

## Investigación

# Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico

Ángela Sotelo,\* José Mendoza, Rosa Ma. Argote

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Lab. 111, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México 04510, D.F., Tel: 5622-5281; Fax: 5622-5329; E-mail: angela@servidor.unam.mx

Recibido el 20 de mayo del 2002; aceptado el 12 de noviembre del 2002

**Resumen.** Debido a que existen diferencias en los resultados de la medición del ácido fítico en alimentos entre distintos métodos analíticos, se propuso realizar un estudio comparativo de dos métodos colorimétricos uno de ellos que es muy utilizado y otro, en el que se efectúa una purificación previa. Se realizó la validación de este último método y se demostró que es lineal, reproducible y exacto en las concentraciones evaluadas (5 a 50  $\mu\text{g}$  de ácido fítico / mL). Se analizaron nueve muestras de alimentos (cereales y leguminosas), algunos de ellos procesados. En los resultados se observa que el método que incluye la purificación es el más adecuado porque elimina algunos fosfatos que no tienen actividad quelante. Los resultados fueron estadísticamente diferentes y menores en la mayoría de los alimentos, con el método validado.

**Palabras clave:** ácido fítico, fitatos, cereales, leguminosas.

**Abstract.** Due to differences in the reported values when measuring phytic acid in foods, we decided to compare two colorimetric analytical methods. One of them implies an additional previous purification. This was validated by proving its linearity, precision and accuracy for concentrations between 5 to 50  $\mu\text{g}$  of phytic acid / mL. Nine food samples were analyzed (including cereals and legumes) some of them correspond to processed foods. The results showed that the method including purification is the most suitable because it eliminates some phosphorous compounds with no chelating activity. Overall, results were statistically different and lower in most of the foods estimated by the validated method in comparison to the method with no purification.

**Keywords:** Phytic acid, Phytates, cereals, legumes.

## Introducción

Los alimentos de origen vegetal contienen una serie de sustancias denominadas *factores antinutricionales*, capaces de disminuir la disponibilidad de los nutrimentos indispensables. A este grupo de sustancias pertenece el ácido fítico o ácido mioinositol hexafosfórico ( $\text{IP}_6$ ), que se encuentra en cereales y leguminosas. Este se considera un factor antinutricional debido a que reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales [1,2]. En cereales y leguminosas constituye aproximadamente entre 1 % y 2 % del peso de la semilla, incluso puede alcanzar cantidades de 3 % a 6 % en algunos cereales [3]. En cuanto a su localización en las leguminosas, este ácido está distribuido de manera uniforme en el cotiledón y asociado a estructuras proteínicas [4-6]. En los cereales se encuentra en las capas externas como aleurona y, en el germen, en forma de subestructuras cristalinas en los cuerpos proteínicos [7]. En semillas germinadas se descompone el fitato al mismo tiempo que se incrementa la actividad de la enzima fitasa [8].

Debido a que la molécula de ácido fítico contiene seis grupos fosfato con carga es un excelente agente quelante que forma complejos con cationes minerales y proteínas [9, 10]. Muchos de estos complejos son insolubles y, si se considera que la solubilidad es un factor esencial para que los nutrimentos sean absorbidos, la presencia de ácido fítico hace que se reduzca la biodisponibilidad de éstos [11] y, en consecuencia, va a influir en el valor nutritivo de los alimentos. Por lo que se

refiere al fósforo presente en la molécula de fitato, el hombre no lo puede aprovechar porque el organismo no produce la enzima necesaria para hidrolizar el ácido fítico (fitasa) y liberar así el fósforo de este compuesto [12]. Esta capacidad del  $\text{IP}_6$  para formar complejos la tiene el mioinositol pentafosfato ( $\text{IP}_5$ ) que resulta de la hidrólisis del ácido fítico por medio de la enzima fitasa; sin embargo, los inositoles fosfato con cuatro o menos grupos fosfato al parecer no poseen ningún efecto negativo en la absorción de minerales [13-16].

El análisis de ácido fítico puede considerarse "primitivo", ya que no existe un reactivo específico o espectro característico de absorción que permita cuantificarlo [17-19]. Por esta razón se recurre a la medición del inositol fosfato, o bien, al establecimiento de una relación estequiométrica entre el fitato y algunos cationes que son relativamente fáciles de medir, como herramienta de cuantificación indirecta [20].

