

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Campus Guanajuato



POSGRADO EN QUÍMICA

Tesis para obtener el grado en Maestro en Ciencias Químicas

“DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO EN MUESTRAS ALIMENTICIAS”

Presenta:

Q. César Omar Guevara Moreno

Director:

Dra. Eunice Yañez Barrientos

Codirector:

Dr. Kazimierz Wrobel

Guanajuato, Gto.,

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título “**Desarrollo de un procedimiento analítico para determinación de ácido fítico en muestras alimenticias**” Realizado por César Omar Guevara Moreno en los laboratorios del departamento de Química, de la unidad Pueblito de Rocha de la Universidad de Guanajuato, para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas bajo la dirección de Dra. Eunice Yañez Barrientos, Dr. Kazimierz Wrobel.

Director:

Dra. Eunice Yañez Barrientos
Universidad de Guanajuato

Codirector:

Dr. Kazimierz Wrobel
Universidad de Guanajuato

Miembros del jurado asignado para el examen recepcional que, para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, presenta el Q. César Omar Guevara Moreno.

Dra. Katarzyna Wrobel (presidente)

MC. Israel Enciso Donis (secretario)

Dr. Armando Gómez Ojeda (Vocal)

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa (Suplente)

Índice

Índice de Figuras.....	5
Índice de Tablas.....	7
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Ácido fítico como componente de vegetales y su relevancia en organismos vivos.....	15
1.2. Importancia de la determinación de ácido fítico en alimentos.....	18
1.3. Técnicas analíticas empleadas en la determinación de fitatos.....	20
1.6. Espectrometría de masas.....	31
1.6.1. Desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI).....	34
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....	40
Objetivo general.....	40
Objetivos particulares.....	40
CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL.....	41
3.1 Equipo de laboratorio.....	41
3.2 Reactivos.....	41
3.3 Software.....	41
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1 Puesta punto de procedimiento analítico para la determinación del contenido de fitatos en alimentos por espectrofotometría UV-Vis.....	42
4.3. Cuantificación de Fósforos total por Espectrómetro de emisión atómica de plasma de nitrógeno sostenido por microondas (MP-AES).....	53
4.3. Evaluación de la aplicación de MALDI-TOF-MS para la determinación de fitatos.....	59
4.3.1. Metodología Experimental.....	63
CAPÍTULO 4 - CONCLUSIONES.....	79
REFERENCIAS.....	83
ANEXOS.....	89

Índice de Figuras

Figura 1. Ilustración esquemática de la reacción hidrolítica de la fitasa. La eliminación gradual del fosfato se cataliza mediante la ruptura hidrolítica de un enlace fosfo-monoéster (líneas negritas) que libera fosfato inorgánico, myo-inositol menos fosforilado, iones metálicos divalentes y proteínas unidas. [10, 12].	15
Figura 2. Estructuras químicas del myo-inositol (Ins) y myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis fosfato dihidrogenofosfato (InsP6) [18].	16
Figura 3. Cromatogramas de monitoreo de iones múltiples típicos. La señal analítica es la suma de fragmentos 73, 147, 191, 204, 217, 305 y 318 m/z. (A) estándar obtenido a partir de $18 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido fítico y que contiene $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de silo-inositol. (B) y (C) cromatogramas correspondientes a riñón y hueso respectivamente (cantidad de muestra indicada en el procedimiento). (1) mioinositol sililado y (2) mioinositol sililado y (2) silo-inositol sililado (patrón interno) [28].	27
Figura 4. Procesos que tienen lugar durante la atomización [43].	28
Figura 5. Componentes básicos de un espectrómetro de masas típico [43, 49].	32
Figura 6. Proceso de ionización MALDI. El cristal de la matriz-analito se bombardea con un rayo láser UV que excita la matriz, que, a su vez, transfiere la energía a los analitos. Esto resulta en la ionización y desorción de los analitos, principalmente como especies cargadas individualmente [47].	36
Figura 7. a) Espectrómetro de masas lineal y b) reflectrón TOF [59].	38
Figura 8. La determinación indirecta se basa en la disminución de la señal analítica de un complejo colorido de Fe(III)-salicilato debido a la formación del complejo incoloro Fe(III)-fitato [18, 63, 64].	42
Figura 9. Espectros obtenidos a distintas concentraciones del complejo Fe(III)-Salicilato. Condición #1 a 0.16 mM de Fe(III) y 0.48 Mm de Salicilato; Condición #2 a 0.48 mM de Fe(III) y 1.44 mM de Salicilato; Condición #3 a 0.80 mM de Fe(III) y 2.40 Mm de Salicilato; Condición #4 a 1.60 mM de Fe(III) y 4.80 mM de Salicilato.	44
Figura 10. Espectro de absorción UV-Vis típico obtenido del análisis de los fitatos.	47
Figura 11. Diagrama de preparación de muestras para porcentaje de recuperación.	50
Figura 12. Espectros de absorción UV-Vis típico obtenido del análisis de los fitatos con adición de estándar.	51
Figura 13. Espectros de emisión obtenidos de la lectura de solución de estándar de fósforo a 1 mg L^{-1} a 1% de NHO_3 , a las longitudes de onda de 214, 213, 255 y 764 nm.	56
Figura 14. Esquema del procedimiento general realizado para la selección de matriz y método de deposición.	64
Figura 15. Esquema del proceso de formación de pares iónicos de los grupos sulfato y el grupo Guanidino de ciertos aminoácidos. La arginina puede formar	

pares de iones e interacciones de enlace de hidrógeno con fosfato, sulfato y carboxilato [83].	65
Figura 16. Espectros de masas obtenidos a) sin adición de L-arginina y b) con L-arginina (0.014 mg L ⁻¹).	66
Figura 17. a) espectro de masas correspondiente a la matriz HCCA; b) espectro de masas correspondiente al estándar de ácido fítico de 5.0 mg L ⁻¹ con la matriz HCCA; c) espectro de masas correspondiente a la matriz 9AA; d) espectro de masas correspondiente al estándar de ácido fítico 5.0 mg L ⁻¹ con la matriz 9AA.	68
Figura 18. a) espectro de masas correspondiente a la matriz S-DHB; b) espectro de masas correspondiente al estándar de ácido fítico de 5.0 mg L ⁻¹ con la matriz S-DHB; c) espectro de masas correspondiente a la matriz DAN; d) espectro de masas correspondiente al estándar de ácido fítico 5.0 mg L ⁻¹ con la matriz DAN.	69
Figura 19. Esquema de tratamiento de muestra seguido para la selección del método de deposición en placa.	71
Figura 20. Posibles estructuras de fitatos determinadas en el análisis por MALDI-TOF.	72
Figura 21. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF MS utilizando el método de deposición de muestra Sándwich, correspondiente a estándar de 0.1 mg L ⁻¹ de ácido fítico en modo de trabajo con reflector.	73
Figura 22. Espectros obtenidos por MALDI-TOF en modo reflexivo, de los extractos de las muestras a) 1H y b) 11SC; utilizando el método de deposición de muestra sándwich.	76
Figura 23. Espectro de masas obtenido Espectros obtenidos por MALDI-TOF en modo reflexivo, de los extractos de las muestras a) 8FL y b) 16AB; utilizando el método de deposición de muestra sándwich.	77

Índice de Tablas

Tabla 1. Alimentos y su contenido de ácido fítico.....	16
Tabla 2. Contenido de ácido fítico y fibra de algunos alimentos comunes [15, 16, 20, 21].	17
Tabla 3. Normas actuales que regulan el contenido de fibra dietética y de los fitatos en alimentos [24-26].	20
Tabla 4. Principales procedimientos y técnicas analíticas utilizados en la determinación de fitatos.	22
Tabla 5. Clasificación de las principales técnicas de espectrometría atómica de acuerdo con el método de atomización [43-46].....	29
Tabla 6. Características de algunos métodos de ionización utilizados en espectrometría de masas [47]	33
Tabla 7. Concentraciones evaluadas para la formación del complejo de salicilato de hierro [14].	43
Tabla 8. Ecuación de la recta, límite de detección y cuantificación que se observó en el método descrito. Para llevar a cabo la cuantificación de fitatos en muestras de alimentos.	45
Tabla 9. Principales condiciones de extracción de fitatos en muestras reportadas en la bibliografía.	45
Tabla 10. Contenido en mg g^{-1} de ácido fítico de diferentes muestras alimenticias.	48
Tabla 11. Promedio del contenido de fitatos en cada punto de adición de estándar.	50
Tabla 12. Promedio del porcentaje de recuperación obtenido para la muestra de harina, formula láctea, semilla y leche.	52
Tabla 13. Parámetros evaluados para llevar a cabo la determinación de P total por MP-AES.....	53
Tabla 14. Tabla de posibles interferentes en la detección específica de fósforo... ..	54
Tabla 15. Tabla de interferentes en la detección específica de fósforo.....	55
Tabla 16. Parámetros analíticos obtenidos del proceso de calibración	56
Tabla 17. Parámetros instrumentales utilizados de Espectrómetro de emisión atómica de plasma de nitrógeno sostenido por microondas.	57
Tabla 18. Contenido total de P y % de P determinado en muestras.	58
Tabla 19. Principales matrices utilizadas en MALDI- TOF.	59
Tabla 20. Principales métodos de deposición de matriz y muestra utilizados en el análisis por MALDI-MS-TOF [43, 79].	60
Tabla 21. Matrices utilizadas para la determinación de fitatos.	63
Tabla 22. Iones observados en los espectros de masas en la generación de clústers de iones de Csl.	67
Tabla 23. Iones observados en los espectros de masas del estándar ácido fítico 5.0 mg L^{-1} , en las distintas matrices y métodos de deposición.....	70

Tabla 24. Condiciones instrumentales utilizadas en la evaluación del método de deposición de muestra	70
Tabla 26. Valores de intensidad y relación señal/ruido (S/R) obtenidos de los diferentes métodos de deposición utilizando diferentes concentraciones del estándar de ácido fítico.	74

Abreviaturas

AAS	Espectrometría de absorción atómica
AES	Espectrometría de emisión atómica
AF	Ácido Fólico
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica
CG-FID	Cromatografía de gases con detección de ionización por flama
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DAN	1,5 - diaminonaftaleno
EI	Impacto de electrones
Er-YAG	Laser Granate de itrio y aluminio dopado con erbio
ESI	Ionización por electroespray
ETASS	Espectrometría de absorción atómica electrotérmica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
GRAS	Generally recognized as safe
HCCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos con detección de arreglo de diodos
IC	Ionización Química
ICP	Espectrometría de plasma acoplado inductivamente
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción
ICP-SFMS	Espectrometría de masas de sector magnético con plasma acoplado por inducción
MALDI-MS	Espectrómetro de masas con sistema de desorción/ionización láser asistido por matriz

MP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma de nitrógeno sostenido por microondas
Nd-YAG	Laser Granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio
NOM	Norma Oficial Mexicana
NORMEX	Sociedad Mexicana de Normalización
SAX	Resinas de intercambio aniónico fuerte
SPE	Cartuchos para extracción en fase sólida
Super DHB	Ácido 2,5 dihidroxibenzoico y ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Tiempo de vuelo
UHPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem
9AA	9-Aminoacridina

Resumen

El ácido fítico (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrogenofosfato o InsP6) es el principal compuesto orgánico y almacenador de fósforo presente de manera natural en la mayoría de los cereales de grano, semillas, legumbres, oleaginosas, polen, soja, frutos secos, frutas y verduras, y puede llegar a contar con más del 70% del fósforo total. La presencia de fítatos en las harinas integrales tiene efectos adversos sobre la biodisponibilidad de cationes multivalentes, especialmente Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} , debido a la formación de complejos insolubles con estos. También une iones metálicos tóxicos, como Cd^{2+} y Pb^{2+} , protegiendo al organismo de su captación y ayudando en su excreción.

Se propone llevar a cabo la determinación de las distintas especies de fosfatos de inositol presentes en muestras alimenticias por medio de una técnica de espectrometría de masas como lo es MALDI, y evaluar la posibilidad de usarla para cuantificación de los analitos de interés.

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Cereales como la avena, arroz, trigo, cebada y el sorgo forman un componente importante de la dieta de los seres humanos. Además del valor nutritivo en términos de los contenidos de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, polifenoles y minerales, los cereales se consideran una buena fuente de fibra dietética. Se conocen varios efectos benéficos de la fibra dietética en la salud, entre ellos: de carácter antioxidante, propiedades laxantes, demostrados efectos en la disminución de los niveles de colesterol en la sangre, prevención de algunos tipos de cáncer, diabetes, enfermedad de Hart y obesidad. Los principales componentes de la fibra incluyen componentes insolubles (celulosa, hemicelulosa, almidón resistente, etc.) y solubles (pectinas, inulina, fructooligosacaridos, etc.) aunque la composición y propiedades fisicoquímicas varían considerablemente dependiendo del tipo de cereal [1]. Un componente de interés de la fibra dietética es el ácido fítico, el cual influye en la capacidad de la fibra de secuestrar los iones metálicos. De hecho, las variaciones en la composición química afectan la afinidad de iones metálicos a la fibra dietética durante la digestión intestinal de los alimentos, de manera que una de las propiedades más importantes de la fibra dietética es su capacidad del intercambio catiónico. Por lo tanto, la reducida captación de minerales de ciertos tipos de alimentos ricos en fibra se asocia al enlace de estos minerales con la fibra. La eficiencia de enlace recae principalmente en la fuente de fibra, es decir, en la cantidad de los grupos carboxilo libres y el contenido úronico de los polisacáridos, así como en el contenido del ácido fítico [1].

Como un ejemplo, cabe mencionar el estudio realizado por Idouraine [2], donde se compara la capacidad de captación de iones metálicos de diferentes tipos de fibras dietéticas, en este estudio se descubrió que el salvado de trigo une con mayor fuerza iones de zinc, calcio y magnesio en comparación con el salvado de arroz y

la fibra de avena, mientras que la fibra de avena confina significativamente más cobre en comparación con otras fuentes de fibra investigadas. Por otro lado, algunos polisacáridos no digeribles, como la inulina y la oligofructosa, a menudo se han informado como fuertes potenciadores de la biodisponibilidad mineral en alimentos de origen vegetal. La absorción mineral mejorada en ratas en presencia de inulina u oligofructosa probablemente se asocie con una disminución del pH del contenido ileal, cecal y colónico[3]. Mientras que los estudios con seres humanos confirmaron parcialmente los hallazgos que señalaron los efectos beneficiosos de la inulina y la oligofructosa sobre la absorción de calcio [1, 4].

Desde hace algunas décadas, ha incrementado progresivamente la producción y el consumo de alimentos con adición de fibra, vitaminas y minerales, diseñados para proveer de contenido adicional de nutrientes y sustancias protectoras de la salud [1]. El objetivo en estos productos es mejorar la calidad nutricional aumentando contenido y biodisponibilidad de proteínas, vitaminas, minerales y al mismo tiempo limitar la asimilación de componentes no deseados en el tracto digestivo (grasas, metales pesados y otros xenobióticos) y aumentar la estabilidad de los alimentos; estos alimentos “mejorados” se obtienen agregando cereales con algunos ingredientes crudos como legumbres o pseudocereales [1].

Los productos integrales, como el pan de grano entero, han sido recomendados por su alto contenido de fibra dietética, vitaminas B, vitamina E y varios minerales (P, Mg, Fe, Cu y Zn) [5]. Dado que el salvado contiene una alta proporción de fítatos, han surgido algunas preocupaciones sobre el consumo de este producto. El ácido fítico o de manera más general fitatos, están presentes en la estructura del grano como una sal de cationes mono y divalentes [6].

La presencia de fítatos en las harinas integrales tiene efectos adversos sobre la biodisponibilidad de cationes multivalentes, especialmente Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} , debido a la formación de complejos insolubles con estos [6-8]. La enzima fitasa puede desfosforilar fítatos, y las enzimas de este grupo están presentes en las semillas, así como en muchas bacterias, levaduras y hongos [6, 7]. Dicha desfosforilación disminuye la fuerza de unión de iones metálicos con fitatos de tal

manera que este proceso es de interés para aumentar biodisponibilidad en tracto digestivo. La reducción de fitatos se puede lograr mediante la degradación enzimática durante la fabricación de pan, ya sea aumentando la actividad de la fitasa endógena o mediante la adición de bacterias de ácido láctico activas en fitasas (LAB), levaduras u otros microorganismos [5, 6]. Las fitasas son un grupo de enzimas que desfosforilan el fitato mediante el corte del enlace tipo éster liberando ácido fosfórico, formando un grupo o gama de fítatos y dejando el ácido fítico con menos grupos fosfóricos, repitiendo esta reacción varias veces hasta llegar a la formación de myo-inositol (Figura 1). La actividad de la fitasa aumenta el fosfato disponible, los minerales y el compuesto no quelante myo-inositol [5]. Hay cuatro fuentes posibles: fitasa vegetal, fitasa microbiana (fitasa fúngica y bacteriana), fitasa generada por la mucosa del intestino delgado y fitasa microfloral asociada al intestino [9]. Algunos ejemplos incluyen fitasas alcalinas de *Bacillus sp.* que degradan los complejos metal-planta de la planta, enzimas que degradan el fitato en la sangre de ternera, ave, reptil y pez, y las fitasas en maíz, cebada, arroz, trigo y soja [10]. Por lo tanto, los alimentos y forrajes derivados de fuentes vegetales que contienen una cantidad apreciable de fitato no puede ser utilizado por los no rumiantes, incluidos los humanos, perros, cerdos, aves o animales monogástricos, porque carecen de la enzima digestiva intestinal fitasa [9, 11].

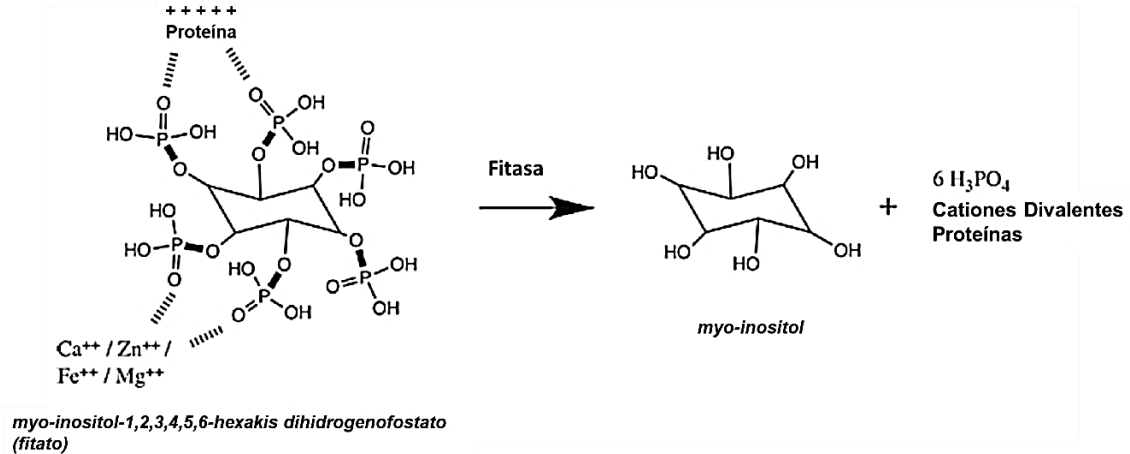


Figura 1. Ilustración esquemática de la reacción hidrolítica de la fitasa. La eliminación gradual del fosfato se cataliza mediante la ruptura hidrolítica de un enlace fosfo-monoéster (líneas negras) que libera fosfato inorgánico, myo-inositol menos fosforilado, iones metálicos divalentes y proteínas unidas. [10, 12].

1.1. Ácido fítico como componente de vegetales y su relevancia en organismos vivos

El ácido fítico (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis fosfato dihidrogenofostato o InsP6) es el principal compuesto almacenador de fósforo presente en la mayoría de los cereales de grano, semillas, legumbres, oleaginosas, polen, soja, frutos secos, frutas y verduras, y puede llegar a contar con más del 70% del fósforo total [1, 7, 8, 13]. Es un compuesto orgánico que se encuentra naturalmente en las semillas de las plantas, raíces y tubérculos, usualmente en rangos de concentración que van desde los 2.5 a los 50 mg g⁻¹ [14]. Algunos ejemplos de estos alimentos los podemos ver en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Alimentos y su contenido de ácido fítico.

Alimento	Ac. Fítico (mg g ⁻¹)	Referencias
Almendras	14.0	[15]
Arroz	10.2	[16]
Harina de Arroz	5.60	[16]
Harina de Avena	24.4	[16]
Zanahoria	4.70	[16]
Maíz	3.67	[17]

La degradación del ácido fítico puede ocurrir mediante la actividad de fitasas (enzimática) o mediante procesos químicos (no enzimáticos). En estos procesos el InsP6 se degrada en myo-inositol penta-, tetra-, tris-, bis- y monofosfatos (InsP5, InsP4, InsP4, InsP3, InsP2, InsP1) y en algunos casos myo-inositol libre (Figura 2) [7, 8]. Solo el InsP6 y InsP5 presentan un efecto de alta afinidad a iones metálicos disminuyendo su biodisponibilidad, los otros productos hidrolizados que se forman tienen una baja capacidad para enlazar minerales, o los complejos respectivos presentan mayor solubilidad que los de InsP6 y InsP5 (Sandberg, Carsson & Svanberg, 1989) [7, 8, 16].

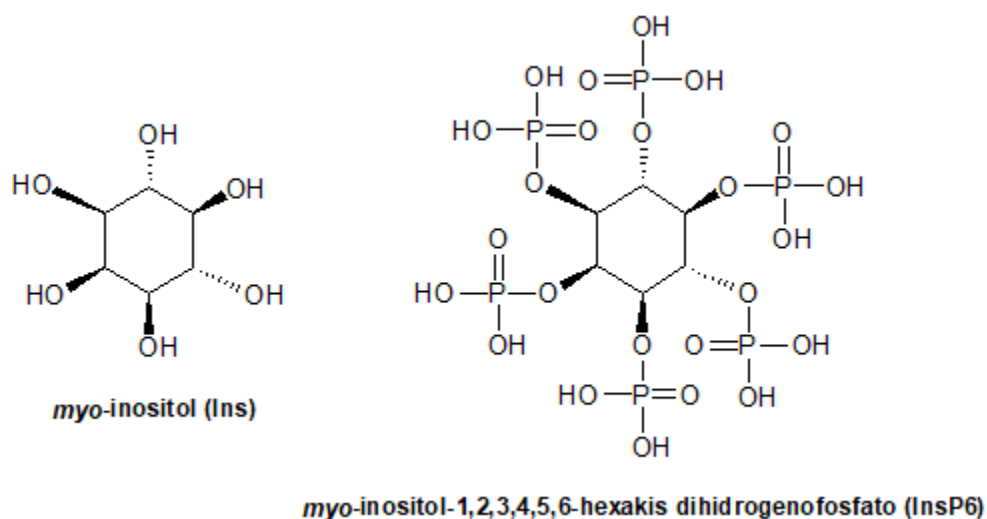


Figura 2. Estructuras químicas del myo-inositol (Ins) y myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis fosfato dihidrogenofosfato (InsP6) [18].

Debido a los numerosos beneficios de la fibra dietética para la salud, el consumo de salvado de distintos granos de cereales está en constante crecimiento lo que trae consigo un mayor consumo de fitatos (Tabla 2) [7]. El ácido fítico puede provocar un déficit de micronutrientes minerales sobre todo si la dieta contiene bajas cantidades de estos elementos [7]. Por otro lado, el InsP6 también une iones metálicos tóxicos, tales como Cd^{2+} y Pb^{2+} , protegiendo al organismo de su captación y ayudando en su excreción [13]. Cabe también señalar que el consumo de dietas pobres en productos enteros y ricos en Ca tiene una propensión a causar calcificación renal. La ingesta de alimentos ricos en ácido fítico mantienen los niveles adecuados de Ca en orina, lo que previene de manera eficaz el desarrollo de piedras renales por cristalización de oxalato de calcio [16, 19].

Tabla 2. Contenido de ácido fítico y fibra de algunos alimentos comunes [15, 16, 20, 21].

Alimento	Ac. Fítico (mg g^{-1})	Fibra dietética total (g /100 g^{-1} d. m.)
Harina de trigo	11.7	12.1
Avena	12.5	37.7
Lentejas	7.79	33.1
Cebada	24.6	17.0
Harina de cebada	13.6	22.9

En la molécula de InsP6, hay 12 protones dissociables, de entre los cuales seis son grupos ácidos fuertemente disociados ($\text{pka} < 3.5$) y otros seis débilmente ($\text{pka} 4.6 - 10$) disociables [13, 22]. Por lo tanto, el InsP6 puede ser desprotonado y existe como una serie de polianiones en un amplio intervalo de pH. Además, debido a la presencia de los seis grupos fosfato en muy estrecha proximidad, InsP6 incluyendo sus especies desprotonados, posee la mayor afinidad entre sus entidades inferior fosforilados para quelar iones metálicos tales como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} , así como las proteínas y el almidón [13]. Debido al impacto del ácido fítico en la biodisponibilidad de ciertos iones de gran relevancia en alimentación humana, es importante su determinación.

1.2. Importancia de la determinación de ácido fítico en alimentos

Como se mencionó anteriormente la fibra dietética y el contenido en ella de ácido fítico, tienen importantes beneficios a nivel fisiológico tales, como actividad antioxidante y antiinflamatoria, demostrando su papel en la prevención de las complicaciones cardiovasculares y diabéticas [8]; aunado a lo anterior y debido a la demostrada afectación que tienen los fitatos en la biodisponibilidad de elementos esenciales en los alimentos, es que se requiere llevar a cabo estudios para la determinación del contenido de fitatos en los alimentos, así como establecer un valor recomendado de su ingesta en la dieta diaria [19]. Debido a que el InsP6 y InsP5 son quelantes fuertes, es necesario controlar su contenido en alimentos, para lo cual existen algunas normas a nivel nacional e internacional. A pesar de que la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en su lista de 1995 no le otorgó el estatus de GRAS (Generally Recognized As Safe), el ácido fítico se utilizó ampliamente como aditivo alimentario fuera de los Estados Unidos. Las propiedades antioxidantes o quelantes de hierro del ácido fítico hacen de este compuesto un conservante de alimentos único y versátil; por lo que el ácido fítico es suministrado rutinariamente a una amplia gama de productos alimenticios tales como carnes, pastas de harina de pescado, mariscos enlatados, frutas, verduras, queso, fideos, salsa de soja, jugos, pan y bebidas alcohólicas para prevenir la decoloración del producto, incrementar el valor nutricional y prolongar la vida útil [16]. Por otro lado, en 1997, el fitato de sodio fue incluido en la lista GRAS y desde entonces se ha utilizado como conservante para productos horneados en los EE. UU. Fuera de la industria alimenticia se ha reportado el uso de fitatos en tratamientos de metales para prevenir la herrumbre como componente de recubrimientos anticorrosivos, en pastas dentales, enjuagues bucales y en sistemas tanto anticongelantes como refrigerantes y otros sistemas cerrados para la protección contra la corrosión [16].

Actualmente, la anemia ferropénica sigue siendo la condición clínica relacionada con deficiencia nutricional más prevalente en los países desarrollados y en vías de

desarrollo, siendo la dieta con baja biodisponibilidad de hierro una de las principales causas de este padecimiento. Por otro lado, para el calcio, la ingesta adecuada durante todo el ciclo de vida es importante para asegurar la mineralización ósea y la prevención de padecimientos como raquitismo y osteoporosis [23]; sin embargo, se ha estimado que un gran porcentaje de la población mundial entre la adolescencia y la edad adulta no alcanzan las recomendaciones dietéticas actuales para la ingesta de este elemento. Una posible causa de la deficiencia de Ca y Fe es la interacción de iones de estos elementos con componentes naturales o adicionados de los alimentos tales como los fitatos, algunas proteínas (soja, leche y yema de huevo), ácidos orgánicos (ácido tánico) y algunos elementos como Zn, Mn y el propio Ca que se ha reportado podría tener efecto antagónico en la absorción de Fe no hemo; aunque estudios recientes han reportado que a dosis ≤ 800 mg de Ca (relación molar de Ca:Fe $\leq 225:1$) no se presenta disminución en la biodisponibilidad de 5 mg de Fe no hemo [23].

