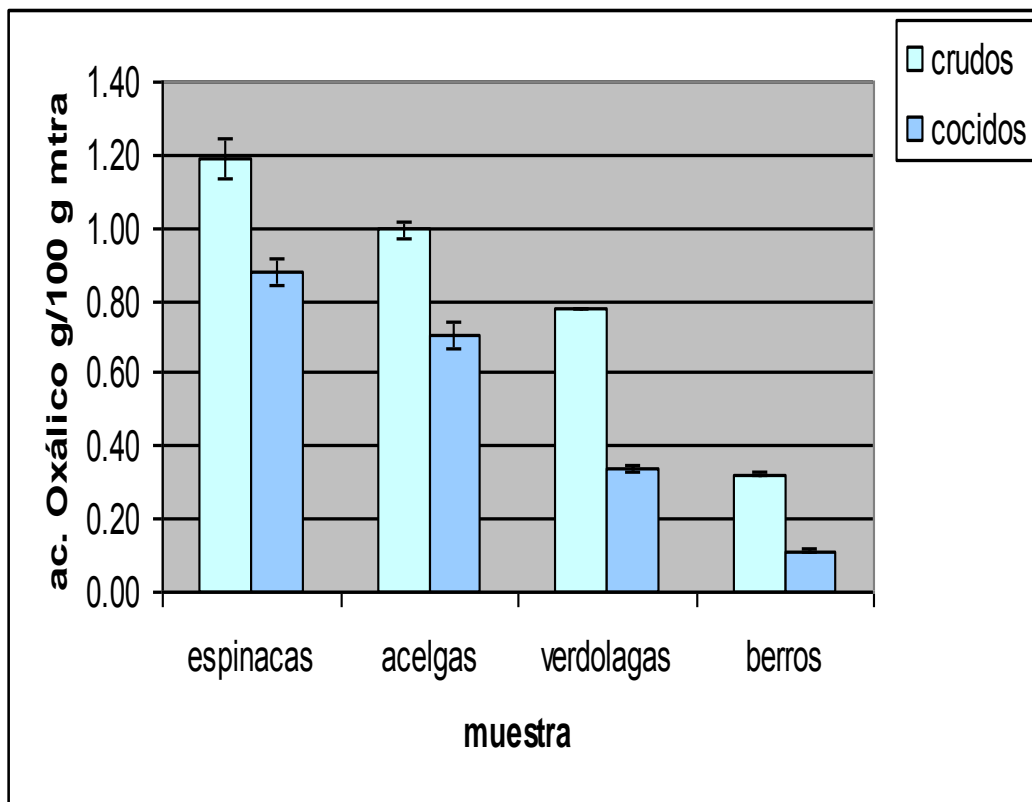


Tabla 3. Contenido de ácido oxálico en 100 g
de muestra seca y húmeda¹

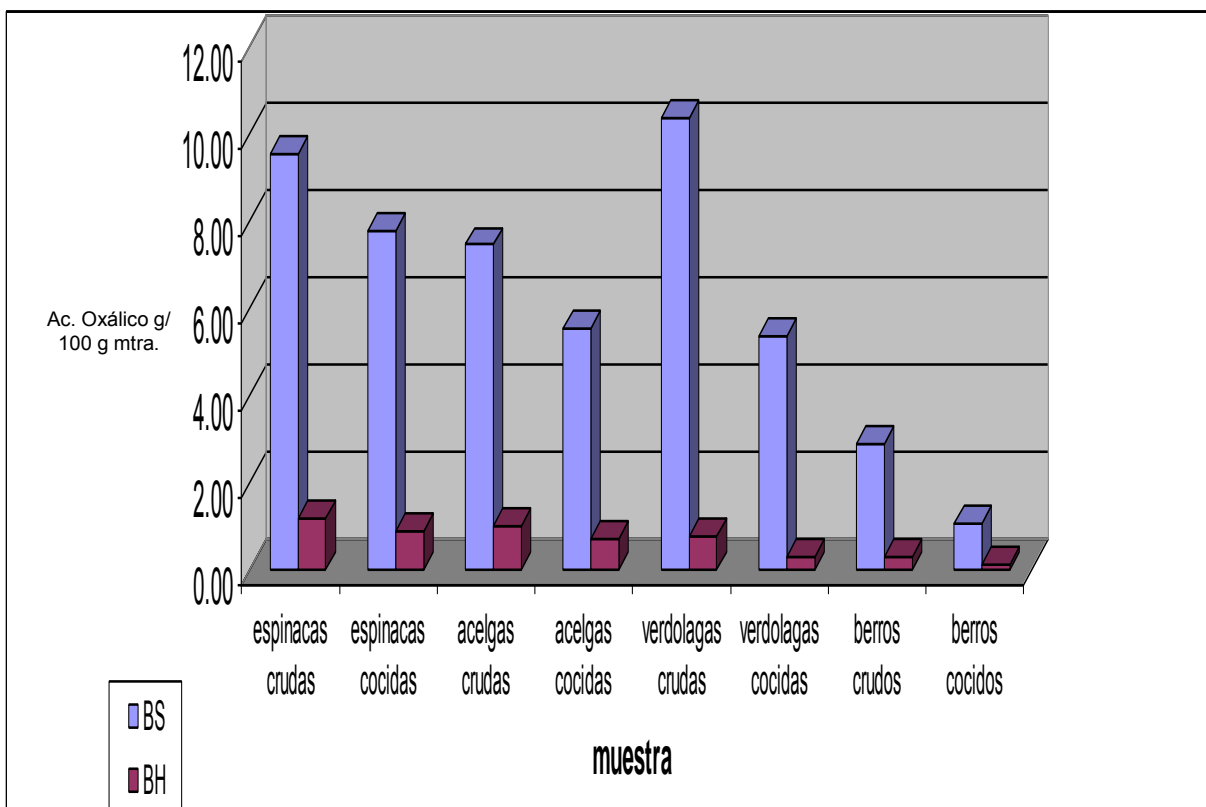
Muestra	g de ácido oxálico en base seca	g de ácido oxálico en base húmeda
Espinacas crudas	9.56	1.19
Espinacas cocidas	7.81	0.88
Acelgas crudas	7.47	0.99
Acelgas cocidas	5.58	0.70
Verdolagas crudas	10.41	0.78
Verdolagas cocidas	5.41	0.34
Berros crudos	2.90	0.32
Berros cocidos	1.10	0.11

¹ promedio \pm desviación estándar de un triplicado, CV < 5%

En las muestras cocidas se obtuvieron valores menores de ácido oxálico con respecto a las crudas. Con esto se comprobó que existe en todas las muestras una parte de oxalato soluble aunque no fue cuantificado de manera exacta debido a que la técnica utilizada no lo permite, pero se tiene un aproximado de la cantidad de oxalato soluble presente en cada muestra comparando las muestras crudas con las cocidas y se asume que el oxalato soluble se pierde en el agua de cocción y por ello es que en las muestras crudas se tiene menor cantidad de ácido oxálico presente.

Como no se tienen datos reportados para las muestras de acelgas y berros no se tienen valores para comparar, pero se observa que las acelgas tienen un valor mayor al de las verdolagas en base húmeda, siendo los berros la muestra que contiene menor cantidad de ácido oxálico.

Gráfica 3. Contenido de ácido oxálico en 100 g de muestra seca y húmeda



El tratamiento térmico tiene un papel importante en la disminución de la cantidad de ácido oxálico en las muestras, como se puede apreciar en la tabla 4, en las espinacas se observa una pérdida del 18.3% de ácido oxálico cuando se someten a un tratamiento de cocción, las acelgas presentan una pérdida

mayor que las espinacas, de 25.3% de las crudas con respecto a las cocidas, las verdolagas tienen una pérdida aún mayor, de 48% cuando se someten al tratamiento térmico; en el caso de los berros, se observa que pierde un 62.1% de ácido oxálico cuando se encuentran cocidos.

