

Avaliação de Metodologias para Análise de Ácido Fítico em Milho

Valéria A. V. Queiroz¹, Paulo Evaristo O. Guimarães¹, Estefânia O. Guedes², Paulo Eduardo A. Ribeiro³ e Luciano R. Queiroz⁴

¹Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, valeria@cnpms.embrapa.br; evaristo@cnpms.embrapa.br, Bolsista PBIC/CNPq, estefania.guedes@yahoo.com, ³Analista, Embrapa Milho e Sorgo, pauloedu@cnpms.embrapa.br, ⁴Bolsista pós-doutorado CNPq/UFV, lrodqueiroz@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Zea mays*, razão molar fitato:Fe, razão molar fitato:Zn

Estudos sobre a biodisponibilidade de nutrientes têm demonstrado que os teores de minerais nos alimentos não podem ser considerados isoladamente e que o aumento da concentração dos mesmos na matriz alimentar nem sempre significa aumento da utilização pelo organismo. Tanto fatores intrínsecos (fisiológicos), quanto extrínsecos (dietéticos), podem interferir na absorção, no transporte, na utilização e no armazenamento desses nutrientes, com subsequente aumento da suscetibilidade à deficiência ou à toxidez (Bremner e Beattie, 1995). Pesquisadores têm demonstrado o efeito de frutoligossacarídeos, de alguns aminoácidos, do ácido ascórbico e do β -caroteno, no aumento da biodisponibilidade mineral (Lopez et al., 2000; Davidsson et al., 2004; Brigide e Canniatti-Brazaca, 2006; Vitali et al., 2007). Em contrapartida, o ácido fítico, o ácido oxálico e os taninos são alguns dos fatores dietéticos considerados como inibidores da absorção intestinal de minerais, dentre os quais, o ácido fítico tem papel de destaque. A análise dessas substâncias têm sido úteis na avaliação da biodisponibilidade de Fe e Zn em alimentos e dietas (Brigide e Canniatti-Brazaca, 2006). Estes fatores são relevantes para populações dos países subdesenvolvidos, em desenvolvimento, e vegetarianos de maneira geral, que possuem como base alimentar os cereais e as leguminosas, que são alimentos ricos nas substâncias antinutricionais supracitadas (Wyatt e Triana-Tejas, 1994).

Segundo Hambidge et al. (2003), para manter a homeostase do zinco em populações consumidoras de dietas baseadas em milho, o “Food and Nutrition Board” de 2001, estimou um requerimento médio diário desse mineral cerca de 40% maior que o recentemente calculado para crianças norte americanas de mesma idade. Este fato foi atribuído, principalmente, ao elevado teor de fitato contido neste alimento. Khokhar e Pushpanjali (1994) verificaram que o consumo de alimentos com altos níveis de AF, na Índia, era 2 a 3 vezes maior que na Europa. Lönnerdal (2002) cita diversos trabalhos desde 1973 até 2002 que mostram o efeito negativo de fitatos na absorção de Zn, acarretando deficiências nutricionais tanto em animais quanto em humanos. Desta forma, a razão molar ácido fítico (AF)/mineral tem sido usualmente empregada como método para estimar a biodisponibilidade dos minerais nos alimentos e dietas (Lestienne et al., 2005; Lazzari, 2006).

O ácido fítico é a principal forma de armazenamento de fósforo inorgânico nas sementes dos cereais e das leguminosa (Zhou e Erdman, 1995). Em sementes de milho maduro constitui cerca de 75% a 80% do P total sendo que mais de 90% concentra-se no germe, com resíduos na camada de aleurona, mas, variações quantitativas significantes têm sido observadas

entre genótipos, linhagens e cultivares de várias espécies (Raboy et al., 2000). Por não haver atividade suficiente de fosfatases (fitases) capazes de liberar o grupo fosfato da estrutura dos fitatos, esta forma de P permanece não disponível na alimentação do homem e animais monogástricos (Walsh et al., 1994).

Vários métodos convencionais têm sido utilizados para análise de AF, sendo a maioria deles derivados do procedimento de Heubner e Standler (1914), citado por Dominguez et al., 2002. Esses métodos são baseados na precipitação do íon férrico com fitato em solução ácida diluída e análise do fósforo ou do ferro no precipitado ou no sobrenadante (Thompson e Erdman, 1982, Haug e Lantzsch, 1983). Nos casos em que a quantificação de AF é realizada por meio do Fe, a concentração de P fítico é calculada usando uma razão teórica Fe:P de 4:6. O cálculo do teor de AF é feito considerando o valor teórico de 28,2% de P na molécula de AF, uma vez obtido o valor do P fítico. Existem métodos indiretos em que os teores de P ou de Fe residual são quantificados no sobrenadante, e o AF é calculado por diferença (Dominguez et al., 2002).