Como se mencionó anteriormente, el ácido fítico puede ser degradado perdiendo los grupos fosfatos unidos a inositol, lo que disminuye su capacidad quelante de iones metálicos; esta degradación puede llevarse a cabo mediante la acción de enzimas fitasas provenientes de lactobacterias, tratamientos térmicos o durante la digestión del alimento en el tracto digestivo (dependiendo de la composición del bolo alimenticio). Es por ello, que existe interés en la formulación y preparación de alimentos ricos en fibra dietética (y InsP5) de tal manera que quede asegurada buena biodisponibilidad de iones metálicos. Asimismo, es necesario el control de ácido fítico en todos los alimentos que contienen naturalmente o han sido formulados agregando fibra dietética. La Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-1995, establece las especificaciones sanitarias y nutrimentales que deben cumplir las fórmulas para lactantes y fórmulas de continuación, los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad, así como los alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad. Sin embargo solo cubre la cuantificación de inositol como parte de la regulación [24]. De manera más general, en Mexico existen varias normas que regulan los contenidos de fibra y de inositol en diferentes tipos de alimentos, algunos ejemplos de estas normas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Normas actuales que regulan el contenido de fibra dietética y de los fitatos en alimentos [24-26].

Norma, o documento regulatorio	Compuesto	Objetivo
NMX-F-622-NORMEX-2008	Fibra dietética soluble e insoluble	Cantidad de fibra dietética fracción soluble y fracción insoluble, presentes en alimentos.
NOM-F-90-S-1978	Fibra Cruda	Procedimiento para la determinación de fibra cruda en productos alimenticios.
NOM-131-SSA1-1995	Inositol	Establece las especificaciones sanitarias y nutrimentales que deben cumplir las fórmulas para lactantes y fórmulas de continuación, los alimentos envasados para lactantes y niños de corta edad y los alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.

1.3. Técnicas analíticas empleadas en la determinación de fitatos

Con el fin de conocer el estado del arte referente a las técnicas y procedimientos analíticos empleados en la determinación de ácido fítico y sus derivados fosfatos de inositol, en la Tabla 4 se presentan los principales de ellos; en donde se puede observar que los métodos comúnmente utilizados para llevar a cabo la determinación de fitatos son espectrofotométricos de carácter indirecto, esto debido a que el ácido fítico y sus productos de desfosforilación no absorben en la región

visible del espectro electromagnético [27]. Como alternativa, se han desarrollado procedimientos analíticos en los que se llevado a cabo la detección de estos analitos por fluorescencia (también indirecta), espectrometría atómica y espectrometría de masas atómica y molecular [13, 28].

Como ya se ha mencionado, la determinación de fitatos típicamente se lleva a cabo por espectrofotometría UV-Vis con o sin una separación cromatográfica previa; por lo general, se utilizan como protocolos analíticos de rutina métodos espectrofotométricos indirectos (Tabla 4), donde a la muestra se agrega una cantidad conocida y en exceso de un complejo colorido de Fe(III), el cual, presenta una banda de absorción con el máximo entre 350 - 600 nm ($\log K_f = 15$); cuando existe presencia de fitatos en la muestra, el Fe(III) se une preferentemente al ácido fítico ($\log K_f (\text{Fe(III)[InsP6]}) = 22$) formando un complejo incoloro que no presenta absorbancia en la región visible [14, 29, 30]; como resultado, se observa la disminución de absorción de la solución del complejo colorido de hierro (III), la cual es proporcional a la concentración de InsP6 presente en la muestra. Así mismo, se han hecho y reportado modificaciones de este procedimiento, dependiendo de la naturaleza de la muestra a analizar; tal es el caso de la metodología desarrollada por Costa-Bauza y col., para la determinación de fitatos en orina, en la cual, se utilizó como complejo colorido tiocianato de Fe(III) (máximo de absorción a 460 nm), la muestra fue purificada y pre-concentrada utilizando cartuchos de extracción en fase sólida previo a la determinación [27]; en otros casos, se ha hecho uso de la técnica de cromatografía de líquidos con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la determinación indirecta de fitatos, tal como lo reportó K. Dost y col., para análisis de muestras de trigo y su derivados, en donde se identificó en la corrida cromatográfica la señal analítica correspondiente al tiocianato de hierro(III), de la cual, se monitoreó su disminución cuando se llevaba a cabo la sustitución del ligante (-tiocianato) por el ácido fítico cuando estaba presente en la muestra [16].

Tabla 4. Principales procedimientos y técnicas analíticas utilizados en la determinación de fitatos.

Muestra	Pretratamiento	D/ID	Técnica analítica	Comentarios	Ref.
Orina	Extracción de fitato en fase sólida (SPE), (purificación y preconcentración). La resina de intercambio aniónico y la orina se transfirieron a un tubo vacío de SPE con frits, para separar la orina y descartarla. La resina se lava con 120 ml de HCl 50 mM y 5 ml de agua desionizada. Finalmente, el fitato se eluyó en 4 ml de NaCl 2 M.	ID	Espectrofotometría UV/Vis y ICP-AES	Se basa en la formación y detección del complejo colorido de Fe (III) - tiocianato. El límite de detección es 0.055 μM de fitato en la orina.	[27]
Cereales	La Extracción de fitato con HCl (1.0 mol L^{-1}) y de forma paralela en una matriz de intercambio iónico (purificación).	ID	Sistema basado en inyección al flujo (MPFS) para la determinación espectrofotométrica	Método indirecto que utiliza el complejo de Fe(III) con salicilato. En el que se observa la disminución de absorbancia conforme el ácido fítico en la muestra sustituye al salicilato en el complejo. El límite de detección estimado fue de 1.0 mg L^{-1}	[14]
Orina	Limpieza de muestra con carbón activado, purificación a través de una columna de resina de intercambio aniónico con elución del ácido fítico retenido con HCl (2 mol L^{-1}) y su posterior liofilización y reconstrucción con 5 mL de solución de HCl-NaCl.	ID	Espectrofluorimetría	El ácido fítico añadido sustituye la gelatina del complejo Cu^{2+} -gelatina, libera la molécula de gelatina fluorescente y la señal de fluorescencia es proporcional a la concentración de ácido fítico. Los límites de detección de InsP6 se estimaron en 0.23 mg L^{-1}	[13]
Alimentos comerciales	Extracción basada en la hidrólisis y posterior purificación por cromatografía de intercambio aniónico	ID	Inyección secuencial (SIA)/Espectrofotometría Uv-vis	Se basa en la disminución de la velocidad de reacción de cristalización de oxalato de calcio en presencia de ácido fítico y la velocidad de cristalización se evaluó a partir del aumento de la turbidez con el tiempo. El límite de detección estimado fue de 0.03 mg L^{-1} .	[19]
Harina de trigo y un producto farmacéutico	El ácido fítico de las muestras se extrajo con 3% de H_2SO_4 y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico o	ID	Espectrofotometría	Método para la determinación de ácido fítico, basado en la determinación espectrofotométrica de fosfato inorgánico con	[17]

	mediante precipitación de fitato de hierro (III) y resuspender el fitato con NaOH.			vanadato y molibdato, para su cuantificación por espectrofotometría UV/Vis. La liberación de fosfato se llevó a cabo por una hidrólisis enzimática de ácido fítico con fitasa del <i>Aspergillus Ficum</i> .	
Trigo (y productos derivados del mismo)	Cada muestra se extrajo pesando 0,2 g de muestras secas y homogeneizada en solución de HCl.	ID	HPLC/ Espectrofotometría UV/Vis	La determinación cromatográfica del ácido fítico se basa en la sustitución del ligante por el ácido fítico del complejo hierro (III)-tiocianato, y la disminución será proporcional al contenido de ácido fítico en la concentración del complejo coloreado. La determinación espectrofotométrica se basó en la reacción de reemplazo del ácido fítico por el ligante del complejo coloreado de hierro(III)-5-sulfosalicílico ácido. El límite de detección estimado fue de 0.5 µg mL ⁻¹ ácido fítico.	[16]
Muestras biológicas (órganos de rata, plasma humano, orina y cálculos renales)	Los tratamientos de muestra previos a la derivatización incluyen la extracción de lípidos con cloroformo-metanol (2:1), desnaturalización de proteínas con ácido tricloroacético y acidificación de muestras con HCl (2.0 a 12.0 M) con ajuste de pH (3-4) usando NaOH.	D	GC-MS	Determinación de ácido fítico basado en la purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico, hidrólisis enzimática de ácido fítico a myo-inositol y la reacción de derivatización que involucra la reacción de silación con clorotrimetilsilano de los grupos hidroxilo del inositol usando escilo-inositol como patrón interno. El límite de detección estimado fue 19 µg L ⁻¹ de ácido fítico.	[28]
Cereales para bebe (seis tipos comerciales)	Tratamiento de tostado y con alfa-amilasa para evaluación del contenido de ácido fítico. Determinación de fosfatos de inositol por extracción con HCl.	D	HPLC	Evaluación del efecto de dos etapas de tratamiento, el tostado y tratamiento con alfa-amilasa, en el contenido de ácido fítico y fosfato de inositol. Usando hidróxido de tetrabutylamonio (TBA) como reactivo de par iónico. Un límite de detección estimado de 0.04 mg mL ⁻¹ .	[31]

Ácido fítico comercial y diversas muestras (nueces, cereales, legumbres, etc.)	La extracción se llevó a cabo con HCl. La separación de fosfatos de inositol y fosfato inorgánico se llevó a cabo mediante cromatografía de pares de iones (IPC) usando una columna C 18 columna de fase inversa.	D	HPLC/ ICP-SF-MS	Se utilizó hidróxido de tetrabutilamonio para formar pares iónicos, alcohol metílico para acelerar la elución y el citrato para amortiguar la fase móvil. Con un límite de detección para InsP6 de 230 ng g ⁻¹ .	[15]
Leguminosas	La extracción se llevó bajo agitación mecánica y con HCl. Purificación de extracto por cromatografía de intercambio aniónico	D	HPLC	El método permite la separación de IP3, IP4, IP5 e IP6 de fosfatos de inositol inferiores. Se utilizó una columna de fase inversa.	[32]
Orina (Sintética y humana)	La orina se acidifica con HCl (4.0 M) y se transfirió a la columna con resina. El primer eluato se desecha y la columna se lava con HCl (0.05 M). El segundo eluato se descarta y se lava con 200 ml de HCl (2 M). Este último eluato se concentra hasta 5 ml en un evaporador rotativo y se transfiere a un matraz volumétrico.	ID (Fosforo)	ICP-AES	Determinación espectro métrica de la emisión atómica ICP de fósforo, después de la separación previa y la concentración de ácido fítico utilizando la resina aniónica AGI-X8. El límite de detección es 0.5 g/L de fosforo.	[33]
Avena	En 1 g de muestra, se usan 25 ml de H ₂ SO ₃ al 3% seguido de filtración y precipitación férrica del ácido fítico.	ID (Fosforo)	ICP-AES	El hierro complejo se convirtió en hidróxido férrico mediante la adición de NaOH, liberando el ácido fítico como fitato de sodio soluble, que se determinó cuantitativamente como fósforo por ICP-AES.	[34]
Soya	Se mezclaron 0,50 g de muestra de soya con 10 mL de HCl al 2,4% en tubos Falcon de 14 ml. Los tubos de muestra se agitaron durante 16 h y se centrifugaron a 1000 g por 20 min.	ID (Fosforo)	ICP-AES	Los extractos brutos se recogieron para el análisis de P total mediante espectroscopía de emisión de plasma (ICP) acoplada inductivamente y para la determinación de AF mediante cuatro métodos de ensayo.	[35]
Alimentos infantiles (harina y pasta)	La muestra se trató dos veces con cloroformo-metanol (2:1, v: v). Las muestras desgrasadas se extrajeron con HCl 2,4 M. La solución extraída se centrifugó y el sobrenadante se almacenó en un refrigerador a 4 ° C antes del análisis.		GC-FID y HPLC	El propósito de este estudio fue evaluar un método apropiado para determinar el nivel de ácido fítico en alimentos infantiles, y también proporcionar información disponible para los niveles de ácido fítico en varios alimentos infantiles usando el método sugerido. Se compararon los métodos espectrofotométricos y cromatográficos (GC-FID y HPLC). El valor determinado por espectrofotometría mostró	[36]

				niveles de ácido fítico superiores a los de los métodos cromatográfico	
Solución de suelo y extractos de plantas	<p>Extracción de suelo con NaOH 0.25 M y EDTA 0.005 M en proporción suelo/solución de 1:10. Después de la extracción, se filtraron con una jeringa (0,45 µm) y se transfirieron a viales lavados con HNO₃ de polietileno y se almacenaron a 4°C.</p> <p>Para extraer InsP6 de plantas se agregó HCl 0.75 M. Después las muestras se transfirieron a viales lavados con HNO₃ de polietileno y se almacenan a 4 ° C hasta el análisis por C HPIC-ICP-MS.</p>	ID (Fosforo)	Cromatografía de intercambio aniónico fuerte (IC) y la detección por ICP-MS (HPIC-ICP-MS)	La especiación de InsP6 en extractos de suelo y plantas se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con elución de gradiente HNO ₃ en combinación con detección por ICP.	[37]
Orina (pacientes litiasicos)	<p>Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm antes del proceso de purificación. Se transfirieron muestras diluidas 3 veces a un cartucho SPE (extracción en fase solida) para garantizar una concentración de IP6 en los extractos purificados. Después de la separación de Pi (fosfato interferente) y la elución de PPI (pirofosfato) de la resina, se recuperó un extracto purificado con IP6 mediante una tercera elución del contenido de la columna con 2 ml de HCl (2 mol L⁻¹).</p>	ID (Fosforo)	ICP-MS	Método para determinar inhibidores en muestras de orina de forma selectiva y su aplicación al diagnóstico de pacientes litiasicos. Los compuestos de fósforo se analizaron mediante mediciones de ³¹ P mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) en los extractos de orina purificados. El límite de detección obtenidos se determinó como 3 veces la desviación estándar del reactivo en blanco para la recuperación de pirofosfato (PPI). similar	[38]
Muestras de leche en polvo	<p>Se añade agua (ácido fórmico al 0,01%, v/v) a las muestras de leche en polvo y se agita. Se añade metanol y se agita nuevamente. Se centrifugaron y se transfirieron 100 µL de sobrenadante a un vial con 900 µL de agua (ácido fórmico al 0.01%, v/v), y se inyectan 5 µL en el sistema UHPLC-MS / MS.</p>	D (<i>myo</i> -inositol)	UHPLC - MS/MS	Determinación mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. El límite de detección es de 0.2.	[39]
Orina	<p>Se concentra la orina a sequedad (100°C). El residuo se trata con piridina a 100°C durante 6 h con agitación. Se transfiere a otro vial y se lava con 1 mL de piridina. Los extractos se mezclan, calientan (100°C) y se les añade</p>	D (<i>myo</i> -inositol)	GS-MS	Se describe un método de cromatografía de gases capilares para el análisis de isómeros de inositol y arabitol y se aplica a la orina después de la derivatización.	[40]

	hexametildisilazano y clorotrimetilsilano. El vial se mantiene a 100 ° C durante 1 h. Se expone a una corriente de nitrógeno y se extrae el residuo con hexano.				
Riñón y cerebro	Los tejidos se congelaron, liofilizaron y pulverizaron. Se homogeneizan en agua usando un homogenizador. Se añade EDTA 0.1 M, y se agita por 1 h. Se añade ácido tricloroacético 1 M para desnaturalizar la proteína. La fase sólida se separa por centrifugación. El sobrenadante se trata con cloroformo: metanol (2:1). La fase acuosa se liofiliza y se reconstituye con H ₂ O.	D	HPLC y CG	La determinación de los niveles de InsP4, InsP5 e InsP6 en órganos se basa en la separación de diferentes fosfatos de inositol utilizando un sistema de HPLC y el análisis, después de la hidrólisis enzimática, del mioinositol total presente en las fracciones recogidas por cromatografía de gases.	[41]

D-método directo; ID(complejo)-método indirecto.

Así mismo, también se ha descrito el uso de otras técnicas analíticas para la determinación directa de fitatos, como la cromatografía de gases con detección de ionización por flama (GC-FID) y acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). En este sentido, March, J.G reportó un procedimiento en el cual utilizó la técnica GC-MS para la determinación de ácido fítico en muestras biológicas como órganos de rata, plasma, orina y cálculos renales; en donde como primer paso las muestras fueron pasadas por cartuchos de intercambio aniónico, posteriormente se llevó a cabo una hidrólisis enzimática para transformar el ácido fítico a myo-inositol, al término de la hidrólisis se realizó una derivatización de la muestra hidrolizada con clorotrimetilsilano, para su posterior inyección al sistema GC-MS [28] (Tabla 4). La Figura 3 muestra una serie de cromatogramas que corresponden a dos muestras y un estándar. La evaluación de los picos a 13.8 y 14.5 min permitió la determinación del ácido fítico. Los fragmentos identificados característicos de fitatos fueron 73, 147, 191, 204, 217, 305 y 318 *m/z*.

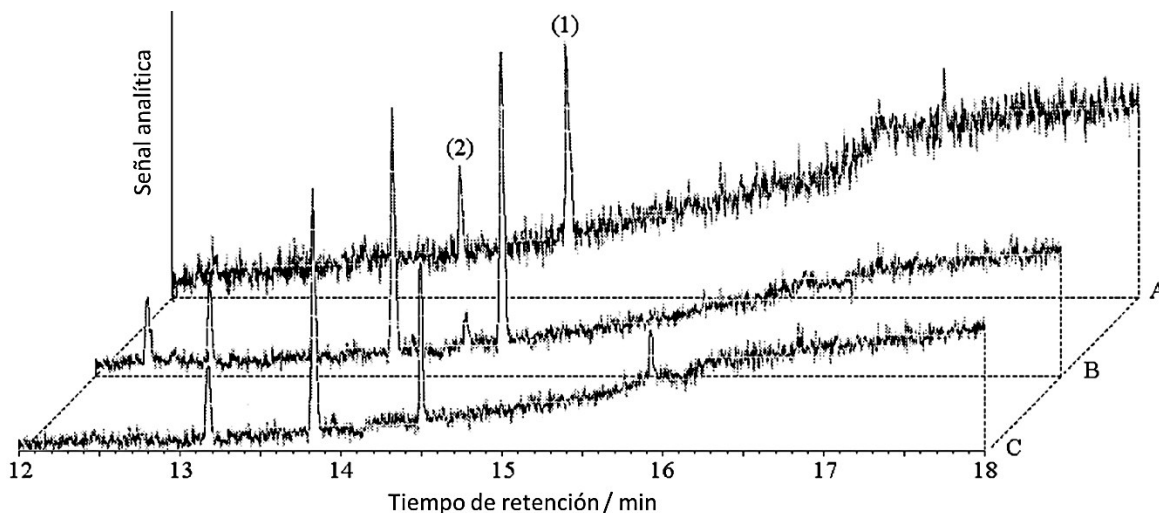


Figura 3. Cromatogramas de monitoreo de iones múltiples típicos. La señal analítica es la suma de fragmentos 73, 147, 191, 204, 217, 305 y 318 m/z . (A) estándar obtenido a partir de $18 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido fítico y que contiene $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de silo-inositol. (B) y (C) cromatogramas correspondientes a riñón y hueso respectivamente (cantidad de muestra indicada en el procedimiento). (1) mioinositol sililado y (2) mioinositol sililado y (2) silo-inositol sililado (patrón interno) [28].

En la tabla 4 también se mencionan otras técnicas utilizadas para la determinación de fitatos en diferentes matrices biológicas, son la espectrometría atómica y espectrometría de masas atómica y molecular [33, 38, 40, 41].

La espectrometría atómica se basa en la absorción, emisión o fluorescencia de átomos o iones elementales. Durante la atomización ocurren diversos procesos en los cuales los componentes de una muestra se convierten en átomos o iones elementales en estado gaseoso, de los cuales se obtienen espectros de emisión, absorción o fluorescencia, tal como se describe en la Figura 4; estos espectros son específicos para cada átomo, lo que sirve para llevar a cabo la determinación cualitativa o cuantitativa de uno o varios elementos en la muestra [42].

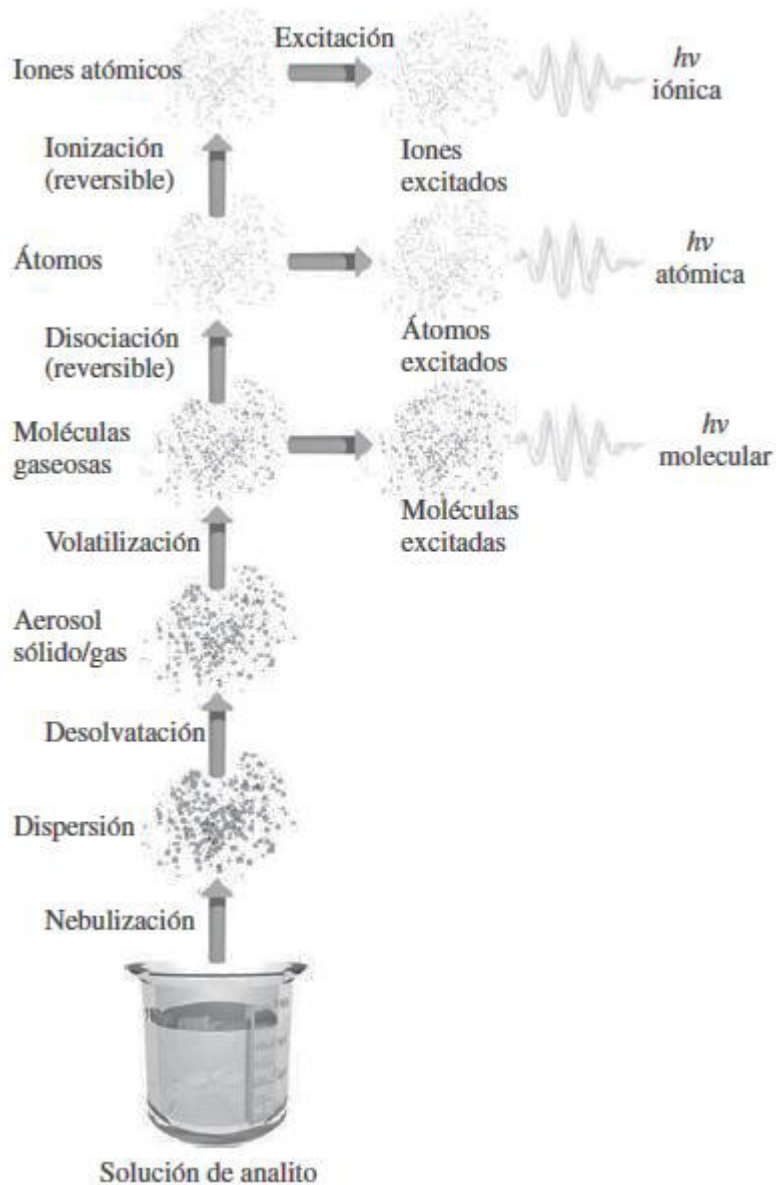


Figura 4. Procesos que tienen lugar durante la atomización [43].

Existen diferentes métodos de atomización, los principales se describen en la Tabla 5, en la cual también se indican los nombres de las técnicas de espectrometría atómica en las cuales son aplicados.

Tabla 5. Clasificación de las principales técnicas de espectrometría atómica de acuerdo con el método de atomización [43-46].

Tipos de atomizadores	Técnicas
1.- Llama	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrometría de absorción atómica AAS. • Espectrometría de emisión atómica, AES. • Espectrometría de fluorescencia atómica, AFS.
2.- Plasma de argón acoplado inductivamente	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrometría de Masas con sistema de ionización por plasma acoplado inductivamente, ICP. • Espectrometría de fluorescencia con plasma acoplado inductivamente. • ICP-OES
3.- Plasma de Nitrógeno sostenido por microondas	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrometría de emisión atómica con plasma de nitrógeno sostenido por microondas, MP-AES
4.- Electrotérmica	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrometría de absorción atómica electrotérmica, ETAAS. • Espectrometría de fluorescencia atómica electrotérmica.
5.- Arco eléctrico	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrometría de emisión con fuente de arco.
6.- Chispa eléctrica	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrometría de emisión con fuente de chispa.

En general los atomizadores son de dos tipos continuos y discretos; en los primeros (continuos) la muestra se introduce en el atomizador a una velocidad constante, la señal espectral es por tanto constante con el tiempo; mientras que en los atomizadores de tipo discreto una cantidad de la muestra se introduce al sistema, la señal espectral obtenida en este caso alcanza un valor máximo y luego disminuye

a cero cuando el vapor atómico de la muestra abandona la región calentada; en cada uno de ellos la solución de la muestra se convierte en una niebla de pequeñas gotas finamente divididas mediante un flujo de gas comprimido, este proceso se denomina nebulización; a continuación, un flujo de gas transporta la muestra a una región calentada donde tiene lugar la atomización. En la Figura 4 se muestra el esquema del proceso general de atomización; donde la primera etapa corresponde a la desolvatación, en la que el disolvente se evapora para producir un aerosol muy fino, la disociación de las moléculas conduce luego a la formación de un gas atómico; a su vez los átomos pueden disociarse en iones y electrones. Como se indica en la figura, moléculas, átomos y iones pueden excitarse en el medio calorífico produciéndose así espectros de emisión moleculares y dos tipos de espectros de emisión atómicos en flama y plasma. Sin embargo, existen menos problemas de interferencias químicas en los de plasma que en flamas, tal vez porque la gran concentración de electrones que provienen de la ionización del argón mantiene una concentración de electrones casi constante en el plasma [43].

El plasma es un estado de materia eléctricamente conductor que contiene una concentración importante de cationes y electrones. En el plasma de argón, que se usa con frecuencia para el análisis de emisión, los iones y los electrones de argón son las especies conductoras principales. Hay tres tipos principales de plasmas de alta temperatura: 1) plasma acoplado por inducción, 2) plasma de corriente continua y 3) plasma inducido por microondas [43]. La atomización es más completa en algunas de las técnicas analíticas que utilizan este tipo de atomización como espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES), espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción (ICP-MS) y espectrometría de masas de sector magnético con plasma acoplado por inducción (ICP-SFMS) y que han sido empleadas en la determinación de fitatos en diferentes tipos de muestras, tal como se describe en la Tabla 4. Al igual que para los métodos espectrofotométricos (Tabla 4), en la mayoría de los métodos atómicos descritos la determinación de fitatos es indirecta; la cual se lleva a cabo mediante la diferencia en el contenido de fósforo total en la muestra después de la extracción el ácido fítico y sus derivados fosfatos de inositol mediante procedimientos que van desde una

simple agitación de la muestra en medio ácido, al uso de cartuchos para extracción en fase sólida (SPE) [38] o de resinas de intercambio aniónico (SAX) [33].

Aunque también se han reportado, el uso de otras técnicas y procedimientos analíticos para llevar a cabo la determinación de AF en diferentes tipos de muestras, los cuales se presentan en la Tabla 4. Las principales desventajas para la aplicación de estos procedimientos en análisis de rutina son: a) la mayoría de los métodos son determinaciones indirectas, b) involucran largos y complicados protocolos de preparación de la muestra, y c) en los procedimientos indirectos no se logra elucidar la estructura de las especies de fosfato de inositol se encuentran presentes en la muestra.

El uso de técnicas de espectrometría de masas molecular para la determinación de ácido fítico y sus derivados fosfatos de inositol, también se describe en la Tabla 4.

1.6. Espectrometría de masas

Para la determinación de ácido fítico y sus derivados fosfatos de inositol también se ha reportado el uso de técnicas de espectrometría de masas tanto atómica (ICP-MS, ICP-SF-MS) [15, 38] como molecular (GC-MS) [28, 40], tal como se muestra en la Tabla 4. La espectrometría de masas se basa en la formación de iones en fase gaseosa (cargados positiva o negativamente) para ser separados en función a su relación masa / carga (m/z). El analito puede ser ionizado térmicamente, por campos eléctricos o por la interacción con electrones energéticos, iones o fotones [42, 47, 48]. Como ya se ha mencionado antes, la introducción de muestra puede llevarse a cabo de manera directa o mediante acoplamiento con una técnica de separación. Finalmente, los iones son detectados y la señal eléctrica se procesa generando un espectro de masas, el cual es una representación gráfica de la abundancia de los iones para diferentes valores m/z . A continuación, se describen las principales fuentes de ionización utilizadas en espectrometría de masas.

