

## Polifenoles de extractos de soja. Identificación de isoflavonas

María del Huerto Farías<sup>1</sup>, Analía V. Medina<sup>1,2</sup>, Lucrecia L. Chaillou<sup>1</sup>, Mónica A. Nazareno<sup>1,2</sup>

(1) Laboratorio de Antioxidantes y Procesos Oxidativos, Instituto de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero. [farias.huerto@gmail.com](mailto:farias.huerto@gmail.com), [veromedina83@hotmail.com](mailto:veromedina83@hotmail.com), [llchaillou@yahoo.com](mailto:llchaillou@yahoo.com), [nazareno@unse.edu.ar](mailto:nazareno@unse.edu.ar)

(2) CITSE-CONICET -UNSE

**RESUMEN:** En la naturaleza, existe un gran número de vegetales que contienen compuestos bioactivos, dentro de estos, los fitoestrógenos son especies no nutritivas, muy importantes para el funcionamiento del organismo humano. Dentro de ellos, Las isoflavonas pueden aislarse de hojas, tallos, raíces, flores, semillas y germen de soja, encontrándose éstas en mayor concentración en germen y brotes. Las más importantes en la dieta son: daidzeína y la genisteína. Tienen estructuras y actividades similares a los estrógenos. El objetivo de este trabajo fue cuantificar el contenido de polifenoles y flavonoides totales e identificar isoflavonas mayoritarias en extractos de porotos y harina de soja. Para ello, se prepararon extractos etanólicos y metanólicos, la extracción se hizo a 60 °C, utilizando ultrasonificación. El contenido de polifenoles y flavonoides totales se determinó mediante técnicas espectrofotométricas y la identificación de isoflavonas se hizo mediante HPLC. El mayor contenido de polifenoles, se determinó en el extracto etanólico de porotos de soja sin cutícula, mientras que el contenido más alto de flavonoides se midió en extractos metanólicos. Se identificaron las isoflavonas agliconas genisteína y daidzeína.

### 1 INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, existe un gran número de vegetales que contienen compuestos bioactivos, dentro de estos, los fitoestrógenos son especies no nutritivas, importantes para el funcionamiento del organismo humano. Su importancia biológica se debe a su similitud estructural con la hormona femenina estradiol (Hendrick et al., 1999).

Los fitoestrógenos se dividen en dos grandes grupos: lignanos e isoflavonas (Hodgson et al., 1998). Este último grupo está presentes en hongos y plantas (Manzur y Adlercreutz, 1998), se las denomina fitoalexinas puesto que actúan como sustancias de defensa de plantas contra el ataque de insectos y hongos patógenos (Dixon, 1993), están involucradas, también, en la nodulación de plantas leguminosas (Pueppke, 1996). Estudios epidemiológicos han demostrado que su consumo puede estar asociado a la baja incidencia de ciertos tipos de cáncer y la reducción en el riesgo de varias enfermedades, incluyendo problemas cardiovasculares, la osteoporosis y los síntomas menopáusicos (Strauss et al., 1998).

Las isoflavonas pueden aislarse de hojas, tallos, raíces, flores, semillas y germen de soja, encontrándose éstas en mayor concentración en germen y brotes (Manzur y Adlercreutz, 1998). Las más importantes en la dieta son: daidzeína y

genisteína. Estas últimas tienen estructuras y actividades similares a los estrógenos (Hodgson et al., 1998), ya que pueden unirse al receptor de estrógeno (Tikkanen y Adlercreutz, 2000).

Químicamente, las isoflavonas, constituyen una subclase de flavonoides. La estructura básica está formada por un núcleo de flavona, compuesto por dos anillos bencénicos (A y B) unidos a un anillo heterocíclico (C), estando el anillo B unido al C en posición 3 (Fig.1).

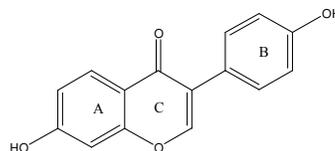


Fig.1. Daidzeína

Las principales isoflavonas identificadas son daidzeína (4',7-dihidroxiisoflavona) (Fig.1), genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona) (Fig.2), gliciteína (4',7-dihidroxi-6-metoxi-isoflavona) (Fig.3), se presentan en las semillas como glucósidos conjugados, mientras que, en productos procesados se presentan en sus formas agliconas o bien acetiladas (Ho et al., 2002).

