

## Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas

Beatriz Martínez Domínguez, M<sup>a</sup> Victoria Ibáñez Gómez y Francisco Rincón León

Universidad de Córdoba-Córdoba, España

**RESUMEN.** Este artículo proporciona una revisión del estado actual de los conocimientos existentes sobre el ácido fítico (AF) en relación a varios aspectos. Se incluyen datos en relación a su estructura química y sus propiedades fisicoquímicas, su presencia en numerosos cereales y leguminosas y su papel en la planta. Además, se discuten otros aspectos como el significado nutricional del AF en relación a su capacidad de quelar proteínas y minerales, sus efectos beneficiosos para la salud y los métodos más comúnmente utilizados en su determinación.

**Palabras clave:** Acido fítico, antinutrientes, proteínas, mineral, biodisponibilidad, cereales, leguminosas, métodos de análisis.

**SUMMARY.** Nutritional and analytical implications of phytic acid. This review provides a current summary of the literature concerning various aspects of phytic acid. These include data relative to its chemical structure and physicochemical properties, its occurrence in numerous cereals and legumes, and its role in plants. In addition, the nutritional significance of phytate with regard to its protein and mineral binding abilities, its health benefits and the methods commonly used for the analysis of phytate are discussed.

**Key words:** Phytic acid, antinutrients, proteins, mineral, bioavailability, cereals, legumes, analytical methods.

### INTRODUCCION

El ácido fítico (AF) y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en semillas de cereales y leguminosas (1,2). Sin embargo, en esta forma el P permanece no disponible para el hombre y animales monogástricos (3,4), debido a que éstos no están provistos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato (5). El AF es además un compuesto con actividad antinutricional, debido a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales y proteínas (2,6) convirtiéndolos en no asimilables por el organismo bajo condiciones fisiológicas (7-9). Paradójicamente, el AF, a bajas dosis, presenta también efectos positivos sobre la salud como son su acción protectora frente al cáncer, reducción de la formación de cálculos renales y prevención de enfermedades cardiovasculares (10).

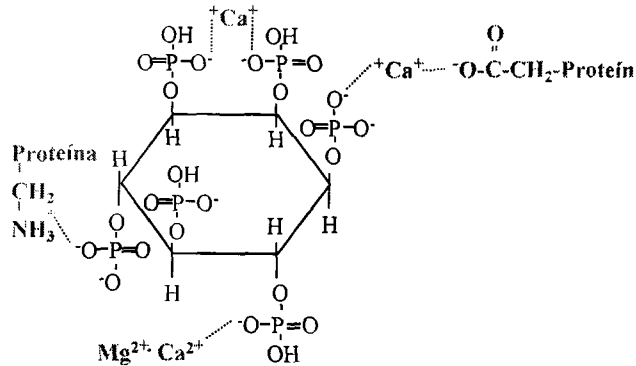
En los últimos años, la divulgación dada a los potenciales efectos beneficiosos de dietas bajas en grasas y con alto contenido de fibra, ha supuesto un fuerte empuje en el uso de leguminosas y semillas en grano en la alimentación humana (11). Estos cambios en los hábitos alimentarios hacia una alimentación rica en fibra han conducido a una mayor ingesta de fitatos en la dieta (12). No obstante, es importante considerar que durante el procesado de los alimentos y la digestión, la cantidad final de AF disminuye significativamente (13) como consecuencia de su hidrólisis, enzimática o química, en inositol fosfatos con un menor grado de fosforilación (InsP5 - InsP) (2,14). Uno de los principales

problemas encontrados en la interpretación de los datos existentes sobre el AF en la bibliografía es el derivado de la variabilidad de resultados asociada a la utilización de diferentes procedimientos analíticos para su determinación. En la actualidad, dado que los efectos del AF y sus derivados desfosforilados en la nutrición humana son diferentes, aquellos métodos que permiten su separación son considerados los más adecuados (2,14).

### Estructura química y propiedades

Se han propuesto varios modelos para la estructura del AF. Según el modelo propuesto por Anderson (15), el AF sería una molécula con seis grupos ortofosfato (InsP6), de nombre químico *myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexaquis (dihidrógeno fosfato) (16-18). Según esta estructura, el AF, a pH neutro y al pH que normalmente presentan los alimentos, es una molécula cargada negativamente y por tanto muy reactiva, por lo que presenta una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas (19). La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes la interacción es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato: éstos pueden unirse bien a un sólo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfato de distintas moléculas de AF (Figura 1) (18,20). En la semilla el AF se encuentra como una mezcla de sales con varios cationes como K, Mg, Ca, Mn, Zn y Fe (21); el término fitina se ha empleado para designar una mezcla de sales de Ca y Mg del AF (22,23).

FIGURA 1  
Interacciones del AF con proteínas y minerales (18)



La "insolubilidad" del AF es la principal causa de su comportamiento antinutricional y de sus propiedades fisicoquímicas (16,24). Sin embargo, es importante considerar que la solubilidad de las sales del AF varía con el pH, ya que el grado de protonación de los grupos fosfato que no se han unido a los metales está en función de dicho parámetro (25). Aparentemente, en la semilla el AF se encuentra como sales relativamente solubles de Na o K más que como fitina insoluble (26). Las sales de Ca y Mg son solubles a pH bajos e insolubles a pH elevados, por lo tanto a pH fisiológico serían insolubles, de ahí el descenso de la biodisponibilidad mineral. En general, las sales hidrogenadas y monovalentes del AF son solubles en agua, mientras que las sales metálicas divalentes y trivalentes son bastante insolubles (27).

El grado de interacción entre AF y proteínas es dependiente de la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con minerales a un pH dado (18,28,29). A bajo pH, por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el AF negativamente. En estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas, y ésteres fosfato aniónicos del AF, formándose un complejo binario (16, 18) (Figura 1). A pH intermedio, por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, dado que la carga de las proteínas al igual que la del AF es negativa, su interacción sería imposible, sin embargo si puede realizarse a través de la formación de un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca<sup>2+</sup> o el Mg<sup>2+</sup> (Figura 1). Esta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo imidazol desprotonado de la histidina, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos (18). A pH intermedio también pueden existir algunos complejos binarios, ya que a dicho pH los residuos lisil y arginil de las proteínas están aún cargados positivamente. A pH elevado la interacción entre las proteínas y el AF disminuye, los grupos lisil y arginil

pierden su carga, y por tanto su capacidad de formar complejos binarios. Los complejos ternarios se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta a pH elevado; un incremento en la concentración del ión Na hace que la reacción de equilibrio del complejo ternario se desplace hacia la derecha liberándose fitato cálcico insoluble y proteína-Na soluble (Figura 1) (16,18). Como hemos visto la formación de complejos entre AF y proteínas no sólo afecta a la solubilidad y propiedades funcionales de las mismas, sino que también tiene una gran influencia en la biodisponibilidad mineral (30). Además, el AF puede unirse también al almidón, bien directamente a través de puentes de hidrógeno o indirectamente mediante las proteínas a las que se asocia (29).

### Distribución, localización y contenido

El AF se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal. En la mayoría de las plantas una gran proporción de P (80%) está presente en forma de fitato (6,31), especialmente en aquellas semillas en las que el AF se encuentra en concentraciones elevadas, desde 1-7% (2,32). Así, en las semillas de cereales, oleaginosas y leguminosas los niveles de AF son elevados y constituyen el mayor porcentaje (60-82%) del P total; varias raíces y tubérculos presentan cantidades moderadas de AF, siendo el P fítico el 21-25% del total, mientras que en verduras las cantidades de AF encontradas son muy pequeñas (5,33).

En cereales el P fítico constituye el 64-85% del P total (33), localizándose la mayoría del AF en aleuronas celulares (21,34). Los niveles de AF (g/100g) encontrados en el arroz entero (*Oriza sativa*) oscilan desde un 0,86-0,99%, localizándose el 80% del fitato en la capa externa del salvado; en el trigo (*Triticum aestivum*) la localización es similar a la del arroz y los valores mayores: 1,13%; en el maíz (*Zea mays*) el AF representa de 0,77-0,99%, y de éste más del 90% se encuentran en el germen (16,33,35). En el sorgo (*Sorghum vulgare*) se han encontrado valores de 0,82-0,96% siendo los niveles de AF mayores en las variedades coloreadas (33). En la cebada (*Hordeum vulgare*) y en la avena (*Avena sativa*) los niveles de AF obtenidos son del 0,99% y 0,77%, respectivamente (16).