Los componentes principales de un espectrómetro de masas son: 1) sistema de introducción de muestra; 2) fuente de ionización; 3) separador de masas y; 4) detector; tal como se muestra en la Figura 5.

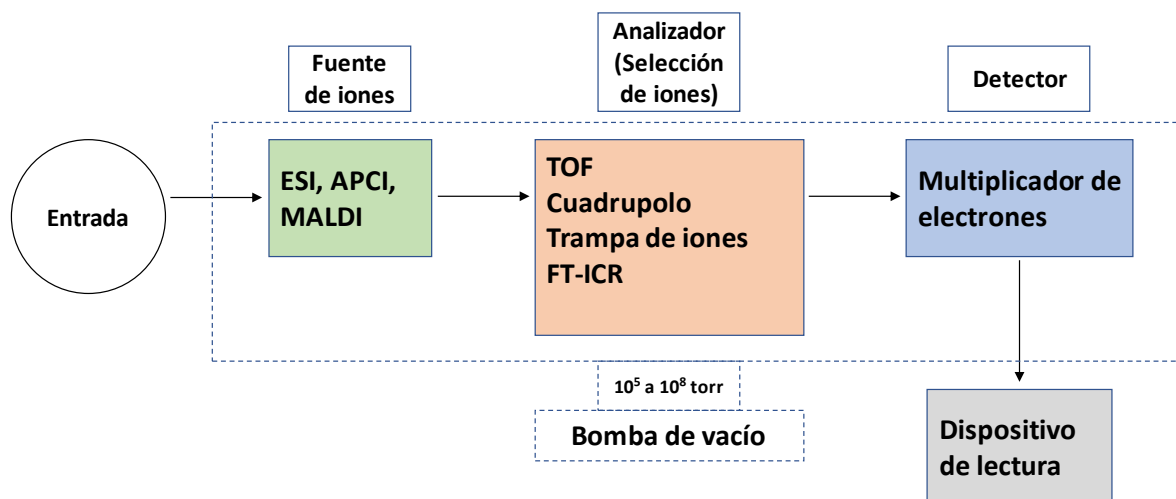


Figura 5. Componentes básicos de un espectrómetro de masas típico [43, 49].

En general, se puede decir que hay dos tipos de técnicas de ionización: técnicas de ionización dura y suave. En el primer caso, el ion molecular sufre una fragmentación significativa (incluso sin detección de iones moleculares), mientras que en el último caso se puede detectar fácilmente el ion molecular del analito [48-51]. La importancia de las fuentes de ionización radica en el tipo de analito que se desea analizar, en la Tabla 6 se presentan las principales fuentes de ionización utilizadas en espectrometría de masas y sus principales características.

Tabla 6. Características de algunos métodos de ionización utilizados en espectrometría de masas [47]

Técnica de ionización	Tipo de analito	Rango de masa	Descripción
Impacto de electrones (EI)	Volátil; térmicamente estable	<1000 Da	Método fuerte; principalmente iones fragmentados
Ionización Química (IC)	Volátil; térmicamente estable	<1000 Da	Método suave; Ion molecular
Desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI)	Biomoléculas (proteínas, ADN, glicoconjugados)	Puede ir más allá de 500,000 Da.	Método muy suave, iones monocargados
Ionización por electroespray (ESI)	Compuestos orgánicos e inorgánicos.	De masas muy bajas a extraordinariamente altas.	Método muy suave; iones de carga múltiple

Para la determinación de fitatos se ha descrito el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, como se describe en la Tabla 4, esta técnica utiliza como fuente de ionización la electroionización [40], en esta metodología se requirió la extracción de los fitatos y la purificación de la muestra, para su posterior derivatización previo al análisis, considerando el tiempo requerido para el tratamiento por muestra aunado a la duración de la corrida cromatografía hacen de este procedimiento una proceso largo y costoso.

Por otro lado, hoy en día se cuenta con fuentes de ionización suave que permiten la adquisición de la m/z de los iones moleculares ya sea protonados, formando aductos catiónicos con Na^+ , K^+ , Li^+ , NH_4^+ o aductos aniónicos con Cl^- entre otros. Las dos principales técnicas de ionización suave tal como lo muestra la Tabla 6 son ESI (ionización por electroespray) y MALDI (Desorción/ionización laser asistida por

matriz); para esta última se ha descrito aplicación del ácido fítico como componente de matriz química en análisis de imágenes con MALDI-MS [52, 53]. La aplicación de las técnicas de espectrometría de masas molecular específicamente de la técnica de espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS) puede ser una alternativa viable en el desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de ácido fítico en ensayos de rutina ;por lo que en este trabajo se planteó llevar a cabo la evaluación de la factibilidad del uso de esta técnica para la determinación de ácido fítico y sus productos de desfosforilación. A continuación, se describe brevemente las principales características de la técnica de Desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI).

1.6.1. Desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI)

La técnica de ionización/desorción laser asistida una matriz (MALDI) fue introducida en 1987, y rápidamente cambio el estatus que se tenía en aquel momento de la espectrometría de masas con láser y el análisis biomolecular. MALDI se desarrolló como una solución para ionización de analitos no volátiles, proporcionando un medio nuevo de ionización suave y eficiente para muestras frágiles y de alto peso molecular, incluyendo péptidos (proteínas), oligosacáridos, oligonucleótidos y polímeros sintéticos. Además, la incorporación de una matriz durante la preparación de la muestra evitaría algunos de los problemas que exhibía la espectrometría de masa, como la fragmentación severa incluso para moléculas orgánicas de bajo peso molecular, la necesidad de usar energía de laser alta y una eficiencia de ionización reducida provocada por una transferencia de energía rápida [51, 54].

Algunos de los beneficios que presenta la técnica de espectrometría de masas de desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI-MS) son:[55].

- No presenta efecto memoria.

- Adquisición de espectros en poco tiempo y la posibilidad de análisis de varios analitos al mismo tiempo sin necesidad de separación previa por HPLC.
- Permite la desorción/ionización de analitos en un intervalo de valores de masas moleculares de hasta cientos de kDa (500) y en alta resolución.
- Preparación relativamente sencilla de la muestra.

En MALDI, los iones se desorben de la fase sólida. Primero la muestra es disuelta en un solvente adecuado y se mezcla con una cantidad de una matriz apropiada. Posteriormente, se carga en una placa de metal para MALDI (portamuestras) y se seca al aire (o bajo una corriente de nitrógeno). La evaporación del solvente produce idealmente una solución sólida del analito en la matriz. El cristal de la matriz-analito se bombardea con un rayo láser UV que excita la matriz, que, a su vez, transfiere la energía a los analitos. Esto da lugar a la ionización y desorción de los analitos, principalmente como especies cargadas individualmente. y la elección de una matriz específica es principalmente experimental. Posteriormente, estos iones cargados se detectan utilizando diferentes tipos de analizadores de masas cuadrupolo, trampa de iones, tiempo de vuelo (TOF). Durante el análisis MALDI-TOF, la relación m/z de anión se mide determinando el tiempo requerido para que viaje la longitud del tubo de vuelo. Por otro lado, el análisis de matrices líquidas (no volátiles) que contienen el analito de interés también es posible cuando los compuestos son capaces de absorber radiación UV y o IR. Entre los rayos láser empleados se incluyen nitrógeno (337 nm), Nd-YAG (266 y 355 nm), excímero (308 nm), Er-YAG (2.94 μm) y CO₂ (10.6 μm). Este desarrollo ha reducido el costo, ha mejorado la facilidad de operación y ha mejorado la producción comercial de espectrómetros de masas con fuentes intercambiables de MALDI y ESI. Los mecanismos por los cuales se forman los iones en MALDI aún no se entienden completamente [43, 48, 56, 57].

Además de depender de la naturaleza de los analitos, la elección de la matriz también puede verse influida por el modo de ionización, ya sea positivo o negativo. Las matrices básicas se favorecen en el caso de este último, mientras que las ácidas son más eficientes en el caso del primero (es decir, donante de protones) [43, 48, 56, 57]. La matriz es típicamente una pequeña molécula orgánica con absorbancia

en la longitud de onda del láser empleado. Las matrices difieren en la cantidad de energía que imparten a las biomoléculas durante la desorción y la ionización y, por lo tanto, el grado de fragmentación [50]. La matriz sirve para varios propósitos, es decir, es el soporte mecánico para el analito, reduce el enlace de hidrógeno intermolecular y, por lo tanto, produce moléculas de analito aisladas, mientras que también sirve como agente de transferencia de energía entre la fuente de excitación y el analito en cuestión (Figura 6) [46].

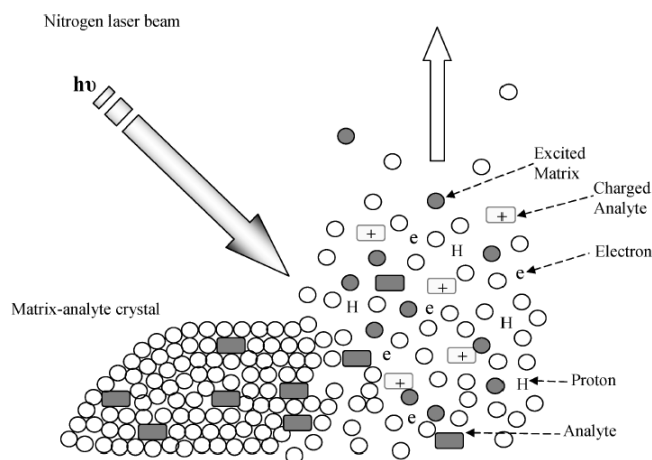


Figura 6. Proceso de ionización MALDI. El cristal de la matriz-analito se bombardea con un rayo láser UV que excita la matriz, que, a su vez, transfiere la energía a los analitos. Esto resulta en la ionización y desorción de los analitos, principalmente como especies cargadas individualmente [47].

Existen algunos problemas críticos asociados con la caracterización cuantitativa en MALDI-MS y que tienen que ver con: (a) instrumentación, en la resolución y precisión de masas similares, (b) linealidad y precisión del sistema de adquisición de datos y, (c) preparación de muestras y reproducibilidad de la señal. La resolución de masas y la linealidad de los sistemas de adquisición han sido uno de los principales obstáculos en las primeras aplicaciones de MALDI. Una gran variedad de métodos para la preparación de muestras han sido desarrollados para aumentar la reproducibilidad de la señal; el uso de materiales específicos y superficies como sondas MALDI y sustratos, recristalización de la matriz en la sonda, cristalización

de la matriz por "evaporación rápida", cristalización al vacío, deposición de la matriz de electropulverización y uso de matrices multicomponentes [56].

Se puede utilizar un estándar interno para compensar algunos de estos problemas. La selección de un estándar interno es una pieza clave de un análisis. El estándar interno ideal tiene varias características:

- 1) Debe resolverse completamente a partir del analito
- 2) Debe ser químicamente estable durante el análisis.
- 3) Debería ser químicamente similar al analito (incluidas las eficiencias de ionización y extracción) y no debería reaccionar con el analito.
- 4) Debe estar cerca del analito en masa y concentración para evitar errores instrumentales.

Por otro lado, los analizadores de masas TOF son los más utilizados en MALDI. En TOF la relación *masa/carga* de un analito es adquirida a partir de su tiempo de vuelo a través de un tubo de una longitud específica que se encuentra al vacío hasta que impactan con el detector [58].

En un espectrómetro TOF, un paquete de iones se acelera a una cantidad fija de energía cinética por un potencial eléctrico. La velocidad de los iones será proporcional a $(m_i/z_i)^{-1/2}$ [59]. Los iones pasan a través de una región donde se separan en una serie de paquetes de iones individuales espacialmente discretos, cada uno viajando con una velocidad característica de su *m/z*. Los iones pequeños tienen una velocidad más alta y se registran en un detector antes que los más grandes, lo que produce el espectro del tiempo de vuelo (TOF) [59, 60].

En la Figura 10a es un diagrama de un espectrómetro de masas TOF lineal (es decir, de vuelo recto). El paquete inicial de iones se produce por un pulso de luz láser absorbida por la muestra. Estos iones son extraídos y acelerados por el campo eléctrico estático entre los electrodos planos. Los iones luego pasan a través de la

región libre de campo magnético y llegan al plano frontal del detector. Muchos investigadores utilizaron posteriormente diseños similares con una variedad de configuraciones de electrodos, fuentes de iones y detectores. Los voltajes de aceleración son típicamente de 1 a 30 kV (polaridad positiva o negativa), y las longitudes de trayectoria de vuelo van de 0.1 a 3 m [59].

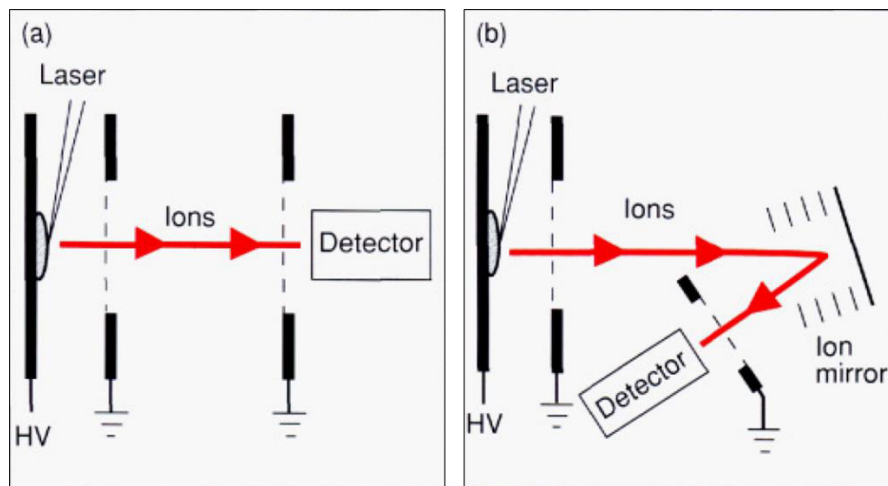


Figura 7. a) Espectrómetro de masas lineal y b) reflector TOF [59].

La limitación práctica de la resolución de masa obtenida con el espectrómetro de masas que se muestra en la Figura 10a es el ancho de una señal observada para una sola especie de ion. El tiempo de producción de iones, la distribución de la velocidad inicial y el tiempo de extracción contribuyen al ancho del pico observado por el detector. La ampliación causada por la distribución de velocidad inicial de los iones se puede reducir utilizando una configuración instrumental como la que se muestra en la Figura 10b. En este, un espejo de iones se coloca en la trayectoria de vuelo de los paquetes de iones. Si los voltajes de los electrodos de espejo están dispuestos de manera adecuada, la contribución de ancho de pico de la distribución de velocidad inicial se puede corregir en gran medida en el plano del detector. La corrección lleva a una resolución de masa aumentada para todos los iones estables en el espectro. (Los iones estables son aquellos que no se disocian en vuelo.) Un

instrumento con un espejo de iones configurado de esta manera a menudo se conoce como un espectrómetro de masas reflector TOF[59].

El estudio e identificación del ácido fítico (y en general de fítatos) por desorción/ionización láser asistida por matriz no ha sido explorado a detalle. Hasta ahora solo existen en la literatura reportes que sugieren su posible identificación acomplejándolo con Fe^{3+} o que proponen la utilización del ácido fítico como un aditivo de matriz para la detección y una visualización más eficiente de pequeños dipéptidos bioactivos distribuidos en el tejido [22, 52]. En el presente trabajo se evaluó la factibilidad del uso del espectrómetro de masas con sistema de desorción/ionización láser asistido por matriz y analizador de tiempo de vuelo para la identificación y cuantificación de ácido fítico.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar/adaptar un procedimiento analítico para la determinación de ácido fítico en alimentos y evaluar la factibilidad del uso MALDI-TOF-MS para la determinación de fitatos.

Objetivos particulares

- Establecer condiciones de extracción de fitatos de diferentes muestras alimenticias.
- Poner a punto un procedimiento analítico para la determinación de ácido fítico mediante el uso de la técnica de espectrofotometría UV-vis.
- Explorar la factibilidad del uso del espectrómetro de masas con sistema de desorción/ionización láser asistido por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) para la determinación de ácido fítico y sus derivados fosfatos de inositol

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipo de laboratorio

- Espectrofotómetro ultravioleta-visible Varian Cary 50,
- Espectrómetro de masas de desorción/ionización laser asistida por matriz Autoflex Speed (Bruker Daltonics)
- Un pHmetro portátil marca Hanna
- Mini centrifuga Gusto® High-Speed (HEA10050)
- Purificador de agua mili-Q Labconco
- Limpiador ultrasónico Cole-Parmer

3.2 Reactivos

- Hexafosfato de Inositol ($C_6H_{18}O_{24}P_6 \cdot xNa^+$)
- Salicilato de sodio (HOC_6H_4COONa)
- Cloruro de Hierro (III) hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)
- Resina de intercambio catiónico fuertemente ácida Dowex® 50WX8
- Ácido Nítrico (HNO_3)
- 9-Aminoacridina ($C_{13}H_{10}N_2$)
- Super DHB (DHB and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid) de sigma Aldrich
- Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico o HCCA ($HOC_6H_4CH=C(CN)CO_2H$)

3.3 Software

- FlexControl V3.4 (Bruker Daltonics)
- ACD ChemSketch V2.2 (Freeware versión)
- FlexAnalysis V3.4 (Bruker Daltonics)
- Scan (Varian)
- Data Analysis V4.1 SP2 (Bruker Daltonics)

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Puesta punto de procedimiento analítico para la determinación del contenido de fitatos en alimentos por espectrofotometría UV-Vis.

Para la determinación de fitatos en diferentes alimentos se puso a punto un procedimiento analítico basado en el método espectrofotométrico de determinación indirecta, en el cual se utiliza el complejo salicilato de Fe(III) ($\log K_f = 15.3$), el cual presenta un máximo de absorción en la región visible a 525 nm [14]. Tal como se describió en la introducción, este procedimiento se basa en la reacción de desplazamiento que ocurre una vez que se comienza a adicionar ácido fítico, este sustituye al salicilato en el complejo Fe(III)-Salicilato y se comienza a observar la disminución en la absorbancia de manera proporcional a la concentración del analito debido a la formación del complejo de Fe(III)-Fitato ($\log K_f = 22$) que no absorbe en la región visible [61, 62], tal como se muestra en la Figura 8.

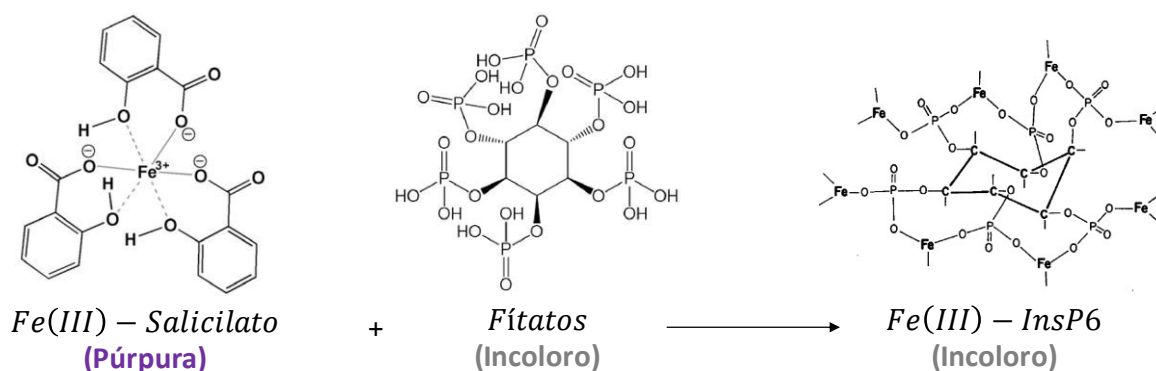


Figura 8. La determinación indirecta se basa en la disminución de la señal analítica de un complejo colorido de Fe(III)-salicilato debido a la formación del complejo incoloro Fe(III)-fitato [18, 63, 64].

Para llevar a cabo la puesta a punto de la metodología de determinación indirecta por UV-Vis, se monitoreó la disminución de la absorbancia (a 525 nm) del complejo de salicilato de Fe(III) en función de creciente concentración de fitatos en la muestra; el complejo se preparó a partir de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y salicilato de sodio manteniendo la relación molar 1:3 (Fe(III):salicilato) en ácido nítrico 2.4 mM [14].

Tabla 7. Concentraciones evaluadas para la formación del complejo de salicilato de hierro [14].

Condición	Fe (III) (mM)	Salicilato (mM)	Ácido fítico (mg L^{-1})
1	0.16	0.48	5.0 - 20
2	0.48	1.44	5.0 - 50
3	0.80	2.40	5.0 - 50
4	1.60	4.80	5.0 - 50

Para determinar la concentración adecuada de trabajo del salicilato de hierro (III), se probaron diferentes concentraciones de Fe(III) y salicilato, los cuales se presentan en la Tabla 7. Para cada condición se preparó una curva de calibración de ácido fítico de rango de concentración de 5.0 a 50 mg L^{-1} ; los parámetros analíticos obtenidos de cada una de ellas se presentan en la Tabla 8. En la Figura 9 se presentan los respectivos espectros obtenidos de cada estándar de calibración para cada una de las cuatro condiciones. Cabe señalar que para la Condición 1 la linealidad se observó en el rango de 5.0 a 20 mg L^{-1} por lo que únicamente se presentan los espectros hasta esa concentración.

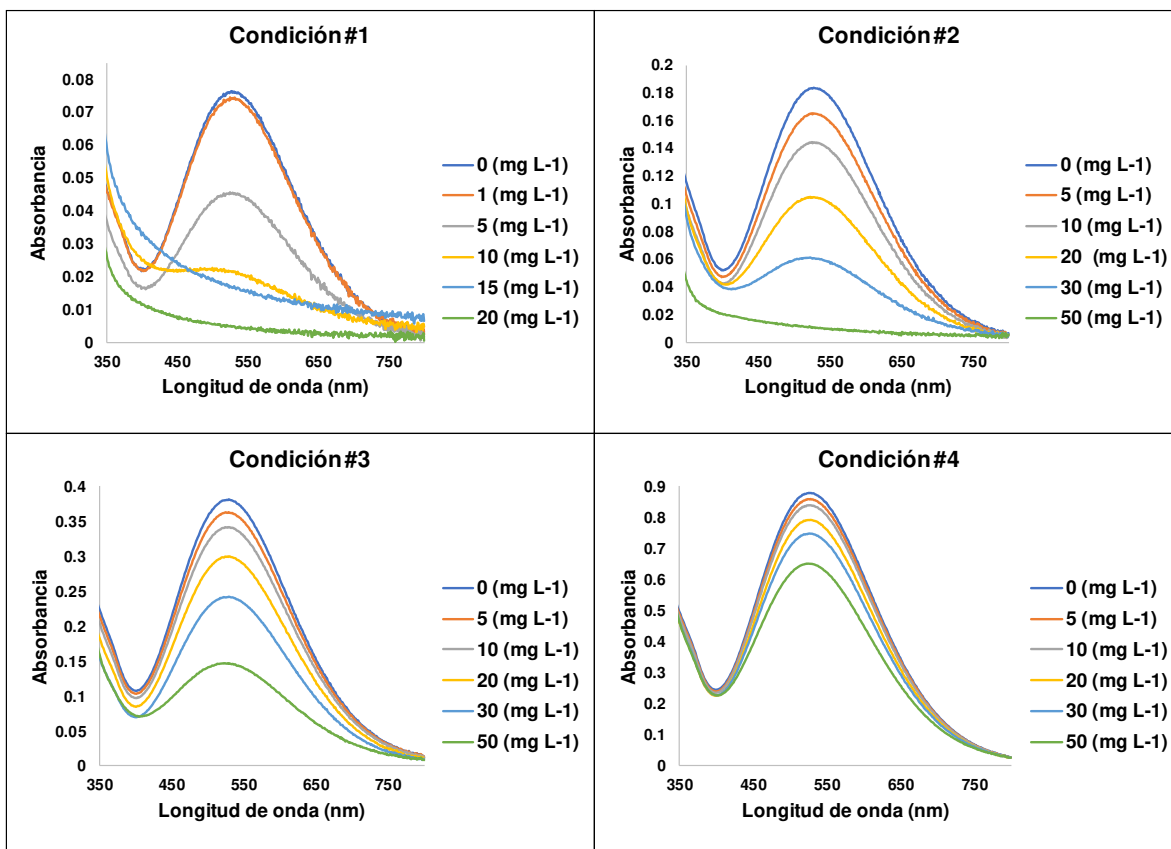


Figura 9. Espectros obtenidos a distintas concentraciones del complejo Fe(III)-Salicilato. Condición #1 a 0.16 mM de Fe(III) y 0.48 Mm de Salicilato; Condición #2 a 0.48 mM de Fe(III) y 1.44 mM de Salicilato; Condición #3 a 0.80 mM de Fe(III) y 2.40 Mm de Salicilato; Condición #4 a 1.60 mM de Fe(III) y 4.80 mM de Salicilato.

A partir de los parámetros analíticos obtenidos de las funciones de calibración (Tabla 8) de cada una de las condiciones, se concluyó que la metodología realizada con la condición 4 (1.6 mM de Fe(III) y 4.8 mM de Salicilato), presenta la mejor linealidad ($R^2= 0.997$) y la mayor sensibilidad. Además de que, la cantidad residual del complejo Fe(III)-Salicilato que se puede observar en el espectro de absorción UV-Vis permite asegurar la total acomplejación del ácido fítico presente en la muestra con el Fe(III).

Tabla 8. Ecuación de la recta, límite de detección y cuantificación que se observó en el método descrito. Para llevar a cabo la cuantificación de fitatos en muestras de alimentos.

Condición	Función de Calibración	R ²	LD (µg L ⁻¹)	LC (µg L ⁻¹)
1	Int. = $4.10 \times 10^{-3}c + 3.10 \times 10^{-3}$	0.939	4.50	15.0
2	Int. = $3.60 \times 10^{-3}c + 3.90 \times 10^{-3}$	0.988	3.91	12.8
3	Int. = $4.50 \times 10^{-3}c - 6.40 \times 10^{-3}$	0.991	7.14	23.8
4	Int. = $4.61 \times 10^{-3}c - 1.00 \times 10^{-3}$	0.997	7.26	24.2

Una vez establecidas las condiciones experimentales para la formación del complejo de salicilato de hierro, se llevó a cabo la determinación de fitatos en muestras de alimentos. Los alimentos analizados fueron adquiridos en el mercado local de la ciudad de Guanajuato, siendo en total 19 muestras, las cuales se clasificaron en harinas (H), fórmulas lácteas (FL), alimentos para bebé (AB) y semillas (S). Las muestras fueron homogeneizadas con nitrógeno líquido y liofilizadas para su preservación y posterior análisis. Para la extracción de fitatos en alimentos, se han reportado diferentes condiciones de tratamiento de muestra, siendo los tratamientos con ácido clorhídrico, nítrico y sulfúrico los principales, en la Tabla 9 se presentan algunos de ellos.

Tabla 9. Principales condiciones de extracción de fitatos en muestras reportadas en la bibliografía.

Matriz analizada	Condiciones de extracción	Referencia
Plantas.	2.0 g de muestra HCl 1M 40 ml, agitación vigorosa por 3h a temperatura ambiente	[14]
Trigo y sus productos.	0.2 g de muestra seca y homogénea	[65]

	10 ml de HCl 0.5 M se agita por 1h a temperatura ambiente.	
Alimentos	Extracción según el método de Sandegren. 0.25 g muestra en polvo homogéneo 50 ml de HCl 0.5 M Alícuota de 5ml ajuste de pH 3-4 con NaOH	[19]
Leche en polvo	Extracción sólido-líquido 1.0 g de muestra Ácido Fórmico al 0.001% v/v Agitación durante 1h 10ml de metanol, se agita nuevamente durante 30 minutos	[39]
Alimentos para infantes	5.0 g de muestra sin grasa 15 ml HCl 2.4 M, excepto para el análisis por HPLC, el cual se extrajo con HCl 0.5 M.	[36]
Alimentos elaborados de vegetales	Muestras liofilizadas 1.0 g de muestra, se extrae con H ₂ SO ₄ 0.5 M por 30 min con agitación media temperatura ambiente Muestras con altos niveles de fosfato inorgánico se aconseja incubar el precipitado de hierro en HCl 0.5 M durante 2h a temperatura ambiente	[66]

Para este trabajo se tomaron las condiciones de extracción descritas en un trabajo realizado previamente en el grupo de investigación (Tesis de Licenciatura) [67] con ligeras modificaciones.