Se han publicado varios métodos para la determinación cuantitativa de fitatos. La mayoría tiene que ver con la extracción mediante ácido ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o ácido tricloroacético (TCA) a diferentes concentraciones y tiempos de extracción, una precipitación posterior del complejo fitato-hierro(III) seguida de la adición de cloruro férrico [21]. El fitato se estima al calcular fósforo, hierro o inositol en el complejo aislado. O bien, en forma indirecta con base en la determinación de hierro residual en la solución después de la precipitación de fitato férrico de una solución ácida de sal férrica de concentración conocida. Después se encontró que si se agrega inosi-

tol hexafluorofosfato, el ion férrico también precipita al mioinositol pentafluorofosfato y tetrafluorofosfato en solución ácida diluida. Asimismo, coprecipitan ciertas cantidades de fosfato inorgánico, [3, 18, 22].

También se han creado varias técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución [23-25]. Así, se han elaborado procedimientos en los que se utilizan columnas de intercambio iónico. Después de la retención en la resina de intercambio iónico, el fitato se eluye por separado de las fracciones menores de inositol fosfato (IP<sub>3</sub>-IP<sub>5</sub>) y de fósforo inorgánico el cual también se cuantifica [22].

Por lo anterior, existen muchos métodos para medir el ácido fítico; sin embargo, hay discrepancias entre los resultados obtenidos por estos métodos [19]. En el presente estudio se decidió comparar dos métodos colorimétricos tomando en consideración que estas técnicas son más accesibles pues no requieren equipos costosos. El método de Haug y Lantzsch [26] es muy usado por rápido y se comparó con el método de Frühbeck *et al.* [27]. En este trabajo se realizó la validación de este método, que incluye una purificación por medio de una resina de intercambio iónico para determinar el contenido real de ácido fítico (IP<sub>6</sub> y IP<sub>5</sub>) sin sobreestimar el valor debido a la presencia de fracciones menores de fosfatos de inositol, las cuales resultan de la hidrólisis del ácido fítico que comúnmente se incluyen en la cuantificación por otros métodos.

## Parte experimental

**Equipo utilizado.** Espectrofotómetro Sequoia-Turner, Modelo 340.

### Muestras de estudio

Se seleccionaron nueve muestras de alimentos (cereales y leguminosas) que fueron las siguientes: frijol negro *Jamapa* (*Phaseolus vulgaris*), arroz integral, *All Bran*®, salvado de trigo, galleta de salvado, adquiridos en el mercado local, y grano de arroz entero (*Oryza sativa*) (variedad Veracruz A-94), el cual fue proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental de Zacatepec, y una leguminosa silvestre comestible llamada guaje (*Leucaena macrocephala*) adquirida en un mercado de Zacatepec, Estado de Morelos.

### Acondicionamiento de las muestras

Para el caso particular del grano de arroz, se obtuvieron por separado las tres fracciones de este cereal: grano pulido, la cascarilla y el salvado con ayuda de una máquina pulidora de arroz en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Todas las muestras se molieron en un molino Thomas Wiley hasta pasar por una malla de 0.5 mm de diámetro con el fin de obtener una harina fina, y se almacenaron en refrigeración normal hasta el momento de su análisis.

## Metodología

### Análisis proximal

Este análisis se llevó a cabo porque permitía conocer la composición de cada muestra y sobre todo, su contenido de grasa que se debe tomar en cuenta para evitar interferencias en la medición. La determinación de humedad, grasa, cenizas, proteína y fibra se realizó por triplicado en cada una de las muestras de acuerdo con la metodología descrita en el AOAC [26]. El valor correspondiente a los hidratos de carbono se obtuvo por diferencia.