En la mayoría de las semillas de leguminosas el P fítico constituye aproximadamente el 80% del P total, y se localiza fundamentalmente en el cotiledón y ejes embrionarios (36). Estructuralmente su localización no es bien conocida; según algunos autores está integrado con el cuerpo de proteínas formando complejos con proteínas o minerales (2), sin embargo otros investigadores han indicado que en judías más del 70% del fitato se encuentra en formas solubles en agua, posiblemente combinadas con proteínas solubles, más que como fitina insoluble (9,37). En habas (*Vicia faba*) los niveles de AF oscilan entre 0,71-1,15% (38), localizándose

fundamentalmente en el cotiledón, mientras que la cáscara contiene tan sólo del 0,06-0,20% del AF (39). El contenido de AF del guisante (*Pisum sativum*) es del 0,75-0,94% (38). En el frijol de vaca (*Vigna unguiculata*) el AF constituye un 0,77% (35). En lentejas (*Lens culinaris*) y garbanzos (*Cicer arietinum*) los niveles de AF son similares, aproximadamente un 0,7% (33).

En la soja (*Glycine max*) el AF constituye el 1,5% del peso total del cotiledón, y un gramo de soja contiene aproximadamente 4 mg de fitato que representan el 57% del P orgánico y el 70% del P total, este fitato se encuentra uniformemente distribuido en el cotiledón, probablemente como fitato potásico soluble (16, 40, 41). En otras semillas oleaginosas, como girasol (*Helianthus annuus*), cacahuete (*Arachis hypogaea*) y algodón (*Gossypium herbaceum*), el AF se encuentra en subestructuras de tipo cristaloides o globoide que al parecer no existen en la soja (16). En general, en las harinas de semillas oleaginosas el P fítico es el 60-77% del total, siendo los niveles de AF muy elevados, desde 1,7% en la harina de cacahuete hasta 4,8% en la de semilla de algodón (16,33).

#### **Función fisiológica en la planta**

Entre las funciones fisiológicas que se le han atribuido al AF se encuentran: depósito de P, depósito de energía, fuente de cationes o iniciador de la latencia (16). Además, algunos metabolitos procedentes del *myo*-inositol y del inositol monofosfato (InsP) juegan un papel importante en el desarrollo de la planta (42). Raboy *et al.* (43,44) han realizado una descripción detallada de la síntesis y metabolismo del AF y los *myo*-inositol fosfatos en la planta.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto un incremento en la acumulación de AF con la maduración de la semilla. Aunque dicha acumulación ha sido interpretada por algunos autores como una manera de prevenir niveles excesivamente altos de P inorgánico durante la maduración, la mayoría coincide en que su función principal es el almacenamiento de P (24). En la semilla, el AF constituye el principal almacén de P inorgánico, en forma de fosfatos y *myo*-inositol, así como de determinados cationes, como el  $Mg^{2+}$  que son movilizados durante la germinación para la síntesis de ácidos nucleicos (23,33,45), además el *myo*-inositol es un importante precursor de los polisacáridos de la pared celular (46) y de fosfolípidos incluidos en la señal de transducción (47). Por otro lado, la capacidad antioxidante del AF hace que éste contribuya a aumentar el tiempo de latencia de la semilla, ya que previene la peroxidación de lípidos (48), y se ha visto que inositoles metilados participan en la osmoprotección en plantas halofílicas (49).

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

que participan numerosos genes (50, 51). Altas concentraciones de AF en semilla de soja aparecen como paralelas a mayores concentraciones de P en la hoja, y ambas están relacionadas de una manera compleja determinada tanto por factores ambientales (influyen en la cantidad de P disponible), como genotípicos (influyen en la absorción de P), de modo que determinan el suministro de P durante la germinación (52).

Numerosos investigadores han encontrado una reducción del AF durante la germinación en las semillas de leguminosas, aparentemente como resultado de un elevado aumento de la actividad fitasa (14,30,53-56). La enzima fitasa (*myo*-inositol-*hexakis*fosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), que cataliza la hidrólisis del AF en *myo*-inositol, *myo*-inositol fosfatos y fosfatos inorgánicos (21) está ampliamente distribuida en plantas, tejidos animales y en numerosas especies de mohos (9,57). Las semillas presentan tanto actividad fitasa constitutiva, así como enzimas fitasa que son sintetizadas "de novo" durante la germinación (58). La actividad fitasa intrínseca depende del tipo de alimento vegetal que se considere (59), no obstante la mayoría de las fitasas de las semillas se encuadran dentro de las fosfatasas ácidas no específicas, teniendo un pH óptimo de 4-5.6. Por el contrario la actividad fitasa adicional, que se localiza a nivel subcelular en el cuerpo de proteínas en aleuronas de cereales y está asociada a las membranas de los orgánulos corpusculares de almacenamiento de fitina, se produce a pH alcalino (46).

#### **Significado nutricional y fisiológico**

El AF se encuentra en los alimentos en niveles del 0,1-6% (60,61), dependiendo su concentración de la parte de la planta que se consuma: en semillas los niveles son elevados, en tubérculos, raíces y frutas moderados, y en verduras bajos (33). En países subdesarrollados y en vías de desarrollo, así como en la población vegetariana de países desarrollados, el consumo de alimentos con altos niveles de AF es muy elevado (1,62,63). El consumo medio de AF en la dieta se ha estimado en 0,75-0,79 g/persona/día, siendo estos niveles 2 ó 3 veces mayores en países en vías de desarrollo como la India (62).

#### **Efectos antinutricionales**

Los fitatos reducen la biodisponibilidad mineral e inhiben enzimas proteolíticas y amilolíticas (62,64). A pesar de que la naturaleza exacta y el grado de unión del AF a minerales y proteínas son difíciles de determinar, y su papel en la nutrición es complejo (65), sí está claro que altos niveles de AF en la dieta están asociados con efectos nutricionales adversos en el hombre (62).

#### **Efectos en la proteína**

La interacción del AF con las proteínas ha sido ampliamente estudiada, principalmente en soja, sin embargo

su naturaleza no es totalmente conocida y los efectos antinutricionales en la disponibilidad de dichas proteínas no están aun claros (26,38).

La existencia de una correlación negativa ( $p < 0,05$ ) entre el AF y la digestibilidad proteica ha sido puesta de manifiesto en varios alimentos (64,66-69). Sin embargo en varios estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre el efecto del fitato en la digestibilidad de las proteínas queladas y la absorción de aminoácidos, el efecto adverso del fitato es o muy pequeño o nulo (70-73). Anderson (74) ha revisado la interacción entre AF y proteínas, encontrando resultados discordantes en los experimentos *in vivo* en lo referente a ingesta de fitato y digestibilidad proteica. La causas de estas discrepancias puede ser la diferente naturaleza de la fuente de proteínas (38). Otros investigadores han atribuido el efecto negativo de los fitatos en el metabolismo proteico más que a la formación de un complejo fitato-proteína a la capacidad de inhibir enzimas digestivas (26). Es conocido que el AF inhibe  $\alpha$ -amilasa de diferentes orígenes, tripsina, tirosinasa y pepsina (57). Que el fitato inhiba enzimas como la pepsina no es extraño, ya que al pH ácido al cual ésta es activa se promueven fuertes uniones electrostáticas entre ambos; lo mismo ocurre con aquellas enzimas que tienen un pH óptimo ácido (26). A diferencia de lo que ocurre con la pepsina, la interacción con la tripsina y la quimiotripsina no sólo depende del pH, sino también de otros factores entre los que se encuentra la relación proteína/fitato. A pH 3 el fitato forma complejos insolubles tanto con la tripsina como con la quimiotripsina, sin embargo a pH 7,8, en el que la actividad de estas enzimas es algo mayor, es necesario el  $\text{Ca}^{2+}$  para la formación estos complejos, no obstante las condiciones a la que se producen fuertes interacciones rara vez se dan *in vivo* (26). Varios estudios han mostrado claramente que aunque la digestibilidad de la proteína, y por lo tanto la absorción de aminoácidos, es solamente marginalmente mayor en dietas con bajo contenido en fitato, las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas (75-77).

Una cuestión clave a tener en cuenta para entender el efecto antinutricional del AF sería conocer cuanto fitato está aun disponible tras el procesado. Si consideramos la fuerte afinidad del AF hacia varios cationes y el tipo de interacciones que supone su asociación con proteínas de la dieta, así como el efecto del procesado de los alimentos, la degradación térmica de los ésteres inositol y el pH, habría que esperar que quedara poco fitato libre que interaccionara con enzimas y sistema digestivos para causar una influencia significativa (26). Por otro lado hay que tener en cuenta que estudios anteriores han mostrado que en presencia de minerales como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , la inhibición *in vitro* de las enzimas podría ser mucho menor (78). Existen también evidencias de que el complejo fitato-proteína es menos susceptible a la digestión proteolítica que la proteína sola, sin embargo es lógico que

las proteínas en las cuales alguna cadena lisil o arginil están queladas por el fitato, no sean efectivamente hidrolizadas por la tripsina, en estas condiciones serían más efectivas enzimas como la quimiotripsina que muestra gran afinidad por las cadenas hidrofóbicas (26).