La extracción de los fitatos se llevó a cabo a partir de 0.10 g de muestra a los cuales se adicionó 3.0 mL de HNO₃ 1.0 M, la muestra fue agitada durante 16 horas a temperatura ambiente, posterior a la incubación el extracto fue centrifugado a 5000

g durante 30 min, el sobrenadante fue recuperado y aforado a 10 mL con agua desionizada.

Para la cuantificación de ácido fítico se tomaron 150 μL del extracto aforado al cual se añadió 1100 μL del complejo de Fe(III)-salicilato, preparado como se describió en la condición 4 (este volumen del complejo fue el mismo tanto para muestras como para los estándares de calibración) el volumen final de muestra y estándares fue de 3 mL, el cual se completó con HNO_3 2.4 mM. La cuantificación de los fitatos presentes en las muestras de alimentos estudiadas se realizó mediante calibración externa empleando los parámetros analíticos de la Condición 4 que se presentan en la Tabla 8. Para la construcción de la curva de calibración se utilizaron 5 niveles de calibración (5.0,10.0,20.0,30.0 y 50.0 mg L^{-1}). En la Figura 10, se presenta un típico espectro de absorción UV-Vis obtenido del análisis de los fitatos presentes en una muestra de alimento analizada en este trabajo.

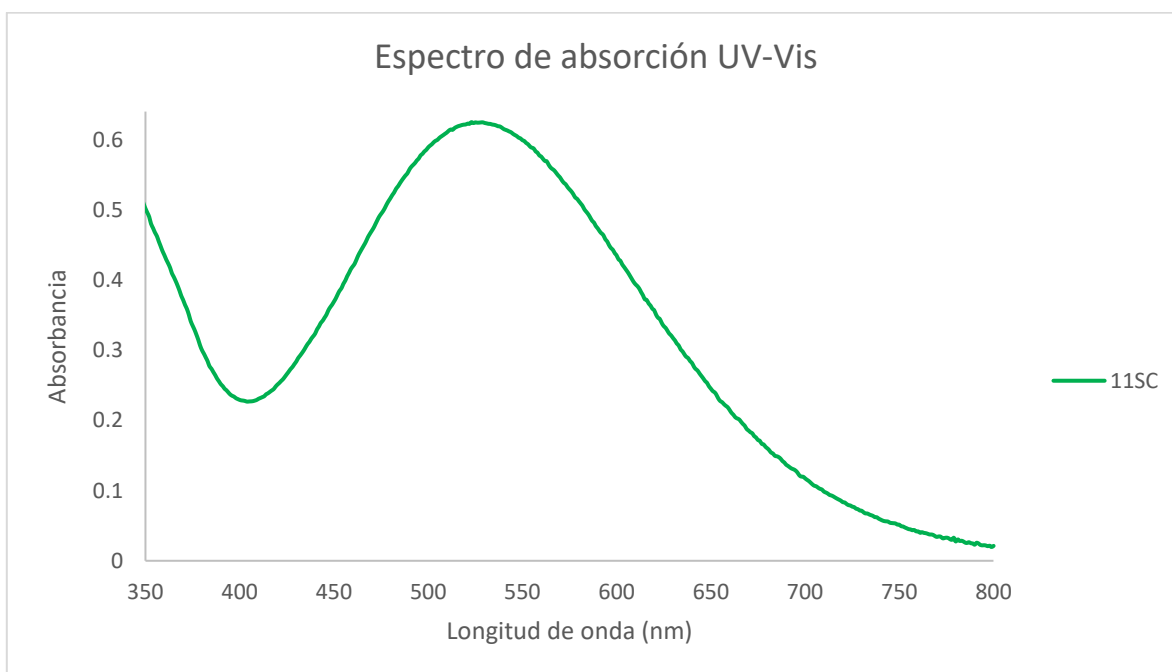


Figura 10. Espectro de absorción UV-Vis típico obtenido del análisis de los fitatos.

Tanto la extracción como el análisis de las muestras se realizó por triplicado, en la Tabla 10 se presentan los valores promedio y de desviación estándar obtenidos para cada uno de los alimentos, así como el valor del porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD %).

Tabla 10. Contenido en mg g^{-1} de ácido fólico de diferentes muestras alimenticias.

No. y clasificación de muestra	Muestra	mg g^{-1}	RSD (%)
1H	Hot cakes Tradicionales Gamesa	80.4 ± 3.8	4.8
2SC	Amaranto	80.9 ± 4.6	5.7
3SC	Avena	69.9 ± 2.9	4.1
4H	Harina Selecta de trigo	65.2 ± 4.1	6.3
5H	Harina Hot Cakes lodge	72.7 ± 5.6	7.6
6H	Harina de trigo 3 estrellas	68.4 ± 5.0	7.3
7H	Harina de trigo Casera	74.3 ± 5.2	7.0
8FL	Nutrileche en polvo	82.7 ± 3.7	4.5
9FL	Nutri Rindes	81.9 ± 5.9	7.2
10SQ	Semilla de Quinoa	80.9 ± 5.3	6.5
11SC	Semilla de Chía	102.5 ± 8.1	7.9
12AB	4 cereales Gerber	83.1 ± 6.5	7.8
13AB	Arroz Gerber	79.3 ± 6.4	8.1
14FL	NIDO Kinder (1-3 años)	79.4 ± 5.5	6.9
15FL	Carnation Clavel	72.3 ± 7.2	9.9
16AB	Nestle Nestum Avena	88.8 ± 7.5	8.4
17AB	Arroz Nestle	67.3 ± 3.2	4.8
18AB	Nestle Nestum 4 cereales	82.4 ± 4.3	5.2
19AB	Nestle Cerelac	60.6 ± 3.0	5.0

Con base en los resultados obtenidos, se puede apreciar que en todas las muestras los fitatos fueron encontrados en el intervalo de concentraciones de 60.6 a 102.5 mg g⁻¹. Cabe mencionar que la muestra 11SC fue la que reportó mayor contenido de fitatos, mientras que la muestra 19AB fue en la que menor contenido se determinó. De acuerdo con la bibliografía los niveles de fitatos en muestras de alimento para bebé se encuentran en el rango de 1.0 a 36.0 mg g⁻¹; los valores reportados en nuestro análisis para este tipo de muestras (muestras 12AB, 13AB, 16AB-19AB) van desde 60.6 a 88.8 mg g⁻¹, valores muy por encima de los reportados en otros países para este tipo de alimento. Por otro lado, dentro del grupo de muestras analizadas se encuentran alimentos clasificados como fórmulas lácteas (muestras 8FL, 9FL, 14FL y 15FL) que de acuerdo con el fabricante no contienen ingredientes de origen vegetal, sin embargo, presentan niveles de fitatos similares a las demás muestras analizadas (82.7, 81.9, 79.4 y 72.3 mg g⁻¹ respectivamente). Los valores de desviación estándar relativa calculados fueron menores al 10% para todas las muestras, lo que indica una buena repetibilidad del protocolo de determinación realizado, aunque se debe tener en cuenta que al haberse utilizado un método de determinación indirecta, la detección de fitatos no es específica por lo que otros compuestos en la matriz de cada alimento pueden interferir en la determinación; así mismo la presencia de fosfato inorgánico en las muestras puede afectar de manera significativa la determinación del contenido de fitatos totales, ya que también se une al Fe(III) provocando la disminución de la señal analítica del salicilato de hierro (III).

Para evaluar la exactitud del procedimiento analítico adaptado, se llevó a cabo la adición de estándar de ácido fítico; para lo cual se seleccionaron 4 muestras, una por cada grupo de alimentos las cuales fueron 1H, 8FL, 11SC y 16AB (correspondientes a harina, fórmula láctea, semilla-cereal y alimento para bebé).

Para llevar a cabo el procedimiento de adición de estándar se utilizaron 60 µL de extracto de cada muestra, a los cuales se les adicionó 1100 µL de la solución del complejo de salicilato de Fe(III) (condición 4), a partir de esta mezcla se hicieron cuatro puntos de adición de estándar, las cantidades adicionadas fueron 60, 90, 150

µg de estándar de ácido fítico, las cuales se establecieron con base en la cantidad de fitatos presente en los 60 µL del hidrolizado. El procedimiento realizado se presenta en la Figura 11.

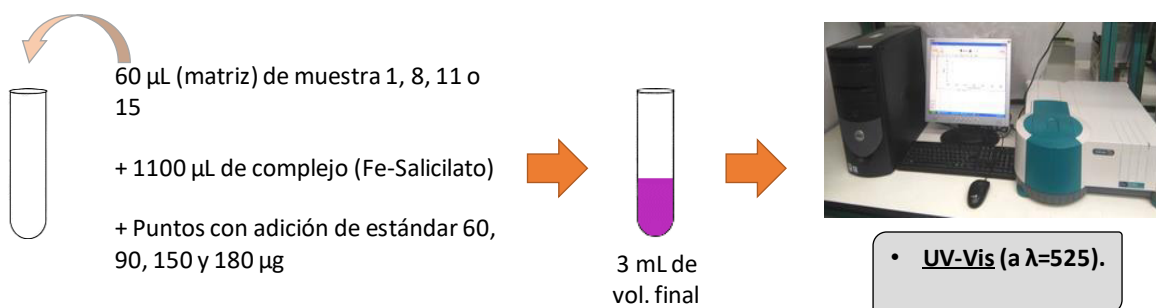


Figura 11. Diagrama de preparación de muestras para porcentaje de recuperación.

Los resultados obtenidos de la adición de estándar se muestran en la Tabla 11, en donde se presentan los µg determinados en las muestras y en cada punto de adición de estándar; así mismo en la tabla, se presentan los valores de porcentaje de recuperación para cada adición.

Tabla 11. Promedio del contenido de fitatos en cada punto de adición de estándar.

Muestras	µg de fitatos en 60 µL de muestra	µg de fitatos determinados después de la adición de estándar, n=3 ± DE			
		60 µg	90 µg	150 µg	180 µg
1H	54.7 ± 1.95	115	145	205	235
8FL	49.7 ± 3.56	110	140	200	230
11SC	70.7 ± 1.55	131	161	221	251
16AB	49.6 ± 2.54	110	140	200	230

En la Figura 12 se presentan típicos espectros de absorción UV-Vis obtenidos del análisis de fitatos presentes en una de las muestras estudiadas con diferentes adiciones de una solución estándar de ácido fítico.

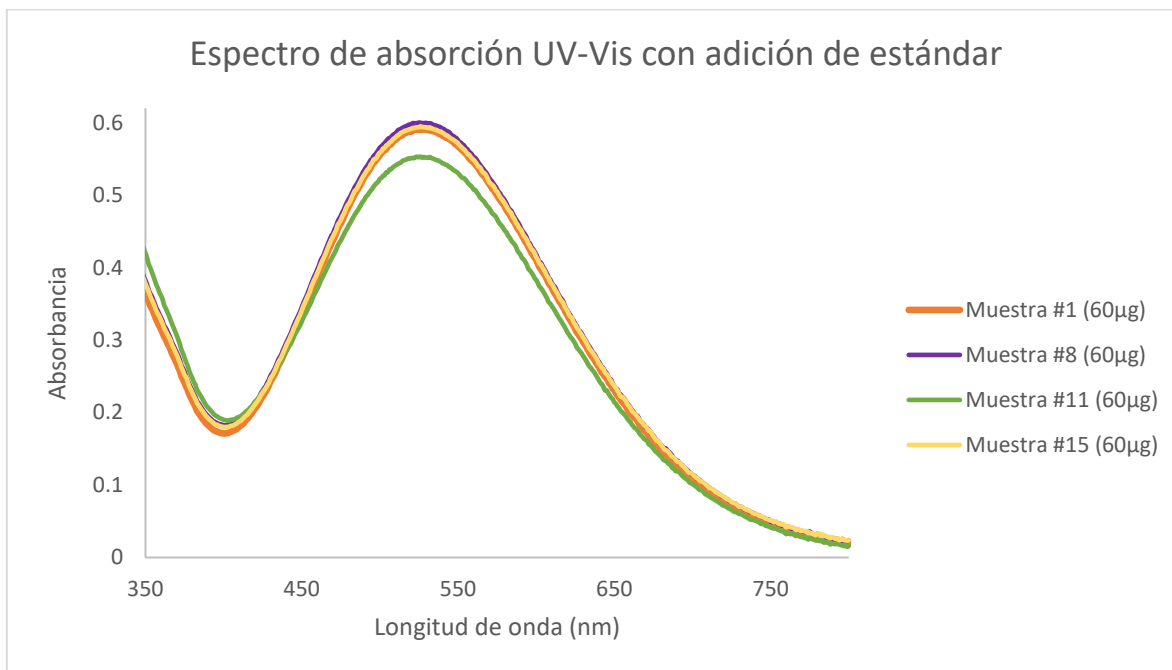


Figura 12. Espectros de absorción UV-Vis típico obtenido del análisis de los fitatos con adición de estándar.

Los resultados obtenidos (en las Tablas 11 y 12), muestran una buena concordancia entre la cantidad de estándar adicionada con la determinada; por otro lado, los porcentajes de recuperación obtenidos van del 98.1% al 118% con buena exactitud del procedimiento implementado. Cabe mencionar que los porcentajes de recuperación mayores (114-118%) se reportaron para la adición de 60 µg de ácido fítico, así mismo, se registró el mayor valor de desviación estándar en este punto de adición comparado con las otras cantidades adicionadas, esto para todas las muestras.

Tabla 12. Promedio del porcentaje de recuperación obtenido para la muestra de harina, formula láctea, semilla y leche.

µg estándar adicionados	Promedio del % de recobro obtenido para cada punto de adición de estándar ± DE, n=3			
	1H	8FL	11SC	16AB
60	114	119	118	114
90	107	108	109	110
150	99.3	102	101	103
180	98.2	100	104	101

Una vez realizado la puesta a punto del procedimiento analítico para la determinación de fitatos por UV, se llevó a cabo la determinación del contenido de fósforo total por MP-AES.

4.3. Cuantificación de Fósforo total por Espectrómetro de emisión atómica de plasma de nitrógeno sostenido por microondas (MP-AES)

Se llevó a cabo la cuantificación de fósforo total en las muestras anteriormente descritas mediante la técnica de espectrometría de emisión atómica de plasma de nitrógeno sostenido por microondas (MP-AES). Para lo cual, las muestras fueron hidrolizadas (100 mg de alimento liofilizado, 1 mL de HNO₃ (69%), 70°C por 30 min, 110°C por 2h; enfriamiento y adición de 0.5 mL de H₂O₂, 110 °C por 1 h; ajuste de volumen a 2 mL con agua milli-Q) previo a su introducción al sistema. Para el ajuste de las condiciones instrumentales del espectrómetro de emisión atómica, se evaluaron sistemáticamente los parámetros descritos en la Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros evaluados para llevar a cabo la determinación de P total por MP-AES

Parámetros evaluados	Valores
Longitudes de onda (nm)	213.618
	214.915
	255.326
	764.934
Flujo de introducción de muestra (mL min ⁻¹)	0.5 - 1.0
Posición de visualización	-10 a -30
Presión de nebulización (kPa)	180 a 240

Los valores de flujo de introducción de muestra, posición de visualización y presión de nebulización que se presentan en la Tabla 13 fueron evaluados para las cuatro longitudes de onda que se reportan para la determinación de P por emisión atómica, las cuales son: 213.618, 214.915, 255.326 y 764.934 nm. Las pruebas para el ajuste de condiciones instrumentales se realizaron utilizando una solución de 1.0 mg L⁻¹ P en HNO₃ al 1%; la selección se hizo con base en: i) la intensidad de la línea de

emisión atómica, ii) la relación señal/ruido y iii) las interferencias espectrales provocadas por la presencia de otros elementos en las muestras.

En la Tabla 14 y 15 se presentan los elementos y sus respectivas longitudes de onda que se reportan como interferentes, así como las intensidades relativas de cada una de ellas. En las Tablas se observa que elementos como Zn (para 213.618 nm), Ca (para 214.914 nm) y Fe (para 213.618, 214.915 y 255.326 nm) los cuales están presentes en los alimentos a analizar [67], interfieren con algunas de las longitudes de onda de P; por otro lado, para la longitud de onda de 764.934 nm no se registran interferencias de otros elementos, lo que indica que podría ser la longitud de onda más adecuada para la determinación de P total.

Tabla 14. Tabla de posibles interferentes en la detección específica de fósforo.

Longitud de onda para determinación de P	Elemento	Longitud de onda (nm)	Intensidad relativa
213.618 nm	Nb	213.47	116.00
	P	213.62	547.80
	Os	213.71	281.40
	*Zn	213.86	37285.10
	*Fe	213.86	9.00
	Re	213.90	366.90
214.915 nm	Ta (Tantalio)	214.69	309.70
	Te (Telurio)	214.73	298.00
	P	214.92	400.60
	Ta	215.06	162.60
	*Ca	215.08	16.90
	*Fe	215.10	11.60
	Ta	215.14	159.00
	*Fe	215.17	11.10

**elementos presentes en las muestras de alimentos seleccionadas*

Tabla 15. Tabla de interferentes en la detección específica de fosforo.

Longitud de onda para determinación de P	Elemento	Longitud de onda (nm)	Intensidad Relativa
255.326 nm	Zr	255.07	1936.00
	*Fe	255.11	19.10
	Ta	255.12	247.20
	W (Wolframio)	255.14	2262.00
	Nb	255.14	77.30
	Hf (Hafnio)	255.14	738.90
	Sc	255.24	26430.10
	*Fe	255.26	20.10
	P	255.33	133.60
	Os	255.45	116.60
	Ta	255.45	1069.00
	W	255.49	1008.30
	W	255.51	1347.60
	Sc	255.58	5213.60
764.934 nm	P	764.93	132.00

**elementos presentes en las muestras de alimentos seleccionadas*

El ajuste de línea base en todas las pruebas realizadas se llevó a cabo de manera automática por el software MP Expert. En la Figura 13 se presentan como ejemplo los espectros de emisión para las cuatro longitudes de onda monitoreadas correspondientes a la solución de P de 1.0 mg L⁻¹ en HNO₃ 1%; en donde se observa que para la longitud de onda de 255.326 nm hay mucha fluctuación de la línea base sin la identificación de un máximo de emisión; únicamente para esta longitud de onda se llevó a cabo la corrección de línea base manual, sin haber mejoras respecto al modo automático.

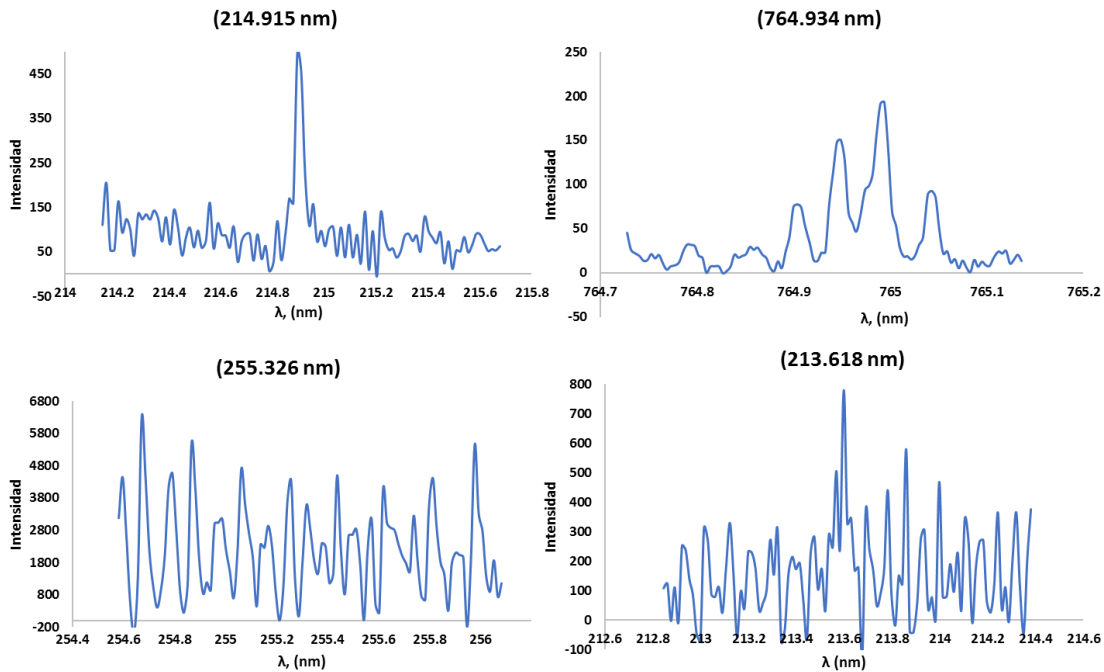


Figura 13. Espectros de emisión obtenidos de la lectura de solución de estándar de fósforo a 1 mg L^{-1} a 1% de HNO_3 , a las longitudes de onda de 214, 213, 255 y 764 nm.

Para la selección de la longitud de onda más adecuada se realizó el proceso de calibración externa para lo cual se utilizaron seis niveles de concentración de P (0.2 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 y 5.0 mg L^{-1} con HNO_3 al 1%), los parámetros analíticos obtenidos del proceso de calibración para cada longitud de onda se presentan en la Tabla 16. El cálculo de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizaron tomando en cuenta el punto de menor concentración de los estándares de calibración (0.2 mg L^{-1}).

Tabla 16. Parámetros analíticos obtenidos del proceso de calibración

λ (nm)	Función de Calibración	R^2	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
213.618	$\text{int} = 1001c + 558.7$	0.961	0.14	0.37
214.915	$\text{int} = 483.07c + 141.7$	0.992	0.71	2.37
764.934	$\text{int} = 1099.9c + 1612.7$	0.817	0.77	2.58

255.326	int = 225.49c + 238.47	0.691	1.13	3.78
---------	------------------------	-------	------	------

A partir de estos resultados, se seleccionó a la longitud de onda de 214.915nm para llevar a cabo la determinación de P en las muestras de alimentos, por su mayor sensibilidad, bajo error del intercepto y mejor linealidad ($R^2=0.992$). Las condiciones finales de trabajo se presentan en la Tabla 17, para la longitud de onda de 214.915 nm.

Tabla 17. Parámetros instrumentales utilizados de Espectrómetro de emisión atómica de plasma de nitrógeno sostenido por microondas.

Parámetros Instrumentales de MP-AES	
Nebulizador	MicroMist de vidrio concéntrico
Cámara de niebla	Ciclónica de un solo paso
Tiempo de toma de muestra	4 s
Flujo de introducción de muestra	0.8 mL min ⁻¹
Presión de Nebulización (kPa)	-30
Posición de visualización	240

Una vez establecidos los parámetros instrumentales se llevó a cabo la determinación del contenido total de fósforo en los alimentos hidrolizados. Los resultados obtenidos de las 19 muestras se presentan en la Tabla 18; así mismo, en esta tabla se presentan los valores de los porcentajes de fósforo total. Los resultados obtenidos muestran que el mayor contenido de fósforo se determinó en los alimentos para bebé (de 5.04 a 7.29 mg g⁻¹), seguidos de las fórmulas lácteas (4.93 a 6.43 mg g⁻¹) y las semillas-cereales (1.43 a 6.75 mg g⁻¹); las harinas fueron las que registraron menor contenido de este elemento (1.17 a 3.61 mg g⁻¹).

Tabla 18. Contenido total de P y % de P determinado en muestras.

Muestra	P (mg g ⁻¹)	% Fosforo	Muestra	P (mg g ⁻¹)	% Fosforo
1H	1.31 ± 0.04	0.131 ± 0.004	11SC	6.75 ± 0.20	0.675 ± 0.002
2SC	2.11 ± 0.06	0.211 ± 0.006	12AB	5.04 ± 0.15	0.504 ± 0.002
3SC	1.43 ± 0.04	0.143 ± 0.004	13AB	6.15 ± 0.18	0.615 ± 0.002
4H	1.17 ± 0.04	0.117 ± 0.004	14FL	6.43 ± 0.19	0.643 ± 0.002
5H	2.63 ± 0.08	0.263 ± 0.008	15FL	6.18 ± 0.19	0.618 ± 0.002
6H	3.37 ± 0.10	0.337 ± 0.001	16AB	6.23 ± 0.16	0.527 ± 0.002
7H	3.61 ± 0.11	0.361 ± 0.001	17AB	5.27 ± 0.22	0.729 ± 0.002
8FL	4.93 ± 0.15	0.493 ± 0.001	18AB	7.29 ± 0.18	0.615 ± 0.002
9FL	4.94 ± 0.15	0.494 ± 0.001	19AB	6.15 ± 0.21	0.683 ± 0.002
10SC	5.06 ± 0.15	0.506 ± 0.002			

Los porcentajes de fósforo en relación a masa seca de la muestra reportados para alimentos similares a los analizados en este trabajo van del 0.1-0.9% [36, 68-73]; siendo las semillas las que mayor porcentaje de este elemento presentan (0.5 – 0.9 %) [68, 69]. Comparando estos valores con los obtenidos (Tabla 18), se puede observar una buena concordancia para la mayoría de las muestras con los valores reportados.

4.3. Evaluación de la aplicación de MALDI-TOF-MS para la determinación de fitatos

Como ya se ha descrito, las técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de ácido fítico son espectrofotométricas en las cuales se realiza un procedimiento de determinación indirecta. En este sentido, se planteó la evaluación de la factibilidad del uso de la técnica de espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz, para la determinación directa de fosfatos de inositol en diferentes alimentos.

En esta técnica la muestra se encuentra en estado sólido, co-cristalizada con una matriz química adecuada; para la selección de esta se deben de considerar varios aspectos: i) disolvente utilizado para obtener soluciones homogéneas; ii) principales señales en el espectro de masas que no interfieran con las señales de los analitos y; iii) el modo de ionización (positivo o negativo) en el cual se llevará a cabo el análisis. En la Tabla 19, se presentan algunas de las principales matrices químicas utilizadas en análisis por MALDI-TOF MS y sus características generales.

Tabla 19. Principales matrices utilizadas en MALDI-TOF.

Nombre y Estructura	Observaciones	Referencia
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB)	Proporciona pocas señales en el espectro y de baja abundancia, alta tolerancia a contaminantes, con lo que la interpretación del espectro se simplifica. Puede utilizarse en modo de ionización positivo y negativo	[74, 75]
Ácido ciano-hidroxicinámico (HCCA)	Muy poco soluble en metanol. Una de las mejores matrices universales para analizar digeridos de péptidos, proteínas y glicanos.	[74]

9-aminoacridina (9AA)	Matriz muy prometedor para la investigación de lípidos. Mayor sensibilidad que DHB, pero los espectros dependen fuertemente de la composición de disolventes utilizados.	[74, 76]
1,5-diaminonaftaleno (DAN)	Ideal para análisis a bajas masas por ausencia de iones de matriz. Identificación en modo positivo y negativo	[74, 77]
Ácido 2,5 dihidroxibenzoico y ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (S-DHB)	Se informa que el uso de la matriz super-DHB reduce la presencia de iones de fondo de la matriz y da como resultado señales que exhiben mejores relaciones señal / ruido y una resolución más alta en el espectro de masas.	[78]

La co-cristalización ocurre como resultado de la evaporación del disolvente; es muy importante obtener el depósito homogéneo y evitar formación de clústeres de iones provenientes de la muestra. La matriz debe absorber la energía del láser y promover la desorción/ionización de compuestos; habitualmente es una pequeña molécula orgánica que presenta una fuerte absorción a una longitud de onda del láser. En la Tabla 20 se presentan los principales métodos de deposición de la muestra en MALDI.

Tabla 20. Principales métodos de deposición de matriz y muestra utilizados en el análisis por MALDI-MS-TOF [43, 79].