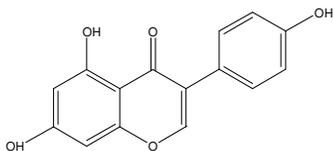


Fig.2. Genisteína

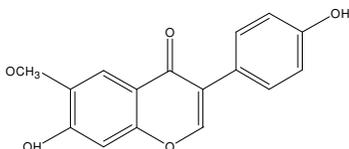


Fig.3. Gliciteína

El objetivo de este trabajo fue cuantificar el contenido de polifenoles y flavonoides totales e identificar isoflavonas mayoritarias en extractos de porotos y harina de soja.

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1. Preparación de los extractos de porotos y harina de soja

Se utilizaron porotos y harina de soja adquiridas en supermercados locales. Se aplicó la técnica de cuarteo para obtener muestras de 10 g. Los porotos con y sin cutícula se molieron finamente, en molinillo de café.

Las muestras fueron sometidas a extracción, a 60°C, con etanol de 96%, etanol al 70% y metanol al 80%, utilizando diferentes tiempos de ultrasonificación y diferentes relaciones entre la masa de muestra y el volumen de solvente.

Los métodos utilizados, en los que se indica tipo de solvente; relación entre masa de muestra y volumen de solvente y tiempo de ultrasonificación fueron:

- Etanol 96%; 1:6; 2 h (M1)
- Etanol 96%; 1:6; 4 h (M2)
- Etanol 96%; 1:6; 6 h (M3)
- Metanol 80 %; 1:45; 1 h (M4)
- Etanol 70%; 1:6; 30 min (3 extracciones) (M5).

### 2.2. Determinaciones analíticas

#### 2.2.1. Determinación de Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos se determinaron, en solución etanólica, a una concentración de 0,1 % v/v, con el reactivo de Folin-Ciocalteu, por

absorbancia espectrofotométrica a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg de compuestos fenólicos por mL de extracto, expresados como ácido gálico equivalente.

#### 2.2.2. Determinación de Flavonoides totales

Se determinó la absorbancia a 428 nm del complejo flavonoides-aluminio, obtenido por reacción del extracto etanólico de soja, a 0,1 % v/v, con una solución metanólica de  $AlCl_3$  al 2%. Los resultados se expresaron como mg de flavonoides por mL de extracto, expresados como quercetina equivalente.

#### 2.2.3. Identificación de isoflavonas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El análisis cualitativo de isoflavonas se realizó utilizando un cromatógrafo líquido de alta Resolución marca LAB-ALLIANCE serie III, con inyector Rheodyne bucle de 20  $\mu$ l de inyección, detector con arreglo de diodos (DAD), SCHIMADZU UV/Visible SPD-M20A y procesador Konikrom 6.2, provisto de una columna de fase reversa LUNA 5 $\mu$ m C18 (2) 250 x 4,6 mm. En condiciones isocráticas, se utilizó como fase móvil acetonitrilo-agua-ácido acético (20:79:1), con un flujo de 1 mL/min a 26,0  $\pm$  0,5°C. La detección de las isoflavonas se realizó a 260 nm, en corridas de 40 min. En gradiente, se utilizó como fase móvil inicial acetonitrilo-agua-ácido acético (20:79:1), la composición de la misma se mantuvo durante 8 min, se incrementó el acetonitrilo hasta un 30% los primeros 10 min, se mantuvo esta concentración durante 8 min, luego, se aumentó la concentración de este solvente hasta un 40 % en los 4 min siguientes, se alcanzó un 60%, y se mantuvo durante 4 min. En los 6 min siguientes, se aumentó a 20% la concentración de ácido acético. Esta fase se mantuvo hasta el final de la corrida. El flujo fue de 0,5 mL/min y se aumentó progresivamente durante los primeros 8 minutos hasta llegar a 1 mL/min. La temperatura fue 26,0  $\pm$  0,5°C. El volumen de inyección fue 20  $\mu$ L y la detección, en corridas de 40 min, se realizó, también, a 260 nm. La identificación de las isoflavonas se realizó por comparación de tiempos de retención y co-inyección de patrones de marca Sigma y Aldrich.

#### 2.2.4. Análisis estadístico

Se calculó la media y la desviación estándar de los datos obtenidos y se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) y el test de la diferencia límite significativa (DLS) como prueba de significación de diferencias entre las medias de estos métodos.

### 3 RESULTADOS

En las Fig.4 y 5 se presentan los contenidos porcentuales totales de polifenoles y flavonoides, extraídos de porotos de soja con cutícula (C) y sin cutícula (SC) y de harina de soja (H), utilizando una serie de solventes orgánicos puros y combinados, de acuerdo con los métodos indicados en el ítem 2.1.