Dado que la interacción fitato-proteína y su efecto en la digestibilidad proteica se produce bajo una amplia gama de condiciones, y tanto las condiciones simuladas *in vivo* como los resultados obtenidos son limitados, el estudio de los efectos adversos de los fitatos en la nutrición debería ser dirigido exclusivamente hacia el punto de vista de la biodisponibilidad mineral (26).

### Efectos en la biodisponibilidad mineral

Por su estructura altamente reactiva, el AF es un excelente agente quelante presentando gran afinidad por todos los elementos trazas polivalentes y minerales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (6,40,45,79-82). La mayor parte de los estudios realizados sobre la interacción entre el fitato y los minerales ponen de manifiesto la existencia de una relación inversa entre la absorción de estos micronutrientes y el AF, aunque existen grandes diferencias en el comportamiento individual de cada elemento mineral (16).

Los efectos adversos del AF en la biodisponibilidad mineral dependen de un gran número de factores entre los que se destacan la concentración de AF y la fuerza de su unión con los diferentes minerales (29). También influyen otros factores como (16,29,83-86): (a) las condiciones de procesado del alimento (especialmente el pH), así como el tipo de AF (añadido o endógeno) y la concentración de minerales en dicho alimento, (b) si el AF es ingerido en la misma comida que la fuente mineral o en comidas separadas, (c) la concentración de proteínas de la dieta, y por tanto la presencia de proteínas, péptidos o aminoácidos en el intestino que pueden interferir en la formación del complejo fitato-mineral, (d) la presencia de otros agentes quelantes como fibra dietética, ácido oxálico, ácido ascórbico, ácido cítrico o taninos, que pueden competir con el AF en su unión con minerales, (e) la presencia de fitasa de origen intestinal, bacteriana o de la dieta, así como la inhibición de dicha enzima, y (f) la adaptación metabólica del individuo a altos niveles de AF. Zhou y Erdman (2) y Plaami (87) han revisado el efecto del AF en distintos minerales.

### Calcio

Estudios realizados en el hombre indican que el AF reduce la absorción de Ca (88), y que la disminución del AF en la soja mediante mejora genética, supone un incremento en la biodisponibilidad de este mineral (89). Por el contrario, los resultados obtenidos en ratas son contradictorios: algunos estudios indican la existencia de un efecto inhibitor del AF

en la absorción de Ca (90,91), mientras en otros no se obtiene efecto significativo alguno (79,92-94). Por otra parte se ha sugerido que las ratas no pueden ser consideradas como un buen modelo para la absorción de Ca debido a la actividad fitasa de su mucosa intestinal, que en el hombre (si existe) no juega un papel importante en la digestión del AF (89).

Lonnerdal *et al.* (90) han indicado que el efecto inhibitor del fitato depende del grado de fosforilización del inositol, cuando es elevado (5 ó 6 fosfatos) la absorción del Ca y Zn es inhibida significativamente, sin embargo a niveles de fosforilización menor este efecto no se observa. La solubilidad de los complejos formados depende también de la razón fitato-Ca; así la solubilidad del complejo fitato-Ca, es extremadamente baja a razones 1/8, pero a otras es alta (81). Cuando el Ca está presente en concentraciones elevadas se forman complejos con 5 ó 6 cationes por molécula de fitato ( $[Ca]_5$ -fitato o  $[Ca]_6$ -fitato) (25). También pueden existir otros complejos que incluyen de uno a 4 cationes unidos a una molécula de fitato, dependiendo de la concentración de Ca presente; los complejos hexa-, penta-, tetra-, y tricalcio son insolubles mientras que los complejos mono- y dicalcio son solubles (95). No obstante, la absorción del Ca de los complejos solubles fitato-Ca es muy pobre, ya éstos que no sufren transporte pasivo en el intestino debido a la alta carga de estas moléculas (45). Por último, hacer notar que los complejos insolubles fitato-calcio son también considerados como los principales responsables de la reducción de la biodisponibilidad de otros minerales como Fe y Zn, a través de la unión de éstos al complejo fitato-Ca para formar un complejo aún menos soluble (2,86).

### Hierro

Debido al importante contenido de Fe de los cereales, la mayoría de los estudios sobre la interacción entre el AF y este mineral se han realizado con el pan integral, que al mismo tiempo vehicula el AF presente en la cubierta de la semilla. A la hora de evaluar los resultados de dichos estudios es importante tener en cuenta la adición de Ca, práctica habitual en la elaboración del pan, ya que estudios sobre el balance de nutrientes tanto *in vivo* como en investigaciones *in vitro* sugieren que la adición de calcio reduce la hidrólisis del AF (11), como consecuencia de que elevadas concentraciones de dicho mineral impiden la acción de las fitasas (96). Numerosos estudios realizados en el hombre indican que el AF tiene un fuerte efecto inhibitor en la absorción de hierro (97-99). Es conocido que el salvado es un importante inhibitor del Fe, y aunque según las investigaciones realizadas por Simpson *et al.* (100) este efecto no puede ser atribuido por entero al fitato, la mayoría de los estudios coincide en que es debido exclusivamente al AF y otros inositol fosfato presentes en el salvado y no a la presencia de fibra y otros constituyentes (2,97,99). Se ha demostrado en adultos que el

efecto negativo del AF en la absorción del Fe es dosis-dependiente, pudiéndose incrementar la biodisponibilidad del Fe mediante la adición de ácido ascórbico (2,101). El ácido ascórbico no sólo facilita la solubilización del Fe de la dieta, sino que además reduce el ión férrico a ferroso, que es más soluble, y forma complejos con éstos, impidiendo por tanto su unión al AF, estos complejos Fe-ascorbato siguen siendo solubles en el intestino delgado (102).

### Zinc

Numerosas investigaciones en animales de experimentación demuestran que el AF contenido en los alimentos reduce la biodisponibilidad del Zn (95,103). Los InsP6 y InsP5 son las formas de AF que ejercen este efecto, mientras que los fitatos con menor grado de fosforilación ejercen un bajo o nulo efecto en la absorción del Zn (104). Los resultados de estudios en el hombre también han demostrado que el AF presente en la dieta inhibe la biodisponibilidad del Zn, y que altos niveles de este antinutriente pueden dar lugar a una deficiencia de Zn (2). En España, las necesidades calculadas para este elemento sólo se cubren en un 68,3% (105), siendo considerado principal responsable el AF. Se ha sugerido la razón molar AF/Zn como indicador de la biodisponibilidad del Zn, y así valores de la misma mayores de 20 supondrían una disminución de la absorción de este mineral (106-108). Otros investigadores, considerando que el contenido de Ca en la dieta es de vital importancia en el efecto negativo del AF sobre el Zn (109), indican que para la predicción de la utilización del Zn sería más adecuada la razón fitato-Ca/Zn (85,110). Un aumento de la concentración de Ca en dietas que contienen Zn y fitato supone una reducción de la biodisponibilidad del Zn (95) debido a la formación de complejos insolubles Ca-fitato-Zn (2). A valores de la razón fitato-Ca/Zn mayores de 22 la utilización de Zn queda comprometida (106).

Por último señalar que cuando en un alimento confluyen diferentes constituyentes capaces de ejercer una acción antinutritiva frente a cationes, tal es el caso de oxalatos, taninos, fibra y AF, resulta complicado establecer un orden de importancia en cuanto a las fuerzas de unión que cada uno de ellos ejercen (111, 112). La mayoría de los alimentos que presentan elevado contenido de AF son también buenas fuente de fibra dietética, la cual tiene una gran afinidad por los minerales, y aunque los fitatos y la fibra son separados y evaluados independientemente en los distintos estudios, es difícil atribuir los efectos negativos en la biodisponibilidad mineral únicamente a los fitatos (33). Así pues, justificado el efecto negativo del AF sobre la biodisponibilidad mineral sería adecuada la selección genética de semillas con bajo contenido en AF, sin embargo aunque ésta supone un aumento de la eficiencia de utilización del P, lo cual es deseable,

implica una disminución de la toma de P hacia el interior del germen o la semilla que no es deseable. En cualquier caso, los programas de mejora genética han de estar dirigidos a reducir el contenido de P fítico, pero manteniendo el contenido total de P en la planta y en la semilla, así como otros constituyentes deseables (51,113).

### Efectos farmacológicos

Del AF a bajas concentraciones, ha sido descrita bibliográficamente la existencia de efectos positivos, entre los que se pueden citar: retardo de la digestibilidad del almidón y disminución de la respuesta a la glucosa en sangre, hipocolesterolemia, prevención de cálculos renales, control de la caries dental y cáncer, y mejora de la capacidad de captación de oxígeno de los glóbulos rojos (2,18,32,81,114). Estudios epidemiológicos y estudios en ratas sugieren también un posible papel preventivo del AF frente a diversas patologías cardíacas, derivado del control de la hipercolesterolemia y la arteriosclerosis en el hombre (2,115,116). También se ha indicado el papel del AF como antídoto frente a la intoxicación aguda por plomo, debido principalmente a su capacidad de unirse a minerales (29,32).