Método de deposición	Procedimiento	Características
Gota seca	0.5-1.0 ul de una solución que contiene volúmenes iguales de matriz	Regiones ricas en cristales, así como

	<p>saturada (exceso molar de 100 a 1000 respecto a la muestra) con una solución de muestra son colocados en una placa e MALDI que se seca a temperatura ambiente.</p>	<p>regiones sin matriz o analito.</p> <p>Posibilidad de cristalización de contaminantes separados del analito.</p> <p>Gran número de disparos en un punto. Necesidad de búsqueda de puntos con alto contenidos de cristales.</p> <p>Resolución limitada por presencia de cristales de gran tamaño.</p>
Capa delgada	<p>La matriz HCCA en acetona se coloca sobre la placa para formar una capa delgada de pequeños cristales por la evaporación rápida de la acetona la muestra es colocada sobre los cristales de matriz</p>	<p>Moléculas de analito sobre superficie de matriz.</p> <p>Tamaño homogéneo de los cristales.</p> <p>Alta resolución.</p> <p>Límite de detección menos que el método de gota seca.</p> <p>Número de disparos limitado sobre un punto</p> <p>Solo se aplica a la matriz HCCA</p>
Doble capa	<p>En este método, se aplica el procedimiento descrito para capa delgada y</p>	<p>Los cristales pequeños en la capa fina actúan como núcleos de</p>

	sobre este se aplica el método de gota seca.	cristalización para la gota seca. Cristalización homogénea. Mayor número de disparos que en el método de gota seca, pero menor que en el de capa delgada.
Sándwich	Este método implica la estratificación de la matriz (0.5-1.0 µL), después la del analito y posteriormente la matriz adicional, permitiendo que cada etapa se seque antes de agregar la siguiente.	Se ha informado que esto aumenta el nivel mínimo de detecciones significativamente, que es posible con muestras de rutina a costa de pasos adicionales de pipeteo manual o la necesidad de robótica.

Como antecedente del uso de esta técnica para la determinación de fitatos se tienen reportes que sugieren su posible visualización acompañado el InsP6 con Fe³⁺ o incluso como un aditivo de matriz para la detección y una visualización más eficiente de pequeños dipéptidos bioactivos distribuidos en el tejido por MALDI-TOF MS [22, 52]; sin embargo, ninguna de estas ha sido enfocada a la determinación de fitatos como tal, además de que no se ha descrito la utilización de alguna matriz química de las anteriormente descritas, ni método de deposición; por lo cual en el presente trabajo se propuso la evaluación de la factibilidad del uso de la técnica de MALDI-TOF MS, para la determinación directa de fosfatos de inositol en alimentos, en el que se probaron diferentes matrices y métodos de deposición de matriz/muestra.

4.3.1. Metodología Experimental

Para el desarrollo del procedimiento analítico se probaron las matrices ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), 9-aminoacridina (9AA), Super-DHB (ácido 2,5 dihidroxibenzoico y ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico) y 1,5 diaminonaftaleno (DAN); los solventes utilizados y la concentración a la que fueron preparadas cada una de ellas se presenta en la Tabla 21.

Tabla 21. Matrices utilizadas para la determinación de fitatos.

Matriz	Disolvente	Concentración de la matriz (mg L⁻¹)
HCCA	TFA (0.1%): acetonitrilo 70:30	0.14 mg mL ⁻¹
9AA	90:10 [v/v] Metanol: agua	0.14, 0.25, 0.44, 0.5 y 1.0 mg mL ⁻¹
Super-DHB	30:70 [v/v] acetonitrilo: 0.1% TFA en agua	0.12, 0.25, 0.35, 0.50 y 1.0 mg mL ⁻¹
DAN	60:40 [v/v] isopropanol: acetonitrilo	0.5 y 0.25 mg mL ⁻¹

Para cada matriz se probaron tres métodos de deposición de muestra (gota seca, sándwich y capa fina), las pruebas se realizaron utilizando una solución de estándar de ácido fítico a una concentración de 5.0 mg L⁻¹. En la Figura 14, se presenta el esquema general del procedimiento experimental realizado.

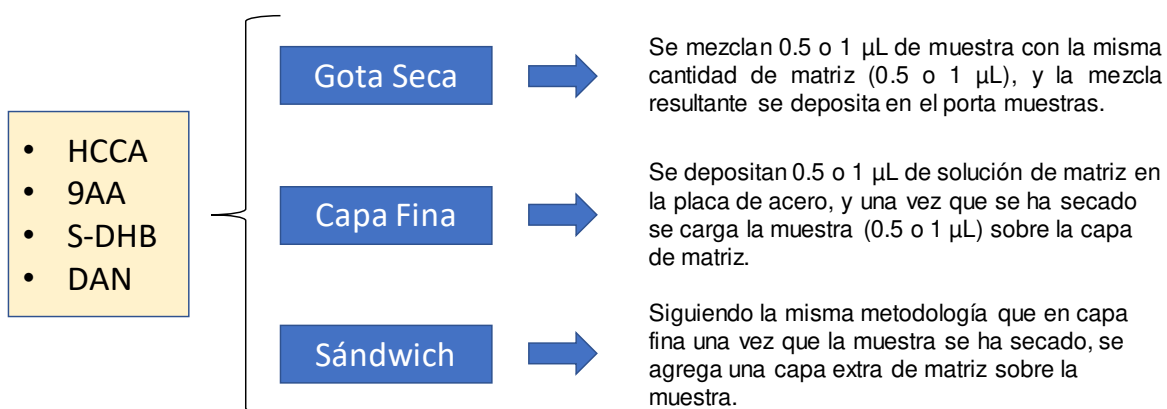


Figura 14. Esquema del procedimiento general realizado para la selección de matriz y método de deposición.

Previo al análisis se realizó la calibración del equipo utilizando como estándares de calibración tres colorantes: Rojo 88 $[\text{M-Na+H}]^- = 377.06$, Tartracina $[\text{M-3Na+2H}]^- = 466.99$ y Erioglaucina $[\text{M-3Na+2H}]^- = 747.14$ en una concentración de 1.0 mg L^{-1} , esto para cubrir el rango de m/z donde de pudieran presentar las señales características de fitatos. Las primeras condiciones instrumentales con las que se evaluaron las matrices y los métodos de deposición fueron: modo de trabajo lineal negativo, a intensidad de láser del 50%, 100 disparos (sumando un total de 500) modo manual y el rango de adquisición de masa/carga (m/z) fue de 400 a 1000. Con estas condiciones no se obtuvieron señales de fitatos en ninguna de las matrices seleccionadas, lo que podría sugerir un mala ionización del ácido fítico debido al su alta carga negativa proporcionada por los grupos fosfato; tal es el caso de polisacáridos sulfonados (oligosacáridos de condroitina y carragenano altamente sulfatados) los cuales comparten características químicas similares con el ácido fítico y sus derivados fosfatos de inositol (alta polaridad, alta carga negativa, naturaleza polianiónica) [80-82]; así mismo se ha reportado para estos polisacáridos una deficiente ionización derivada de su alta carga negativa atribuida a los grupo sulfato, lo cual ha sido mejorado mediante la formación de pares iónicos entre los grupos sulfonados con aminoácidos (arginina, lisina) u oligonucleótidos que tienen en su estructura grupo(s) Guanidino como la pirenometilguanidina [81, 82]. En la Figura 15 se presenta el esquema de formación de pares iónicos entre el grupo

Guanidino con los grupos sulfato. El grupo Guanidino en la arginina puede formar enlaces de hidrógeno bidentados e interacciones electrostáticas con grupos sulfato, fosfato y carboxilato [83].

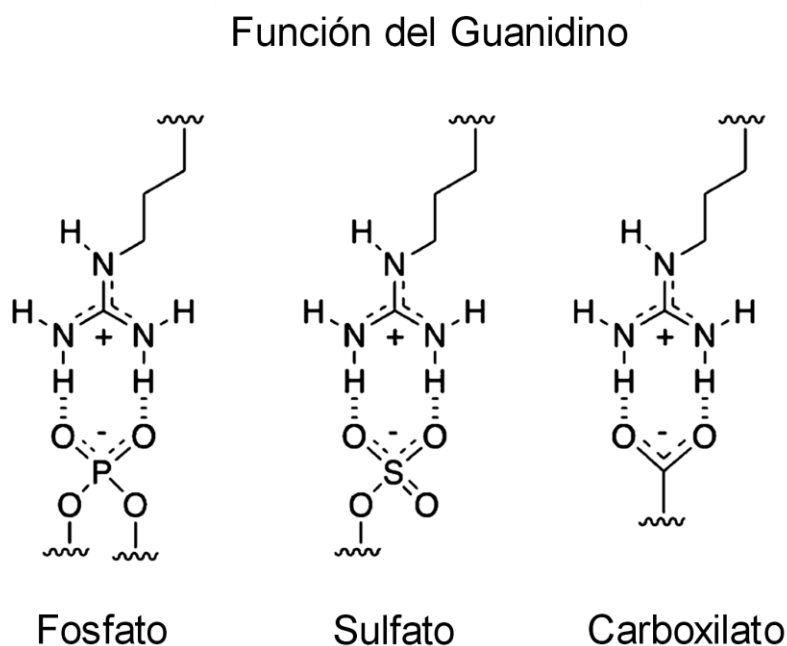


Figura 15. Esquema del proceso de formación de pares iónicos de los grupos sulfato y el grupo Guanidino de ciertos aminoácidos. La arginina puede formar pares de iones e interacciones de enlace de hidrógeno con fosfato, sulfato y carboxilato [83].

Con base en los antecedentes arriba descritos y dadas las similitudes de alta carga negativa y polaridad de los polisacáridos polisulfonados con el ácido fítico y sus derivados, es que se decidió evaluar la factibilidad del uso de L- arginina (Figura 15) en el tratamiento de muestra previo a la deposición, con el fin de formar pares iónicos entre el grupo Guanidino de este aminoácido y los grupos fosfatos de los fitatos, lo que podría mejorar la ionización y facilitar la detección de estas moléculas en su análisis por MALDI-TOF MS.

Para lo cual se llevó a cabo el tratamiento de la muestra mediante la administración de L-arginina al estándar de InsP6 como posible potenciador de la ionización. En la

Figura 16 se presenta como ejemplo los espectros de masas obtenidos a) con adición de L-arginina y b) sin la adición del aminoácido.

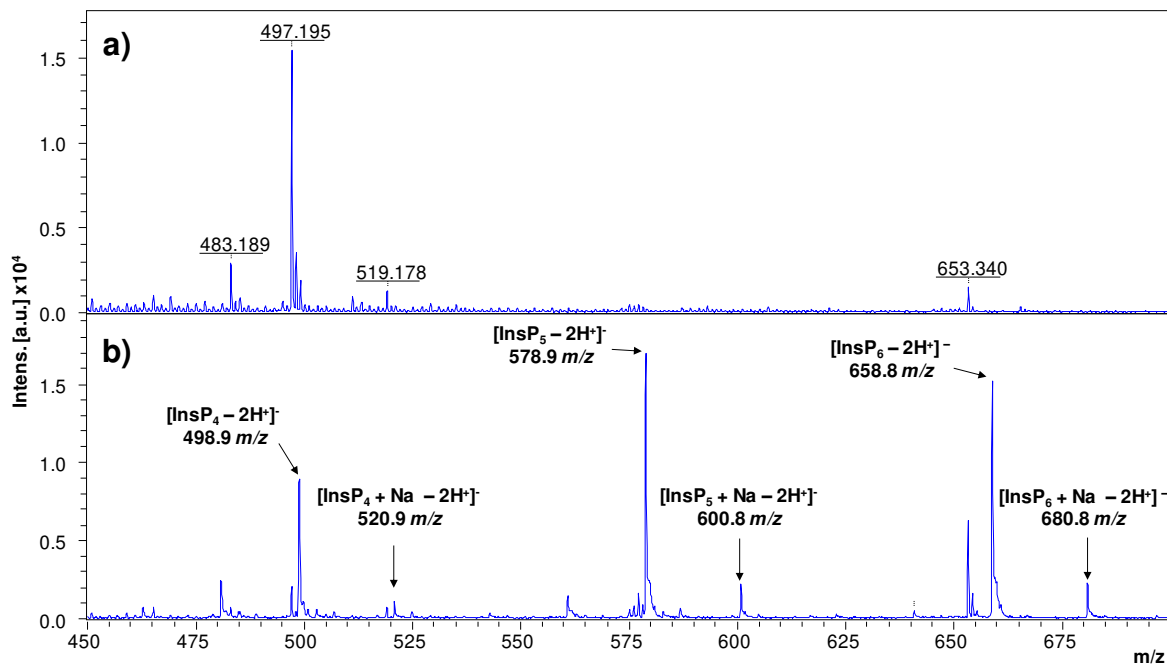


Figura 16. Espectros de masas obtenidos a) sin adición de L-arginina y b) con L-arginina (0.014 mg L⁻¹).

Como se puede observar en la Figura 16, la adición de L-arginina mejora la ionización y por tanto se observan las posibles señales de los derivados fosfatos de inositol hexa-, penta- y tetra- sustituidos, los cuales no se aprecian en las muestras a las cuales no les fue añadida L-arginina.

Con el propósito de obtener tener una calibración del instrumento con una mayor cantidad de puntos se propuso llevar a cabo la generación de clústers de iones de Csl. Como referencia se tiene el uso de clúster usando Csl₃, así que se llevaron a cabo una serie de análisis utilizando una matriz de 9-Aminoacridina (1.0 mg mL⁻¹) 90% metanol y un estándar de Csl en lugar de Csl₃ (como se tiene reportado) para la generación de clústers [84]. Los espectros se obtuvieron en modo de trabajo con reflector con ionización en modo negativo con una intensidad del láser del 90%, 500 disparos (sumando 1500), de manera manual y en un rango de adquisición en

relación masa/carga (m/z) de 340 a 2000, donde se evaluaron tres métodos de deposición de muestra (sándwich, gota seca y capa fina).

Tabla 22. Iones observados en los espectros de masas en la generación de clústers de iones de Csl.

Especie observada	m/z
$[(\text{Csl})_1 \text{I}]^-$	386.86
$[(\text{Csl})_2 \text{I}]^-$	646.52
$[(\text{Csl})_3 \text{I}]^-$	906.33
$[(\text{Csl})_4 \text{I}]^-$	1166.45
$[(\text{Csl})_5 \text{I}]^-$	1425.95
$[(\text{Csl})_6 \text{I}]^-$	1685.76

La serie principal de iones agrupados observada en el modo negativo fue $[(\text{Csl})_n \text{I}]^-$, con señales en 386.86, 643.73, 906.69, 1166.70 m/z.

Una vez establecidas las condiciones de calibración para nuestro análisis, así como la adición de L-arginina en el tratamiento de muestra previo a la deposición, se llevó a cabo la evaluación de las matrices anteriormente descritas (9AA, DAN, S-DHB y HCCA) para la selección de la más adecuada en la determinación de fitatos por MALDI-TOF MS; los parámetros instrumentales utilizados fueron los descritos anteriormente. La prueba se realizó utilizando una solución de estándar de ácido fítico de 5.0 mg L⁻¹.

En las Figuras 17 y 18 se presentan como ejemplo los espectros de masas obtenidos para cada una de las matrices con y sin estándar de ácido fítico, utilizando el método de deposición de sándwich. Así mismo, en la Tabla 23 se presentan las señales observadas y sus respectivas especies de fitatos atribuidas para cada matriz probada; cabe mencionar que las señales que ahí se presentan fueron observadas en todos los métodos de deposición con 9AA. Como se puede observar en esta Tabla 23 y en los espectros obtenidos Figuras 17 (a,b) y 18 (c,d), para las matrices HCCA y DAN no se observaron señales características de fitatos, esto se

presentó para todos los métodos de deposición probados; por otro lado, para la matriz S-DHB únicamente se observó la señal con m/z 658. 8 correspondiente a la especie $C_6H_{16}O_{24}P_6^{2-}$ (fosfato de inositol hexa-sustituido).

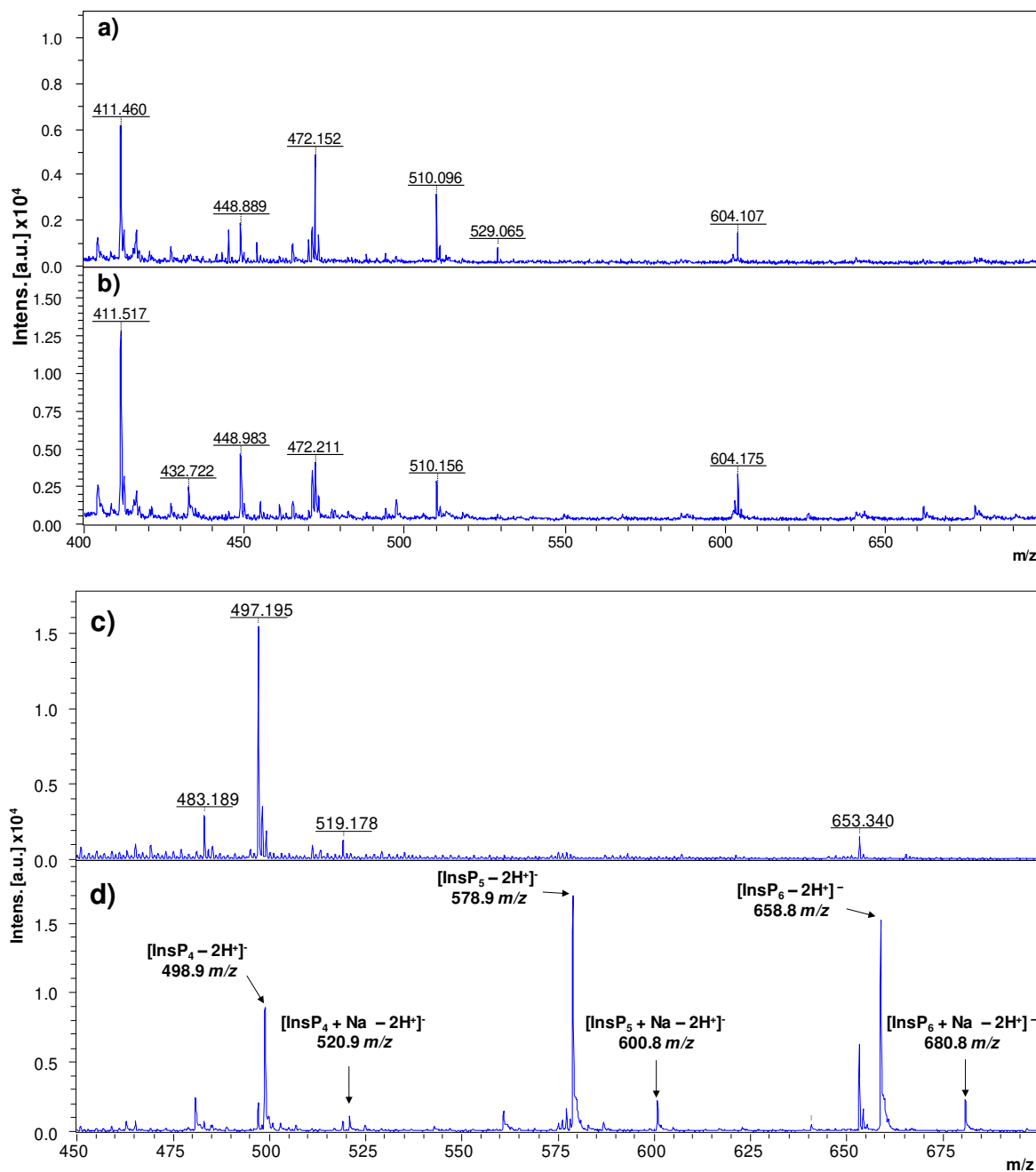


Figura 17. a) espectro de masas correspondiente a la matriz HCCA; b) espectro de masas correspondiente al estándar de ácido fólico de 5.0 mg L^{-1} con la matriz HCCA; c) espectro de masas correspondiente a la matriz 9AA; d) espectro de masas correspondiente al estándar de ácido fólico 5.0 mg L^{-1} con la matriz 9AA.

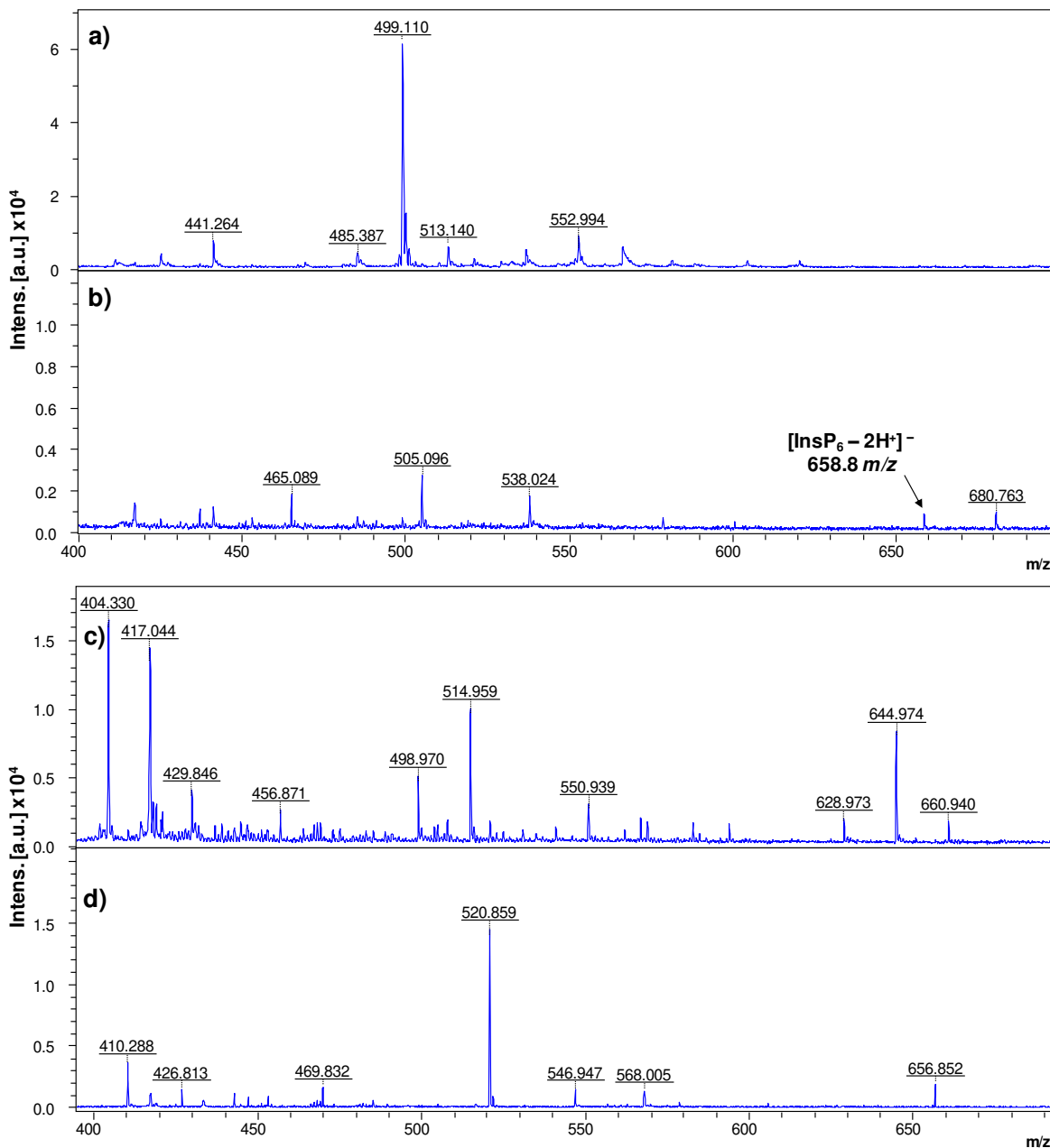


Figura 18. a) espectro de masas correspondiente a la matriz S-DHB; b) espectro de masas correspondiente al estándar de ácido fítico de 5.0 mg L^{-1} con la matriz S-DHB; c) espectro de masas correspondiente a la matriz DAN; d) espectro de masas correspondiente al estándar de ácido fítico 5.0 mg L^{-1} con la matriz DAN.

Únicamente en la matriz 9AA (Figuras 17c y 17d) se observaron señales características de fitatos 498.060, 520.04, 578.04, 600.02, 658.85 y 680.00 m/z ; las cuales se podrían atribuir a las especies $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_{18}\text{P}_4^{2-}$, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NaO}_{18}\text{P}_4^{2-}$, $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_{21}\text{P}_5^{2-}$, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{NaO}_{21}\text{P}_5^{2-}$, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{O}_{24}\text{P}_6^{2-}$ y $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NaO}_{24}\text{P}_6^{2-}$ respectivamente,

que a su vez podrían corresponder a fosfatos de inositol -tetra, -penta y -hexa sustituidos con y sin aductos con Na⁺ Tabla 23. Cabe mencionar que estas especies fueron observadas para esta matriz en todos los métodos de deposición probados; sin embargo, tanto en los valores de intensidad como de relación señal/ruido (S/R) obtenidos, hubo diferencias significativas entre los métodos de colocación de muestra en la placa utilizando la misma concentración de estándar de ácido fítico.

Tabla 23. Iones observados en los espectros de masas del estándar ácido fítico 5.0 mg L⁻¹, en las distintas matrices y métodos de deposición.

Fórmula	Especie observada	m/z observada	Matriz
C ₆ H ₁₄ O ₁₈ P ₄ ²⁻	[InsP4 - nH ⁺] ⁻	498.9	9AA
C ₆ H ₁₃ NaO ₁₈ P ₄ ²⁻	[InsP4 - nPO ₃ + Na - nH] ⁻	520.9	9AA
C ₆ H ₁₅ O ₂₁ P ₅ ²⁻	[InsP5 - nH ⁺] ⁻	578.9	9AA
C ₆ H ₁₄ NaO ₂₁ P ₅ ²⁻	[InsP5 - nPO ₃ + Na - nH] ⁻	600.8	9AA
C ₆ H ₁₆ O ₂₄ P ₆ ²⁻	[InsP6 - nH ⁺] ⁻	658.8	9AA, S-DHB
C ₆ H ₁₅ NaO ₂₄ P ₆ ²⁻	[InsP6 - nPO ₃ + Na - nH] ⁻	680.8	9AA

A partir de los resultados anteriormente descritos se eligió como matriz de trabajo 9AA; la selección del método de deposición de muestra se llevó a cabo mediante la evaluación de los valores de intensidad, relación S/R y de sus respectivas desviaciones estándar relativas, esto para cada una de las señales atribuidas a especies de fitatos. Para llevar a cabo lo anterior se utilizaron diferentes concentraciones de ácido fítico 0.1, 0.3 y 0.5 mg L⁻¹; las condiciones instrumentales con las cuales se llevó a cabo el análisis se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24. Condiciones instrumentales utilizadas en la evaluación del método de deposición de muestra

Modo de trabajo	reflector
Adquisición	Aleatorio

Frecuencia de disparo	2000 Hz
Intensidad del laser	50 - 90 %
Porta muestras	Anchor Chip
Rango de adquisición (m/z)	350 - 1000

Para cada método de deposición, la preparación de las muestras se realizó por triplicado; el procedimiento de preparación de muestra, así como, los volúmenes y cantidades de solventes, estándar de ácido fítico, matriz y L-arginina se presentan en el siguiente esquema (Figura 19).