### Valoración de ácido fítico por el método de Haug y Lantzsch [27]

La valoración del ácido fítico se realizó de la siguiente manera: se pesó la muestra (0.040-0.120g) y se extrajo con 20 mL de HCl 0.2N y con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se centrifugó el extracto a 12000 r.p.m. durante 15 min. A continuación se tomó una alícuota de 0.5 mL a la que se le agregó 1 mL de la solución férrica: 0.2 g de sulfato férrico de amonio. 12H<sub>2</sub>O disueltos en 100 mL de HCl 0.2 N y se aforó con agua a 1000 mL. El tubo se tapó con una canica, se colocó en baño de agua a ebullición por 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 2 mL de solución de 2,2-bipiridina, 1g más 1 mL de ácido tioglicólico y aforado con agua a 100 mL. Se mezcló el contenido y la absorbancia se leyó a 519 nm 30 segundos después de haber agregado el último reactivo.

### Valoración del ácido fítico por el método de Frühbeck [28]

Se pesó el alimento (que debe contener menos de 5 % de grasa), se agregaron 20 mL de HCl (0.65 N) para llevar a cabo la extracción. El pH de la mezcla debe estar entre 0 y 1. Esta mezcla se sometió a agitación vigorosa durante dos horas a temperatura ambiente. El extracto obtenido se transfirió cuantitativamente a unos tubos para centrifugarlos a 17300 G. Una vez transcurridos 30 min se colectó el sobrenadante, y se tomó una alícuota que se diluyó con agua desionizada. Se recomienda la dilución 1:25 para alimentos que contengan 1 % o más de ácido fítico y la dilución 5:25 para contenidos menores. El pH se ajustó a un valor de 6.0 con solución de NaOH 1N y luego se tomaron 10 mL de la alícuota diluida que se transfirieron cuantitativamente a la columna de resina de 8 mm × 65 mm (AG1-X8, 200-400 mesh, 0.5 g, Bio Rad No. 140-1451). El lavado de la columna se hizo con 15 mL de NaCl 0.1 N. El fitato se eluyó con 15 mL de NaCl 0.7 N y se recolectó el extracto purificado. Se tomaron 3 mL de agua desionizada (usada como blanco), o bien, 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio (Sigma Co.) cuyo contenido es de 5 a 50 µg / mL en agua desionizada) o bien, los extractos purificados a través de la columna a los que previamente se les ajustó el pH a 3 y se les adicionó 1 mL de reactivo de Wade: 0.03 % de FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Sigma Co.) más 0.3 %

**Tabla 1.** Análisis proximal de las muestras (g / 100 g de muestra).

Muestra	Humedad	Proteína	Cenizas	Grasa	Fibra	Carbohidratos <sup>1</sup>
Cascarilla de arroz	6.68 ± 0.26	3.47 ± 0.05	16.27 ± 0.46	3.15 ± 0.08	41.88 ± 1.45	28.55
Arroz pulido Salvado de arroz	15.84 ± 0.35	8.09 ± 0.16	0.69 ± 0.03	0.83 ± 0.02	0.25 ± 0.01	74.30
Frijol Jamapa	8.53 ± 0.39	7.62 ± 0.16	18.09 ± 0.90	10.96 ± 0.55	28.94 ± 0.40	25.86
Guaje	6.26 ± 0.32	24.41 ± 0.96	3.63 ± 0.15	1.11 ± 0.04	3.33 ± 0.16	61.26
Galleta de salvado	14.91 ± 0.68	33.54 ± 0.75	5.52 ± 0.24	1.87 ± 0.09	11.81 ± 0.33	32.35
Salvado de trigo	1.34 ± 0.06	7.21 ± 0.29	3.14 ± 0.04	18.67 ± 0.90	1.05 ± 0.05	68.57
Arroz integral	14.54 ± 0.64	14.70 ± 0.11	5.46 ± 0.14	2.27 ± 0.02	10.92 ± 0.42	52.11
All Bran®	10.61 ± 0.29	8.64 ± 0.21	1.53 ± 0.01	2.44 ± 0.03	0.96 ± 0.01	75.82
	2.76 ± 0.05	14.34 ± 0.57	4.45 ± 0.16	1.95 ± 0.09	6.57 ± 0.10	69.93

n = 3

CV < 5%

<sup>1</sup> Obtenido por diferencia

de ácido sulfosalicílico disueltos en agua desionizada. Después de la agitación en un vórtex durante 5 s se leyó la absorbancia a 500 nm.