Uma das limitações surgidas para tais procedimentos é a de que outros inositóis-fosfatos e pequenas quantidades de P inorgânico são precipitados juntamente com o inositol hexafosfato (AF). O método oficial da AOAC utiliza uma coluna com resina de troca iônica na qual o AF é eluído da coluna separadamente dos demais inositóis fosfato e P inorgânico e quantificado por meio do fosfato liberado após hidrólise ácida das frações fitato (Harland e Oberleas, 1986). No entanto, em grãos de milho não processados, onde há cerca de 95% de prevalência de inositol hexafosfato (InsP6), os métodos convencionais de análise de AF são válidos e bastante úteis devido à simplicidade e baixo custo. Além disso, os mono (InsP), di (InsP2) e trifosfatos (InsP3) são bastante solúveis e por isto não se precipitam em quantidades significantes. Porém, em alimentos processados, por conterem também quantidades apreciáveis de isômeros desfosforilados do AF como InsP5, InsP4 e InsP3 e possivelmente InsP2 e InsP, o uso de métodos de precipitação são desaconselháveis (Phillippy et al., 1988).

Métodos mais precisos para análise de ácido fítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) têm sido desenvolvidos, mais recentemente (Dominguez et al., 2002). Entretanto, tais métodos exigem equipamentos mais sofisticados, de alto custo, tornando a análise mais onerosa, além de serem mais trabalhosos e por isto despenderem mais tempo.

A Embrapa milho e Sorgo vem trabalhando na seleção de genótipos de milho com maiores concentrações de Fe e Zn, no entanto, a biodisponibilidade desses materiais é ainda desconhecida pela inexistência de metodologia implementada para tal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi selecionar uma metodologia para análise de ácido fítico na Embrapa Milho e Sorgo, entre três metodologias testadas.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Grãos Armazenados da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4 (genótipos x método de análise) com três repetições.

Para a determinação da concentração de ácido fítico foram testados e avaliados três métodos: (1) método baseado na análise do fósforo fítico presente no precipitado após reação do fitato com cloreto férrico (Thompson e Erdman, 1982), (2) método baseado na análise da diferença do fósforo inorgânico presente no sobrenadante após precipitação do ácido fítico com cloreto férrico (Thompson e Erdman, 1982), (3) método baseado na análise indireta do fósforo fítico após reação de cor do Fe contido no sobrenadante com o reagente 2,2'-bipiridina (Haug e Lantzsch, 1983). Os teores de ácido fítico foram analisados em amostras provenientes de cinco

genótipos de milho selecionadas ao acaso, em três repetições, com análises em duplicata. Para fins de seleção e validação da metodologia a ser posteriormente utilizada, nas 30 linhagens de milho com maiores teores de Fe e Zn, foi realizada, na Embrapa Agroindústria de Alimentos, análise dos teores de ácido fítico por meio do método oficial da AOAC (2000). Para todos os métodos testados (inclusive o testemunha/AOAC) foram utilizadas alíquotas dos mesmos genótipos. O método selecionado foi validado, ainda, levando-se em conta o parâmetro de repetitividade determinada pelos coeficientes de variação apresentados pelas replicatas de cada amostra.

Para as análises estatísticas foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial (5 linhagens de milho x 4 métodos de análise) com 3 repetições. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA). Para comparação dos métodos, as médias foram testadas por meio do teste de Dunnett ($p < 0,05$), tendo o método da AOAC como referência.

Verificou-se que a interação genótipo vs metodologias foi não significativa, indicando que houve concordância no ordenamento da posição dos genótipos em função da metodologia (Tabela 1). Os resultados dos teores de ácido fítico (%) por meio das quatro metodologias utilizadas encontram-se na Tabela 2. De acordo com o teste de Dunnett, os teores de ácido fítico (%) obtidos por meio, tanto da metodologia que utiliza o reagente Biperidina (Haug e Lantzs, 1983), quanto daquela que utiliza o sobrenadante na metodologia proposta por Thompson e Erdman (1982) não diferiram estatisticamente daqueles obtidos pela metodologia descrita pela AOAC em ensaio realizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos. No entanto, observou-se que a metodologia de Haug e Lantzs (1983) foi também mais simples, de mais fácil operação e utilizou menor quantidade de amostra e de reagentes que as demais. Sendo assim, optou-se por utilizar essa técnica para análise de ácido fítico na Embrapa Milho e Sorgo.