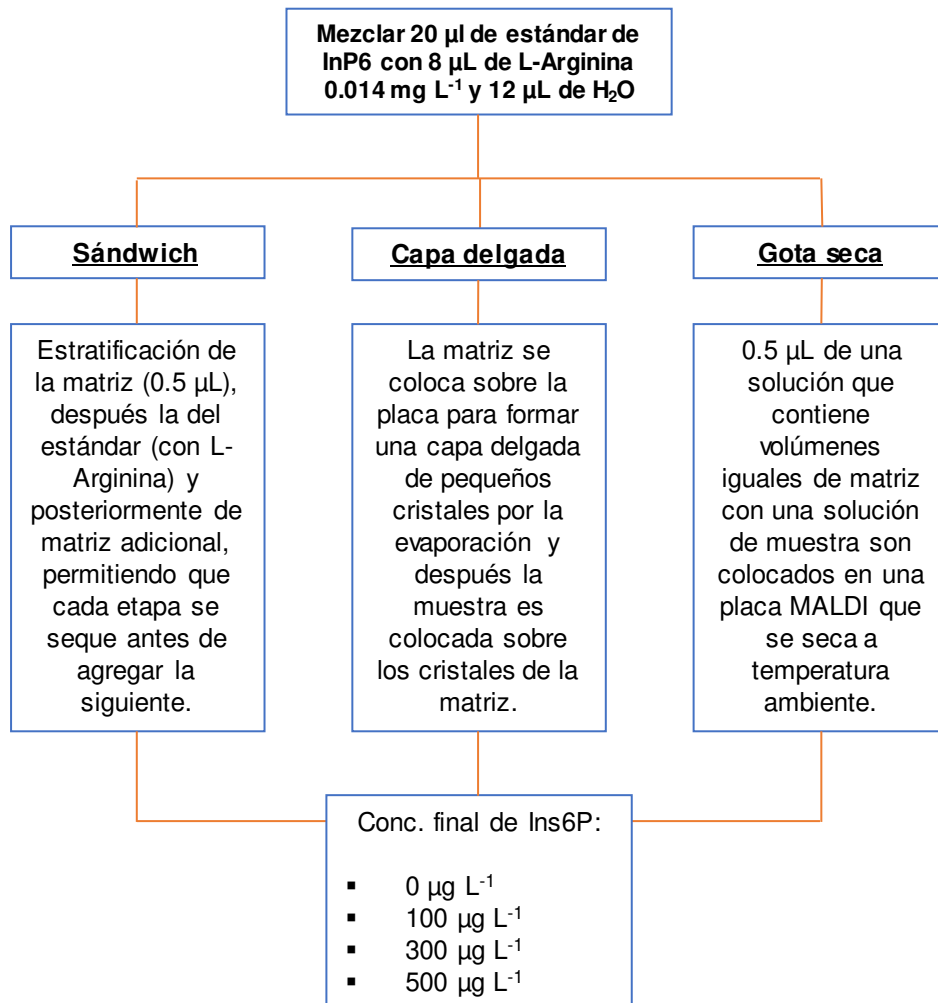


Figura 19. Esquema de tratamiento de muestra seguido para la selección del método de deposición en placa.

El cambio a modo con reflector para esta etapa del estudio se llevó a cabo con el fin de aumentar la resolución de masa y facilitar la discriminación entre señales de posibles interferentes de matriz y señales de fitatos con valores de m/z cercanos, así mismo para este modo de trabajo las señales de los aductos con Na^+ de las tres especies de fosfatos de inositol descritas en la Tabla 23 para modo lineal no se observaron; por lo que únicamente se tomaron en cuenta las señales de InsP6, InsP5 e InsP4 (Figura 20). También es importante señalar que en modo con reflector de los tres colorantes utilizados en la calibración en modo lineal (Rojo 88 $[\text{M}-\text{Na}+\text{H}]^- = 377.06$, Tartrazina $[\text{M}-3\text{Na}+2\text{H}]^- = 466.99$ y Erioglaucina $[\text{M}-3\text{Na}+2\text{H}]^- = 747.14$ m/z) en reflector no era posible apreciar la señal del Rojo 88 (377.06 m/z), por lo que el ajuste de calibración por medio de la formación de clústers de Csl representaba una mejor opción. En la Tabla 26 se presentan los valores promedio de intensidad y relación S/R de las tres especies de fosfatos identificadas a diferente concentración de ácido fítico para cada método de deposición de muestra.

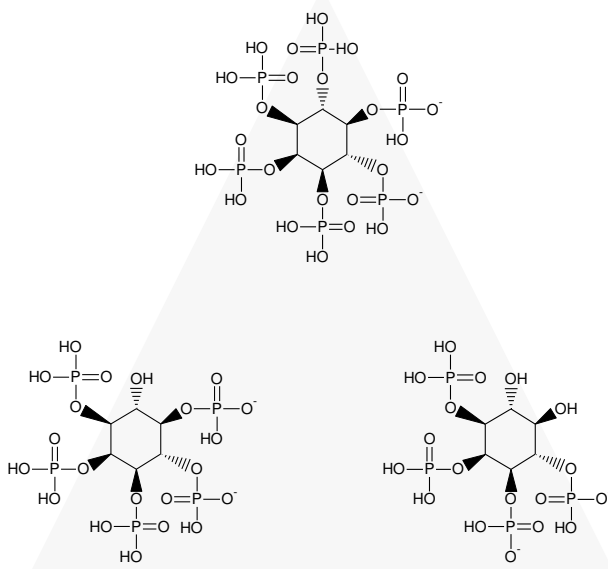


Figura 20. Posibles estructuras de fitatos determinadas en el análisis por MALDI-TOF.

Con base en los resultados obtenidos, se observa que de las tres señales de fosfatos de inositol que se logran apreciar en los espectros de masas obtenidos en modo de reflexión, es que la señal correspondiente a InsP5 (578.9 m/z) es la que mayor intensidad de las tres presenta, seguida de la de InsP6 (658.8 m/z), siendo la de menor intensidad la atribuida a la especie InsP4 (498.9 m/z); esto se registró para todos los métodos de deposición en todas las concentraciones de ácido fólico probadas. En la Figura 21 se presenta el espectro de masas obtenido para la concentración de 0.1 mg L^{-1} de ácido fólico mediante el método de deposición de Sandwich.

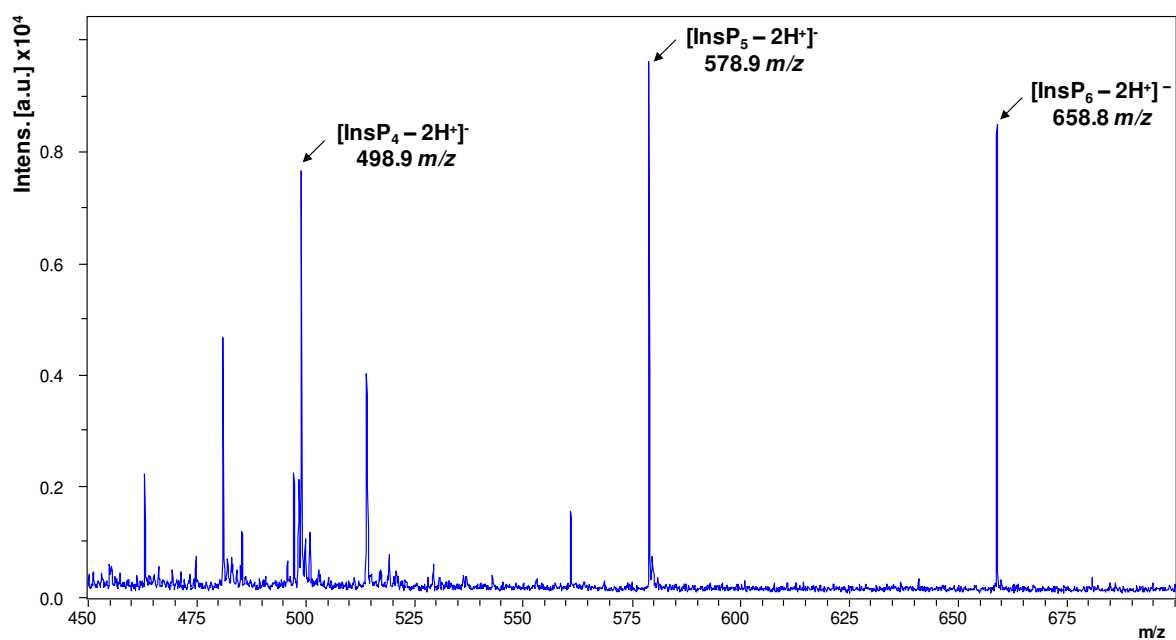


Figura 21. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF MS utilizando el método de deposición de muestra Sándwich, correspondiente a estándar de 0.1 mg L^{-1} de ácido fólico en modo de trabajo con reflector.

Tabla 25. Valores de intensidad y relación señal/ruido (S/R) obtenidos de los diferentes métodos de deposición utilizando diferentes concentraciones del estándar de ácido fítico.

Especie	AF (mg L ⁻¹)	Sándwich		Capa Fina		Gota	
		S/R	Intensidad ± DE, (%DER)	S/R	Intensidad ± DE, (%DER)	S/R	Intensidad ± DE, (%DER)
InsP6 (658.8 m/z)	0.1	56	5817 ± 289 (4.96)	14	1406 ± 145 (10.3)	36	2727 ± 775 (28.4)
	0.3	132	17651 ± 953 (5.39)	9	1250 ± 183 (14.6)	121	6976 ± 853 (12.2)
	0.5	146	23129 ± 3423 (14.8)	8	939 ± 236 (25.1)	20	2249 ± 441 (19.6)
InsP5 (578.9 m/z)	0.1	63	6065 ± 456 (7.51)	32	4450 ± 632 (14.2)	56	5451 ± 681 (12.5)
	0.3	163	16195 ± 1318 (8.13)	26	2604 ± 243 (9.33)	124	7516 ± 1053 (14.0)
	0.5	256	22325 ± 2589 (11.6)	13	1522 ± 201 (13.2)	39	4947 ± 1230 (24.8)
InsP4 (498.9 m/z)	0.1	29	4054 ± 321 (7.93)	20	3435 ± 368 (10.7)	25	4052 ± 956 (23.6)
	0.3	86	10135 ± 859 (8.47)	14	1764 ± 208 (11.8)	49	5455 ± 835 (15.3)
	0.5	139	16102 ± 2785 (17.3)	15	1897 ± 353 (18.6)	34	4341 ± 1750 (40.3)

A partir de los valores de intensidad, señal/ruido y las desviaciones estándar relativas que se presentan en la Tabla 26, se seleccionó como método de deposición de muestra para la determinación de fitatos por MALDI-TOF el método

de sándwich. Para esta forma de deposición se obtuvieron las intensidades más altas de las tres señales observadas de fitatos en todos los niveles de concentración de ácido fítico probados en comparación con los otros métodos; los valores tanto de intensidad como de S/R aumentan conforme aumenta la concentración de estándar en la muestra, en cuanto a la repetibilidad para todas las señales en los primeros dos niveles de concentración (0.1 y 0.3 mg L⁻¹), se obtuvieron valores de desviación estándar relativa menores al 10% lo que indica buena repetibilidad, mientras que para el nivel de 0.5 mg L⁻¹ los porcentajes reportados son 14.8, 11.6 y 17.3 % para las señales (658.8 *m/z*) InsP6, (578.9 *m/z*) InsP5 e (498.9 *m/z*) InsP4 respectivamente; lo que podría indicar que a concentraciones de ácido fítico superiores a 0.3 mg L⁻¹ la ionización del ácido fítico disminuye y provoca variación en las señales lo que empeora la repetibilidad.

Para los métodos de capa fina y gota seca los valores de intensidad y S/R no tuvieron buena concordancia ni repetibilidad, para ninguna de las concentraciones probadas y de las señales de fitatos; además de que al aumentar la concentración de ácido fítico en la muestra no se observó un incremento correspondiente en la intensidad de las señales.

A partir de los resultados obtenidos, se llevó a cabo el análisis de algunas de las muestras en las cuales se determinó el contenido total de fitatos por UV anteriormente descrito. Las muestras seleccionadas para su análisis por MALDI-TOF fueron 1H, 8FL, 11SC y 16 AB correspondientes a cada tipo de alimento (harinas, fórmulas lácteas, semillas-cereales y alimento para bebé respectivamente). Las muestras se procesaron tal y como se llevó a cabo para la determinación espectrofotométrica indirecta de fitatos, a los extractos obtenidos se ajustó el pH a 4 con acetato de sodio 0.1M. Del extracto obtenido de cada muestra se tomaron 20 µL, los cuales se mezclaron con 8 µL de L- Arginina (0.014 mg L⁻¹) y 12 µL de H₂O; primeramente y por el método de deposición de Sándwich se llevó a cabo la estratificación de 0.5 µL de la matriz sobre la placa, después se tomó 0.5 µL de la mezcla anteriormente descrita y posteriormente la matriz adicional (0.5 µL), permitiendo que cada etapa se seque antes de agregar la siguiente. Los

parámetros instrumentales con los cuales se llevó a cabo el análisis de los extractos de las muestras seleccionadas son los anteriormente descritos en la Tabla 24. En la Figuras 22 y 23 se presentan los espectros obtenidos de cada una de las muestras analizadas, en donde se puede observar la presencia de la señal características de Ins6P en los extractos de las muestras 1H y 11SC; mientras que para las muestras correspondientes a fórmulas lácteas y alimento para bebé (8FL y 16AB respectivamente) no se observan ninguna de las señales características de fitatos

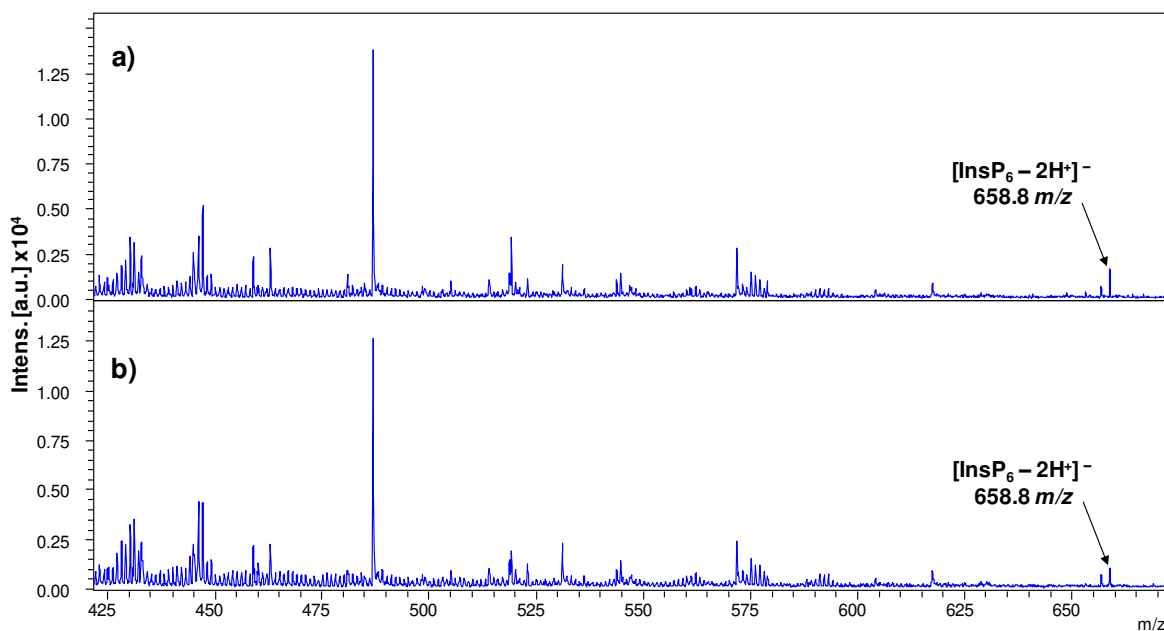


Figura 22. Espectros obtenidos por MALDI-TOF en modo reflexivo, de los extractos de las muestras a) 1H y b) 11SC; utilizando el método de deposición de muestra sándwich.

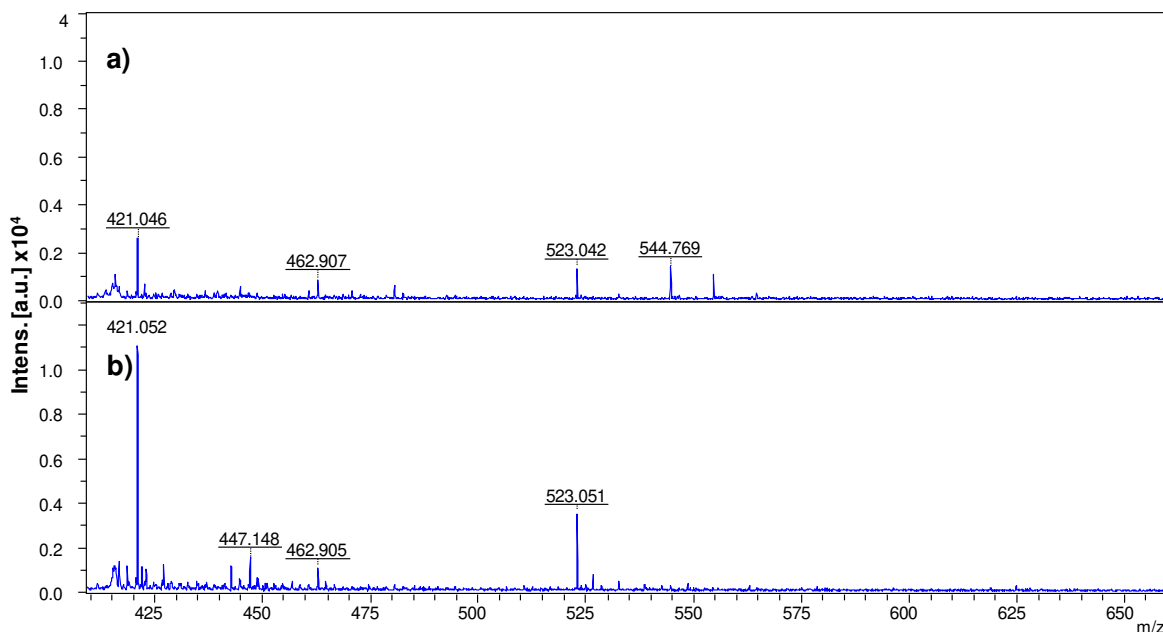


Figura 23. Espectro de masas obtenido Espectros obtenidos por MALDI-TOF en modo reflexivo, de los extractos de las muestras a) 8FL y b) 16AB; utilizando el método de deposición de muestra sándwich.

Con base en los espectros obtenidos para cada uno de los extractos de las muestras de alimentos analizados por MALDI-TOF (Figuras 22 y 23), se puede concluir que, es posible identificar especies de fitatos presentes en muestras de harinas, cereales y semillas; para el caso de muestras como fórmulas lácteas y alimento para bebe hecho a base de cereales aunque se detectó la presencia de fitatos por el método espectrofotométrico indirecto, por este procedimiento analítico por MALDI-TOF no se observan señales características de fitatos, lo que podría ser indicativo para este tipo de muestras que: a) la existencia de fosfato inorgánico presentes en la muestra que da respuesta positiva a la presencia de fitatos por el método espectrofotométrico; b) interferentes de matriz de muestra que comprometen la ionización de las especies de fitatos por lo cual no se observan en el espectro de masas, lo que implicaría llevar a cabo limpieza de muestra o un procedimiento de extracción más selectivo; y c) bajas concentraciones de los derivados de ácido fítico

por lo que se requeriría introducir un procedimiento de preconcentración de muestra. Estos aspectos se quedan como perspectivas a evaluar para trabajo futuro.

En resumen, este procedimiento analítico por MALDI-TOF MS, nos permite detectar de manera rápida y sencilla la presencia de ácido fítico e identificar sus derivados fosfatos de inositol (InsP5 y InsP4) en extractos de muestras como semillas, cereales y harinas.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la puesta a punto del procedimiento analítico para la determinación del contenido total de fitatos por espectrofotometría UV-Vis, para lo cual primeramente se realizó un ajuste de las concentraciones de Fe (III) y salicilato más adecuadas para la formación del complejo colorido de salicilato de Fe(III) e intercambio de ligantes (salicilato por fitato). A partir de los parámetros analíticos obtenidos de las funciones de calibración (5.0 – 50 mg L⁻¹ ácido fítico) para cada una de las diferentes concentraciones probadas, se seleccionó las concentraciones de 1.6 mM para Fe(III) y 4.8 mM para salicilato.
- El procedimiento analítico espectrofotométrico establecido se utilizó para el análisis de 19 muestras de alimentos obtenidas de los mercados locales de la ciudad de Guanajuato, las cuales fueron clasificadas en harinas, fórmulas lácteas, semillas-cereales y alimento para bebé. Los fitatos fueron encontrados en todas las muestras, cubriendo el intervalo de concentraciones del ácido fítico de 60.6 a 102.5 mg g⁻¹
- De acuerdo con la bibliografía los niveles de fitatos en muestras de alimento para bebé se encuentran en el rango de 1.0 a 36.0 mg g⁻¹; los valores reportados en nuestro análisis para este tipo de muestras (muestras 12AB, 13AB, 16AB-19AB) van desde 60.6 a 88.8 mg g⁻¹, valores muy por encima de los reportados en otros países para este tipo de alimento. Por otro lado, dentro del grupo de muestras analizadas se encuentran alimentos clasificados como fórmulas lácteas (muestras 8FL, 9FL, 14FL y 15FL) que de acuerdo con el fabricante no contienen ingredientes de origen vegetal, sin embargo, presentan niveles de fitatos similares a las demás muestras analizadas (82.7, 81.9, 79.4 y 72.3 mg g⁻¹ respectivamente).

- Los valores de desviación estándar relativa calculados en base de tres replicas independientes fueron inferiores del 10% para todas las muestras, lo que indica una buena repetibilidad del protocolo de determinación realizado, aunque se debe tener en cuenta que al haberse utilizado un método de determinación indirecta, la detección de fitatos no es específica por lo que otros compuestos en la matriz de cada alimento pueden interferir en la determinación; así mismo la presencia de fosfato inorgánico en las muestras puede afectar de manera significativa la determinación del contenido de fitatos totales, ya que también se une al Fe(III) provocando la disminución de la señal analítica del salicilato de hierro (III).
- Se llevó a cabo la determinación de fósforo total en de los alimentos hidrolizados. Los resultados obtenidos muestran que los alimentos para bebé contenían relativamente más altas concentraciones de fosforo (de 5.04 a 7.29 mg g⁻¹), seguidos de las fórmulas lácteas (4.93 a 6.43 mg g⁻¹) y las semillas-cereales (1.43 a 6.75 mg g⁻¹); las harinas fueron las que registraron menor contenido de este elemento (1.17 a 3.61 mg g⁻¹). Los porcentajes de fósforo reportados para alimentos similares a los analizados en este trabajo van del 0.1-0.9% (REF); siendo las semillas las que mayor porcentaje de este elemento presentan (0.5 – 0.9 %) (REF). Comparando estos valores con los obtenidos, se puede observar una buena concordancia para la mayoría de las muestras respecto los valores reportados.
- Se planteó la evaluación de la factibilidad el uso de la técnica de espectrometría de masas de desorción/ionización laser asistida por matriz, para la determinación directa de fosfatos de inositol en diferentes alimentos para lo cual se llevó a cabo el estudio sistemático para la selección de la matriz química y método de deposición de muestra; siendo la 9-aminoacridina la matriz química más apropiada para la identificación de especies de fosfatos de inositol, por otro lado el mejor método de deposición

basándose en la repetibilidad de las señales observadas fue el método de aplicación de sándwich.

- Con la adición de L- arginina se mejoró la ionización de las especies de fitatos pudiéndose observar las señales características de estos en los espectros de masas, por lo que la adición de este aminoácido en la concentración de (0.014 mg L⁻¹) se añadió al protocolo de preparación de muestra previo a la deposición en la placa.
- Se identificaron en los espectros de masas señales características de iones de fitatos con m/z 498.06, 520.04, 578.04, 600.02, 658.85 y 680. 00; las cuales se podrían atribuir a las especies $C_6H_{14}O_{18}P_4^{2-}$, $C_6H_{13}NaO_{18}P_4^{2-}$, $C_6H_{15}O_{21}P_5^{2-}$, $C_6H_{14}NaO_{21}P_5^{2-}$, $C_6H_{16}O_{24}P_6^{2-}$ y $C_6H_{15}NaO_{24}P_6^{2-}$ respectivamente, que a su vez podrían corresponder a fosfatos de inositol -tetra, -penta y -hexa sustituidos con y sin aductos con Na⁺.
- Se llevó a cabo el análisis de algunas de las muestras en las cuales se determinaron los fitatos totales (como ácido fítico) por espectrofotometría UV/Vis, las muestras seleccionadas fueron una por cada tipo de alimento, 4 en total. En los espectros de masa obtenidos para las muestras correspondientes a harinas y semillas-cereales se logró la detección de la especie asignada como Ins6P; mientras que para las muestras correspondientes a fórmulas lácteas y alimento para bebé no se observan ninguna de las señales características de fitatos.
- Con base en los espectros obtenidos para cada uno de los extractos de las muestras de alimentos analizados por MALDI-TOF MS, se puede concluir que, es posible detectar e identificar especies de fitatos presentes en muestras de harinas, cereales y semillas, aunque para fines del análisis cuantitativo sería necesaria una preconcentración previa. En las muestras correspondientes a las fórmulas lácteas y alimento para bebe hecho a base de cereales, en las cuales se determinó fitatos por el método

espectrofotométrico indirecto, dichos compuestos no fueron detectados por el procedimiento MALDI-TOF MS. La no-detección de fitatos por MALDI-TOF MS en algunas muestras podría deberse a: a) la existencia de fosfato inorgánico en la muestra que da respuesta positiva en el análisis de fitatos por el método espectrofotométrico; b) interferentes de matriz de muestra que comprometen la ionización de las especies de fitatos por lo cual no se observan en el espectro de masas, lo que implicaría llevar a cabo limpieza de muestra o un procedimiento de extracción más selectivo; y c) bajas concentraciones de los derivados de ácido fítico por lo que se requeriría introducir un procedimiento de preconcentración de muestra. Estos aspectos se quedan como perspectivas a evaluar para trabajo futuro.

REFERENCIAS

1. Vitali, D., I.V. Dragojević, and B. Šebečić, *Bioaccessibility of Ca, Mg, Mn and Cu from whole grain tea-biscuits: Impact of proteins, phytic acid and polyphenols*. Food Chemistry, 2008. **110**(1): p. 62-68.
2. Idouraine, A., M. Khan, and C. Weber, *In vitro binding capacity of wheat bran, rice bran, and oat fiber for Ca, Mg, Cu, and Zn alone and in different combinations*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(8): p. 2067-2072.
3. Levrat, M.-A., C. Rémésy, and C. Demigné, *High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin*. The Journal of nutrition, 1991. **121**(11): p. 1730-1737.
4. Coudray, C., et al., *Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men*. European journal of clinical nutrition, 1997. **51**(6): p. 375.
5. Nuobariene, L., et al., *Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **63**(1): p. 766-772.
6. Karaman, K., O. Sagdic, and M.Z. Durak, *Use of phytase active yeasts and lactic acid bacteria isolated from sourdough in the production of whole wheat bread*. LWT, 2018. **91**: p. 557-567.
7. García-Esteva, R.M., E. Guerra-Hernández, and B. García-Villanova, *Phytic acid content in milled cereal products and breads*. Food research international, 1999. **32**(3): p. 217-221.
8. Chen, Q.-C. and B.W. Li, *Separation of phytic acid and other related inositol phosphates by high-performance ion chromatography and its applications*. Journal of Chromatography A, 2003. **1018**(1): p. 41-52.
9. Kumar, V., et al., *Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review*. Food chemistry, 2010. **120**(4): p. 945-959.
10. Yao, M.Z., et al., *Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications*. Journal of Applied Microbiology, 2012. **112**(1): p. 1-14.
11. Greiner, R. and M.L. Alminger, *Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated oat (Avena sativa)*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999. **79**(11): p. 1453-1460.
12. Shivange, A.V. and U. Schwaneberg, *Recent advances in directed phytase evolution and rational phytase engineering*, in *Directed enzyme evolution: advances and applications*. 2017, Springer. p. 145-172.
13. Chen, Y., et al., *Fluorimetric determination of phytic acid in urine based on replacement reaction*. Analytica chimica acta, 2007. **605**(2): p. 185-191.
14. Carneiro, J.M.T., et al., *Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system*. Analytica Chimica Acta, 2002. **474**(1-2): p. 161-166.
15. Helfrich, A. and J. Bettmer, *Determination of phytic acid and its degradation products by ion-pair chromatography (IPC) coupled to inductively coupled plasma-sector field-mass spectrometry (ICP-SF-MS)*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004. **19**(10): p. 1330-1334.
16. Dost, K. and O. Tokul, *Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography*. Analytica Chimica Acta, 2006. **558**(1-2): p. 22-27.