### Validación del método de Frühbeck

Los parámetros por evaluar en la validación fueron los siguientes [29, 30]:

#### Linealidad

Ésta se determinó mediante la construcción de una curva estándar de concentración (x) en función de la absorbancia (y). Se utilizaron cinco concentraciones diferentes preparadas a partir de una misma solución estándar, y se efectuó un análisis por triplicado para cada dilución.

Con los datos obtenidos se calcularon el coeficiente de correlación r y el coeficiente de determinación r<sup>2</sup>, así como los otros parámetros de regresión. Se tomaron como criterios de aceptación r ≥ 0.99 y r<sup>2</sup> ≥ 0.98.

#### Precisión

Se determinó mediante el análisis por sextuplicado del contenido de ácido fólico en una muestra de frijol. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación (CV en por ciento). El criterio de aceptación es CV < 3%.

#### Exactitud

Se estableció mediante la adición de cantidades conocidas del estándar a los extractos de la muestra de frijol negro *Jamapa*. Se usaron dos concentraciones de ácido fólico (3.5 y 18.62 mg / mL), y cada una se evaluó por sextuplicado mediante la realización del análisis completo. Luego, se comparó con el extracto de frijol negro *Jamapa* sin adicionar, de tal manera que se calculó el por ciento de recuperación. Criterio de aceptación: 95 a 105 por ciento de recuperación y CV 3%.

#### Límite de detección y cuantificación

Se realizó una serie de 5 diluciones a partir de la concentración más baja de la curva patrón (5 µg de ácido fólico / mL) y se evaluó la respuesta. Se observó hasta qué concentración dio respuesta de absorbancia el espectrofotómetro.

#### Estabilidad del extracto

Se determinó por medio del monitoreo del contenido de ácido fólico en el extracto de la muestra de frijol a diferentes tiempos. El procedimiento fué como sigue:

1. Se realizó la extracción del ácido fólico de la muestra de frijol y se llevó a cabo el análisis (tiempo = 0).
2. Se almacenó el extracto en condiciones de refrigeración normal (4 °C) (1 semana).
3. Se realizó el análisis para cada uno de los extractos en las mismas condiciones de operación de acuerdo con lo establecido en el método analítico a las 24 h, 48 h, 72 h y a la semana. Criterio de aceptación: el extracto es estable si no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos del contenido de ácido fólico al cabo de los diferentes intervalos de muestreo (ANOVA de una vía, p < 0.01).

## Resultados y discusión

### Composición proximal de las muestras de estudio

Como se observa en la Tabla 1 las muestras de guaje, frijol negro *Jamapa*, salvado de trigo y *All Bran*® destacan por su alto contenido proteínico. Respecto al contenido de cenizas, éste se concentra en las partes externas del grano de arroz (salvado y cascarilla), así como en la muestra de salvado de trigo. El guaje también destaca por su contenido de cenizas. Las muestras mencionadas anteriormente son las que presentan mayor cantidad de fibra, de las cuales la cascarilla de arroz tiene el valor más alto. Cabe señalar que las muestras con un contenido de grasa mayor de 3% se desengrasaron para

**Tabla 2.** Porcentaje de recuperación de ácido fólico para evaluar la exactitud.

Frijol <i>Jamapa</i>	% ácido fólico	% recuperación
Blanco	1.09	—
Extracto de frijol	1.37	95.75
+ 3.5 mg de sol. Std	1.37	95.25
"	1.39	96.79
"	1.38	95.98
"	1.38	96.21
"	1.37	95.72
Blanco	1.08	—
Extracto de frijol	2.84	96.32
+ 18.62 mg de sol. Std	2.87	97.51
"	2.87	97.56
"	2.88	97.92
"	2.85	97.62
"	2.87	97.43

analizarlas. Estas muestras fueron la galleta de salvado, el salvado de arroz y el de trigo y el guaje.

### Validación del método de Frühbeck

#### Linealidad

Se encontró que existe una relación lineal entre la cantidad presente de estándares (5 a 50 µg de ácido fólico / mL) y la respuesta observada (absorbancia), con un coeficiente de correlación  $r$  de 0.9997 y  $r^2$  igual a 0.9995. Así se confirma que cumple con los criterios de linealidad del método según la Fig. 1.