La adición de AF (en niveles de 0,2-9%) en la dieta de ratas reduce significativamente los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos (117). Esto parece estar relacionado con la capacidad del AF de unirse al Zn disminuyendo los niveles séricos de Zn y la razón Zn/Cu, ya que altos valores en esta relación tienden a predisponer al hombre a enfermedades cardiovasculares por implicar hipercolesterolemia (29). Además, posiblemente este efecto está también relacionado con la reducción de los niveles plasmáticos de glucosa y la concentración de insulina (116), la cual conduce a una disminución del estímulo para la síntesis hepática de lípidos (118).

Por otra parte el AF disminuye la velocidad de la digestión del almidón por los mismos mecanismos por los que ejerce su acción antinutrientes, esto es, puede unirse o bien directamente a la  $\alpha$ -amilasa inactivándola, o al Ca que es necesario para estabilizar la actividad amilasa, o al almidón, modificando así su grado de gelatinización o su accesibilidad para las enzimas digestivas, además influye en la respuesta sanguínea a la glucosa por producir retardo del vaciado gástrico (29).

Estudios realizados en animales y en el hombre han mostrado que la inclusión en la dieta del salvado de trigo supone un papel protector frente a diversos tipos de cáncer, especialmente de colon y mama, sin embargo en un principio no estaba claro si este efecto era debido exclusivamente a la fibra o a otros componentes como el AF (119). En este sentido, Jenab y Thompson (120) han observado que el AF presente en el salvado de trigo, así como el AF añadido a dietas con bajo contenido en fibra reduce la presencia de biomarcadores

del riesgo de cáncer. Además estudios realizados en ratas alimentadas con AF muestran una relación negativa significativa entre los niveles de AF (0,6-2,0%) y la proliferación de células epiteliales en el colon ascendente y descendente (121). El AF disminuye el riesgo de cáncer a través de varios mecanismos (29,32,122,123): (a) al unirse al Fe disminuye la formación de radicales libres durante la oxidación de los lípidos, ya que ésta es catalizada por dicho ion, (b) al unirse al Zn, que es necesario para la síntesis de ADN, reduce indirectamente la proliferación celular, (c) al retardar la digestión del almidón, éste puede llegar al colon y ser fermentado por las bacterias produciéndose ácidos grasos de cadena corta cuya actividad protectora frente al cáncer es conocida. Shamsuddin *et al.* (124, 125) han revisado el papel del AF sobre el cáncer, llegando a la conclusión de su papel no solo en la prevención sino también como agente terapéutico ya que los InsP6 incrementan la diferenciación de células malignas que a menudo resulta en una reversión al fenotipo normal (126). No obstante, el efecto del AF no es igual en todos los órganos: aunque se ha encontrado una reducción en la incidencia de nódulos hiperplásicos en el hígado, de carcinoma hepatocelular y de cáncer de mama (29,127), estudios realizados con distintos carcinógenos en esófago, intestino delgado, colon, riñones y tiroides muestran un efecto nulo del AF en la incidencia de cáncer en estos órganos (128).

En cuanto a la prevención de cálculos renales y tratamiento de la hipercalciuria, existen evidencias experimentales de que los inositol di- y trifosfato (InsP2, InsP3) son efectivos en la prevención de cristales de hidroxapatita *in vitro*, que son los que actúan como núcleo en la formación de cálculos (2, 129). Además estudios *in vivo* e *in vitro* y estudios clínicos, han mostrado claramente que el fitato juega un papel importante como inhibidor de la cristalización de sales cálcicas en los fluidos biológicos, siendo considerado una alternativa clara en el tratamiento de la litiasis renal (130).

### Métodos de análisis

Dado que el AF no tiene un espectro de absorción característico, y por tanto no existen reactivos específicos para su identificación, su determinación ha constituido un problema analítico durante mucho tiempo. Hasta 1980, el AF era exclusivamente determinado a través de métodos de precipitación no específicos o de intercambio iónico. En la actualidad, aunque algunos de los métodos anteriores siguen vigentes, el empleo de procedimientos en los que se incluyen HPLC de fase reversa, cromatografía de par iónico o RMN es común.

### Extracción del AF

En la extractabilidad del fitato presente en los distintos

alimentos y/o semillas influyen varios factores entre los que se encuentran (36,131): (a) la asociación del fitato con otros componentes, y por tanto la naturaleza de las proteínas y los cationes mono- y divalentes con los que el fitato se encuentra formando complejos, (b) el pH, (c) el tipo de solvente y fuerza iónica usada en la extracción, y (d) la presencia de Fe endógeno, que a altas concentraciones puede precipitar el fitato durante la extracción, y con ello producir un error por defecto en la cuantificación final.

Varios solventes han sido evaluados para determinar su especificidad en la extracción del AF. Los más comúnmente utilizados son el HCl (0,2 N, 0,5 N ó 0,65 N) (64,69,132-138) y el ácido tricloroacético diluido (TCA) (36,139-141). En la bibliografía también aparecen otros solventes como el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3% (131,139) y la solución HCl 1,2% / Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (131,142). Reddy y Salunkhe (36) han estudiado la eficiencia de diferentes solventes en la extracción en un tipo de judía (*Phaseolus mungo*), obteniendo extracciones más completas y mayores valores de AF con TCA al 3% que con HCl al 2%. Otros autores (141,143) también han observado, en judías y trigo, una baja solubilidad del fitato en HCl debida probablemente a la formación de complejos insolubles entre fitato y proteínas. Estudios realizados por Camire y Clydesdale (139) muestran resultados similares en la extracción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3% y con TCA al 3%. Plaami y Kumpulainen (131) han obtenido en cereales la misma efectividad utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3% y HCl al 2,4% (0,65 M), siendo ésta menor que la de la solución HCl 1,2% / Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%.

En cuanto a las condiciones de extracción, algunos autores han indicado que el uso de altas temperaturas (60 °C) implica extracciones más satisfactorias, obteniéndose extractos más claros, y además se previene el desarrollo de gas durante la formación del complejo fitato férrico en los métodos de precipitación con cloruro de hierro (143). No obstante, en la mayoría de los estudios la extracción se realiza a temperatura ambiente y con agitación continua, durante tiempos que oscilan de 0,5-3 horas, tras lo cual la suspensión obtenida es centrifugada y filtrada.

### Métodos de precipitación

Estos métodos están basados en el desarrollado por Heubner y Stadler (144), y la mayor parte de ellos incluyen la precipitación a bajo pH y la formación, en presencia de un exceso de ión férrico de un complejo Fe-fitato y la subsiguiente cuantificación del P, Fe o del inositol en el precipitado (71,131,141). En los casos en que la cuantificación final se realiza sobre el Fe, la concentración de P fítico es calculada usando una razón teórica Fe:P de 4:6 (139), en estos métodos es importante el lavado del precipitado obtenido ya que la presencia de SO<sub>4</sub><sup>=</sup> o Cl<sup>-</sup> en la extracción puede alterar la razón Fe:P (131). Una vez obtenido

el valor del P fítico, el cálculo del contenido de AF se realiza considerando el valor teórico 28,2% de P en la molécula de AF (22). Existen métodos indirectos en los que la cuantificación, ya sea del P (131,145) o del Fe residual (39) se realiza en el sobrenadante, y el AF es calculado por diferencia. Reddy *et al.* (54) han revisado los métodos de precipitación disponibles para la determinación del AF.

### Métodos de intercambio iónico

En estos métodos la etapa de precipitación es eliminada, la extracción del fitato se realiza directamente y la solución resultante es pasada a través de una resina de intercambio iónico, eluyendo primero el P, y posteriormente el fitato que es determinado por distintos procedimientos. El uso de una columna de intercambio aniónico fue introducido por Harland y Oberleas (135) que desarrollaron un método en el que una vez extraído el fitato con HCl 1,2%, el extracto obtenido es eluido a través de una resina de intercambio iónico para separar el P inorgánico. El fitato eluido es digerido con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HNO<sub>3</sub> concentrado, y el contenido de P liberado cuantificado colorimétricamente. El principal inconveniente de este método es que la etapa de digestión necesita una continua atención para minimizar las pérdidas producidas como consecuencia de una digestión incompleta o excesiva (137), se ha sugerido que si la digestión ácida no es completa las muestras sean introducidas en la mufla durante 8 horas a 535°C (1). Posteriormente, Latta y Eskin (137) desarrollaron un método más rápido y simple, basándose la reacción entre el ión férrico y el ácido sulfosalicílico. En éste, el AF es primero concentrado en una resina de intercambio aniónico, y una vez eluido el P inorgánico con NaCl 0,5 M se realiza la elución del fitato con NaCl 0,7 M. La concentración de fitato se determina colorimétricamente utilizando el reactivo de Wade (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O al 0,03% y ácido sulfosalicílico al 3%), utilizando como estándar fitato cálcico, que es previamente convertido en AF libre y determinado con el método de Harland y Oberleas (135), o bien fitato sódico que es soluble en agua por lo que no es necesaria su conversión en AF libre.