17. March, J., A. Villacampa, and F. Grases, *Enzymatic—spectrophotometric determination of phytic acid with phytase from Aspergillus ficuum*. *Analytica Chimica Acta*, 1995. **300**(1-3): p. 269-272.
18. Duong, Q.H., et al., *Determination of myo-inositol phosphates in tree nuts and grain fractions by HPLC–ESI–MS*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017. **59**: p. 74-82.
19. March, J., B. Simonet, and F. Grases, *Kinetic–turbidimetric determination of phytic acid by sequential injection analysis*. *Analytica chimica acta*, 2000. **409**(1-2): p. 9-16.
20. Harland, B.F., S. Smikle-Williams, and D. Oberleas, *High performance liquid chromatography analysis of phytate (IP6) in selected foods*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2004. **17**(2): p. 227-233.
21. Bednar, G.E., et al., *Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model*. *The Journal of nutrition*, 2001. **131**(2): p. 276-286.
22. Aiyappa, H.B., et al., *Fe (III) phytate metallogel as a prototype anhydrous, intermediate temperature proton conductor*. *Chemical science*, 2015. **6**(1): p. 603-607.
23. Jaramillo, Á., et al., *Effect of phytic acid, tannic acid and pectin on fasting iron bioavailability both in the presence and absence of calcium*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015. **30**: p. 112-117.
24. NOM-131-SSA1-1995, *Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.*, N.O. Mexicana, Editor. 1997.
25. NMX-F-622-NORMEX-2008, *ALIMENTOS-DETERMINACION DE FIBRA DIETETICA, FRACCION INSOLUBLE Y FRACCION SOLUBLE (METODO GRAVIMETRICO ENZIMATICO) EN ALIMENTOS-METODO DE PRUEBA*. Norma Oficial Mexicana, 2008.
26. NOM-F-90-S-1978, *Determinación de fibra cruda en Alimentos*. Norma Oficial Mexicana, 1978.
27. Costa-Bauza, A., et al., *A simple and rapid colorimetric method for determination of phytate in urine*. *Urological research*, 2012. **40**(6): p. 663-669.
28. March, J., B. Simonet, and F. Grases, *Determination of phytic acid by gas chromatography–mass spectroscopy: application to biological samples*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. **757**(2): p. 247-255.
29. T., M.M., et al., *Acquisition of iron bound to strong organic complexes, with different Fe binding groups and photochemical reactivities, by plankton communities in Fe-limited subantarctic waters*. *Global Biogeochemical Cycles*, 2005. **19**(4).
30. Witter, A.E., et al., *Determination of conditional stability constants and kinetic constants for strong model Fe-binding ligands in seawater*. *Marine Chemistry*, 2000. **69**(1-2): p. 1-17.
31. Frontela, C., et al., *Phytic acid and inositol phosphates in raw flours and infant cereals: The effect of processing*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008. **21**(4): p. 343-350.
32. Burbano, C., et al., *Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology*. *Food chemistry*, 1995. **52**(3): p. 321-325.
33. Grases, F. and A. Llobera, *Determination of Phytic Acid in Urine by ICP Atomic Emission Spectrometry*. *Analytical Letters*, 1996. **29**(7): p. 1193-1199.
34. Saastamoinen, M., S. Plaami, and J. Kumpulainen, *β -Glucan and phytic acid content of oats cultivated in Finland*. *Acta Agriculturae Scandinavica B-Plant Soil Sciences*, 1992. **42**(1): p. 6-11.
35. Gao, Y., et al., *A modified colorimetric method for phytic acid analysis in soybean*. *Crop Science*, 2007. **47**(5): p. 1797-1803.

36. Park, H.-R., et al., *Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods*. Food Control, 2006. **17**(9): p. 727-732.
37. Rugova, A., et al., *Speciation analysis of orthophosphate and myo-inositol hexakisphosphate in soil-and plant-related samples by high-performance ion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of separation science, 2014. **37**(14): p. 1711-1719.
38. Muñoz, J.A., M. López-Mesas, and M. Valiente, *Minimum handling method for the analysis of phosphorous inhibitors of urolithiasis (pyrophosphate and phytic acid) in urine by SPE-ICP techniques*. Analytica chimica acta, 2010. **658**(2): p. 204-208.
39. Flores, M.I.A., et al., *Fast determination of myo-inositol in milk powder by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Food chemistry, 2011. **129**(3): p. 1281-1286.
40. March, J., R. Forteza, and F. Grases, *Determination of inositol isomers and arabitol in human urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Chromatographia, 1996. **42**(5-6): p. 329-331.
41. Grases, F., et al., *Variation of InsP4, InsP5 and InsP6 levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate*. The Journal of nutritional biochemistry, 2001. **12**(10): p. 595-601.
42. Harris, D.C., *Análisis químico cuantitativo*. 2007: Reverté.
43. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principios de análisis instrumental 6ta. ed.* Cengage Learning, México, DF, 2008.
44. LAGALANTE, A.F., *Atomic absorption spectroscopy: A tutorial review*. Applied Spectroscopy Reviews, 2004. **34**(3): p. 173-189.
45. Komaromy-Hiller, G., *Flame, flameless, and plasma spectroscopy*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(12): p. 338-342.
46. Hettipathirana, T., *Determination of metals in soils using the 4100 MP-AES*. Australia, PN, 2011.
47. El-Aneed, A., A. Cohen, and J. Banoub, *Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers*. Applied Spectroscopy Reviews, 2009. **44**(3): p. 210-230.
48. Kirk, R.E., et al., *Encyclopedia of chemical technology*. 1982.
49. Glish, G.L. and R.W. Vachet, *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nature reviews drug discovery, 2003. **2**(2): p. 140.
50. Yates III, J.R., *Mass spectrometry: from genomics to proteomics*. Trends in Genetics, 2000. **16**(1): p. 5-8.
51. Niessen, W.M., *Interpretation of MS-MS mass spectra of drugs and pesticides*. Vol. 51. 2017: John Wiley & Sons.
52. Hong, S.-M., et al., *Enhanced visualization of small peptides absorbed in rat small intestine by phytic-acid-aided matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2013. **85**(21): p. 10033-10039.
53. Zaima, N., et al., *Application of imaging mass spectrometry for the analysis of Oryza sativa rice*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(18): p. 2723-2729.
54. Cohen, L.H. and A.I. Gusev, *Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2002. **373**(7): p. 571-586.
55. Karas, M., et al., *Ultraviolet-laser desorption/ionization mass spectrometry of femtomolar amounts of large proteins*. Biomedical & Environmental Mass Spectrometry, 1989. **18**(9): p. 841-843.

56. Gusev, A.I., et al., *Direct quantitative analysis of peptides using matrix assisted laser desorption ionization*. Fresenius' journal of analytical chemistry, 1996. **354**(4): p. 455-463.
57. Singhal, N., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. Frontiers in microbiology, 2015. **6**: p. 791.
58. Domon, B. and R. Aebersold, *Mass spectrometry and protein analysis*. science, 2006. **312**(5771): p. 212-217.
59. Hillenkamp, F., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Analytical chemistry, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
60. Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey, *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*. Annual review of biochemistry, 2001. **70**(1): p. 437-473.
61. Pozdnyakov, I.P., et al., *Photochemistry of Fe (III) complexes with salicylic acid derivatives in aqueous solutions*. Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry, 2015. **307**: p. 9-15.
62. Khalipova, O., S. Kuznetsova, and V. Kozik. *The composition and structure of iron (III) complex compounds with salicylic acid in ethanol solution and in the solid thin film state*. in *AIP Conference Proceedings*. 2016. AIP Publishing.
63. Dippe, M. and R. Ulbrich-Hofmann, *Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron (III) complexation for assaying phospholipase D activity*. Analytical biochemistry, 2009. **392**(2): p. 169-173.
64. Thompson, D.B. and J. Erdman Jr, *Phytic acid determination in soybeans*. Journal of Food Science, 1982. **47**(2): p. 513-517.
65. Dost, K. and O. Tokul, *Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phases high performance liquid chromatography* Analytica Chimica Acta, 2006. **558**: p. 22-27.
66. Camire, A. and F. Clydesdale, *Analysis of phytic acid in foods by HPLC*. Journal of Food Science, 1982. **47**(2): p. 575-578.
67. Calleja, C.L., *Determinación del contenido de ácido fítico en diferentes matrices alimenticias*. 2018: p. 58.
68. Raboy, V., D. Dickinson, and F. Below, *Variation in Seed Total Phosphorus, Phytic Acid, Zinc, Calcium, Magnesium, and Protein among Lines of Glycine max and G. soja 1*. Crop Science, 1984. **24**(3): p. 431-434.
69. Steiner, T., et al., *Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar*. Animal Feed Science and Technology, 2007. **133**(3-4): p. 320-334.
70. Kayode, B. and E. Esiet, *Phytate and selected mineral composition of foliage from some ornamental plants*. Continental Journal of Agricultural Science, 2007. **1**: p. 14-17.
71. Selle, P.H., et al., *Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal*. Nutrition research reviews, 2012. **25**(1): p. 1-17.
72. Buerkert, A., et al., *Phosphorus application affects the nutritional quality of millet grain in the Sahel*. Field Crops Research, 1998. **57**(2): p. 223-235.
73. Lolas, G., *The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans, and wheat*. Cereal Chemistry, 1976. **53**: p. 867-871.
74. Sigma-Aldrich, *MALDI-Mass Spectrometry*. 2014.
75. Karas, M., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2, 5-dihydroxybenzoic acid*. Organic Mass Spectrometry, 1993. **28**(12): p. 1476-1481.

76. Vermillion-Salsbury, R.L. and D.M. Hercules, *9-Aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization*. Rapid communications in mass spectrometry, 2002. **16**(16): p. 1575-1581.
77. Dong, W., et al., *Phospholipid analyses by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry using 1, 5-diaminonaphthalene as matrix*. International Journal of Mass Spectrometry, 2013. **343**: p. 15-22.
78. Sigma-Aldrich, *Super-DHB suitable for matrix substance for MALDI-MS, ≥99.0%* 2019.
79. O'Rourke, M.B., S.P. Djordjevic, and M.P. Padula, *The quest for improved reproducibility in MALDI mass spectrometry*. Mass spectrometry reviews, 2018. **37**(2): p. 217-228.
80. Heighton, L., et al., *Electrospray ionization mass spectroscopy shows speciation of phytate to be pH dependent*. Journal of Food Agriculture and Environment, 2008. **6**(2): p. 402.
81. Ohara, K., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of polysulfated-derived oligosaccharides using pyrenemethylguanidine*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(1): p. 131-137.
82. Kornfelt, T., et al., *Improved peptide mapping using phytic acid as ion-pairing buffer additive in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography a, 1996. **726**(1-2): p. 223-228.
83. Futaki, S. and I. Nakase, *Cell-surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization*. Accounts of chemical research, 2017. **50**(10): p. 2449-2456.
84. Lou, X., J.L. Van Dongen, and E. Meijer, *Generation of Csl cluster ions for mass calibration in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(7): p. 1223-1226.
85. Díaz, N.A., et al., *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Universidad de Córdoba.[En línea] España.[Fecha de acceso: 15 de mayo de 2014] Disponible en URL: http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf, 2000.
86. Skoog, D.A., et al., *Fundamentos de química analítica*, Ed. Cengage, São Paulo SP, 2008.
87. Brown, C.W., *Ultraviolet, visible, and near-infrared spectrophotometers*. Applied Spectroscopy Reviews, 2000. **35**(3): p. 151-173.
88. Brunatti, C. and A. Martín, *Introducción a la espectroscopía de absorción molecular ultravioleta, visible e infrarrojo cercano*. Recuperado el, 2010. **24**.
89. Bings, N.H., A. Bogaerts, and J.A. Broekaert, *Atomic spectroscopy: a review*. Analytical chemistry, 2010. **82**(12): p. 4653-4681.
90. Zoorob, G.K., J.W. McKiernan, and J.A. Caruso, *ICP-MS for elemental speciation studies*. Microchimica Acta, 1998. **128**(3-4): p. 145-168.
91. Litter, M., M. Armienta, and S. Farías, *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. IBEROARSEN, CYTED, Buenos Aires, Spanish, 2009.
92. Charles, B. and K.J. Fredeen, *Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry*. Perkin Elmer Corporation, 1997.
93. Karlsson, S., V. Sjöberg, and A. Ogar, *Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*)*. Talanta, 2015. **135**: p. 124-132.
94. Zhao, Y., et al., *Determination of heavy metals in leather and fur by microwave plasma-atomic emission spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2015. **112**: p. 6-9.

95. Yoshida, Y., *Analysis of aluminum in beverages using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer (MP-AES)*.
96. Agilent Technologies, I., *ESPECTRÓMETRO DE EMISIÓN ATÓMICA DE PLASMA POR MICROONDAS AGILENT 4100*. 2011: p. 10 -12.
97. Truong, P. and J. Cauduro, *Determination of major elements in fruit juices using the Agilent 4200 MP-AES with the Agilent 4107 Nitrogen Generator*.
98. Amais, R.S., et al., *Determination of silicon in diesel and biodiesel by Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometry*. Agilent Application Note, 2012.
99. Agilent Technologies, I., *Agilent 4210 MP-AES Specifications*. 2016: p. 1 - 8.
100. Scalbert, A., et al., *Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research*. *Metabolomics*, 2009. **5**(4): p. 435.
101. Gomis Yagües, V., *Tema 5. Espectrometría de masas*. Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial, 2008.
102. Yates III, J.R., *Mass spectrometry and the age of the proteome*. *Journal of Mass Spectrometry*, 1998. **33**(1): p. 1-19.
103. Miller, P.E. and M.B. Denton, *The quadrupole mass filter: basic operating concepts*. *Journal of chemical education*, 1986. **63**(7): p. 617.

ANEXOS

Espectrometría por absorción molecular ultravioleta y visible

Utilizada ampliamente en la determinación cuantitativa de una gran variedad de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas, la espectroscopía por absorción molecular en la región ultravioleta y visible se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A de soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria b (cm). Por lo que, comúnmente la concentración del analito absorbente c se relaciona en forma lineal con la absorbancia según la ley de Beer. Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución [43, 85-87]:

$$A = abc$$

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

Los términos P_0 y P se refieren a la potencia de la radiación después de pasar a través de celdas o cubetas que contienen al solvente y a las soluciones del analito, respectivamente. Un haz de radiación monocromático paralelo de potencia P_0 choca de forma perpendicular contra la superficie del bloque. Después de atravesar una longitud b de material, que contiene n átomos, iones o moléculas absorbentes, su potencia disminuye hasta un valor P como resultado de la absorción. Cuando la concentración se expresa en moles por litro y la longitud de la celda en centímetros, la absorptividad (constante de proporcionalidad) se llama absorptividad molar y se designa como ϵ ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [86-88].

Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma [85].

Aunque pueden variar en diseño, los instrumentos para medir la absorción de la radiación ultravioleta, visible e infrarrojo cercano están compuestos por uno o más de los siguientes componentes:

1. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.

3. Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos. [85, 86].

Espectroscopia atómica

Las técnicas de espectroscopia atómica se basan en la descomposición de una muestra en átomos mediante una llama o un plasma. La cantidad de cada elemento se determina por la radiación visible o ultravioleta que absorben, emiten o fluorescen los átomos en estado gaseoso[42].

La espectroscopia de absorción atómica (EAA) es una de las técnicas instrumentales más importantes para análisis cualitativo y cuantitativo de elementos tanto metálicos como no metálicos en materiales orgánico e inorgánicos. Que es ampliamente usada gracias a que es elemento selectivo, con sensibilidad analítica en niveles de partes por millón o menores. Tiene aplicaciones en la manufactura industrial, la medicina y la agricultura. La espectroscopia atómica se puede dividir en dos pasos: la conversión de una molécula de analito en sus átomos constitutivos en fase gaseosa (atomización) y la subsecuente absorción de radiación de estos átomos libres[44, 45].

Atomización por llama, horno y plasma

La espectroscopia de absorción atómica en llama es un método analítico que se presenta en casi cualquier laboratorio analítico para la determinación elemental de metales[89]. En espectroscopia de absorción atómica en llama la muestra a analizar se disuelve en un solvente adecuado. En la atomización por llama el analito contenido en la solución es convertido en un aerosol y pasa a través de la flama por medio de un nebulizador neumático. Los nebulizadores neumáticos utilizan el gas de la flama oxidante como gas de nebulización. La presión diferencial del gas oxidante, entre la solución que se pretende analizar y la cabeza del quemador extrae la solución a través de un capilar de muestra en la corriente del gas oxidante (mechero de premezcla). La corriente se expande a través de un orificio pequeño para producir gotas con gran distribución de tamaño [44]. A la suspensión de estas

partículas líquidas (o sólidas) en un gas se le llama aerosol. La niebla formada, el oxidante y el combustible chocan con pantallas, que aumentan el grado de mezcla y retienen las gotitas más gruesas. El exceso de líquido se recoge en el fondo de la cámara de nebulización y se elimina por el drenaje, por lo que el aerosol que llega a la cámara contiene alrededor del 5% de la muestra inicial[42].

Las gotitas que llegan a la llama se evaporan y el sólido restante que queda se vaporiza y se descompone en átomos. Para determinar un elemento en su forma óptima se precisa una llama determinada, rica o pobre en combustible, según los casos. La altura en la flama en la cual se observa la mayor emisión o absorción atómica depende del elemento que se mida y de los caudales de muestra, combustible y oxidante[42].

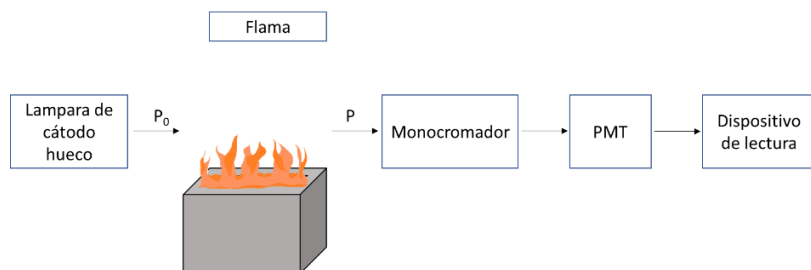


Figura 24. Los componentes esenciales de un espectrofotómetro de absorción atómica [44].

La atomización electrotérmica incluye el horno de grafito, barra de carbono y atomizadores de cinta de tungsteno[44]. Los atomizadores electrotérmicos son por lo general más sensibles debido a que la muestra completa se atomiza en un corto periodo, y el tiempo de residencia promedio de los átomos en la trayectoria óptica es de un segundo o más. Los atomizadores electrotérmicos se usan para medir la absorción y la fluorescencia atómica, pero en general no se aplican en la producción directa de espectros de emisión. No obstante, se usan para evaporar muestras en la espectroscopía de emisión de plasma acoplado de manera inductiva[86]. Se inyecta en el horno de 1 a 100 μL de muestra a través del orificio que hay en el centro (Figura 24). Se hace pasar la luz procedente de la lampara de cátodo hueco a través de las ventanas que hay en cada extremo del tubo de grafito. Para evitar la oxidación del grafito, se pasa gas Ar alrededor del horno [42].

El horno confina la muestra atomizada en el camino óptico durante varios segundos, resultando en un aumento de sensibilidad. Cuando se inyecta una muestra, la gotita debe depositarse en el fondo del horno y debe ocupar un área pequeña. Si se inyecta una gotita desde una posición demasiado elevada, salpicaría, empeorando la precisión. Incluso puede ocurrir que una gota adherida a la punta de la pipeta se deposite en el borde del orificio de entrada al sacar la pipeta[42].

Un plasma es un estado de materia eléctricamente conductor que contiene una concentración importante de cationes y electrones (Las concentraciones de ambos son tales que la carga neta es cero). En el plasma de argón, que se usa con frecuencia para el análisis de emisión, los iones y los electrones de argón son las especies conductoras principales, aunque los cationes provenientes de la muestra también están presentes en cantidades pequeñas. Los iones de argón, una vez formados en el plasma, son capaces de absorber suficiente potencia de una fuente externa para conservar la temperatura en un nivel en el que la ionización posterior mantiene indefinidamente al plasma, el cual alcanza temperaturas hasta de 10 000 K. Hay tres tipos principales de plasmas de alta temperatura: 1) plasma acoplado por inducción, 2) plasma de corriente continua y 3) plasma inducido por microondas[43].

El tiempo de residencia de las muestras es de nos 2 ms antes de alcanzar el punto de observación, donde los átomos experimentan temperaturas que varían entre los 5500 y 8000 K. El tiempo y las temperaturas son aproximadamente dos o tres veces mayores que los que se encuentran en las llamas de combustión más calientes (acetileno/óxido nitroso) que se utilizan en métodos espectroscópicos de flama. Por lo tanto, la atomización es más completa en los plasmas que en las flamas y existen menos problemas de interferencias químicas, tal vez porque la gran concentración de electrones que provienen de la ionización del argón mantienen una concentración de electrones casi constante en el plasma [43].

Espectrometría de absorción atómica

Los tres métodos espectrométricos principales que se usan para identificar los elementos presentes en muestras y determinar sus concentraciones son: 1) espectrometría atómica, 2) espectrometría de masas y 3) espectrometría de rayos X [86].

La cuantificación en espectroscopia de absorción atómica se lleva acabo midiendo la cantidad de especies absorbentes producidas en una longitud de onda analítica dada. Los principios de cuantificación en espectroscopia de absorción atómica se basan en el apego a la ley de Lambert-Beer, dado que el incremento en la absorbancia (que se mide como un decrecimiento en transmitancia) tiene una relación lineal a la concentración de átomos en fase gaseosa. La EAA difiere de otras técnicas espectroscópicas predominantemente en la naturaleza de la fuente de radiación que se usa y el uso de calentamiento para producir especies absorbentes. Las líneas atómicas producidas por las fuentes de radiación deben ser suficientemente anchas para superar las limitaciones debidas al paso de banda

finito del instrumento. Comúnmente este requerimiento se cumple al usar una fuente lineal, como la lámpara de cátodo hueco[44].

Plasma Acoplado Inductivamente

La especiación elemental involucra la separación y cuantificación de diferentes estados de oxidación o formas químicas de un elemento traza en particular. Hoy en día la información que proporciona la especiación elemental es crucial, debido a que la actividad tóxica y biológica de ciertos elementos traza depende de su estado de oxidación, forma química o su cantidad, por ejemplo el As (V) y As (III), donde este último es el estado con mayor movilidad y toxicidad [90, 91]. La determinación de elementos múltiples se hace de forma rutinaria por emisión atómica en plasma acoplado por inducción, dicha técnica ha sustituido a la absorción atómica de flama [42, 45].

El plasma de acoplamiento inductivo de argón es una fuente de iones utilizada comúnmente. Mediante el uso de una antorcha de cuarzo que consiste en un conjunto de tres tubos concéntricos (Figura 25). El gas nebulizador, que transporta el analito al plasma fluye en el tubo central. El gas auxiliar fluye alrededor del tubo central y ajusta la posición horizontal del plasma axial en relación con la antorcha. El gas refrigerante fluye tangencialmente a través del tubo exterior y sirve como gas de plasma primario y para enfriar las paredes internas de la antorcha, así como para centrar y estabilizar el plasma. [90].

La sección transversal del quemador de un plasma acoplado por inducción tiene dos vueltas de una bobina de inducción de radiofrecuencia, arrollada alrededor de la salida superior de un aparato de cuarzo. Se alimenta una entrada del plasma con gas Ar de gran pureza. El gas Ar se ioniza mediante una chispa procedente de un alambre Tesla y los electrones libres formados se aceleran en el potente campo de radiofrecuencia de 27 MHz, que oscila alrededor de la bobina de carga. Los electrones acelerados chocan con los átomos, comunicando su energía a todo el gas. Una vez que se inicia el proceso, los electrones absorben suficiente energía de la bobina para mantener el plasma a una temperatura de 6000 a 10 000 K. Es tan caliente (especialmente cerca de las bobinas) que la cabeza del quemador de cuarzo se debe proteger mediante una corriente de gas Ar frío que se hace pasar a su alrededor[42].

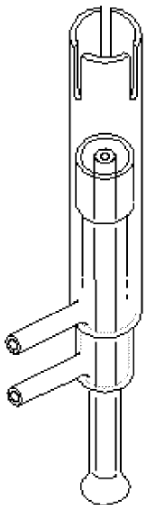


Figura 25. Antorcha para ICP [92].

La concentración de analito necesaria para conseguir una señal adecuada se reduce en un orden de magnitud utilizando un nebulizador ultrasónico, que se caracteriza por dirigir la disolución de muestra a un cristal piezoeléctrico que oscila a 1 MHz. La vibración del cristal crea un aerosol fino, que es arrastrado por la corriente de Ar a través de un tubo calentado, donde el disolvente se evapora. La corriente pasa luego a través de una zona refrigerada donde el disolvente se condensa y se elimina. El analito llega al plasma en forma de un aerosol de partículas sólidas secas. Como no se necesita energía para evaporar el disolvente, se dispone de más energía para la atomización en el plasma. Asimismo, al atomizador llega una fracción de la muestra mayor que cuando se usa un nebulizador convencional. La sensibilidad que se obtiene en un plasma acoplado por inducción se puede aumentar aún en un factor de 3 a 10 observando la emisión a lo largo de toda la longitud del plasma, en lugar del diámetro del mismo. Detectando los iones formados en un plasma mediante un espectrómetro de masas, en lugar de medirlos por emisión óptica [42].

Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas como herramienta del estudio

Aunque el micro plasma ha estado disponible durante un par de décadas, muy pocos instrumentos analíticos comercialmente disponibles han explorado sus posibilidades. Hoy en día, las técnicas multi elementales más comunes para el análisis de metales en una amplia variedad de matrices se basan en el plasma de argón acoplado inductivamente, en combinación con emisión óptica (OES) o

detectores de masa (MS). Por lo tanto, las propiedades del plasma de argón y su aplicabilidad son bien conocidas [93].

La espectrometría de emisión atómica de plasma de microondas (MP-AES) es una tecnología de análisis espectroscópico alternativo en la que se produce un plasma de nitrógeno estable utilizando energía de microondas [94]. El sistema Agilent 4100 MP-AES (Figura 26) genera un plasma de microondas (MP) a presión atmosférica autosostenido que utiliza gas nitrógeno y una antorcha específicamente diseñada para el MP-AES [46]. El sistema cuenta con un magnetrón refrigerado por aire a 2.45 GHz que se utiliza para generar un campo magnético alrededor de una antorcha. El efecto de envoltura del campo magnético hace que el plasma tome la forma de una rosquilla, al igual que con ICP, haciendo posible introducir muestras líquidas a un ritmo constante (Figura 27). El nitrógeno utilizado para generar el plasma se puede suministrar a través de un simple compresor de aire [95].

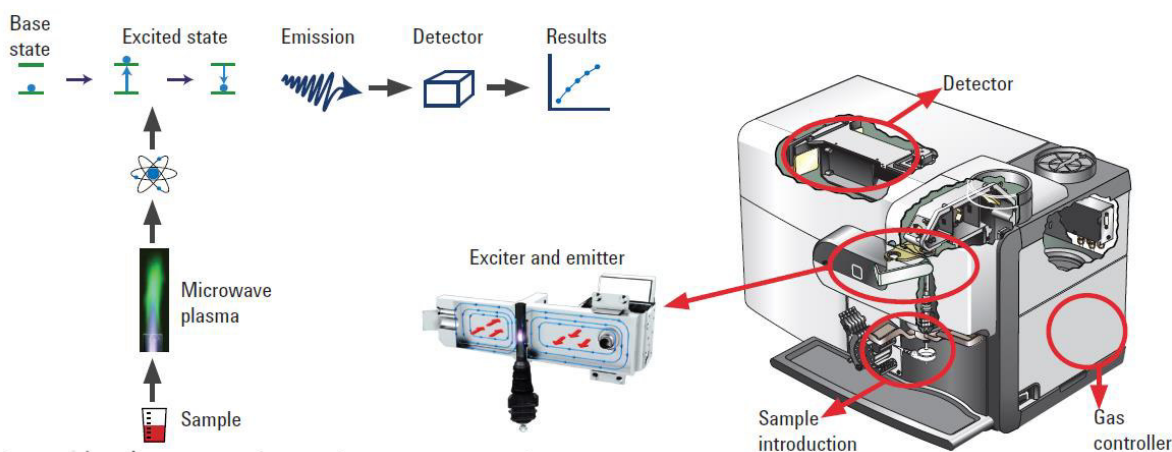


Figura 26. Esquema y principios básicos detrás del sistema Agilent 4100 MP-AES [95].

La introducción de la muestra al MP es neumática, utiliza un nebulizador concéntrico y una cámara de pulverización ciclónica. El aislamiento y la detección de la línea de emisión es secuencial utilizando un monocromador Czerny-Turner y un detector de dispositivo de carga acoplada (CCD). Este equipo de MP-AES permite el arrastre fácil de aerosoles de muestra, tanto acuosos como orgánicos [46]. El plasma generado es extremadamente caliente, (aproximadamente 6000 °C) y emite luz de alta intensidad. La emisión de espectros atómicos se dirige a un detector CCD de amplio intervalo y bajos niveles de ruido que permite la corrección simultánea de los fondos y proporciona unos límites de detección y una precisión óptimos [96].