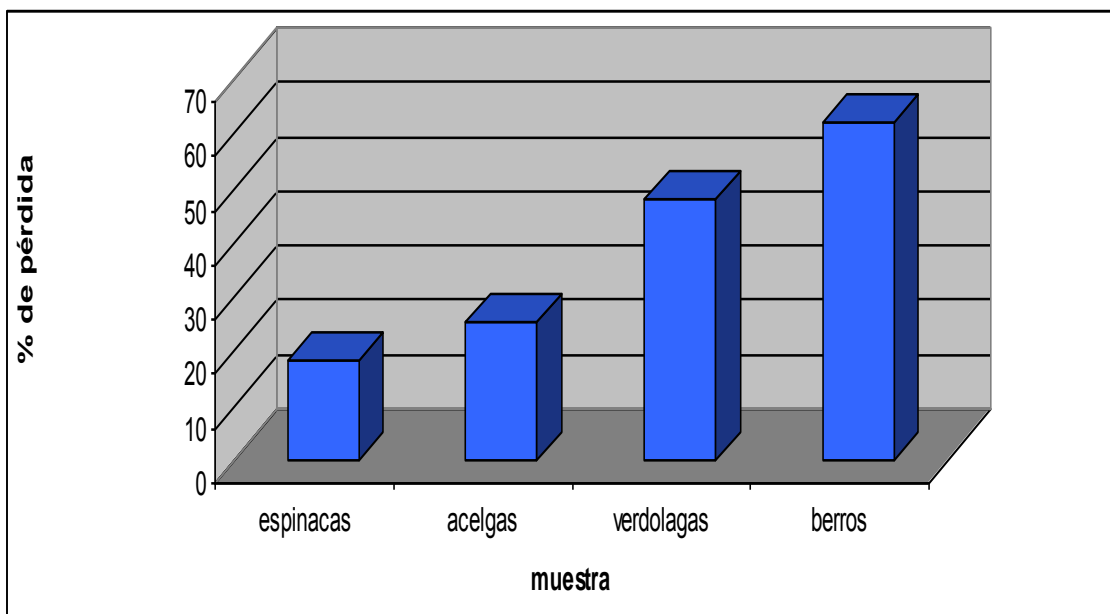
Tabla 4. Porcentaje de pérdida de ácido oxálico por efecto del tratamiento térmico

Muestra	% pérdida de ácido oxálico
Espinacas	18.3
Acelgas	25.3
Verdolagas	48.0
Berros	62.1

En la gráfica 4 se observa una tendencia inversamente proporcional con respecto a la cantidad de ácido oxálico presente en la muestra y el porcentaje de pérdida debido al tratamiento térmico, como la técnica utilizada sólo cuantifica la cantidad de oxalato total suponemos que la pérdida se debe a que en el agua de cocción se pierde el oxalato soluble, con esto podemos saber que la cantidad de oxalato soluble es mayor en las muestras con mayor porcentaje de pérdida; por ejemplo en los berros tenemos 0.11 g de ácido

oxálico totales de los cuales más de la mitad es oxalato soluble, en contraste, las espinacas contiene la mayor cantidad de ácido oxálico total, sin embargo su porcentaje de pérdida es el menor de las muestras trabajadas, con lo que sabemos que su cantidad de oxalato soluble es el menor, a pesar de ello, el contenido de ácido oxálico en las espinacas cocidas es alta.

Gráfica 4. Porcentaje de pérdida de ácido oxálico por efecto del tratamiento térmico



Con las cantidades obtenidas de ácido oxálico en las muestras empleadas sabemos que no causan daño a la salud, ya que las dosis requeridas para causar algún efecto tóxico son de 4 a 5 gramos,¹⁵ además de que cuando las plantas comestibles se someten al tratamiento térmico, la cocción disminuye considerablemente la concentración de ácido oxálico en las muestras.