#### Precisión

El método cumple con el criterio de precisión para cuantificar el ácido fólico debido a que el coeficiente de variación es menor de 3%.

#### Exactitud

Los promedios de recuperación obtenidos son mayores al 95 % (96.68 %) y dado que los coeficientes de variación son menores que 3 % se puede decir que el método analítico es suficientemente exacto (Tabla 2).

#### Límite de detección y de cuantificación

En los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 3, se observa que el límite de cuantificación para el ácido fólico es de 5 µg de ácido fólico / mL y el límite de detección es de 2.5 µg de ácido fólico / mL. Las concentraciones inferiores a las mencionadas ya no dan respuesta bajo las condiciones establecidas.

#### Estabilidad de la muestra

Al realizar el análisis estadístico de ANOVA para los datos obtenidos del estudio de estabilidad se observa que el contenido de ácido fólico en las muestras permanece estable durante una semana de almacenamiento en refrigeración normal (Tabla 4).

**Tabla 3.** Límite de detección y de cuantificación de los estándares de ácido fólico.

µg de ácido	Absorbancia Muestra 1	Absorbancia Muestra 2	Absorbancia Muestra 3
5.000	0.028	0.030	0.027
2.500	0.024	0.011	0.010
1.250	—	0.012	—
0.625	0.002	—	—
0.312	—	—	—
0.250	—	—	—

**Tabla 4.** Contenido de ácido fólico en frijol negro *Jamapa* almacenado en condiciones de refrigeración normal (g / 100 g de muestra).

Muestra	T0	24 h	48 h	72 h	1 semana
1	1.05	1.02	1.05	1.04	1.05
2	1.05	1.03	1.01	1.01	1.05
3	1.06	1.01	1.02	1.05	1.05
4	1.04	1.02	1.03	1.04	1.04
5	1.03	1.02	1.01	1.02	1.01
6	1.04	1.05	1.01	1.03	1.02
Promedio	1.04	1.03	1.02	1.03	1.04

Por lo que se refiere al contenido de ácido fólico determinado por el método de Frühbeck, (Fig. 2) las muestras de los salvados de trigo y arroz presentaron los valores porcentuales más altos, 3.69 y 2.53, respectivamente. Esto coincide con lo mencionado por algunos autores, ya que esta sustancia se concentra en las capas externas del grano [7]. Esta tendencia se observa en los datos, sobre todo en las diferentes fracciones estudiadas del grano de arroz, ya que durante la molienda se obtuvieron por separado las fracciones del salvado y cascari-lla, que es en donde se concentra el ácido fólico, mientras que el endospermo (arroz pulido) tiene una cantidad mínima. El valor de 1.86 % encontrado para la muestra de *All Bran*® es superior al que dio a conocer Yoon et al. [31], así como para el caso de la muestra de arroz pulido (0.28 %). Para la muestra de frijol negro *Jamapa*, en la revisión que hizo Lolas [4] se informa un contenido de ácido fólico de 0.54 a 1.58, intervalo en el que se sitúa el valor encontrado para esta muestra (1.04). Cabe agregar que para la muestra de guaje no existen valores publicados respecto al contenido de ácido fólico, pero el valor encontrado está dentro del intervalo que dan a conocer varios autores para el contenido de ácido fólico en leguminosas (alrededor de 1 %). Es importante señalar que el contenido de ácido fólico en cereales y leguminosas está influido por varios factores, como la variedad del grano, zona de cultivo, calidad de molienda, etc. [16], por lo cual en un mismo tipo de muestra pueden existir valores diferentes.

En el presente estudio se incluyeron muestras de alimentos procesados. En el caso de la galleta de salvado no se encontró ácido fólico, lo cual puede deberse a la hidrólisis del

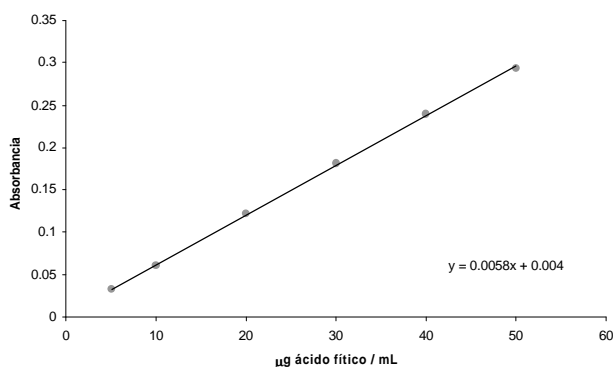


Fig. 1. Curva patrón de ácido fítico. Método de Frühbeck.