Figura 27. Esquema que presenta el efecto de envoltura del campo magnético que da forma al plasma [95].

El instrumento es controlado por el software MP Expert, que presenta una cobertura de longitud de onda continua y muestra una extensa base de datos de espectros de emisión de elementos que permite la selección de longitudes de onda apropiadas para el rango de concentración requerido para el análisis. Hay que resaltar que lo más importante es obtener una detección libre de interferencias, de tal manera que la extensa base de datos nos permita seleccionar una línea de emisión libre de interferencias y con una sensibilidad adecuada para determinación de elementos [97].

El equipo utiliza un módulo de control de gas externo (EGCM) para inyectar aire en el plasma y evitar la deposición de carbono en la antorcha y los componentes ópticos. Este dispositivo también contribuye a la estabilidad del plasma y la reducción de emisiones de fondo en análisis de muestras orgánicas. El software Agilent MP Expert permite la corrección de fondo automática, mejorando la precisión y exactitud. La corrección automática de fondo consiste en grabar, almacenar y restar automáticamente un espectro de fondo de cada estándar y solución de muestra analizada. El software MP Expert también realiza la optimización de la presión del nebulizador y la posición de visualización para cada longitud de onda utilizada [98].

El sistema óptico consta de un monocromador de alta resolución y escaneo rápido que permiten una medición rápida con un diseño compacto. El monocromador de diseño Czerny-Turner tiene una distancia focal de 600 mm y una ranura de entrada fija para facilitar el manejo. La rejilla de difracción holográfica posee 2400 líneas/mm y un rango de longitud de onda de 178-780 nm. El sistema óptico se puede purgar con aire para protección en ambientes polvorientos o corrosivos, o con nitrógeno a 10 L/min para determinaciones de azufre [99].

El detector CCD (sellado herméticamente) de estado sólido sensible a los rayos UV (532 x 128 píxeles) está diseñado especialmente para la detección de niveles bajos

de luz con > 90% de eficiencia cuántica a la máxima sensibilidad. Se enfría directamente a 0 ° C utilizando un dispositivo Peltier termoeléctrico para baja corriente oscura y ruido de línea de base reducido. El detector CCD recoge los espectros del analito y los espectros vecinos, lo que permite una corrección de fondo simultánea para una mayor estabilidad y precisión [99].

El uso de nitrógeno como gas de plasma para la espectroscopía de emisión atómica de plasma de microondas (MP-AES) es un desarrollo interesante en la ciencia analítica ya que el costo de funcionamiento puede reducirse significativamente en comparación con instrumentos dependientes de argón o helio [93, 94]. En este sentido el sistema agilent 4100 MP-AES, se postula como una alternativa en el análisis de elementos que no se presentan en bajas concentraciones, como en el caso del ácido fólico. De tal forma que se propone es el uso de esta herramienta en la detección específica de fosforo en el análisis de ácido fólico.

Espectrometría de masas

Gracias a su selectividad y sensibilidad la espectrometría de masas ha progresado hasta convertirse en una herramienta muy poderosa en análisis cuantitativos y cualitativos [47, 100]. En 1912 se construyó el primer espectrómetro de masas, y desde entonces se ha desarrollado a partir de solo analizar pequeñas moléculas inorgánicas a analizar macromoléculas biológicas, prácticamente sin limitaciones de masa. De manera particular, la investigación proteómica, depende cada vez más de las tecnologías de MS. La habilidad de la espectrometría de masa para analizar proteínas y extractos biológicos se debe a los avances obtenidos a través del desarrollo de las técnicas de ionización suave, tales como la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización laser asistida por matriz laser (MALDI) que pueden transformar biomoléculas en iones. La ionización por electrospray (ESI) puede interactuar eficientemente con técnicas de separación que realzan su papel en las ciencias de la vida y la salud. Sin embargo, MALDI tiene la ventaja de producir iones individuales de péptidos y proteínas, minimizando la complejidad espectral. Independientemente de la fuente de ionización, la sensibilidad de un espectrómetro de masas está relacionada a los analizadores de masas donde ocurre la separación de los iones. Los analizadores de masa de tiempo de vuelo y cuádruplo son comúnmente usados y se pueden configurar juntos como instrumentos de espectrometría de masas en tándem QToF. La espectrometría de masas en tándem (MS/MS), como su nombre lo indica es el resultado de llevar a cabo dos o más separaciones secuenciales de iones que generalmente se acoplan dos o más analizadores de masas. El acoplamiento de un cuádrupolo y el tiempo de vuelo dio como resultado en la producción de espectrómetros de masas de alta resolución (es decir, Q-ToF)[47].

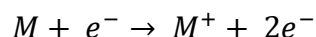
La espectrometría de masas se basa en la formación de iones en fase gaseosa (cargados positiva o negativamente) que puede ser aislado eléctricamente (o magnetizado) basado en su relación masa-carga (m/z) [42, 47].

Fuentes de ionización

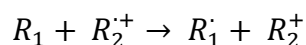
Un espectrómetro de masas comprende básicamente de tres componentes principales: una fuente de iones para producir iones en fase gaseosa, uno o varios analizadores de masas para separar los iones según su masa y un detector para contar los iones [48-50].

Impacto de electrones

La fuente de impacto de electrones (IE) fue una de la más utilizada hasta finales del siglo XX. El principio se basa en producir electrones que se aceleran hacia la muestra de vapor. Por medio de la interacción entre las moléculas de la muestra y los electrones, ocurre la siguiente reacción:



Así, el electrón primario expulsa otro electrón de la molécula produciendo un radical, el catión M^{+} . Algunos de estos iones sobrevivirán, produciendo el ion molecular en el espectro. Otros se unirán para producir fragmentos. La simple ruptura de un enlace producirá un radical neutro y un ion par:



Por supuesto que los rompimientos en otras posiciones dentro de la molécula producirán otros iones. Los radicales neutros no serán observables en el espectro, solo como partículas cargadas serán detectadas [48].

Ionización química

Los espectrómetros de masas más modernos están diseñados para poder intercambiar esta fuente con la de impacto de electrones. En ionización química, las moléculas gaseosas de la muestra (tanto de un sistema discreto como de una sonda caliente) son ionizadas por colisión con los iones producidos por el bombardeo con electrones de un exceso de un gas reactivo. Normalmente se utilizan iones

positivos, pero la ionización química de iones negativos se utiliza ocasionalmente con analitos que contienen átomos muy electronegativos. La ionización química es probablemente el segundo de los procedimientos más comunes para la producción de iones en espectrometría de masas. Para llevar a cabo experimentos de ionización química, es necesario modificar el área de ionización del haz de electrones que se muestra en la Figura 28 poniendo una bomba de vacío y reduciendo la anchura de la rendija que conduce al analizador de masas. Estas medidas permiten mantener unas presiones de gas reactivo de alrededor de 1 torr en el área de ionización mientras se mantiene la presión en el analizador por debajo de 10^{-5} torr. Con estos cambios, se introduce un reactivo gaseoso en la región de ionización en una cantidad tal que la relación de concentración entre el reactivo y la muestra sea de 10^3 a 10^4 . Debido a esta elevada diferencia de concentraciones, el haz de electrones reacciona casi exclusivamente con las moléculas de reactivo. Uno de los reactivos más comunes es el metano, que reacciona con electrones de elevada energía para dar varios iones como CH_4^+ , CH_3^+ y CH_2^+ . Los dos primeros predominan y representan alrededor del 90% de los productos de reacción. Estos iones reaccionan rápidamente con moléculas de metano adicionales siguiendo un esquema de reacciones que dan el ion $(M + 1)^+$ o el ion $(M - 1)^+$ de la muestra. Una gran variedad de reactivos, tales como propano, isobutano y amoníaco, se utilizan para la ionización química y cada uno de ellos produce un espectro diferente con un analito dado [101].

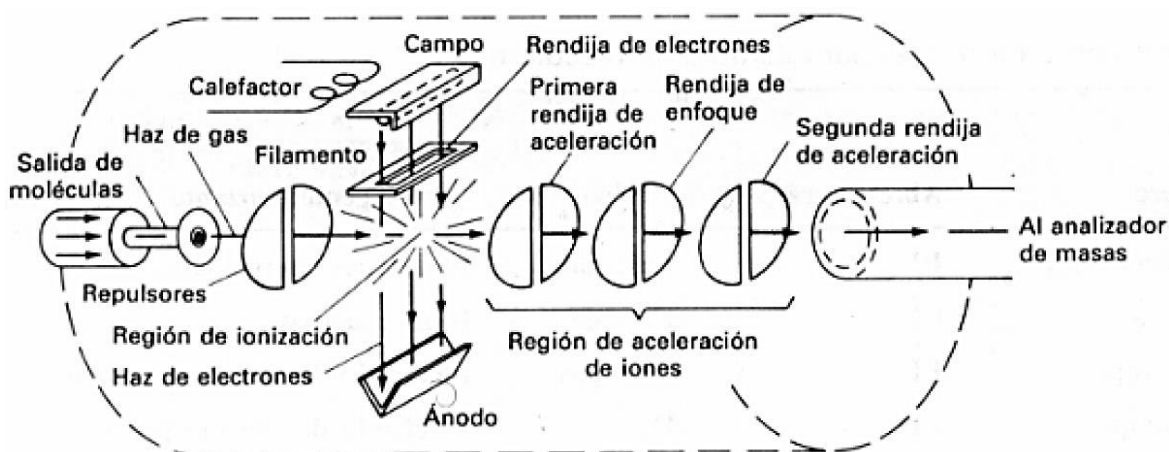


Figura 28. Fuente de impacto electrónico [101].

Ionización por Electronebulización (Electrospray)

La ionización por electronebulización se efectúa en condiciones de presión atmosférica y temperatura ambiente[86]. En la ionización por electrospray se crean

iones por medio de una diferencia de potencial colocada entre un capilar y la entrada al espectrómetro de masas (Figura 29). La disolución de la muestra se bombea a través de una aguja capilar de acero inoxidable a razón de algunos microlitros por minuto. La aguja se mantiene a un potencial de varios kilovoltios respecto al electrodo cilíndrico que la rodea. El campo eléctrico genera gotas cargadas en forma de neblina. La niebla de finas gotitas pasa después por un capilar de desolvatación. Ya sea a través de la aplicación de un gas de secado o de calor, el solvente se evapora y el tamaño de la gota disminuye, resultando en la formación de iones desolvatados. Debido a que las gotitas se vuelven más pequeñas por efecto de la evaporación del solvente, su densidad de carga aumenta hasta que la tensión superficial ya no puede soportar la carga en un punto llamado límite de Rayleigh. Aquí sucede la llamada explosión de Coulomb y la gotita se divide en pequeñísimas gotitas. El proceso se repite en éstas hasta que el solvente es eliminado del analito; entonces sólo quedará una molécula del analito con múltiples cargas. Las moléculas se transfieren al espectrómetro de masas, y para estabilizar la pulverización, a menudo se emplea un gas nebulizador o algún otro dispositivo. [60, 86, 102].

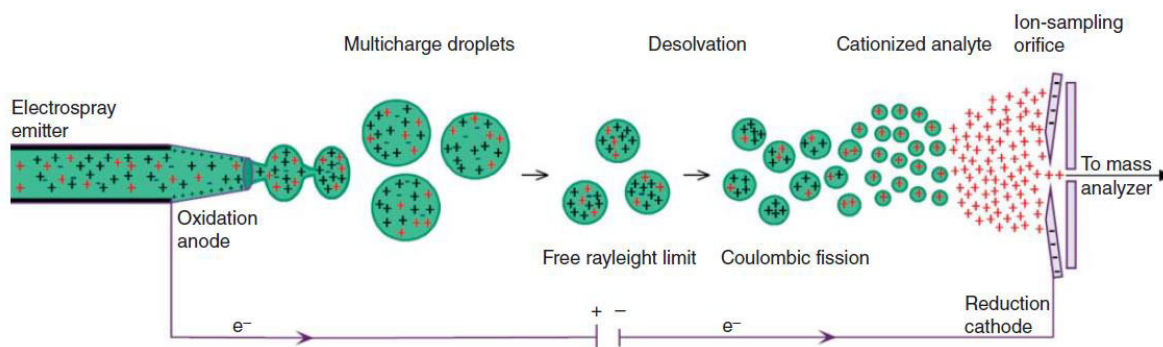


Figura 29. Formación de iones de analito que ilustra los eventos de fisión coulombica de evaporación en ESI-MS de iones positivos. [51]

Una característica de la ionización por electrospray es la formación de iones altamente cargados sin fragmentación, que se produce en biomoléculas grandes y térmicamente frágiles, causada por una pequeña cantidad de energía extra que requiere el analito en la ionización. Este proceso tiene el efecto de reducir los valores de relación masa-carga (m/z) a un rango que es medido con más facilidad por una gran cantidad de diferentes tipos de analizadores de masas. La verdadera masa molecular de un ion se puede calcular pues se observa más de un estado de carga. El estado de carga y la masa molecular también pueden ser determinados cuando se resuelven las formas de isótopos del ion molecular [60, 86, 102].

Analizadores de masas

Después de la producción de iones en fase gaseosa, se separan en un analizador de masas. Las características de un analizador de masas incluyen:

(1) Rango de masa: algunos están limitados a compuestos de baja masa, por ejemplo, menos de 1000 Da, mientras que otros tienen la capacidad de separar iones hasta varios cientos de miles de Da.

(2) Resolución de masa: R , definida por $R = m/\delta m$ donde δm es la diferencia de masa más pequeña que se puede medir en la masa nominal. Considere los iones de dos compuestos que tienen la masa nominal 28: N_2 y CO . La masa exacta es respectivamente 28.0062 y 27.9949 Da. La diferencia de masa δm es 0.0113. Para poder distinguir entre estos dos iones, la resolución del instrumento debe ser al menos: $R = 28/0.0113 = 2,477.9$.

(3) Resolución: La resolución se puede estimar a partir de un espectro considerando el ancho de un pico a $x\%$ de la altura máxima. Donde x es a menudo un 10% o un 50%, este último se utiliza con frecuencia, ya que produce cifras más impresionantes. De hecho, la cifra al 50% es aproximadamente 2,2 veces el valor al 10%.

(4) Transmisión de iones: El porcentaje (%) de iones producidos en la fuente que llega al detector. Puede ser tan alto como el 99%.

(5) Sensibilidad: la cantidad inyectada más pequeña de una muestra detectada con una relación señal/ruido dada, a menudo microgramos o nanogramos que producen una señal cinco veces mayor que el ruido [48].

Cuadrupolo

Los analizadores de cuadrupolo son a menudo combinados con la ionización por electronebulización. El cuadrupolo es un filtro de masa, que consiste en cuatro barras y que conforman los electrodos (Figura 30), que se colocan con precisión de forma paralelas entre sí y en una matriz radial, a las que se aplica un campo eléctrico oscilante y que permite que solo pase una cierta masa (las otras masas están en trayectorias inestables y no llegan al detector). Generalmente, se emplean varillas de acero inoxidable o varilla de cerámica recubiertas de metal. Un par está conectado al polo positivo de una fuente y el otro par se conecta a la terminal negativa. A cada par se les aplican voltajes variables de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180° . Los voltajes de corriente directa y alterna en las barras se incrementan de manera simultánea mientras se mantiene

constante su relación. En cualquier momento, todos los iones excepto los que tengan un determinado valor de m/z chocan contra las barras y se convierten en moléculas neutras. Por tanto, sólo los iones cuyo valor de m/z esté dentro de un intervalo limitado de valores llegan al transductor. [51, 86, 103].

Al escanear la amplitud del campo eléctrico y registrar los iones en el detector, uno obtiene un espectro de masas. Hasta la fecha, la mayoría de los experimentos de secuenciación de péptidos se han realizado en instrumentos de triple cuadrupolo que constan de tres secciones: dos secciones de cuadrupolo separadas en masa separadas por una sección de cuadrupolo central (o un multipolo superior) cuya función es contener los iones durante la fragmentación. Los espectrómetros de masas cuadrupolos son capaces de una resolución de masa unitaria y una precisión de masa de 0.1–1 Da y sobresalen en mediciones cuantitativas. Debido a la presencia de dos secciones de cuadrupolo independientes, el cuadrupolo triple puede programarse para una variedad de modos de escaneo diferentes además del aislamiento de un péptido seguido de la obtención de un espectro de masas de los fragmentos [55].

En los últimos años, el cuadrupolo triple ha comenzado a complementarse con el instrumento de tiempo de vuelo cuadrupolo en el que la tercera sección de cuadrupolo se reemplaza por un analizador de TOF. Sus principales ventajas son que proporciona la alta precisión para la masa y la alta resolución típica de los instrumentos modernos de tiempo de vuelo, lo que resulta en una determinación inequívoca del estado de carga y una especificidad muy alta en las búsquedas en la base de datos [60].

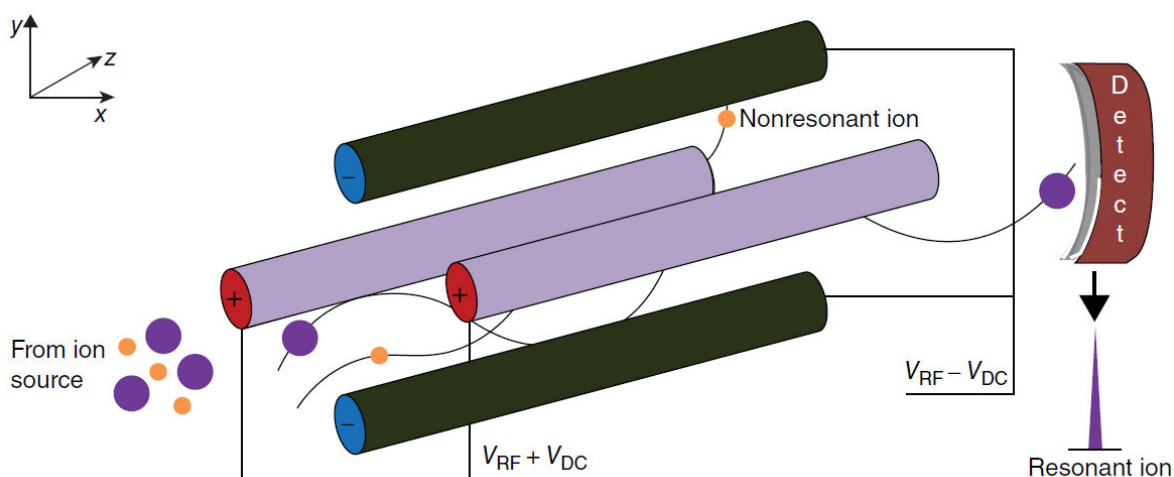


Figura 30. Diagrama esquemático de un analizador de masas de cuadrupolo [51].

También poseen la ventaja de emplear tiempos de barrido pequeños (es decir, <100 ms), lo cual es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos en tiempo real. Los analizadores cuadrupolares son los más utilizados hoy en día [86, 101].

Trampa de Iones

Una trampa de iones es un dispositivo que consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores en el que los iones cationes o aniones gaseosos pueden ser atrapados y quedar confinados durante largos periodos para llevar a cabo un análisis gracias a la acción de campos eléctricos y magnéticos. En la trampa de iones se aplica en el electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados con tierra. Los iones con un valor apropiado de m/z circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Cuando este dispositivo funciona como un espectrómetro de masas, en la trampa se captura el haz continuo de iones mediante la aplicación de los voltajes y radiofrecuencias adecuados hasta el límite de su carga espacial, sacando los que no interesan de la trampa y dejando el que interesa estudiar que chocaría con el He y llevando a cabo masas/masas [60, 86].

Las trampas de iones son instrumentos compactos y versátiles cuya operación a sido altamente automatizada. Incluso, aunque en teoría se puede lograr un alto rendimiento, en la practica la precisión y la resolución de la masa no alcanzan los niveles de los instrumentos de cuádruplo con tiempo de vuelo, además, existe una alta probabilidad de que se produzcan interacciones ion molécula durante el tiempo prolongado de residencia de los iones en la cavidad. Otra versión del principio de captura está incorporado a la Resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier (FTMS). En la actualidad se usan los espectrómetros de masas de trampa de iones como detectores para cromatografía y para obtener espectros de masas de una diversidad de analitos[60, 86].

Orbitrap

Un analizador de masas orbitrap consiste de tres electrodos un electrodo central en forma de huso o elipsoide (A) y dos electrodos exteriores en forma de copa (B) uno frente al otro. En este instrumento se utilizan potenciales electrostáticos. Los iones

son inyectan tangencialmente dentro de un campo eléctrico presente en un espacio pequeño entre los electrodos central y exteriores. El campo eléctrico radial que resulta a partir del voltaje aplicado entre el electrodo central y los electrodos exteriores permite el movimiento circular de los iones alrededor del electrodo central. La atracción electrostática de los iones al electrodo interno esta equilibrada por fuerzas centrifugas. Asimismo, el campo eléctrico axial provocado por la forma de los electrodos inicia las oscilaciones axiales armónicas de los iones a lo largo del electrodo central. Por lo tanto, los iones giran alrededor del electrodo central como anillos, a medida que se mueven hacia adelante y hacia atrás a lo largo del eje del electrodo central. Esta oscilación es proporcional a $(m/z)^{-1/2}$, y, además, independiente de la energía cinética (velocidad) del ion. Estas oscilaciones se detectan mediante la amplificación de la corriente que inducen en el pequeño espacio entre los dos electrodos exteriores. Esta corriente inducida se convierte en frecuencia e intensidad en cada frecuencia mediante la aplicación de la transformada de Fourier, y luego se convierte en m/z y valores de intensidad para obtener el espectro de masas. La imagen digitalizada en el dominio del tiempo es una transformada por Fourier en el dominio de la frecuencia. El valor m/z de un ion está relacionado con la frecuencia ω de las oscilaciones axiales como $\omega = (k \times z / m)^{1/2}$. Por lo tanto, el espectro del dominio de la frecuencia se puede convertir en un espectro de masas [48, 51].

Para obtener una buena señal y una alta resolución, los iones de cada masa deben tener un movimiento coherente. Esto se logra inyectándolos en muy poco tiempo con una interfaz especial entre una fuente de electronebulización y el orbitrap. Este instrumento requiere un alto vacío en la trampa para mantener el movimiento coherente de los iones. Se ha demostrado una resolución de 150 000 FWHM a m/z 600. Esto es importante porque este instrumento con una fuente de electronebulización puede proporcionar información de composición elemental como con un instrumento ICR / FTMS [48, 51].

Técnicas de ionización suave

Independientemente del método por el cual una muestra se introduzca a un espectrómetro de masa (es decir, CG, HPLC, inyección directa), la fuente de iones es el compartimiento donde las especies cargadas se producen y es la “puerta para otras secciones del instrumento como el analizador y el detector. Muchas técnicas de ionización se usan actualmente con instrumentación de espectrometría de masas (Tabla 26). Los métodos de ionización tradicionales como la ionización por impacto electrónico (EI) utilizan haces de electrones energéticos durante el proceso de ionización y opera únicamente al vacío mientras que el analito está en fase gaseosa. Un haz de electrones se forma a partir del calentamiento de un filamento

metálico (que puede ser Tungsteno), estos electrones son acelerados eléctricamente y dirigidos a chocar con la muestra vaporizada, provocando expulsión de electrones del analito y la subsiguiente formación de cationes radicales cargados positivamente. Estas condiciones no son adecuadas para moléculas largas o diversos materiales biológicos. Sin embargo, la ionización por impacto electrónico (EI), junto con la ionización química, se mantienen como el método de elección para el equipo de GC-MS. En la Figura 31 se ilustra el proceso por el cual se forman los iones durante la EI, es importante notar que, con compuestos específicos, se pueden observar especies cargadas negativamente [47].

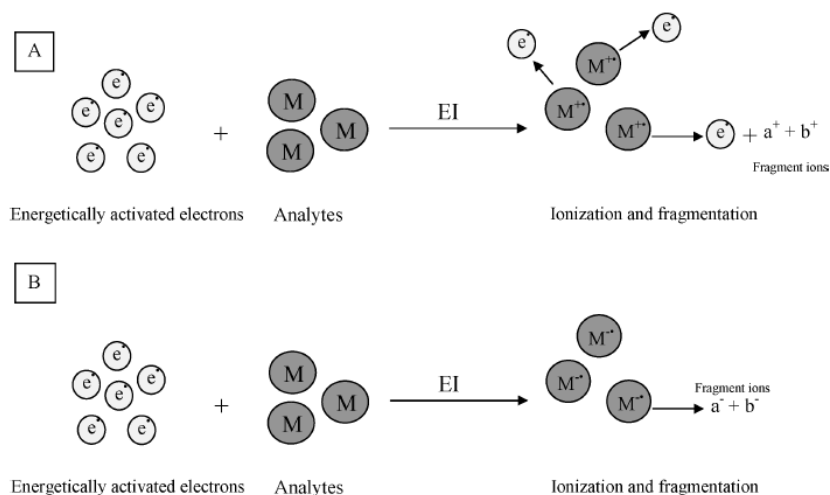


Figura 31. Proceso convencional de ionización por impacto electrónico. A) posible formación de complejos cargados. B) formación de iones cargados negativamente [47].

Debido a las limitaciones asociadas con los métodos de impacto electrónico (EI), en 1966 y 1974 se introdujo la ionización química (IC) y desorción por plasma (DP), respectivamente. Ambas técnicas resultarán predominantemente en la formación de iones protonados (o desprotonados), que son más estables que los iones radicales formados durante el análisis EI-MS. La ionización química depende de la interacción entre los electrones energéticos y las moléculas neutras, como el metano, que resulta en la formación de iones cargados que interactúan con los analitos y producen especies protonadas. Similar a la ionización por impacto electrónico, este método presenta ciertas limitaciones en términos de rango de masa (<1000) y requiere características específicas de la muestra con respecto a la estabilidad térmica y la volatilidad. Sin embargo, la ionización química es mejor que la IE con respecto a la producción del ion molecular. No obstante, tanto la ionización por impacto electrónico como la ionización química no fueron capaces de ionizar los compuestos biológicos polares más valiosos e inestables térmicamente[47].

Por otro lado, la ionización/desorción por plasma es una de las primeras técnicas de ionización "suave" capaces de analizar biomoléculas, con un peso molecular de hasta 100,000 Daltons (Da). El término "suave" indica que la energía interna mínima se transmite a los analitos durante el proceso de ionización. La ionización DP se introdujo después del diseño de los métodos de ionización de campo y de desorción de campo. Posteriormente, se desarrollaron métodos de ionización suave adicionales y se reemplazaron las técnicas más antiguas. Estos incluyen el bombardeo rápido con átomos (FAB), la ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) y la ionización por electrospray (ESI). Las dos últimas técnicas de ionización, en particular, han revolucionado el uso de los espectrómetros de masas y han permitido estudiar fácilmente sustancias biológicas, como glucoconjugados, proteínas y ADN. La importancia del desarrollo de MALDI y ESI fue reconocida globalmente cuando los "inventores", Koichi Tanaka de Shimadzu Corp en Kyoto, Japón, y John Fenn, de la Virginia Commonwealth University, Richmond, compartieron el Premio Nobel de química de 2002. No obstante, gran parte del crédito otorgado al desarrollo de MALDI también debe ir a Michael Karas y Franz Hillenkamp, quienes desarrollaron las ideas de las técnicas de desorción con láser.

Tabla 26. Características de algunos métodos de ionización utilizados en espectrometría de masas [47]

Técnica de ionización	Tipo de analito	Rango de masa	Descripción	Técnica de ionización
Impacto de electrones (EI)	Volátil; térmicamente estable	<1000 Da	Método fuerte; principalmente iones fragmentados	Impacto de electrones (EI)
Ionización Química (IC)	Volátil; térmicamente estable	<1000 Da	Método suave; ion molecular	Ionización Química (IC)
Desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI)	Biomoléculas (proteínas, ADN, glicoconjugados)	Puede ir más allá de 500,000 Da.	Método muy suave, iones monocargados	Desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI)
Ionización por electrospray (ESI)	Compuestos orgánicos e inorgánicos.	De masas muy bajas a extraordinariamente altas.	Método muy suave; iones de carga múltiple	Ionización por electrospray (ESI)