Comparando con nuevas técnicas empleadas que cuantifican oxalato soluble, insoluble y total, solo se tiene resultados para las muestras de espinacas, obteniendo valores muy cercanos a los reportados con métodos enzimáticos y de electroforesis capilar considerando que sólo se cuantificó oxalato total por este trabajo. El resto de las muestras no han sido reportadas en estudios recientes, ya que se está trabajando mucho con la soya y no existen valores reportados de oxalato soluble e insoluble para verdolagas o acelgas. Los berros debido a su baja cantidad de ácido oxálico no están considerados como plantas con alto contenido de oxalato o que puedan causar algún riesgo, por eso no se trabaja con ellas para las determinaciones en los métodos más recientes.

En la tabla 5 se tienen los resultados del análisis estadístico realizado con t de student, obteniendo diferencia significativa en todas las muestras crudas con respecto a sus cocidas. Eso sirve para comprobar lo que ya se tenía supuesto con las diferencias obtenidas con las muestras cocidas, ya que en cada caso el valor era menor con respecto a las crudas, al haber diferencia en un análisis estadístico nos comprueba de manera matemática que el tratamiento térmico tiene un efecto sobre la determinación del ácido oxálico en las muestras trabajadas.

Tabla 5. Comparación con análisis de t de student
de muestras crudas y cocidas

Muestra	Valor del límite	$X_1 - X_2$	Diferencia significativa
Espinacas	0.18	0.31	SI
Acelgas	0.11	0.29	SI
Verdolagas	0.02	0.44	SI
Berros	0.035	0.21	SI

Con el análisis estadístico de ANOVA se observa con mayor claridad la diferencia significativa que hay entre las muestras crudas. El siguiente cuadro presenta el análisis para las muestras en base seca.

Fte. de Var.	SC	g.l.	M.C.	$f_{calculada}$	f_{tablas}	Significancia	Conclusión
Factor(muestra)	101.60	3	33.87	604.58	4.07	5%	No todas las muestras son iguales entre si
Via	En este caso no hay via						
Error	0.45	8	0.06				
Total	102.05	11					

Como la f calculada es mayor a la f tablas, las muestras crudas no contienen la misma cantidad de ácido oxálico.

A continuación se presenta el análisis para las muestras cocidas en base seca.

Fte. de Var.	SC	g.l.	M.C.	$f_{calculada}$	f_{tablas}	Significancia	Conclusión
Factor(muestra)	70.96	3	23.65	488.00	4.07	5%	No todas las muestras son iguales entre si
Via	En este caso no hay via						
Error	0.39	8	0.05				
Total	71.35	11					

Como la f calculada es mayor a la f tablas, las muestras cocidas no contienen la misma cantidad de ácido oxálico.

En relación con las ventajas y desventajas de la técnica utilizada para determinar el contenido de ácido oxálico se puede afirmar que el método oficial de la AOAC presenta la ventaja de que es un método oficial y ha sido revisado e introducido ligeras modificaciones a través de los años con las nuevas versiones de la AOAC.

Algunas limitaciones que tiene este método son con respecto a términos de sensibilidad, precisión y tiempo de realización. Además la metodología propuesta es para vegetales enlatados y no crudos, como en el caso de las muestras con las que se trabajó.

La ventaja de utilizar un método de HPLC son los bajos costos comparados con un cromatógrafo de gases o un kit enzimático, además es un método preciso y confiable que tiene una alta sensibilidad y selectividad, ésta se debe a que se desarrolla un sistema de extracción rápido. Teniendo en cuenta que es un método de costos bajos y rápidas extracciones se pueden llegar a realizar grandes cantidades de muestras.

Una de las desventajas para el método del HPLC es que se debe contar con el equipo y columnas necesarias para realizar la determinación; además los tiempos para la determinación pueden llegar a ser muy prolongados dependiendo de la muestra con la que se trabaja.

Los métodos enzimáticos presentan la ventaja de ser muy rápidos en las determinaciones y además cuantificar la cantidad de oxalato total, soluble e insoluble de la muestra.

Una de las desventajas tiene que ver con la disponibilidad de la enzima con la que se va a trabajar.