En la actualidad sigue vigente el método considerado como oficial por la A.O.A.C. (147) desarrollado por Harland y Oberleas (17). Estos autores considerando que el fitato en la planta se encuentra unido a proteínas y minerales, modificaron su método inicial (135) mediante la inclusión del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ajuste de los extractos a pH 7, para eliminar estas uniones y mejorar así la recuperación del fitato y la exactitud del ensayo. Así, el AF es extraído de la matriz del alimento con HCl al 2,4% y el extracto obtenido, una vez filtrado, es diluido con una solución de EDTA/NaOH y lavado a través de una columna de intercambio aniónico, donde la mayoría de las impurezas son eluidas fuera de la columna, mientras que el AF es retenido en la misma.

El principal inconveniente tanto de los métodos de precipitación como de los de intercambio iónico es la falta de especificidad, como consecuencia de la dificultad del ajuste de las condiciones de hidrólisis necesarias para que sólo determinados inositol fosfato (InsP6) sean liberados para su cuantificación (147). Por ello estos métodos son válidos para aquellos cereales y leguminosas que se encuentren en estado natural, ya que en ellos básicamente sólo hay AF (InsP6), no aconsejándose su uso en alimentos procesados, ya que éstos contienen también cantidades apreciables de isómeros del AF desfosforilados como InsP5, InsP4 e InsP3 y posiblemente InsP2 e InsP (148). Estos fosfatos son determinados también en los métodos de precipitación, y en los de intercambio iónico son retenidos en la columna y eluidos con el AF por lo que deberían de ser incluidos en el cálculo de AF (149,150), ya que si no los valores de AF obtenidos serían sobrestimados.

### Métodos cromatográficos

#### HPLC

Para solventar los inconvenientes encontrados en la determinación del AF con métodos de intercambio iónico numerosos investigadores han recurrido a la cromatografía, especialmente a la HPLC. Sin embargo debido a que los inositol fosfatos no tienen un espectro característico de absorción, su detección mediante análisis HPLC está limitada a métodos que emplean monitoreo del índice de refracción, determinación de productos de reacción postcolumna o detección indirecta, entre otros (151). En muchos de ellos la etapa inicial de obtención de los fitatos se realiza mediante intercambio iónico o precipitación. Así el método desarrollado por Graf y Dintzis (132) combina un método de intercambio iónico (135) con HPLC en una columna de  $C_{18}$ , la técnica utilizada por Camire y Clydesdale (139) se basa en la precipitación del AF como fitato férrico, seguida de su conversión en fitato sódico antes de ser inyectado en una columna de  $C_{18}$  de fase reversa, y en el método de Lehrfeld y Morris (149) la separación de los inositol fosfato se realiza según el método de Harland y Oberleas (17) y la solución resultante es concentrada y analizada por HPLC. Otros autores han mejorado el análisis con HPLC utilizando la cromatografía de intercambio iónico para separar los inositol fosfato, que son determinados con HPLC de par iónico con una columna de  $C_{18}$  fase reversa (152-154). Recientemente, Talamond *et al.* (155) han desarrollado un método HPLC con intercambio aniónico para la detección del AF en alimentos, empleando como sistema de detección la conductividad.

Entre las ventajas que presenta la HPLC en la determinación del AF hay que destacar que en estos métodos los distintos inositol fosfatos son determinados como entidades independientes, permitiendo la cuantificación de

InsP6 ó InsP5 en mezclas que incluso contienen todos los isómeros (149). La HPLC permite además la cuantificación de inositol fosfatos en presencia de nucleótidos, que en otros métodos de análisis pueden interferir en la determinación del AF (148). En los alimentos que contienen carne, pescado, extracto de levadura o cereales germinados, los nucleótidos se encuentran de forma natural, y en algunos alimentos procesados es común su adición como potenciadores del sabor. Por lo tanto en los alimentos procesados (los cuales generalmente contienen inositol parcialmente fosforilado como consecuencia de la hidrólisis del AF) la determinación del AF debería realizarse por HPLC (149).

#### Cromatografía iónica

Los métodos de cromatografía iónica para la determinación de AF están basados en el procedimiento de Fitchett y Woodruff (156) para medir polifosfatos en detergentes, usando el ión férrico como reactivo de derivación. Aunque en el método anterior se utilizaba inicialmente una longitud de onda de 330 nm para la detección, Phillippy y Johnston (138) observaron que el complejo fitato férrico presenta una absorbancia máxima a 290 nm. Estos autores desarrollaron un método de cromatografía iónica para determinar AF en alimentos, en el cual los extractos son directamente inyectados en la columna sin necesidad de una etapa previa de purificación. A pesar de que la reacción post-columna no es específica para los fosfatos, el fitato es eluido limpiamente en el último pico en el análisis de alimentos. El tiempo de retención del AF se determina a partir de la concentración del eluyente utilizado (normalmente  $HNO_3$ ), siendo las recuperaciones obtenidas con el procedimiento de las adiciones estándar del  $96 \pm 4\%$ . Mas recientemente, Skoglund *et al.* (157) han mejorado la separación de los InsP6-InsP y sus isómeros de posición, utilizando columnas de intercambio aniónico de elevada fuerza. En un trabajo anterior (158), para separar los inositol fosfato del extracto crudo, estos autores compararon el uso en un método de cromatografía iónica (HPIC) de dos sistemas de detección: reacción postcolumna más detección por UV (sistema 1) y detección de la pérdida de conductividad (sistema 2); los mejores resultados se obtenían cuando InsP2-InsP6 eran determinados en el sistema 1, que también separaba iones InsP4 y InsP5, pero las fracciones que contenían InsP-InsP3 eran transferidas al segundo sistema.

#### Otras técnicas

La falta de especificidad de los métodos de precipitación y de intercambio iónico llevaron a O'Neill *et al.* (159) a desarrollar una técnica de Resonancia Magnética Nuclear de  $^{31}P$  en modo Transformada de Fourier ( $^{31}P$  FT RMN) para la determinación de AF en alimentos. La RMN proporciona una elevada especificidad ya que el espectro RMN  $^{31}P$  del

fitato es muy característico, consiste en 4 señales que conducen a una relación 1:2:2:1 de una a otra en determinados rangos de pH (138). Los métodos desarrollados por Mazzola *et al.* (138), Ersöz *et al.* (140) y Wang *et al.* (24) para determinar la concentración de fitatos en la dieta están basados en esta técnica. En estos procedimientos, una vez realizada la extracción (con HCl o TCA), a la solución resultante se le adiciona EDTA y el pH se ajusta a 4,5 antes de su análisis mediante  $^{31}\text{P}$  FT RMN.

Plaami y Kumpulainen (131) utilizando la Espectrofotometría de Emisión Atómica-Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP-AES), han desarrollado dos métodos para la determinación de AF en cereales basándose en los métodos tradicionales. En el primero, el AF del extracto de la muestra es separado y concentrado mediante intercambio iónico y determinado como P utilizando ICP-AES. En el segundo método el AF extraído es primero precipitado con una solución de  $\text{FeCl}_3$ , el fitato férrico producido es transformado en hidróxido férrico mediante la adición de NaOH, y el fitato sódico soluble resultante es determinado cuantitativamente por ICP-AES. En ambos métodos tanto la digestión ácida como la determinación espectrofotométrica de P son eliminadas, lo que hace que estos métodos, además de ser más exactos, sean más rápidos y simples que los métodos tradicionales.

Recientemente March *et al.* (160) han desarrollado un método fluorimétrico para la determinación del AF en alimentos y muestras de orina humana, basándose en el hecho de que el AF ejerce un efecto activador en la reacción de oxidación de la 2, 2'-dipyridyl cetona hidrazona para dar un producto que presenta una alta fluorescencia.

## CONCLUSION

En las dos últimas décadas se han realizado importantes avances en el conocimiento del AF. Se han descrito nuevos papeles fisiológicos en la planta, y, en contraposición a los tradicionales efectos adversos en la dieta, se han descubierto nuevos beneficios para la salud; sin embargo, dado que la mayoría de los aspectos beneficiosos del AF son derivados de investigaciones *in vitro*, en animales o de estudios epidemiológicos, serían necesarias más investigaciones en el hombre que evaluaran conjuntamente los efectos adversos y los potenciales aspectos beneficiosos del AF de la dieta. Desde un punto de vista analítico, los métodos de análisis mediante precipitación han sido sustituidos por métodos más sensibles y exactos como HPLC,  $^{31}\text{P}$ FT NMP y ICP-AES.