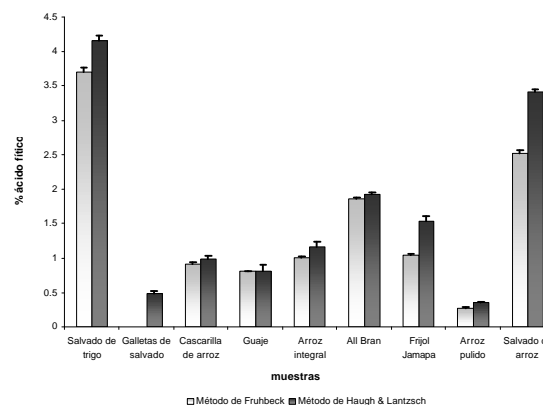


Fig. 2. Comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos.

ácido durante el procesado de la misma [32, 33]. En el caso de la muestra de *All Bran*® se esperaba un contenido similar al del salvado de trigo, ya que este producto está elaborado principalmente con este cereal; sin embargo, el valor encontrado es casi la mitad del contenido encontrado en el salvado de trigo, lo que quizá se debe también a que durante el proceso se haya hidrolizado parte del ácido fítico, que puede haberse convertido en inositol. Los resultados obtenidos por el método comparativo de Haug & Lantzsch presentan valores mayores para todas las muestras evaluadas y, de acuerdo con el análisis estadístico de la *t* de *Student*, se encontró que existe diferencia significativa entre ambos métodos. En general, se puede observar la misma tendencia en cuanto al contenido de ácido fítico en los alimentos evaluados. No obstante, existen diferencias importantes en los resultados obtenidos. La más notoria es el caso de la muestra de galleta de salvado, la cual con el método comparativo presenta un contenido de 0.48, en tanto que con el método de Frühbeck no se encuentra ácido fítico. Esta diferencia, como ya se mencionó, se debe probablemente a que durante el proceso, en especial cuando se requiere un tratamiento térmico prolongado, se forman a partir del ácido fítico moléculas de inositol con menor número de fosfatos que en el método de Frühbeck, las cuales se eliminan al pasar por la columna de reserva, en tanto que por el método de Haug y Lantzsch se incluyen en la determinación.

Entre los resultados de ambos métodos pueden observarse diferencias significativas en particular para las muestras de salvado de trigo, salvado de arroz, frijol *Jamapa* y arroz integral. Sin embargo, la diferencia fue menor para las muestras de cascarilla de arroz, guaje y arroz pulido, considerando que tal diferencia podría deberse a que la molécula de ácido fítico en dichas muestras presenta un grado mínimo de hidrólisis.

Si se considera que en la técnica de Frühbeck hay que purificar antes los extractos del ácido fítico en una columna de intercambio iónico y ajustar el pH en las diferentes etapas críticas, como extracción, purificación y determinación, dicho método requiere más tiempo y su ejecución se vuelve más compleja. Sin embargo, gracias a estos pasos se obtiene una

mejor especificidad en la determinación. El método comparativo de Haug y Lantzsch, es más rápido, menos complicado y utiliza menor cantidad de muestra, pero es menos específico.

El proceso de purificación en columna de resina de intercambio iónico también se puede utilizar cuando se mide solamente el ácido fítico por HPLC (IP<sub>5</sub> y IP<sub>6</sub>). Otro punto importante es que el método publicado por Frühbeck se aplica a leguminosas, y en este trabajo se comprueba que también se puede usar para las muestras de cereales y los alimentos procesados.