Los métodos espectrofotométricos tienen la ventaja de ser métodos de determinación rápidos y generalmente los equipos son disponibles, además las lecturas son de manera rápida y los blancos utilizados son generalmente de agua o algún reactivo utilizado durante la realización del extracto.

Las desventajas que tienen los métodos espectrofotométricos es que sólo cuantifica la cantidad de oxalato total en la muestra y además generalmente se trata de métodos complementarios, es decir, que cuantifican la cantidad de oxalato posterior a un tratamiento de la muestra con enzimas o de extracción. Además para algunos casos se necesita contar con una curva de calibración de ácido oxálico para la determinación.

CONCLUSIONES

- ⌘ Las muestras con mayor contenido de ácido oxálico en base húmeda crudas son las espinacas y acelgas, seguidas de las verdolagas, y por último y con mínima cantidad los berros.
- ⌘ El tratamiento térmico disminuye la cantidad de ácido oxálico presente en las muestras, siendo probablemente, el oxalato soluble el que se pierde durante la cocción en el agua dejando únicamente el oxalato insoluble en las muestras cocidas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Association of Official Analytical Chemist, Arlington, Volume II, pp 8-9, (12.1.18). (1995).
- (2) HORNER, Harry. **Oxalate and phytate concentrations in seeds of soybean Cultivars**, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005, 53, Pág. 7870-7877.
- (3) DREISBACH, Robert. **Manual de toxicología clínica**, 6^a edición, Ed. Manual moderno, Pág. 183-184. México D. F., 1988.
- (4) VALLE, Pedro. **Toxicología de alimentos**, Centro panamericano de ecología humana y salud, Pág. 27. Metepec, México, 1986.
- (5) MORRISON R.- BOYD R. **Química orgánica**, 5^a ed., Ed. Pearson, Pág. 832. México, 1998.
- (6) www.es.wikipedia.org, Buscador: Google, fecha de consulta: 28 de febrero 2006.
- (7) www.biopsicologia.net/fichas/page_1080.html, Buscador: Google, fecha de consulta: 21 de mayo de 2007.
- (8) www.iqb.es/nutricion/vitaminac/vitaminac.htm, Buscador: Google, fecha de consulta: 21 de mayo de 2007.
- (9) www.quiminet.com.mx, Buscador: Google, fecha de consulta: 21 de mayo de 2007.
- (10) FELDMAN Elaine. **Principios de nutrición clínica**, Ed. Manual moderno, Págs. 546-547, 578. México, 1990.

- (11) HONOW, Ruth. **Comparision of extraction methods for the determination of soluble and total oxalate in foods by HPLC-enzyme-reactor**, Food Chemistry, 2002, 78, Págs. 511-521.
- (12) WEIWEN, Chai. **Effect of different cooking methods on vegetable oxalate content**, Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53, Págs. 3027-3030.
- (13) LINDNER, Ernst. **Toxicología de los alimentos**, 2ª ed., Ed. Acribia, Págs. 31-32. Zaragoza, España, 1995.
- (14) DERACHE. **Toxicología y seguridad de los alimentos**, Ed. Omega, Pág. 117. Barcelona, España, 1986.
- (15) DE VRIES, John. **Food safety and toxicity**, Ed. CRC, Pág. 43-44. Boca Ratón, 1997.
- (16) ISMAIL, A. **Oxlate and phytate of soy foods**, Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53, Págs. 5670-5674.
- (17) PIQUERAS, J. **Intoxicaciones por plantas y hongos**, Ed. Masson, Págs. 27-29. Barcelona, 1996.
- (18) JUDPRASONG, Kunchit. **Total and soluble oxalate contents in Thai vegetables, cereal grains and legume seeds and their changes after cooking**. Journal of food composition and analysis, 2006, 19, Págs. 340-347.
- (19) MARTINEZ DOMINGUEZ, Beatriz, IBANEZ GOMEZ, Mª Victoria y RINCON LEON, Francisco. **Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. Universidad de Córdoba, España.** ALAN. [online]. set. 2002, vol.52, no.3 [citado 21 Mayo 2007], p.219-231.