## REFERENCIAS

- Wyatt CJ, Triana-Tejas A. Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca and phytates in foods commonly consumed in Northern

- Mexico. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 2204-209.
- Zhou JR, Erdman JW Jr. Phytic acid in health and disease. *C.R.C. Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35, 495-508.
- Petterson DF, Harris DJ, Rayner CJ, Blakeney AB, Choct M. Methods for the analysis of premium livestock grains. *Australian J Agric Res* 1999; 50: 775-87.
- Segueilha L, Moulin G, Galkzy P. Reduction of phytate content in wheat bran and glandless cotton flour by *Schwanniomyces castellii*. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 2451-454.
- Walsh GA, Power RF, Headon DR. Enzymes in the animal-feed industry. *Trends Food Sci Technol* 1994; 5: 81-87.
- Sugiura S H, Raboy V, Young KA, Dong FM, Hardy RW. Availability of phosphorus and trace-elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 1999; 170: 285-96.
- Bindu S, Somashekar D, Joseph R. A comparative-study on permeabilization treatments for in-situ determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. *Letters in Applied Microbiology* 1998; 27: 336-40.
- Liener IE. Implications of antinutritional components in soybean foods. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1994; 34: 31-67.
- Tabekhia MM, Luh BS. Effect of germination, cooking and canned on phosphorus and phytate retention in dry beans. *J Food Sci* 1980; 45: 406-08.
- Szkudelski T. Phytic acid-its influence on organism. *J Anim Feed Sci* 1997; 6: 427-438.
- Snider M, Liebman M. Calcium additives and sprouted wheat effects on phytate hydrolysis in whole wheat bread. *J Food Sci* 1992; 57 118-20.
- Harland BF, Oberleas D. Phytate in foods. *Wld Rev Nutr Diet* 1987; 52: 235-59.
- Khan N, Zaman R, Elahi M. Effect of processing on the phytic acid content of bengal grams (*Cicer arietinum*) products. *J Agric Food Chem* 1988; 36: 1274-276.
- Centeno C, Viveros A, Brenes A, Canales R, Lozano A, de la Cuadra C. Effect of several germination condition on total P, phytate P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in rye and barley. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3208-215.
- Anderson, RJ. Contribution to the chemistry of phytin. *J Biol Chem* 1914; 17: 171.
- Cheryan M. Phytic acid interactions in food systems. *C.R.C. Crit Rev Food Sci Nutr* 1980; 13: 297-35.
- Harland BF, Oberleas D. Anion exchange method for determination of phytate in foods: a collaborative study. *J AOAC* 1986; 69: 667-70.
- Thompson LU. Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *J AOCS* 1987; 64: 1712-717.
- Wang J. Improvement of citric-acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. *Bioresource Technol* 1998; 65: 243-45.
- Lott JNA, Greenwood JS, Batten GD. Mechanisms and mineral nutrient storage during seed development. En: *Seed Development and Germination*. J. Kigel, G. Galili. (Eds). Marcel Dekker, New York 1995; p. 215.
- Frossard E, Bucher M, Mächler F, Mozafar A, Hurrell R. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe,

- Zn, and Ca in plants for human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 861-879.
22. Bhatta RS, Slinkard AE. Relationship between phytic acid and cooking quality in lentil. *Can Inst Food Sci Technol. J* 1989; 22: 137-42.
  23. Yoshida KT, Wada T, Koyama H, Mizobuchifukuoka R, Naito S. Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of myo-inositol-1-phosphate synthase and phytin-containing particles during seed development in rice. *Plant Physiol* 1999; 119: 65-72.
  24. Wang CF, Tsay SM, Lee CY, Liu SM, Aras NK. Phytate content in taiwanese diet determined by <sup>31</sup>P Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1030-33.
  25. Nolan KB, Duffin PA, McWeeny DJ. Effects of phytate on mineral bioavailability. *In vitro* studies on Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Cd. Solubilities in presence of phytate. *J Sci Food Agric* 1987; 40: 79-85.
  26. Deshpande SS, Damodaran S. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *J Food Sci* 1989; 54: 695-99.
  27. Han, YW. Removal of phytic acid from soybean and cottonseed meals. *J Agric Food Chem* 1988; 36: 1181-83.
  28. Dua S, Mahajan A, Mahajan A. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. Toria) preparations by chemical modifications. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 706-10.
  29. Thompson LU. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res Int* 1993; 26: 131-49.
  30. Bau HM, Villaume C, Nicolas JP, Méjean L. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *J Sci Food Agric* 1997; 73: 1-9.
  31. Lolas M, Markakis P. Phytase of navy beans. *J Food Sci* 1977; 42: 1094-97.
  32. Graf E, Eaton JW. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Rad Biol Med* 1990; 8: 61-69.
  33. Ravindran V, Ravindran G, Sivalogan S. Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem* 1994; 50: 133-36.
  34. Lathia DN, Koch M. Comparative study of phytic acid content, *in vitro* protein digestibility and amino acid composition of different types of flat breads. *J Sci Food Agric* 1989; 47: 353-64.
  35. Marero LM, Payumo EM, Aguinaldo AR, Matsumoto I, Homma S. Antinutritional factors in weaning foods prepared from germinated cereals and legumes. *Lebensm Wiss u Technol* 1991; 24: 177-81.
  36. Reddy NR, Salunkhe DK. Interactions between phytate, protein, and minerals in whey fractions of black gram. *J Food Sci* 1981; 46: 564-70.
  37. Lolas GM, Markakis P. Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Agric Food Chem* 1975; 23: 13-15.
  38. Carnovale E, Lugaro E, Lombardi-Boccia G. Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem* 1988; 65: 114-17.
  39. Griffiths DW. The phytate content and iron-binding capacity of various field bean (*Vicia faba*) preparations and extracts. *J Sci Food Agric* 1982; 33: 847-51.
  40. Beleia A, Thu Thao LT, Ida EI. Lowering phytic phosphorus by hydration of soybean. *J Food Sci* 1993; 58: 375-88.
  41. Kirby LK, Nelson TS. Total and phytate phosphorus content in some food ingredient derived from grains. *Nutr Rep Int* 1988; 37: 277-90.
  42. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 1995; 7: 1099-111.
  43. Raboy V, Gerbari P. Genetics of myo-inositol phosphate synthesis and accumulation. En: *Subcellular biochemistry: myo-inositol phosphates, phosphoinositides, and signal transduction*. Biswas, B. y Biswas, S. (Eds.). Plenum Press, New York 1996; pp.257-285.
  44. Raboy V. The biochemistry and genetics of phytic acid synthesis. En: *Inositol metabolism in plants*. Morr e, D., Boss, W. y Locwus, F. (Eds.), Wiley-Liss, New York 1990; pp.55-76.
  45. Schlemmer U, M ller H, Jany KLD. The degradation of phytic acid in legumes prepared by different methods. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49: 207-10.
  46. Scott, JJ. Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. *Plant Physiol* 1991; 95: 1298-301.
  47. Gross W, y Boss WF. Inositol phospholipids and signal transduction. En: *Control of Plant Gene Expression*. D.P.S. Verma (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL 1993.
  48. Graf E, Empson KL, Eaton JW. Phytic acid: a natural antioxidant. *J Biol Chem* 1987; 262: 11647-650.
  49. Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ. Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J* 1996; 9: 537-48.
  50. Oomah BD, Kenaschuk EO, Mazza G. Phytic acid content of flaxseed as influenced by cultivar, growing-season, and location. *J Agric Food Chem* 1996; 9: 2663-666.
  51. Raboy V, Dickinson DB. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Sci* 1993; 33: 1300-305.
  52. Raboy V, y Dickinson DB. Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, magnesium, and protein among lines of *Glycine max* and *G. soja*. *Crop Sci* 1984; 24: 431-34.
  53. Urbano G, Lopez M, Fernandez M, Moreu MC, Porres J, Frias J, Vidalvalverde C. Ca and P bioavailability of processed lentils as affected by dietary fiber and phytic acid content. *Nutr Res* 1999; 19: 49-64.
  54. Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK. Methods for analysis of phytate. En: *Phytate in Cereals and Legumes*. CRC Press: Florida 1989; pp 26-36.
  55. Bau HM, Villaume C, Chandrasiri V, Nicolas JP, Méjean L. Effect de la germination sur la composition et la valeur nutritive de graines de soja chez le rat. *Sci des Aliments* 1994; 14: 688-95.
  56. Chandrasiri V, Bau HM, Villaume C, Giannangeli F, Méjean L. Effect of germinated and heated soybean meals on plasma cholesterol and triglycerides in rats. *Reproduction Nutrition Development* 1990; 30: 611-18.