La Fig.4 muestra que el mayor contenido de polifenoles se determinó en el extracto de porotos de soja sin cutícula, preparado con etanol 96° y sometido a 2 h de ultrasonificación. Este método permitió, también, la mayor extracción de estos compuestos en muestras de harina de soja. En el caso de los porotos de soja con cutícula, etanol al 70% permitió una mayor extracción de los mismos. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por Lee et al. (2007) y Hutabarat et al. (1998).

En la Fig.5 se puede observar que el método que permite la mayor extracción de flavonoides totales, de porotos de soja con y sin cutícula, es aquel en el que se utiliza metanol. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rostagno et al. (2004) y Liggins et al. (2000). En harina de soja, la mayor extracción se obtuvo con etanol al 70%.

Los resultados del ANOVA ( $p < 0,05$ ) para los contenidos de polifenoles y de flavonoides en los tres tipos de muestras analizadas, indicaron que existen diferencias entre los métodos y tiempos de extracción. Además, el test de DLS indicó, con un 95 % de confianza, que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de estos factores de variabilidad, confirmando que los mejores métodos de extracción son los mencionados más arriba.

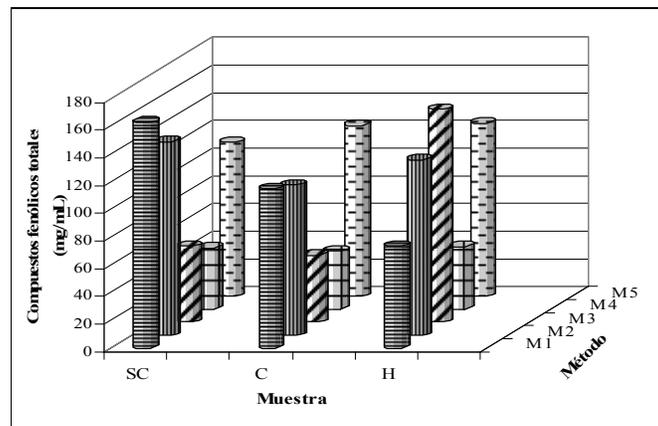


Figura 4. Contenido de polifenoles totales de extractos de porotos y harina de soja

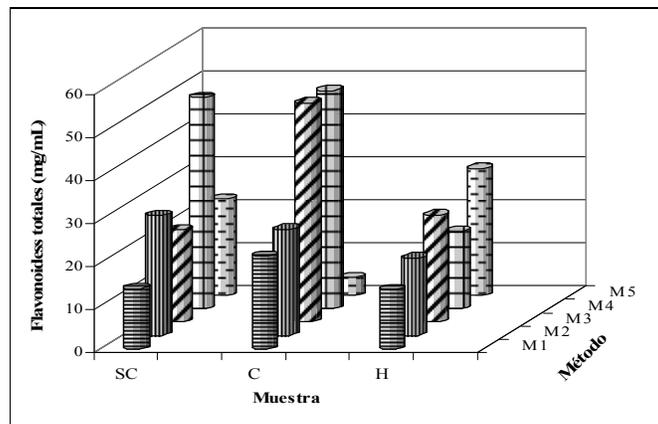


Figura 5. Contenido de flavonoides totales de extractos de porotos y harina de soja

Mediante HPLC, se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los extractos de porotos sin cutícula obtenidos con etanol de 96° sometidos a 2 h de ultrasonificación y de harina de soja extraída, durante 6 h, con el mismo solvente (Fig. 6 y 7). Se identificaron, comparando los tiempos de retención y espectros UV-Vis proporcionados

por el DAD de los patrones y los extractos analizados, los flavonoides agliconas daidzeína (Fig.1) y genisteína (Fig.2). Los picos mayoritarios presentaron espectros coincidentes con los de daizina y genistina en coincidencia con lo informado en la literatura.