Tabela 1 - ANOVA dos teores de ácido fítico (%) em cinco genótipos de milho determinada por meio de quatro métodos distintos

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Blocos	1	0,00461	0,00461		
Genótipos	4	0,21328	0,05332	37,52*	0,0
Métodos	3	0,72851	0,24284	170,88*	0,0
Gen x Met	12	0,01491	0,00124	0,8740	100,0
resíduo	19	0,027	0,00142		
Total	39	0,9883			
Média	0,737905				
CV (%)	5,11				

*Significativos ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Percentagem de ácido fítico em cinco genótipos de milho determinada por meio de quatro métodos distintos

GENÓTIPO	MÉTODO							
	1		2		3		4	
	% ácido fítico							
	Média	*DP	Média	*DP	Média	*DP	Média	*DP
BRS 1030	0,832	0,025	0,900	0,005	0,532	0,096	0,830	0,010
AL 34	0,697	0,004	0,806	0,002	0,478	0,090	0,697	0,018
BR 473	0,933	0,020	0,958	0,006	0,619	0,049	0,935	0,033
BRS 3003	0,752	0,014	0,757	0,004	0,497	0,084	0,769	0,011
BRS 2020	0,763	0,030	0,807	0,006	0,518	0,033	0,794	0,019
Média	0,795 a		0,845 a		0,529 b		0,805 a	

(1) Método proposto por Haug e Lantzsch (1983), (2) e (3) Métodos da análise do P no sobrenadante e no precipitado, respectivamente, ambos propostos por Thompson e Erdman (1982), (4) AOAC: Método testemunha oficializado pela AOAC (AOAC, 2000). *DP = desvio padrão da média. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem da testemunha, pelo teste de Dunnett ao nível de 1% de probabilidade.

Referências Bibliográficas

BREMNER, I.; BEATTIE, J.H. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. **Proc Nutr Soc**, v. 54, p. 489-99, 1995.

BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Antinutrients and “in vitro” availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, v. 98, p. 85-89, 2006.

DOMÍNGUEZ, B.M, GÓMEZ, M.V.I., LEÓN, F.R. Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, n. 3, p. 219-231, 2002.

HAMBIDGE, K.M.; KREBS, N.F.; WESTCOTT, J.E.; MILLER, L.V.; LEI, S.; LAVELY, J.; MAZARIEGOS, M.; SOLOMONS, N.W. **Plant Breeding to Improve the Content & Bioavailability of Zinc in Cereals**. 2003. Disponível em: <http://members.aon.at/namls/Zinc/Hambidge.html>. Acesso em: 10 de janeiro de 2008.

HARLAND, B. F.; OBERLEAS, D. Anion-exchange method for determination of phytate in foods: Collaborative study. **Journal of the AOAC**, v. 69, p. 667-670, 1986.

HAUG, W.; LANTZSCH, H.J. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereal and products. **Journal of the Science of the Food and Agriculture**, v. 34, p. 1423-1426, 1983.

KHOKHAR, S.; PUSHPANJALI, Phytate Content of Indian Foods and Intakes by Vegetarian Indians of Hisar Region, Haryana State. **J Agric Food Chem**, v. 42, p. 2440-2444, 1994.

LESTIENNE, I.; MOUQUET-RIVIER, C.; ICARD-VERNIÈRE, C.; ROCHETTE, I.; TRÈCHE, S. The effects of soaking of whole, dehulled and ground millet and soybean seeds on phytate degradation and phy/fe and phy/zn molar ratios. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 391-399, 2005.

LÖNNERDAL, B. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 749-758, 2002.

LAZZARI, E.N. **Análise de ácido fítico e minerais nos processos de maceração e cocção de soja**. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Londrina – PR, Universidade Estadual de Londrina, 52p., 2006.

PHILLIPPY, B.Q.; JOHNSTON, M.R.; TAO, S.H.; FOX, M.R.S. Inositol phosphates in processed foods. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 496-99, 1988.

RABOY, V; GERBASI, P.F.; YOUNG, K.A.; STONEBERG, S.D.; PICKETT, S.G.; BAUMAN, A.T.; MURTHY, P.P.N.; SHERIDAN, W.F.; ERTL, D.S. Origin and Seed Phenotype of Maize *low phytic acid 1-1* and *low phytic acid 2-1*. **Plant Physiology**, v. 124, p. 355-368, 2000.

THOMPSON, D.B.; ERDMAN, JR., J.W. Phytic Acid Determination in Soybeans. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 513-517, 1982.

VITALI, D.; VEDRINA DRAGOJEVIĆ, I.; ŠEBEČIĆ, B.; VUJIĆ, L. Impact of modifying tea-biscuit composition on phytate levels and iron content availability. **Food Chemistry**, v. 102, p. 82-89, 2007.

WALSH, G.A. POWER, R.F., HEADON, D.R. Enzymes in the animal- feed industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 81-87, 1994.

WYATT, C.J.; TRIANA-TEJAS, A. Soluble and Insoluble Fe, Zn, Ca, and Phytates in Foods Commonly Consumed in Northern Mexico. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2204-2209, 1994.

ZHOU, J.R., ERDMAN, J.W.J.R. Phytic acid in health and disease. **C.R.C. Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 35, p. 495-508, 1995.