57. Nair VC, Laflamme J, Duvnjak Z. Production of phytase by *Aspergillus ficcum* and reduction of phytic acid content in canola meal. *J Sci Food Agric* 1991; 54: 355-65.
58. Nayini NR, Markakis P. Phytases. En: 'Phytic Acid: Chemistry and Applications. E. Graf. (Ed). Pilatus Press: Minneapolis 1986; pp. 23-42.
59. Schroder B, Breves G, Rodehutschord M. Mechanisms of intestinal phosphorus absorption and availability of dietary phosphorus in pigs. *DTW Dtsch Tierarztl Wochensc* 1996; 103: 209-14.
60. Ferguson EL, Gibson RS, Thompson LU, Ounpuu S, Berry M. Phytase, zinc, and colon content of 30 East African foods and their calculated phytate: Zn, Ca: phytate and [Ca]/[phytate]/[Zn] molar ratios. *J Food Comp Anal* 1988; 1: 316-25.
61. Reddy NR, Pierson MD, Salunkhe DK. Legumes-Based Fermented Foods. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1982; 17: 335-370.
62. Khokhar S, Pushpanjali, Fenwick GR. Phytate content of indian foods and intakes by vegetarian indians of Hisar region, Haryana State. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 2440-444.
63. Rasco BA, Gazzaz SS, Dong DD. Iron, calcium, zinc, and phytic acid content of yeast-raised breads containing distillers grains and other fiber ingredients. *J Food Comp Anal* 1990; 3: 88-95.
64. Gupta M, Khetarpaul N. Effect of rabadi fermentation of phytic acid and *in vitro* digestibility of barley. *Die Nahrung* 1993; 37: 141-46.
65. Lee D, Schoroeder J, Gordon DT. Enhancement of copper bioavailability in the rat by phytic acid. *J Nutr* 1988; 118: 712-17.
66. Atwal A, Eskin N, McDonald B, Vaisey-Genser M. The effects of phytase on nitrogen utilization and zinc metabolism in young rats. *Nutr. Rep Int* 1980; 21: 257-67.
67. Chitra U, Vimala V, Singh U, Geervani P. Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes. *Plant Foods Human Nutr* 1995; 47: 163-72.
68. Knuckles BE, Kuzmicky DD, Gumbman MR, Betschart AA. Effect of myoinositol phosphate esters and *in vivo* digestibility of proteins. *J Food Sci* 1989; 54: 1348-50.
69. Kumar A, Chauhan BM. Effects of phytic acid on protein digestibility (*in vitro*) and HCl-extractibility of minerals in pearl millet sprouts. *Cereal Chem* 1993; 70: 504-05.
70. Barampama Z, Simard R E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chem* 1993; 47: 159-67.
71. Reddy NR., Balakrishnan CV, Salunkhe DK. Phytate phosphorus and mineral changes during germination and cooking of blackgram (*Phaseolus mungo* L.) seeds. *J Food Sci* 1978; 43: 540-42.
72. Sharma A, Khetarpaul N. Fermentation of rice-bengal gram dhal blends with whey: changes in phytic acid content and *in vitro* digestibility of starch and protein. *Nahrung* 1995; 39: 282-87.
73. Thompson LU, Serraino M. Effect of phytic acid reduction on rapeseed protein digestibility and aminoacid absorption. *J Agric Food Chem* 1986; 34: 468-69.
74. Anderson P A. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. En: *Digestibility and Aminoacids Availability in Cereals and Oilseeds*. J.W. Finley and D.T. Hopkins (Eds.). Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul. 1985 p. 31
75. Serraino MR, Thompson LU, Savoie L, Parent G. Effect of phytic acid on the *in vitro* rate of digestibility of rapeseed protein and amino acids. *J Food Sci* 1985; 50: 1689-692.
76. Siddhuraju P, Vijayakumari K, Janardhanan K. Chemical composition and nutritional evaluation of an under exploited legume, *Acacia nilotica* (L) Del. *Food Chem* 1996; 3: 385-91.
77. Thompson LU. Antinutrients and blood glucose. *Food Technol* 1988; 42: 123-32.
78. Deshpande SS, Cheryan M. Effects of phytic acid, divalent cations and their interactions on  $\alpha$ -amilase activity. *J Food Sci* 1984; 49: 516-19.
79. Churella HR, Vivian VM. Effect of phytic acid level in soy protein based formulas on mineral availability in rat. *J Agric Food Chem* 1989; 37: 1352-357.
80. Rimbach G, Pallauf J. Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidant status in growing rats. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 37-45.
81. Graf E, Eaton JW. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr Cancer* 1993; 19: 11-19.
82. Jovani M, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ, Clemente G. Effects of protein, phytates, ascorbic acid and citric acid on dialysability of calcium, iron, zinc and copper in soy-based infant formulas. *Nahrung* 2000; 44: 114-117.
83. Skoglund E, Carlsson NG, Sandberg AS. Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 431-36.
84. Skoglund E, Larsen T, Sandberg AS. Comparison between steeping and pelleting a mixed diet at different calcium levels on phytate degradation in pigs. *Can J Animal Sci* 1997; 77: 471-77.
85. Fordyce EJ, Forbes RM, Robbins KR, Erdman JW Jr. Phytate x calcium/zinc molar ratios: are they predictive of zinc bioavailability? *J Food Sci* 1987; 52: 440-44.
86. Plaami S. Myoinositol phosphates: analysis, content in foods and effects in nutrition. *Lebensm Wiss u Technol* 1997; 30: 633-647.
87. Morris ER. Phytate and dietary mineral availability. En: *Phytic Acid: Chemistry and Applications*. E. Graf. (Ed). Pilatus Press: Minneapolis 1986; pp. 57-76.
88. Knox T, Kassarjian Z, Dawson-Hughes B. Calcium absorption in elderly subjects on high and low fiber diets: effects of gastric acidity. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 1480-486.
89. Heany RP, Weaver CM, Fitzsimmons ML. Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 745-47.
90. Lonnerdal B, Sandberg AS, Sandstorm B, Kunz C. Inhibitory effects of phytic acid and others inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J Nutr* 1989; 119: 211-14.
91. Miyazawa E, Yoshida T. Effects of dietary levels of phytate and inorganic phosphates on phytate breakdown and absorption of calcium and magnesium in rats. *Nutr Res* 1991; 11: 797-806.