### Conclusiones

- Se validó el método de Frühbeck. El método es lineal, preciso y exacto para las concentraciones estudiadas.
- Existe diferencia significativa entre los resultados de ambos métodos para determinar ácido fítico.
- Con el método de Haugh & Lantzsch (1983) se obtienen valores sobreestimados sobre todo en alimentos procesados.
- Es de gran utilidad la purificación a través de la columna de intercambio iónico para la determinación específica del ácido fítico en alimentos.

### Agradecimientos

Este trabajo fue desarrollado con el apoyo recibido de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) IN202998.

## Referencias

1. Maga, J.A. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 1-9.
2. Cheryan, M. *Phytic acid interactions in food systems CRC: Critical Reviews in Food Sci. And Nutrition*, **1980**, 297-335.
3. Kasim, A.B.; Edwards, H.M. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *76*, 1-9.
4. Lolas, G.M.; Markakis, P. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 13-15.
5. Reddy, N.R.; Pierson, M.D. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 109-112.
6. Oberleas, D. Toxicans occurring naturally in foods. National Academy of Sciences. USA. **1973**, 363-371.
7. O'Dell, B.L.; De Boland, A.; Koirtiyohann, S.R. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 718-721.
8. Sandberg, A.S.; Svanberg, U. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 1330-1333.
9. Concon, J. *Food toxicology*. Part A: principles and concepts. Marcel Dekker, Inc. USA, **1998**, 411-416.
10. Carnovale, E.; Lugaro, E.; Lombardi-Boccia, G. *Cereal Chem.* **1988**, *65*, 11-117.
11. Erdman, J.W. *J. Am. Oil Chem. Sci.* **1979**, *56*, 736-741.
12. Martínez, C.; Ros, G.; Periago, M.J.; López, G.; Ortuño, J.; Rincón, F. *Food Science And Technology International.* **1996**, *2*, 201-209.
13. Phillippy, B.Q.; Johnston, M.R.; Tao, S.H.; Fox, M.R. *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 496-499.
14. Lehrfeld, J.; Morris, E.R. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2208-2210.
15. Sandberg, A.S.; Carlsson, N.G.; Svanberg, U. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 159-161.
16. Dintzis, F.R.; Lehrfeld, J.; Nelsen, T.C.; Finney, P.L. *Cereal Chem.* **1992**, *69*, 577-581.
17. Xu, P.; Price, J.; Aggett, P.J. *Prog. Food and Nutr. Sci.* **1992**, *16*, 245-262.
18. Thompson, D.B.; Erdman, J.W. *J. Food Sci.* **1982**, *47*, 513-517.
19. Makower, R.U. *Cereal Chem.* **1970**, *47*, 288-295.
20. Oatway, L. Phytic Acid: A Literature Review, marzo de **2000**, en: <http://www.agric.gov.ab.ca/ministry/pid/fcdc/oatway.html>
21. Ruiz de Lope, C.; García-Villanueva, R.J. *Anales de Bromatología*, **1982**, *34*, 9-12.
22. Sandberg, A.S.; Ahderinne, R. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 547-550.
23. Lee, K.; Abendroth, J.A. *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 1344-1345, 1351.
24. Harland, B.F.; Oberleas, D. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **1986**, *69*, 667-670.
25. Rounds, M.A.; Nielsen, S.S. *Journal of Chromatography.* **1993**, *653*, 148-152.
26. AOAC. Official methods of analysis. 13<sup>th</sup> ed. Washington DC: Associations of Official Analytical Chemists, **1980**.
27. Haug, W.; Lantzsch, H.J. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34*, 1423-1426.
28. Frühbeck, G.; Alonso, R.; Marzo, F.; Santillán, S. *Analytical Biochemistry.* **1995**, *225*, 206-212.
29. Brittain, H.G. *Journal of Validation Technology* **1997**, *3*, 275-279.
30. Asociación Farmacéutica Mexicana. Seminario de Validación. AFM. México, **1998**, 1-7.
31. Yoon, J.H.; Thompson, L.U. *Am. J. Clin. Nutr.* **1983**, *38*, 835-842.
32. Vaintraub, I.; Laptewa, N. *Analytical Biochemistry* **1988**, *175*, 227-230.
33. Khan, N.; Zaman, R.; Elahi, M. *J. Agric. Food Sci.* **1986**, *34*, 1010-1012.