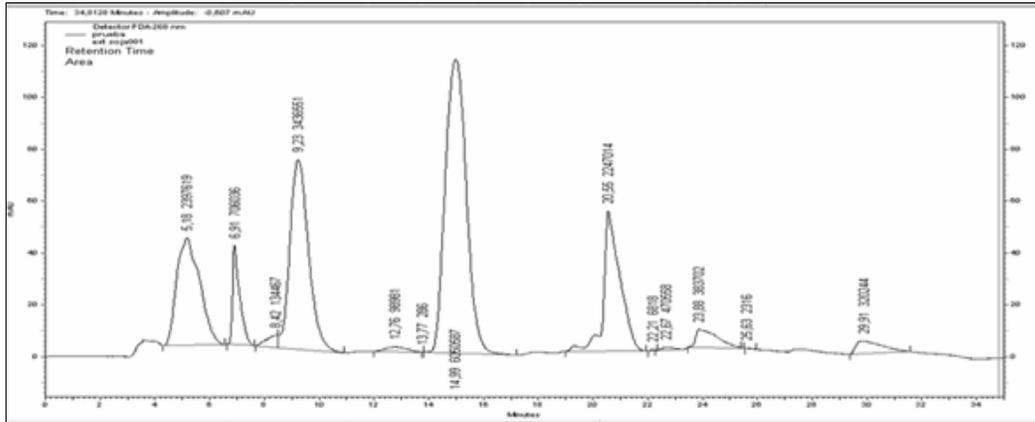


Figura 6. Perfil cromatográfico de porotos de soja sin cutícula

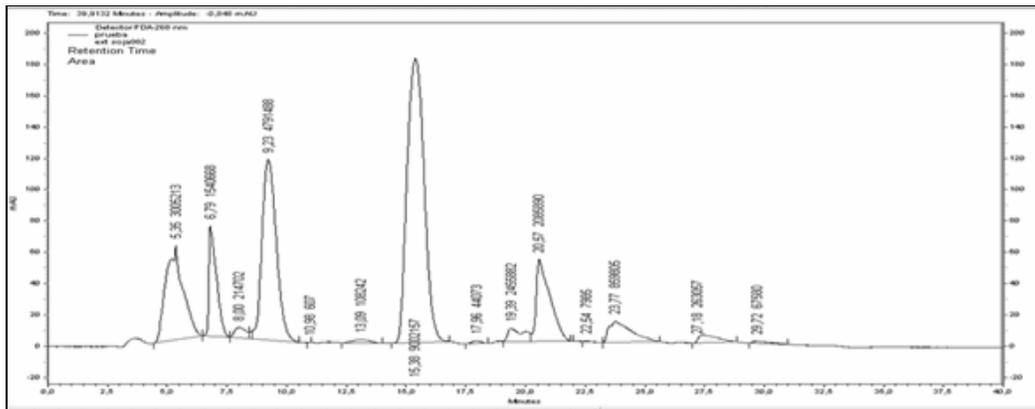


Figura 7. Perfil cromatográfico de harina de soja

#### 4 CONCLUSIONES

Este trabajo muestra que es esencial sistematizar y optimizar el método de obtención de extractos de la soja puesto que influyen en el rendimiento de compuestos fenólicos y flavonoides. El mismo depende del tipo de solvente, el tiempo y la temperatura de extracción, así como también del uso de ultrasonido. Los mayores contenidos de estos compuestos se midieron en extractos etanólicos y metanólicos. Se identificaron las isoflavonas daidzeína y genisteína.

#### 5 REFERENCIAS

Dixon, R. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1993.  
 Hendrich, S., G.J. Wang, H.K. Lin, X. Xu, B.Y. Twe & H.J. Wang, *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Papas A. M., Ed., Boca Raton, FL, 1999.  
 Ho, H.M., R.Y. Chen, L.K. Leung, F.L. Chan, Y. Huang & Z.Y. Chen, Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf.

- Biomedical Pharmacotherapy*, 56, 289–295, 2002.
- Hodgson, J.M., I.B. Puddey, L.J. Beilin, T.A. Mori & K.D. Croft, Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: A randomized controlled trial in humans, *Journal of Nutrition*, 128, 728–732, 1998.
- Hutabarat, L.S., M. Mulholland & H.J. Greenfield, Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean, *Journal of Chromatography A*, 795, 377–382, 1998.
- Lee, Y.W., J.D. Kim, J. Zheng & K.H. Row, Comparisons of isoflavones from Korean and Chinese soybean and processed products, *Biochemical Engineering Journal*, 36, 49–53, 2007.
- Liggins, L., L.J.C. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, A. Coward & S. Bingham, Daidzein and genistein content of fruits and nuts, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 326–331, 2000.
- Manzur, W. & H. Adlercreutz, Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Naturally occurring estrogens in food. *Pure & Applied Chemistry*, 70, 1759–1776, 1998.
- Pueppke, J.L., The genetics and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia, *Critical reviews in biotechnology*, 16, 1–51, 1996.
- Rostagno, M. A. M. Palma & C.G. Barroso, Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans, *Analytical Chimica Acta*, 522, 169–177, 2004.
- Strauss, L., R. Santti, N. Saarinen, T. Streng, S. Joshi & S. Makela, Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease, *Toxicology Letters*, 102–103, 349–354, 1998.
- Tikkanen, M.J. & H. Adlercreutz, Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens – Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochemical Pharmacology*, 60, 1–5, 2000.