92. Ranhotra GS, Gelroth JA, Torrence FA, Bock MA, Winterringer GL. Bread (white and whole wheat) and not fat dry milk as sources of bioavailable calcium for rats. *J Nutr* 1981; 111: 2081-86.
93. Mason AC, Weaver CM, Kimmel S, Brown RK. Effects of soybean phytate content on calcium bioavailability in mature and immature rats. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 246-49.
94. Poneros AG, Erdman JW. Bioavailability of calcium from sesame seeds, almond powder, whole wheat bread, spinach and non-fat dry milk in rats. *J Food Sci* 1989; 54: 150-53.
95. Gifford-Steffen S R, Clydesdale FM. Effect of varying concentrations of phytate, calcium, and zinc on the solubility of protein, calcium, zinc, and phytate in soy protein concentrate. *J Food Protect* 1993; 56: 42-46.
96. Pallauf J, Rimbach G. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch Tierernahr* 1997; 50: 301-19.
97. Brune M, Rossander L, Gleerup A, Sandberg A S. Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J Nutr* 1992; 122: 442-29.
98. Cook JD, Reddy MB, Burri J, Juillerat M, Hurrell RF. The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 964-9.
99. Tuntawiroon M, Sritongkul N, Rossander HL, Pleehachinda R, Suwanik R, Brune R, Hallberg L. Rice and iron absorption in man. *Eur J Clin Nutr* 1990; 44: 489-97.
100. Simpson KM, Morris ER, Cook JD. The inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am. J Clinical Nutr* 1981; 34: 1469-478.
101. Davidsson L, Galán P, Kastenmayer P, Cherouvrier F, Juillera M, Hercberg S, Hurrell RF. Iron bioavailability studied in infants: the influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatric Res* 1994; 6: 816-22.
102. Siegenberg D, Baynes RD, Bothwell TH, Mcfarlane BJ, Lamparelli RD, Car NG, Macphail P, Schmidt U, Tal A, Mayet F. Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am. J Clinical Nutr* 1991; 53: 537-41.
103. Zhou J, Fordyce EJ, Raboy DB, Dickinson M, Wong M, Burns RA, Erdman Jr. Reduction of phytic acid in soys products improves zinc bioavailability in rats. *J Nutr* 1992; 122: 2466-473.
104. Lonnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr* 2000; 130: 1378S-83S.
105. Anónimo. Dieta alimentaria española. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, M.A.P.A., Secretaria General Técnica, Madrid 1991; cap. 6: pp. 257-59.
106. Fitzgerald S L, Gibson RS, Quan de Serrano J, Portocarrero L, Vasquez A, de Zepeda E, Lopez-Palacios C Y, Thompson LU, Stephen AM, Solomons NW. Trace element intakes and dietary phytate/Zn and Ca x phytate/Zn millimolar ratios of periurban guatemalan women during the third trimester of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 195-201.
107. Lo GS, Settle SL, Steinke FH, Hopkins DT. Effect phytate:zinc molar ratio and isolated soybean protein on zinc bioavailability. *J Nutr* 1981; 111: 2223-235.
108. Morris ER, Ellis R. Effect of dietary phytate/zinc molar ratio on growth and bone zinc response of rat fed semipurified diets. *J Nutr* 1980; 110: 1037-47.
109. Wise A. Influence of calcium on trace metal-phytate interactions. En: *Phytic Acid: Chemistry and Applications*. E. Graf. (Ed). Pilatus Press: Minneapolis 1986; p. 151.
110. Davies NT, Carswell AJP, Mills CF. The effects on variation in dietary calcium intake on the phytate-zinc interactions in rats. En: *Trace Elements in Man and Animals*. C. F. Mills, I. Bremner and J. K. Chesters (Eds). Aberdeen, Scotland 1985; p. 456.
111. Platt SR, Clydesdale FM. Binding of iron by cellulose, lignin, sodium phytate and  $\beta$ -glucan, alone and in combination, under simulated gastrointestinal pH conditions. *J Food Sci* 1984; 49: 531-35.
112. Torre M, Rodriguez AR, Saura-Calixto F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1991; 1: 1-22.
113. Mendoza C, Viteri FE, Lonnerdal B, Young KA, Raboy V, Brown KH. Effect of genetically-modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1123-127.
114. Vucenik I, Kalebic T, Tantivejkul K, Shamsuddin AM. Novel anticancer function of inositol hexaphosphate - inhibition of human rhabdomyosarcoma *in-vitro* and *in-vivo*. *Anticancer Res* 1998; 18: 1377-84.
115. Jariwalla RJ, Sabin R, Lawson S, Herman ZS. Lowering of serum cholesterol and tryglicerides and modulation of divalent cation by dietary phytase. *J Appl Nutr* 1990; 42: 18-28.
116. Slavin J, Jacobs D, Marquart L. Whole grain consumption and chronic disease protective mechanisms. *J Nutr Cáncer* 1997; 1: 14-21.
117. Jariwalla RJ. Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. *Anticancer Res*. 1999; 19: 3699-702.
118. Wolever TMS. The glycemic index. *Wld Rev Nutr Diet* 1990; 62: 120-25.
119. Ferguson LR, Harris PJ. Protection against cáncer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur J Cáncer Prev* 1999; 8:17-25.
120. Jenab M, Thompson LU. The influence of phytic acid in wheat bran on early biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogen* 1998; 19: 1087-92.
121. Nielsen BK, Thompson LU, Bird RP. Effect of phytic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Cáncer Lett* 1987; 37: 317-25.
122. Newmark HL, Lupton JR. Determinants and consequences of colonic pH: implications for colon cáncer. *Nutr Cáncer* 1990; 14: 161-73.
123. Phillippy BQ, Graf E. Antioxidant functions of inositol 1,2,3-trisphosphate and inositol 1,2,3,6-tetrakisphosphate. *Free Rad Biol Med* 1997; 6: 939-46.
124. Shamsuddin AM. Metabolism and cellular functions of IP6: a review. *Anticancer Res* 1999; 19: 3733-6.
125. Shamsuddin AM, Vucenik I. Mammary tumor inhibition by IP6: a review. *Anticancer Res* 1999; 19: 3671-4.
126. Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE IP6: a novel anti-cancer agent. *Life Sci* 1997; 61: 343-54.
127. Shamsuddin AM, Yang GY, Vucenik IN. Anticancer functions of Ips-growth-inhibition and differentiation of human

- mammary-cancer cell-lines *in vitro*. *Anticancer Res* 1996; 6A: 3287-292.
128. Horose M, Ozaki K, Takaba K, Fukushima S, Shirai T, Ito N. Modifying effects of the naturally occurring antioxidants gamma oryzanol, phytic acid, tannic acid and n-triacontan-16, 18-dione in rat wide spectrum organ carcinogenesis model. *Carcinogen* 1991; 12: 1917-921.
  129. Modlin M. Urinary phosphorylated inositols and renal stones. *Lancet* 1980; 2: 1113-114.
  130. Grases F, y Costa-Bauza A. Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Res* 1999; 19: 3717-22.
  131. Thompson DB, Erdman J JrW. Phytic acid determination in soybeans. *J Food Sci* 1982; 47: 513-17.
  132. Graf E, Dintzis RF. Determination of phytic acid in foods by High-Performance Liquid Chromatography. *J Agric Food Chem* 1982; 30: 1094-97.
  133. Gustafsson EL, Sandberg AS. Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Sci* 1995; 60: 149-56.
  134. Harland BF, Oberleas D. A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. *Cereal Chem* 1977; 54: 827-32.
  135. Kaur D, Kapoor AC. Some antinutritional factors in rice bean (*Vigna umbellata*): effects of domestic processing and cooking methods. *Food Chem* 1990; 37: 171-79.
  136. Latta M, Eskin M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agric Food Chem* 1980; 28: 1313-315.
  137. Mazzola EP, Phyllippy BQ, Harland BF, Miller TH, Potemra JM, Katsimpiris EW. Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic determination of phytate in foods. *J Agric Food Chem* 1986; 34: 60-62.
  138. Phyllippy BQ, Johnston MR. Determination of phytic acid in foods by ion chromatography with post-column derivatization. *J Food Sci* 1985; 50: 541-42.
  139. Camire AL, Clydesdale FM. Analysis of phytic acid in foods by HPLC. *J Food Sci* 1982; 47: 575-78.
  140. Ersöz A, Akgün H, Aras NK. Determination of phytate in turkish diet by Phosphorus-31 Fourier transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 1990; 38: 733-35.
  141. Wheeler E, Ferrel RE. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem* 1971; 48: 312-20.
  142. Zemel MB, Shelef LA. Phytic acid hidrolisis and soluble zinc and iron in whole wheat bread as affected by calcium containing additives. *J Food Sci* 1982; 47: 535-37.
  143. Chang R, Schwimmer S, Burr, HK. Phytate: removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *J Food Sci* 1977; 42: 1098-101.
  144. Heubner W, Stadler H. Uber eine trititionsmetthode zur bestimmung des phytins. *Biochem Zeitschrift* 1914; 64: 422-37.
  145. Tangkongchitr U, Seib PA, Hosney R.C. Phytic acid I. Determination of 3 forms of phosphorus in flour, dough and bread. *Cereal Chem* 1981; 58: 229-34.
  146. AOAC. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International. Vols. 1 and 2. W. Horwitz (Ed.). AOAC International, Washington, D.C 1990.
  147. Plaami S, Kumpulainen J. Determination of phytic acid in cereals using ICP-AES to determine phosphorus. *J AOAC* 1991; 74: 32-36.
  148. Phillippy BQ, Johnston MR, Tao SH, Fox MRS. Inositol phosphates in processeed foods. *J Food Sci* 1988; 53: 496-99.
  149. Lehrfeld J, Morris ER. Overestimation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 2208-210.
  150. Wise A, Lockie GM, Liddell J. Dietary intakes of phytate and its meal distribution pattern amongs staff and students in a institution of higher education. *British J Nutr* 1987; 58: 337-46.
  151. Xu P, Price J, Aggett PJ. Recent advances in methodology for analysis of phytate and inositol phosphates in foods. *Progr Food Nutr Sci* 1992; 16: 245-62.
  152. Lee K, Abendroch JA. High performance liquid chromatographic determination of phytic acid in foods. *J Food Sci* 1983; 48: 1344-351.
  153. Burbano C, Muzquiz, M, Osagie A, Ayet G, Cuadrado C. Determination of phytate and lower inositol phosphates in spanish legumes by HPLC methodology. *J Food Chem* 1995; 52: 321-25.
  154. Larsson M, Sandberg AS. Malting of oats in a pilot-plant process. Effects of heat treatment, storage and soaking conditions on phytate reduction. *J Cereal Sci* 1995; 21: 87-95.
  155. Talamond P, Doubeau S, Rochette I, Guyot JP Anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. *J Chromatogr A* 2000; 871:7-12.
  156. Fitchett AW, Woodruff A. Determinations of polyvalent anions by ion chromatography. *Liq Chromatogr HPLC Mag* 1983; 1: 48.
  157. Skoglund E, Carlsson NG, Sandberg AS. High-performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange columns. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 1877-82.
  158. Skoglund E, Nasi M, Sandberg AS. Phytate hydrolysis in pigs fed a barley-rapeseed meal diet treated with *Aspergillus niger* phytase or steeped with whey. *Can J Animal Sci* 1998; 78: 175-80.
  159. O'Neill IK, Sargent M, Trimble ML. Determination of phytate in foods by phosphorus-31-transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal Chem* 1980; 52: 1288-291.
  160. March JG, Simonet BM, Grases F. Fluorimetric determination of phytic acid based on the activation of the oxidation of 2,2'-dipyridyl ketone hydrazone catalysed by Cu (II). *Analyst* 1999; 124: 897-900.

Recibido: 15-02-2001

Acceptado: 10-06-2002